

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

Programa de Doctorado en Biomedicina



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Papel de la Citocromo b_5 reductasa-3 (CYB5R3) y del componente graso de la dieta en la fisiología y el envejecimiento del músculo esquelético.

Role of cytochrome b_5 reductase-3 (CYB5R3) and dietary fat in the
physiology and aging of skeletal muscle.

Sara López Bellón

Directores: José Manuel Villalba Montoro

María Isabel Burón Romero

Córdoba, a 25 de febrero 2022

TITULO: *Papel de la Citocromo b5 reductasa-3 (CYB5R3) y del componente graso de la dieta en la fisiología y el envejecimiento del músculo esquelético*

AUTOR: *Sara López Bellón*

© Edita: UCOPress. 2022
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es>

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

Programa de Doctorado en Biomedicina



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Papel de la Citocromo b_5 reductasa-3 (CYB5R3) y del componente graso de la dieta en la fisiología y el envejecimiento del músculo esquelético.

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Sara López Bellón**, Graduada
en Bioquímica, para optar al grado de **Doctor en Biomedicina**.

Los directores,

José Manuel Villalba Montoro

Catedrático de Biología Celular

Universidad de Córdoba

María Isabel Burón Romero

Catedrático de Biología Celular

Universidad de Córdoba

En Córdoba, a 25 de febrero 2022



TÍTULO DE LA TESIS: Papel de la Citocromo b_5 reductasa-3 (CYB5R3) y del componente graso de la dieta en la fisiología y el envejecimiento del músculo esquelético.

DOCTORANDO/A: Sara López Bellón

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El objetivo general de la Tesis Doctoral que se presenta es determinar los mecanismos por los cuales CYB5R3 promueve una extensión de la longevidad en ratones, empleando para ello ratones transgénicos que sobreexpresen esta proteína, y realizando un diseño experimental de intervenciones dietéticas para analizar los efectos de la restricción calórica y de distintas fuentes grasas. Los estudios se centran en músculo esquelético, tejido postmitótico que tiene una contribución mayor al gasto metabólico en los animales. CYB5R3 es una flavoproteína que cataliza la transferencia de electrones desde el NADH hasta el citocromo b_5 o hasta aceptores electrónicos alternativos como coenzima Q y muchos compuestos exógenos. La investigación desarrollada en el grupo de investigación durante los últimos años ha permitido demostrar que los ratones transgénicos que sobreexpresan CYB5R3 (TG) presentan una mayor longevidad, manifiestan una mejor sensibilidad a la insulina, menor inflamación, menor daño oxidativo y están parcialmente protegidos frente a la inducción de cáncer. Sin embargo, los ratones TG muestran un mayor porcentaje de grasa y obtienen su energía preferentemente de los carbohidratos, indicando que la sobreexpresión de CYB5R3 puede contribuir a extender la longevidad a través de mecanismos diferentes a la restricción calórica. Aunque la expresión de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos y los niveles de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de cadena larga aumentaron considerablemente en los animales transgénicos, no se conoce si estas alteraciones del perfil lipídico tisular contribuyen significativamente a los efectos prolongevidad del transgen, particularmente en músculo esquelético (donde tiene lugar el mayor incremento en la expresión de CYB5R3), aspectos que constituyen la base del trabajo de investigación planteado en esta Tesis. La hipótesis de partida es que la eficiencia mitocondrial estará optimizada en los ratones transgénicos, lo que da lugar a una mejora en la producción de

energía y una mayor preservación de la mitocondria durante el envejecimiento. Por otro lado, se ha previsto que puede existir una interferencia entre la sobreexpresión de CYB5R3 y la restricción calórica dado que, aunque la sobreexpresión de CYB5R3 simula algunos de los efectos beneficiosos para la salud de la restricción calórica, también existen efectos metabólicos antagónicos. Sobre esta base, los objetivos de estudio se han centrado en procesos claves del compartimento mitocondrial como son: señalización apoptótica, ultraestructura mitocondrial, biogénesis y dinámica mitocondrial, autofagia, así como niveles de coenzima Q, que son claves a la hora de determinar la pauta de envejecimiento. Las investigaciones se han dirigido al tejido muscular esquelético de ratones transgénicos que sobreexpresan CYB5R3, sometidos a diferentes intervenciones nutricionales (restricción calórica y alteraciones en la composición de ácidos grasos de la dieta), y se han investigado también los efectos del envejecimiento.

La introducción de la memoria de Tesis describe adecuadamente los aspectos clave relativos al envejecimiento, los mecanismos asociados al mismo, y las principales teorías que tratan de explicar sus causas, prestando especial interés a la teoría de los radicales libres, a los efectos deletéreos de las especies reactivas, y al papel clave desempeñado por la mitocondria en este proceso. El concepto de deficiencias asociadas a la edad en la función mitocondrial, a nivel de bioenergética, biogénesis, y dinámica de fusión y fisión, así como a los procesos de autofagia y mitofagia, están bien presentados y revisados. Tras este apartado, se abordan las intervenciones cuyo objetivo es paliar o retardar los efectos deletéreos del envejecimiento como son la restricción calórica y la preservación de los niveles de NAD⁺ mediante sobreexpresión de CYB5R3, una enzima que, además, desempeña importantes funciones metabólicas, entre las cuales se encuentra la regeneración de antioxidantes y la desaturación y elongación de ácidos grasos, aspecto que también es posible modificar mediante intervenciones basadas en el consumo de dietas con una composición lipídica determinada. La doctoranda dedica también un apartado a la importancia del tejido muscular en la investigación de las alteraciones en los mecanismos celulares asociados al envejecimiento y el efecto de las intervenciones genéticas y nutricionales.

Los métodos utilizados en la Tesis son acordes con la consecución de los objetivos perseguidos. Para ello se han investigado posibles alteraciones relacionadas con la función mitocondrial en los ratones TG y controles WT en tres intervenciones:

- 1) efecto de la grasa de la dieta (basada en la formulación AIN93M pero conteniendo manteca, aceite de oliva, aceite de soja o aceite de pescado) en animales jóvenes/adultos (4 meses de intervención, 7 meses de edad en el momento del sacrificio).

2) restricción calórica en animales jóvenes/adultos (4 meses de intervención, 7 meses de edad en el momento del sacrificio).

3) envejecimiento, en una cohorte de animales alimentados con la dieta AIN93M estándar (24 meses de edad en el momento del sacrificio).

Ello justifica que los resultados y discusión se agrupen en tres capítulos donde se detallan en profundidad todos los datos del estudio y se interpretan en el contexto de las investigaciones relacionadas publicadas más relevantes y actualizadas.

Las técnicas y la metodología son innovadoras y adecuadas para abordar los objetivos de la investigación. Los resultados se discuten con claridad y se colocan adecuadamente dentro del contexto del estado actual de conocimiento en el campo de la fisiología mitocondrial. Asimismo, las conclusiones alcanzadas ofrecen un potencial traslacional de posibles enfoques en tratamientos sobre envejecimiento. En conjunto, este trabajo muestra originalidad, adecuada calidad en enfoques técnicos y experimentales, y proporciona avances significativos en nuestra comprensión de los efectos beneficiosos de CYB5R3 en la promoción de un envejecimiento saludable.

El estudio realizado en la intervención con distintas fuentes de grasa a los animales adultos WT y TG, apunta que el fenotipo impuesto por la dieta prevalece frente a la sobreexpresión de CYB5R3 en las distintas rutas estudiadas en músculo esquelético. La dieta de aceite de pescado produce una mejora en el flujo autofágico en el músculo esquelético de los ratones jóvenes, así como un aumento de la biogénesis mitocondrial y un efecto protector frente a la muerte celular programada, sin observarse beneficios adicionales al combinar esta dieta con la sobreexpresión de CYB5R3. Por otra parte, la dieta de manteca parece producir un bloqueo de la autofagia, que en el caso de la fibra blanca se ve paliado por la sobreexpresión de CYB5R3, y un aumento de la apoptosis dependiente de caspasas.

En lo que respecta a la intervención de restricción calórica, los resultados obtenidos han sido incluidos junto con otros correspondientes a una Tesis doctoral del grupo realizados en hígado en un artículo en la revista *GeroScience* (IF: 8.88; Q1). 2020 Jun;42(3):977-994. doi: 10.1007/s11357-020-00187-z. Epub 2020 Apr 22. PMID: 32323139, en el que la doctoranda es co-primera autora. En dicho artículo se demuestran mecanismos que confieren un papel relevante a nivel metabólico de esta enzima modulando las adaptaciones fisiológicas de los ratones a la restricción calórica: la sobreexpresión de CYB5R3 conservó en gran medida el peso corporal y hepático en ratones en condiciones de restricción calórica. En el músculo esquelético, el estudio de los marcadores de dinámica mitocondrial reveló un aumento en los niveles de

MFN-1 por restricción calórica en ambos genotipos. Los datos respaldan que muchas alteraciones provocadas por la restricción calórica en la abundancia y dinámica mitocondrial pueden verse obstaculizadas por la sobreexpresión de CYB5R3, pero estos efectos se compensan con una mayor abundancia de complejos ETC mitocondriales en los ratones TG sometidos a esta intervención dietética

En lo referente al estudio de envejecimiento, se evaluaron comparativamente los parámetros de la función mitocondrial, la autofagia y los marcadores de mitofagia en el tejido muscular de individuos jóvenes/adultos (7 meses) y viejos (24 meses) WT y con sobreexpresión de CYB5R3 (TG). Los resultados de este estudio se han sometido a publicación en la revista *GeroScience* y, habiendo sido evaluados muy positivamente por los revisores, están actualmente en fase de segunda revisión acorde a los comentarios y recomendaciones de estos revisores. En dicho artículo, en que la doctoranda es primera autora, se describen los resultados de esta tesis doctoral correspondientes al estudio ultraestructural de las mitocondrias subsarcolémicas e intermiofibrilares obtenidos mediante microscopía electrónica y análisis de imagen en muestras de gastrocnemio rojo. CYB5R3 se sobreexpresó de manera eficiente y su efecto fue significativo en las mitocondrias del tejido muscular, independientemente de la edad, aumentando la abundancia de los complejos I, II y IV en ratones viejos y previniendo la disminución relacionada con la edad de los complejos I, III, IV y V, y la mitofusina MFN-2. Tanto el envejecimiento como la sobreexpresión de CYB5R3 aumentaron los marcadores de fisión mitocondrial FIS1 y DRP-1, aunque con diferentes resultados en la ultraestructura mitocondrial. La abundancia de marcadores de biogénesis mitocondrial TFAM y NRF-1, y los niveles de coenzima Q se redujeron significativamente con el envejecimiento, pero estas disminuciones no se contrarrestaron por la sobreexpresión de CYB5R3. La importancia de los resultados obtenidos radica en que las intervenciones dirigidas a estimular CYB5R3 podrían representar una estrategia valiosa para contrarrestar los efectos nocivos del envejecimiento en el músculo esquelético, siendo potencialmente de interés para la extensión de la longevidad.

Además de las publicaciones indicadas, la doctoranda ha presentado numerosas comunicaciones (póster y orales) en congresos nacionales e internacionales, tanto de carácter generalista como específicos a nivel internacional en el campo de las especies reactivas y los antioxidantes.

En lo relativo al programa formativo, éste se ha desarrollado también de manera excelente. Cabe destacar su participación en jornadas, congresos (nacionales e internacionales) y cursos formativos, así como en la docencia asignada en el PDD del departamento de Biología Celular,

Fisiología e Inmunología, la cual ha desarrollado con total eficacia y responsabilidad. Por todo lo indicado anteriormente, nuestra consideración sobre la labor realizada en el período desde el inicio de los estudios de la doctoranda hasta la actualidad, así como sobre el grado de cumplimiento de los planes de investigación y de formación, es óptima.

Por todo lo expuesto, consideramos que la Tesis presentada por D^a Sara López Bellón cumple todos los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Córdoba, y se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 25 de febrero de 2022

Firma del/de los director/es

Fdo.: José Manuel Villalba Montoro Fdo.: María Isabel Burón Romero

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba, bajo la dirección de los Dres. José Manuel Villalba Montoro y María Isabel Burón Romero. El trabajo ha sido financiado por los proyectos de investigación BFU2015-64630-R del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), RTI2018-100695-B-I00 del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MICIU), P18-RT-4264 y 1263735-R de la Junta de Andalucía, así como por el programa FEDER de la Unión Europea, y por la Universidad de Córdoba dentro del grupo de investigación BIO-276 (“Biomembranas, Antioxidantes y Estrés oxidativo”). El contrato de la doctoranda ha sido financiado por el programa nacional de Formación del Profesorado Universitario (FPU16/04347, del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte). Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en un modelo de ratón transgénico para la proteína CYB5R3, donado por el Dr. Rafael de Cabo (NIH, Baltimore,USA).

Índices

Índice

Índice

Abreviaturas.....	I
Resumen.....	VII
1 Introducción	1
1.1 Envejecimiento.....	1
1.1.1 Teorías del envejecimiento	2
1.2 Intervenciones antienvjecimiento.....	3
1.2.1 Restricción calórica.....	3
1.2.2 Otras terapias antienvjecimiento.....	7
1.3 Citocromo b_5 reductasa 3.....	9
1.4 Componente graso de la dieta	11
1.5 Procesos celulares relevantes en el envejecimiento	12
1.5.1 Función y dinámica mitocondrial	12
1.5.2 Coenzima Q	20
1.5.3 Autofagia	23
1.5.4 Apoptosis.....	30
1.6 El tejido muscular y su envejecimiento.....	34
1.6.1 Envejecimiento del músculo	35
2 Objetivos	31
3 Materiales y métodos	35
3.1 Modelo animal	35
3.1.1 Animales.....	35
3.1.2 Genotipado de los animales.....	35
3.1.3 Grupos experimentales y dietas.....	37
3.1.4 Preparación de extractos de tejidos.....	39
3.2 Determinación de la cantidad de proteína en las muestras	41
3.3 Determinación de proteínas mediante western-blot	42
3.3.1 Preparación de muestras	42
3.3.2 Electroforesis.....	42
3.3.3 Transferencia y control de carga	43
3.3.4 Inmunotinción y revelado	43
3.3.5 Cuantificación de la señal.....	46
3.4 Determinación de los niveles de Coenzima Q.....	46
3.4.1 Extracción de lípidos.....	46

Índice

3.4.2	Medida de los niveles de Coenzima Q mediante HPLC.....	46
3.5	Microscopía electrónica	47
3.5.1	Inclusión de las muestras de tejido	47
3.5.2	Tallado, corte y obtención de imágenes	48
3.5.3	Análisis ultraestructural	49
3.6	Análisis estadístico	51
4	Capítulo 1: Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3.....	55
4.1	Resultados	55
4.1.1	Sobreexpresión de CYB5R3	55
4.1.2	Niveles de complejos mitocondriales.....	57
4.1.3	Marcadores de dinámica mitocondrial	60
4.1.4	Marcadores de biogénesis mitocondrial.....	62
4.1.5	Alteraciones de la morfología y abundancia mitocondrial por la sobreexpresión de CYB5R3 y por el componente graso de la dieta	64
4.1.6	Marcadores de autofagia y mitofagia	69
4.1.7	Estudio de la abundancia de figuras de autofagia por microscopía electrónica.	71
4.1.8	Apoptosis.....	72
4.2	Discusión	79
5	Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes.....	89
5.1	Resultados	89
5.1.1	Sobreexpresión de CYB5R3	89
5.1.2	Niveles de complejos mitocondriales de la cadena de transporte de electrones (ETC)	91
5.1.3	Estudio de los marcadores de dinámica mitocondrial	93
5.1.4	Marcadores de biogénesis mitocondrial y Coenzima Q.....	95
5.1.5	Ultraestructura, planimetría y estereología de las mitocondrias del músculo esquelético bajo condiciones <i>ad libitum</i> y de RC en ratones jóvenes	98
5.1.6	Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y RC sobre marcadores de autofagia y mitofagia	103
5.1.7	Estudio de la abundancia de figuras de autofagia por microscopía electrónica	105
5.1.8	Marcadores relacionados con la vía de apoptosis	105
5.2	Discusión	111
6	Capítulo 3: Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3.....	127

Índice

6.1	Sobreexpresión de CYB5R3 en músculo esquelético de ratones viejos transgénicos	127
6.2	Niveles de los complejos de la ETC	128
6.3	Estudio de marcadores de dinámica mitocondrial	131
6.4	Marcadores de biogénesis mitocondrial y coenzima Q	133
6.5	Ultraestructura, planimetría y estereología de las mitocondrias del músculo esquelético	135
6.5.1	Estudio de cortes transversales de FB.....	136
6.5.2	Estudios en cortes longitudinales de FB.....	138
6.5.3	Estudio en cortes transversales de FR.....	140
6.5.4	Estudio en cortes longitudinales de FR	143
6.6	Marcadores de autofagia y mitofagia	145
6.7	Análisis de figuras de autofagia por microscopía electrónica.....	146
6.8	Marcadores de apoptosis.....	147
6.9	Discusión	153
7	Conclusiones.....	167
8	Bibliografía	172
	Anexo: Artículo publicado	188

Índice

Índice de figuras

<i>Figura 1. Marcadores del envejecimiento.</i>	2
<i>Figura 2. Mecanismos involucrados en los efectos prolongevidad de la RC.</i>	7
<i>Figura 3. Representación del DNA mitocondrial humano.</i>	13
<i>Figura 4. Cadena de transporte de electrones mitocondrial.</i>	15
<i>Figura 5. Dinámica mitocondrial.</i>	18
<i>Figura 6. Biosíntesis del Coenzima Q (CoQ).</i>	21
<i>Figura 7. Tipos de autofagia en células de mamíferos.</i>	24
<i>Figura 8. Complejo ULK1/2 de iniciación de la autofagia.</i>	25
<i>Figura 9. Complejo I de PI3K de clase III para la fase de elongación de la autofagia.</i>	26
<i>Figura 10. Sistema de conjugación de LC3.</i>	27
<i>Figura 11. Mecanismo de mitofagia.</i>	30
<i>Figura 12. Principales rutas de señalización apoptótica, iniciada por señalización externa a través de receptores específicos (vía extrínseca) o por daño celular (vía intrínseca).</i>	33
<i>Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa para el genotipado de los ratones.</i>	37
<i>Figura 14. Cromatograma representativo de la detección electroquímica del CoQ en extractos lipídicos de músculo esquelético.</i>	47
<i>Figura 15. Análisis de ultraestructura mitocondrial en músculo esquelético con el software ImageJ.</i>	50
<i>Figura 16. Análisis estereológico mitocondrial en músculo esquelético con el software ImageJ.</i>	51
<i>Figura 17. Niveles de expresión de CYB5R3 en músculo esquelético de las extremidades traseras de ratones alimentados con dietas de diferente componente graso.</i>	56
<i>Figura 18. Niveles de los complejos de la ETC y VDAC cuantificado en músculo esquelético de ratones alimentados con dieta de manteca de cerdo, aceite de oliva, aceite de soja y aceite de pescado.</i>	59
<i>Figura 19: Niveles de los complejos mitocondriales referidos a VDAC en animales sometidos a dietas con diferente componente graso.</i>	60
<i>Figura 20. Niveles de expresión de proteínas relacionados con la dinámica mitocondrial en animales alimentados con dietas de diferente componente graso.</i>	62
<i>Figura 21. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la biogénesis mitocondrial en animales alimentados con dietas con diferente componente graso.</i>	63
<i>Figura 22. Características morfométricas de las mitocondrias de fibras blancas (FB) del músculo gastrocnemio en ratones alimentados con dietas de diferente componente graso en secciones longitudinales.</i>	66

Índice

<i>Figura 23. Características morfométricas de las mitocondrias de las fibras rojas (FR) del músculo gastrocnemio en ratones alimentados con dietas de diferente componente graso en secciones longitudinales.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 24. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con autofagia en músculo esquelético de ratones alimentados con dietas con diferente componente graso.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 25. Esterología de las figuras de autofagia de FB y FR en músculo esquelético de ratones alimentados con dietas con diferente componente graso.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 26. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la vía extrínseca de apoptosis por transferencias de Western en músculo esquelético de animales alimentados con dietas con diferente componente graso.....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 27. Niveles de expresión de proteínas desencadenantes de apoptosis en animales WT y TG alimentados con dietas con diferente componente graso.</i>	<i>75</i>
<i>Figura 28. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la vía intrínseca de apoptosis en animales WT y TG alimentados con dietas con diferente componente graso.....</i>	<i>76</i>
<i>Figura 29. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis independiente de caspasas músculo esquelético de ratones alimentados con dietas de diferente componente graso.....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 30. Niveles de expresión de CYB5R3 en músculo esquelético de ratones WT y TG alimentados ad libitum o bajo condiciones de RC.</i>	<i>90</i>
<i>Figura 31. Niveles de los complejos de la ETC y VDAC cuantificado en músculo esquelético de ratones alimentados ad libitum y bajo condiciones de RC.....</i>	<i>92</i>
<i>Figura 32. Niveles de los complejos mitocondriales relativos a VDAC en músculo esqueléticos de animales alimentados ad libitum o bajo condiciones de RC.....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 33. Niveles de expresión de proteínas relacionados con la dinámica mitocondrial en músculo esquelético de animales WT y TG alimentados ad libitum o bajo condiciones de RC.</i>	<i>95</i>
<i>Figura 34. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la biogénesis mitocondrial en músculo esquelético de animales WT y TG alimentados ad libitum o bajo condiciones de RC.</i>	<i>96</i>
<i>Figura 35. Niveles de coenzima Q medidos con HPLC en músculo esquelético de animales WT y TG alimentados ad libitum o bajo condiciones de RC.</i>	<i>97</i>
<i>Figura 36. Características morfométricas de las mitocondrias de fibras blancas (FB) del músculo gastrocnemio en ratones alimentados ad libitum y bajo condiciones de RC en secciones longitudinales.....</i>	<i>100</i>
<i>Figura 37. Características planimétricas de las mitocondrias de las fibras rojas (FR) del músculo gastrocnemio en ratones alimentados ad libitum o bajo RC en secciones longitudinales.</i>	<i>102</i>

Índice

<i>Figura 38. Esterología de las mitocondrias de FR del músculo gastrocnemio en ratones alimentados ad libitum o bajo RC en secciones longitudinales.....</i>	<i>103</i>
<i>Figura 39. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con autofagia en músculo esquelético de animales WT y TG alimentados ad libitum o bajo condiciones de RC.....</i>	<i>104</i>
<i>Figura 40. Esterología de las figuras de autofagia de FB y FR en músculo esquelético de animales WT y TG alimentados ad libitum o bajo condiciones de RC.....</i>	<i>105</i>
<i>Figura 41. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la vía extrínseca de apoptosis por transferencias de Western en animales alimentados ad libitum o bajo condiciones de RC.</i>	<i>106</i>
<i>Figura 42. Niveles de expresión de proteínas desencadenantes de apoptosis en músculo esquelético de animales WT y TG alimentados ad libitum o bajo condiciones de RC.....</i>	<i>107</i>
<i>Figura 43. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la vía intrínseca de apoptosis en músculo esquelético de animales WT y TG alimentados ad libitum o bajo condiciones de RC.</i>	<i>108</i>
<i>Figura 44. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis independiente de caspasas músculo esquelético de animales alimentados ad libitum o bajo condiciones de RC.</i>	<i>109</i>
<i>Figura 45. Niveles de expresión del polipéptido CYB5R3 en músculo esquelético de ratones jóvenes y viejos, WT y TG.</i>	<i>128</i>
<i>Figura 46. Niveles de los complejos de la cadena de transporte de electrones y VDAC cuantificado en músculo esquelético de ratones jóvenes y viejos, WT y TG.....</i>	<i>130</i>
<i>Figura 47. Niveles de los complejos de la ETC referidos a VDAC en músculo esquelético de ratones jóvenes y viejos, WT y TG.</i>	<i>131</i>
<i>Figura 48. Niveles de expresión de proteínas relacionados con la dinámica mitocondrial. .</i>	<i>133</i>
<i>Figura 49. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la biogénesis mitocondrial en animales jóvenes y viejos.....</i>	<i>134</i>
<i>Figura 50. Niveles de coenzima Q medidos con HPLC en ratones jóvenes y viejos.....</i>	<i>135</i>
<i>Figura 51. Características morfométricas de las mitocondrias de fibras blancas (FB) del músculo gastrocnemio en ratones jóvenes y viejos en secciones transversales..</i>	<i>138</i>
<i>Figura 52. Características morfométricas de las mitocondrias de FB del músculo gastrocnemio en ratones jóvenes y viejos en secciones longitudinales..</i>	<i>140</i>
<i>Figura 53. Características planimétricas de las mitocondrias de las fibras rojas (FR) del músculo gastrocnemio en ratones jóvenes y viejos en secciones transversales.</i>	<i>142</i>
<i>Figura 54. Esterología de las mitocondrias de FR del músculo gastrocnemio en ratones jóvenes y viejos en secciones transversales.....</i>	<i>143</i>
<i>Figura 55. Características planimétricas de las mitocondrias de las FR del músculo gastrocnemio en ratones jóvenes y viejos en secciones longitudinales..</i>	<i>144</i>

Índice

<i>Figura 56. Esterología de las mitocondrias de FR del músculo gastrocnemio en ratones jóvenes y viejos en secciones transversales.....</i>	<i>145</i>
<i>Figura 57. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con autofagia en músculo esquelético de animales WT y TG, jóvenes y viejos.....</i>	<i>146</i>
<i>Figura 58. Esterología de las figuras de autofagia de FB y FR en gastrocnemio de animales WT y TG, jóvenes y viejos.</i>	<i>147</i>
<i>Figura 59. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la vía extrínseca de apoptosis en músculo esquelético de animales WT y TG, jóvenes y viejos.....</i>	<i>148</i>
<i>Figura 60. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con el desencadenamiento de la vía intrínseca de apoptosis en músculo esquelético de animales WT y TG, jóvenes y viejos.</i>	<i>149</i>
<i>Figura 61. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la vía intrínseca de apoptosis en músculo esquelético de animales WT y TG, jóvenes y viejos.</i>	<i>150</i>
<i>Figura 62. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis independiente de caspasas en músculo esquelético de animales WT y TG, jóvenes y viejos.</i>	<i>151</i>

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Composición de las dietas utilizadas para cada grupo de estudio.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 2. Contenido de ácidos grasos de cada una de las dietas utilizadas para los distintos grupos experimentales.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 3. Lista de anticuerpos primarios y secundarios usados en este estudio.</i>	<i>45</i>

Abreviaturas

Abreviaturas

ADOA	Atrofia óptica autosómica dominante
AIF	Factor inductor de apoptosis
AL	<i>Ad libitum</i>
ALA	Ácido α -linolénico
AMPK	Proteína quinasa dependiente de AMP
ARA	Ácido araquidónico
ATG	Genes relacionados con autofagia
ATP	Adenosín trifosfato
BAX	Proteína X asociada a Bcl-2
CLAP	Quimostatina, leupeptina, antipaína y pepstatina
CMA	Autofagia mediada por chaperonas
CMT2A	Enfermedad de Charcot-Marie Tooth tipo 2A
CoQ	Coenzima Q
CYB5R3	Citocromo b_5 reductasa 3
DBI	Índice de dobles enlaces
DD	Dominio de muerte
DED	Dominio efector de muerte
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHA	Ácido docosahexaenoico
DHEAS	Dehidroepiandrosterona sulfato
DISC	Complejo señalizador inductor de muerte
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNM2	Dinamina 2
DRP-1	Proteína 1 relacionada con Dinamina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ENDOG	Endonucleasa G
EPA	Ácido eicosapentaenoico
Fa	Área fraccional
FADH ₂	Forma reducida del dinucleótido de flavina y adenina
FB	Fibra blanca

Abreviaturas

FDPS	Farnesil difosfato sintasa
FIS1	Proteína 1 de fisión mitocondrial
FPP	Farnesil pirofosfato
FR	Fibra roja
FUNDC1	Proteína 1 conteniendo el dominio FUN14
GH	Hormona del crecimiento
IAPs	Proteínas inhibidoras de la apoptosis
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IL-2	Interleuquina-2
IMFM	Mitocondrias intermiofibrilares
IMM	Membrana mitocondrial interna
INF2	Formina invertida 2
IPP	Pirofosfato de isopentenilo
J	Jóvenes
LA	Ácido linoleico
LC3	Proteína 1 asociada a microtúbulos de cadena ligera 3
M	Manteca
MFF	Factor de fisión mitocondrial
MFN-1	Mitofusina-1
MFN-2	Mitofusina-2
mitDNA	DNA mitocondrial
MPP	Peptidasa de procesamiento de la matriz mitocondrial
MQC	Mecanismo de control mitocondrial
Mtn	Mitoregulina
mTOR	Diana de rapamicina en mamíferos
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
Na	Número de figuras por área
NAD ⁺	Forma oxidada del dinucleótido de adenina y nicotinamida
NADH	Forma reducida del dinucleótido de adenina y nicotinamida
NIA	Instituto nacional de Envejecimiento
NMN	Nicotinamida mononucleótido
NQO1	NAD(P)H Quinona deshidrogenasa 1
NR	Nicotinamida ribósido

Abreviaturas

NRF-1	Factor respiratorio nuclear-1
NRF-2	Factor respiratorio nuclear-2
O	Oliva
OA	Ácido oleico
OMM	Membrana mitocondrial externa
OPA1	Proteína de atrofia óptica 1
OPTN	Proteína optineutin
P	Pescado
P62/SQTSM1	Sequestosoma 1
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDSS1	Subunidad 1 de la poliprenil difosfato sintasa
PDSS2	Subunidad 2 de la poliprenil difosfato sintasa
PE	Fosfatidiletanolamina
PGC1 α	Coactivador 1 α del receptor activado por proliferador de peroxisomas
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PIM	Maquinaria de importación de proteínas
PINK1	Quinasa putativa 1 inducida por PTEN
PKA	Proteína quinasa A
PMRS	Sistema redox transmembrana de la membrana plasmática
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPAR α	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas α
PPtc7	Proteína fosfatasa dirigida a COQ7
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
RC	Restricción calórica
RE	Retículo endoplásmico
RHM	Metahemoglobinemia hereditaria recesiva
RIPA	Ensayo de radio-inmunoprecipitación
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rRNA	RNA ribosómico
S	Soja
SAEX	Servicio de Animales de Experimentación
SCAI	Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación

Abreviaturas

SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
SEM	Error estándar de la media
SFA	Ácidos grasos saturados
SIRT	Sirtuinas
SIRT1	Sirtuína 1
SIRT3	Sirtuína 3
SOD2	Superóxido dismutasa 2
SSM	Mitocondrias subsarcolémicas
TFAM	Factor de transcripción mitocondrial A
TG	Transgénico
TNF-R	Receptor del factor de necrosis tumoral
tRNA	RNA transferente
UCP	Proteínas desacoplantes
UW	Universidad de Wisconsin Madison
V	Viejos
VDAC	Canal de aniones dependiente de voltaje
V _v	Densidad de volumen
WT	Silvestre

Resumen

Resumen

Introducción

El envejecimiento es el declive progresivo dependiente del tiempo que viene acompañado de una disminución de la fertilidad y del aumento de la susceptibilidad del organismo a amenazas tanto endógenas como externas. A lo largo de toda la historia ha habido un gran interés en dilucidar los mecanismos por los que ocurre el envejecimiento, con el fin de desarrollar distintas intervenciones para retrasarlo o incluso prevenirlo. Este intenso estudio ha llevado a definir distintas teorías para explicar el envejecimiento, así como marcadores de este proceso. Dentro de estas teorías se pueden destacar, por su relevancia, la *teoría de los radicales libres*, según la cual el envejecimiento se debe al ataque que producen los radicales libres en distintos componentes celulares; la *teoría mitocondrial de los radicales libres*, en la que se le da un papel central a la mitocondria como productor principal y diana de los radicales libres; la *teoría de las membranas*, en la que se relaciona la composición de las membranas con su susceptibilidad a sufrir daños, y la *teoría de los telómeros*, que relaciona el acortamiento de los telómeros con el proceso de envejecimiento. Respecto a los marcadores del envejecimiento, se han definido los siguientes: inestabilidad genómica, acortamiento de los telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de la proteostasis, desregulación de la detección del estado nutricional, senescencia celular, agotamiento de células madre, alteración de la comunicación intercelular y disfunción mitocondrial. En este sentido se considera que el conocimiento y control de estos procesos podría servir para intervenir en el envejecimiento.

Entre los resultados positivos obtenidos para hacer frente al proceso de envejecimiento cabe destacar la restricción calórica (RC), que es la intervención no genética mejor caracterizada para aumentar la longevidad. Además, es la única que ha demostrado tener efecto en todas las especies en las que se ha sido estudiado, que van desde la levadura hasta los primates. Esta intervención consiste en la reducción del consumo de calorías sin llevar a la desnutrición, pero los mecanismos exactos por los que logra aumentar la longevidad aún no se conocen con exactitud. Dada la dificultad que supone mantener durante un largo periodo de tiempo esta intervención, se han desarrollado distintas alternativas, como puede ser la ingesta de distintos compuestos, que se denominan miméticos de la RC, porque simulan los efectos de esta intervención, o incluso el aumento

Resumen

en la expresión de distintas enzimas. Entre estas enzimas que se han estudiado para mimetizar los efectos de la RC y promover la longevidad así como el envejecimiento saludable se encuentra la citocromo *b*₅ reductasa 3 (CYB5R3) (NADH: ferricitocromo *b*₅ oxidoreductasa, EC 1.6.2.2). Esta enzima pertenece a una familia de flavoproteínas oxidoreductasas que catalizan la transferencia de electrones desde el NADH al citocromo *b*₅ (CYB5), uno de sus principales aceptores, o hacia otros aceptores como coenzima Q o diversos compuestos exógenos. Entre las funciones de CYB5R3 cabe mencionar la elongación y desaturación de ácidos grasos, la biosíntesis de colesterol o el metabolismo de drogas. Por otro lado, la oxidación del NADH que resulta de la actividad CYB5R3 hace que aumente la relación citosólica NAD⁺/NADH, lo que se observa bajo condiciones de RC, y dicho aumento hace que se activen las sirtuinas (SIRT), que intervienen en la regulación de ciertas rutas metabólicas asociadas con un aumento de la longevidad y un envejecimiento saludable. Todo esto ha llevado a la hipótesis de que el NAD⁺ y las reacciones de oxidación de NADH, como las llevadas a cabo por CYB5R3, están en el centro de los beneficios que se obtienen de la RC. Recientemente, se ha demostrado que la sobreexpresión de CYB5R3 causa la mejora de distintos parámetros metabólicos que llevan a un aumento de la extensión de la vida en animales transgénicos. Además, los ratones que sobreexpresan CYB5R3 se caracterizan por la existencia de altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, mejora de la función mitocondrial, disminución del daño oxidativo e inhibición de rutas proinflamatorias crónicas.

De acuerdo con la teoría de las membranas mencionada anteriormente, el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas celulares influye en la longevidad, y dado que la grasa de la dieta altera los fosfolípidos de las membranas celulares, los cambios en la composición lipídica de la dieta pueden tener efectos sobre la longevidad. Además, estudios previos han revelado que la composición grasa de la dieta también modula los efectos producidos por la RC, observándose una mayor longevidad en los animales sometidos a RC con una dieta con una alta proporción de ácidos grasos saturados (SFA) y monoinsaturados (MUFA) frente a los sometidos a RC con una dieta alta en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Todo esto indica la importancia que tiene la composición de la dieta, especialmente la fuente grasa, en el envejecimiento, convirtiéndose en una posible herramienta o “terapia” que ayude a paliar los efectos nocivos que se producen en los tejidos con el avance de la edad.

Como se ha comentado anteriormente, la teoría mitocondrial de los radicales libres pone el foco en este orgánulo celular y en los procesos que ocurren en él, así como en la

Resumen

disfunción mitocondrial asociada al envejecimiento. Concretamente, cabe destacar la cadena de transporte de electrones mitocondrial (ETC), que va a permitir la obtención de energía en forma de ATP a partir de los electrones contenidos en NADH y FADH₂. La ETC está formada por 4 complejos que se encuentran en la membrana mitocondrial interna (IMM) entre los que se produce el flujo de electrones. Tres de estos cuatro complejos bombean protones hacia el espacio intermembrana, que luego vuelven a la matriz mitocondrial a favor de gradiente a través del complejo de la ATP sintasa, generando energía. Con el envejecimiento se produce una reducción en la actividad de algunos de estos complejos.

Otros procesos a tener en cuenta al estudiar la disfunción mitocondrial son la dinámica y biogénesis mitocondrial. Las mitocondrias son orgánulos dinámicos que están constantemente sometidos a ciclos de fusión y fisión para adaptarse a las necesidades energéticas de la célula, que forman parte del proceso de control de la calidad mitocondrial, fisionando mitocondrias gravemente dañadas para que sean eliminadas por mitofagia, o fusionando mitocondrias dañadas más levemente para diluir mutaciones, garantizando así la homeostasis de este orgánulo. La dinámica mitocondrial resulta especialmente importante en tejidos postmitóticos, como es el caso del músculo esquelético. Durante el envejecimiento, se producen alteraciones en este sistema de control del compartimento mitocondrial, que varían en función del tejido estudiado y resultan en la disfunción y acumulación de mitocondrias aberrantes, debido también a disfunciones en la autofagia. Para mantener la homeostasis de este orgánulo, se deben eliminar las mitocondrias dañadas, mientras que se deben formar nuevas mitocondrias a partir del crecimiento y división de orgánulos preexistentes, lo que ocurre por el proceso de biogénesis. Este proceso desciende con la edad, habiéndose visto aumentado sin embargo por RC, ejercicio físico o exposición al frío.

La disminución de la autofagia asociada a la edad, así como de la mitofagia, lleva al acúmulo de orgánulos defectuosos, lo que tiene efectos negativos sobre la fisiología de los tejidos. Por lo tanto, resulta interesante estudiar el papel que tienen distintas terapias antienvjecimiento sobre esta ruta. En este contexto, también es de interés el estudio de la ruta de apoptosis, que va a mantener la homeostasis de los tejidos, equilibrando la producción de nuevas células con la eliminación de otras cuando ya no son necesarias, están dañadas o son peligrosas para el organismo. La apoptosis está relacionada con el envejecimiento, observándose un incremento de la muerte celular programada a medida que se alcanza una edad avanzada, mientras que la RC produce un descenso de esta ruta,

lo que podría tener efectos beneficiosos sobre el desarrollo de la sarcopenia, que consiste en una disminución progresiva de la masa y la función muscular. Aunque no se conoce claramente la patogénesis de la sarcopenia, se sabe que en su desarrollo se produce inflamación, degeneración neuromuscular y disfunción mitocondrial, siendo este último uno de los principales factores implicados en la degeneración muscular dependiente de la edad y en el que se centra este trabajo. Dentro de esta disfunción mitocondrial como consecuencia del envejecimiento se puede mencionar un descenso en la masa mitocondrial, así como una reducción de la actividad de la ETC. Esta menor actividad de la ETC lleva a una menor síntesis de ATP, y con ello se produce un descenso en la síntesis de proteínas musculares. Todo esto ha llevado a que centremos este estudio en el músculo esquelético, tejido postmitótico que constituye el 45% del peso corporal, considerándose el tejido metabólico más grande del cuerpo, y en el que las mitocondrias tienen un gran peso, constituyendo 2-10% del volumen celular del músculo esquelético de mamíferos. El estudio del músculo esquelético resulta especialmente interesante al tratarse de uno de los órganos más consumidores de energía y al ser un tejido postmitótico, en los que son especialmente pronunciadas las disminuciones de la función mitocondrial asociadas a la edad.

Hipótesis inicial y objetivos

Durante los últimos años, la investigación del grupo se ha enfocado a elucidar el papel de la composición de ácidos grasos en la fisiología mitocondrial y las acciones de la RC que favorecen la longevidad. Además, hemos demostrado el papel de la CYB5R3 en la regulación del metabolismo aeróbico y el envejecimiento a través de mecanismos relacionados con disminución del daño oxidativo y alteraciones en la composición de ácidos grasos.

Se ha utilizado un modelo de intervención nutricional en ratones con cohortes de animales alimentados con dietas que contenían manteca (rica en ácidos grasos saturados y MUFA), aceite de soja (rica en PUFA n-6), o aceite de pescado (rica en PUFA n-3) para realizar un estudio longitudinal de longevidad y estudios transversales para investigar parámetros principalmente relacionados con la mitocondria, como composición en ácidos grasos, fuga de protones, actividades de la cadena de transporte electrónico, generación de ROS, peroxidación lipídica, metabolismo del coenzima Q, ultraestructura mitocondrial y señalización apoptótica. En comparación con las otras dietas, la dieta con manteca maximizó los efectos positivos de la RC. Dos importantes marcadores del envejecimiento en hígado, fragmentación del DNA y tamaño nuclear, aumentaron de manera significativa

Resumen

con la edad en todos los grupos exceptuando el de los animales alimentados con una dieta de RC-manteca, presentando este grupo un aumento en la fisión mitocondrial. En riñón, la RC mitigó numerosas alteraciones estructurales relacionadas con el envejecimiento, encontrándose también los resultados óptimos en el grupo RC-manteca. El análisis longitudinal mostró un beneficio en longevidad para los distintos grupos alimentados en RC en el sentido: manteca > aceite de soja > aceite de pescado.

Esta línea de investigación converge con otra centrada sobre CYB5R3 como un nuevo gen prolongevidad, mediante el desarrollo y caracterización de una estirpe de ratones transgénicos que sobreexpresan CYB5R3. Estos ratones mostraron mayor longevidad, mejoría en la sensibilidad a la insulina, menor inflamación, menor daño oxidativo y protección frente a la inducción de cáncer. Sin embargo, los ratones transgénicos tuvieron un mayor porcentaje de grasa y obtuvieron su energía preferentemente de los carbohidratos, indicando que la sobreexpresión de CYB5R3 puede contribuir a extender la longevidad a través de mecanismos diferentes a la RC. La expresión de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos y los niveles de PUFA de cadena larga, aumentaron considerablemente en los animales transgénicos. Sin embargo, no se conoce si estas alteraciones del perfil lipídico tisular contribuyen significativamente a los efectos prolongevidad del transgen, particularmente en músculo esquelético, donde tiene lugar el mayor incremento en la expresión de CYB5R3. Estos aspectos constituirán la base del trabajo de investigación planteado en esta Tesis, cuyos objetivos se definen a continuación.

El **objetivo general** de este trabajo es determinar los mecanismos por los cuales CYB5R3 promueve una extensión de la longevidad en ratones, empleando para ello ratones transgénicos que sobreexpresen esta proteína, y realizando un diseño experimental de intervenciones dietéticas para analizar los efectos de la RC y de distintas fuentes grasas. Los estudios se centrarán en músculo esquelético, tejido postmitótico que tiene una contribución mayor al gasto metabólico en los animales.

Para lograr este objetivo general se definen los siguientes objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Determinar la influencia de la sobreexpresión de CYB5R3 sobre procesos ligados a la mitocondria relevantes para la pauta de envejecimiento: señalización apoptótica, ultraestructura mitocondrial, biogénesis y dinámica mitocondrial, autofagia, así como niveles de coenzima Q.

Resumen

Objetivo específico 2: Determinar las condiciones dietéticas que maximizan la preservación metabólica por sobreexpresión de CYB5R3. Se estudiarán los efectos de la RC y del contenido graso de la dieta.

Objetivo específico 3: Analizar el efecto de la edad estudiando los efectos de la sobreexpresión de CYB5R3 en animales viejos.

Materiales y métodos

Para la realización de este trabajo se emplearon ratones macho silvestres (WT) y transgénicos (TG) para la CYB5R3, de la cepa C57BL/6J. Los animales TG fueron cedidos por el Dr. Rafael de Cabo, y se cruzaron con hembras WT de la cepa C57BL/6J obtenidas de los laboratorios Charles River (Barcelona, España) para establecer una colonia que fue mantenida en el Servicio de Animales de Experimentación (SAEX) de la Universidad de Córdoba. Durante los tres primeros meses de edad, los dos grupos de ratones WT y TG fueron alimentados con pienso estándar, y transcurrido este tipo fueron sometidos a las distintas intervenciones que se describen a continuación.

Por un lado, se llevó a cabo una intervención de *restricción calórica*, en la que se subdividieron dos grupos en función de la ingesta de calorías. Un grupo fue alimentado *ad libitum* con dieta AIN93M, mientras que el otro grupo se alimentó con una reducción de 40% de la ingesta de calorías. La intervención se llevó a cabo durante 4 meses, por lo que los animales se sacrificaron a los 7 meses de edad.

Otra intervención se basó en diferente *componente graso de la dieta*. De nuevo los animales fueron sometidos a esta intervención durante 4 meses, sacrificándose a los 7 meses de edad, y con la dieta AIN93M, variando en este caso el componente principal de grasa, diferenciándose cuatro subgrupos dietéticos: manteca de cerdo, aceite de oliva, aceite de soja y aceite de pescado.

Por último, se llevó a cabo una intervención de *envejecimiento*, en la que los animales se alimentaron con dieta AIN93M durante 4 meses, el grupo de jóvenes, y 21 meses, el grupo de viejos. Estos animales fueron sacrificados a los 7 y 24 meses de edad, respectivamente.

Al finalizar las distintas intervenciones, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, se extrajo el músculo esquelético de las extremidades posteriores, que fue congelado por inmersión en nitrógeno líquido en un tampón de congelación y almacenado posteriormente a -80°C hasta el momento de su uso. También se tomaron muestras de gastrocnemio que fueron fijadas en glutaraldehído al 4% preparado en tampón cacodilato

Resumen

0,1M pH 7,0, para su posterior procesamiento y estudio por microscopía electrónica de transmisión.

Para llevar a cabo la inmunodetección de las distintas proteínas analizadas mediante la técnica de western blot, se llevaron a cabo dos tipos de homogeneizaciones. Por un lado, se llevó a cabo una extracción de proteínas homogeneizando un trozo de tejido con tampón de RIPA suplementado con DTT 1 mM, PMSF 1 mM, 10 µg/ml de CLAP y cócteles de inhibidores de fosfatasa a 4°C con un disruptor de tejidos mecánico. Una vez homogeneizado el tejido, la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante 15 segundos en vortex y posteriormente se centrifugó a 10.000 g durante 15 min a 4°C, con el fin de separar el sobrenadante, que contenía las proteínas extraídas, del residuo no extraíble que queda en el pellet. Por otro lado, también se llevó a cabo una homogeneización a 4°C con el mismo disruptor de tejidos mecánico, esta vez en tampón de homogeneizado cuya composición fue: Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, KCl 40 mM, sacarosa 0,2 M, EDTA 10 mM, suplementado en el momento de uso con DTT 1 mM, PMSF 1 mM, 10 µg/ml de CLAP y cócteles de inhibidores de fosfatasa. A partir de este homogeneizado total se llevó a cabo un fraccionamiento por centrifugación diferencial para obtener las distintas fracciones subcelulares como se describe a continuación. En primer lugar, se sometió el homogeneizado a centrifugación durante 10 minutos a 420g y a 4°C en una microfuga, con el fin de sedimentar los núcleos y las células sin romper. El pellet así obtenido se trató para extracción nuclear, mientras que el sobrenadante se traspasó a un tubo limpio y se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 6.700g en la microfuga a 4°C. Tras esta centrifugación, el pellet se resuspendió en tampón de homogeneización y se conservó a -80°C como fracción enriquecida en mitocondrias. El sobrenadante generado en este paso de centrifugación, que contiene los restos de membranas ligeras y citosol, se transfirió a un tubo de ultracentrífuga y se sometió a centrifugación durante 15 minutos a 100.000g a 4°C, usando el rotor basculante SW60Ti y una ultracentrífuga L-70. El pellet obtenido se resuspendió en tampón de homogeneización y se conservó a -80°C como membranas extramitocondriales. El sobrenadante, que contenía la fracción citosólica, también se conservó a -80°C hasta su utilización.

Una vez obtenidos los distintos extractos proteicos se determinó la cantidad de proteína mediante el método de Bradford, con la modificación de Stoscheck, y se procedió a preparar los extractos para la electroforesis, empleando 50µg de proteína de cada muestra.

Resumen

La separación de proteínas se llevó a cabo mediante una electroforesis SDS-PAGE en Geles Criterion Stain Free de Bio-Rad, y la transferencia a la membrana de nitrocelulosa mediante el sistema Trans-blot Turbo de Bio-Rad. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con leche e incubadas con el anticuerpo primario en agitación durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente las membranas fueron lavadas e incubadas a temperatura ambiente durante 1h en agitación con el anticuerpo secundario correspondiente. Por último, el revelado de la señal quimioluminiscente se llevó a cabo en el sistema de documentación de geles ChemiDoc Touch Imaging System de Bio-Rad.

Para llevar a cabo la determinación de los niveles de coenzima Q (CoQ) se realizó una extracción de lípidos a partir de los homogeneizados totales. Para ello, se le añadió al homogeneizado SDS al 10% y seguidamente etanol-isopropanol en proporción 95:5, se agitó vigorosamente, se añadieron 500 µl de hexano, se volvió a agitar y se centrifugó durante 5 minutos a 10.000g a 4°C. Tras la centrifugación, se recogió la fase superior de hexano, y se repitió la adición de hexano a la fase inferior y la centrifugación. De nuevo se recogió la fase de hexano, que se combinó con la anterior y se evaporó el solvente en un concentrador de vacío. Los extractos lipídicos se resuspendieron con 30µl de metanol y se sometieron entonces a un proceso de reducción mediante la adición de 1µl de una solución de borohidruro sódico 50mM, tras el que se inyectaron en el HPLC para determinar los niveles de CoQ.

Por último, para el análisis de microscopía electrónica, las muestras se procesaron siguiendo un protocolo estándar por el que se infiltraron en la resina EPON 812. Las secciones ultrafinas obtenidas se contrastaron en soluciones metálicas de plomo y uranilo, y se visualizaron y fotografiaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM 1400 del Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba, para el posterior análisis de las imágenes con el software ImageJ (NIH; Bethesda, MD, USA). Se tomaron micrografía de fibras musculares blancas (FB) y fibras rojas (FR), en las que se procedería a analizar tanto mitocondrias como figuras de autofagia (FA). En el caso de las FR, se diferenciaron los dos tipos de mitocondrias presentes, denominándose estas como mitocondrias intermiofibrilares (IMFM) y mitocondrias subsarcolémicas (SSM).

Resultados y discusión

La sobreexpresión de CYB5R3 se produjo de forma eficiente en el músculo esquelético de los animales TG bajo todas las intervenciones estudiadas, y dicha sobreexpresión se

Resumen

dirigió de forma significativa a la mitocondria. Todo esto hace del músculo esquelético un tejido idóneo para estudiar los efectos directos de la sobreexpresión de esta enzima en la fisiología celular. Por su parte, en los animales WT los niveles de CYB5R3 se vieron afectados por el componente graso de la dieta, y aumentados como consecuencia del proceso de envejecimiento en todas las fracciones estudiadas, mientras que en el caso de la RC sólo se observó dicho aumento en los homogeneizados totales.

De acuerdo con la teoría de las membranas mencionada en la introducción, según la cual el grado de insaturación de las membranas, y especialmente la cantidad de PUFAs n-3 se relacionan inversamente con la longevidad, y teniendo en cuenta que los ácidos grasos ingeridos en la dieta pueden modificar la composición de las membranas, resultaba interesante estudiar el efecto que produce la ingesta de dietas con diferente componente graso en distintos procesos relacionados con el envejecimiento. Por su parte, se ha demostrado previamente que la sobreexpresión de CYB5R3 en ratones TG incrementa la longevidad, mejora la sensibilidad a insulina y disminuye el daño oxidativo. Además, en ese mismo estudio previo se encontró que en estos animales TG se produce un incremento de la expresión de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos, así como un aumento en los niveles de PUFA de cadena larga, efecto relacionado posiblemente con la actividad desaturasa de CYB5R3. Sin embargo, no se conoce si las alteraciones en el perfil lipídico contribuyen al efecto prolongevidad de la sobreexpresión de CYB5R3. Nuestros resultados han revelado que la dieta de aceite de pescado produce un descenso en la fusión mitocondrial, así como un aumento en la fisión, tanto en animales WT como TG. Sin embargo, nuestro estudio de microscopía electrónica no ha puesto de manifiesto cambios en el tamaño mitocondrial en los animales alimentados con dicha dieta. Esto nos podría estar indicando que las mitocondrias más pequeñas generadas a través de procesos de fisión están siendo eliminadas por autofagia, como revela el incremento encontrado en la ratio LC3 II/I, indicativo del flujo autofágico, y como está documentado en la bibliografía para los PUFAs n-3. También se ha descrito que los PUFAs n-3 producen un aumento de la biogénesis mitocondrial, posiblemente para regenerar esa población mitocondrial que está siendo eliminada, lo cual ha sido confirmado en nuestro laboratorio para riñón, pero no para hígado ni corazón. En el caso de músculo esquelético, hemos observado un incremento en los niveles de NRF-1 por la dieta de aceite de pescado en los animales de ambos genotipos, que podría estar indicando un incremento de la biogénesis,

sin embargo, no se encontraron cambios en los demás marcadores relacionados con este proceso.

En lo que respecta a los marcadores relacionados con la ETC, nuestros resultados muestran un descenso de estos en el músculo esquelético de los animales alimentados con la dieta de aceite de pescado, respecto a lo que hay cierta controversia en la bibliografía, con estudios difíciles de comparar debido a las diferencias en el diseño experimental. En este sentido nos ha resultado llamativo que algunos estudios muestran que en organismos saludables no se observan beneficios adicionales por la suplementación con aceite de pescado, lo cual podría estar ocurriendo en nuestro estudio ya que estamos trabajando con animales jóvenes/adultos. En cuanto al efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 en los marcadores de la ETC, se observó un aumento de los niveles de los complejos en los ratones TG alimentados con la dieta de aceite de soja, que se podría relacionar con una mayor producción de ATP, como se ha documentado que ocurre en hígado.

La autofagia también se ha propuesto como un mecanismo esencial en la regulación del metabolismo mitocondrial, habiéndose comprobado la existencia de una inhibición de la autofagia en músculo esquelético con la edad y con el aumento de la inflamación, por lo que resulta interesante estudiar si distintos ácidos grasos con acciones pro- o antiinflamatorias tienen efecto sobre la autofagia del músculo esquelético cuando se ingieren con la dieta. Según lo recogido en la bibliografía, la suplementación con SFA, que sería similar a nuestra dieta de manteca de cerdo, resulta en un bloqueo de la autofagia, lo que también parece coincidir con nuestras observaciones, pues tras el análisis por microscopía electrónica encontramos un mayor número de figuras de autofagia, mientras que constatamos un descenso en la ratio de las isoformas de LC3, lo que es indicativo de un menor flujo autofágico llevando a que los autofagosomas se acumulen y puedan ser identificados en el estudio morfológico. Este efecto parece ser paliado por la sobreexpresión de CYB5R3 a nivel de la ratio de LC3, efecto que aparentemente solo tiene lugar en el caso de la fibra blanca.

También resulta de interés el estudio de la apoptosis, como ruta relacionada con el desarrollo de la sarcopenia y la obesidad. La bibliografía muestra que, en células musculares, la suplementación con SFA induce la apoptosis, mientras que este incremento se evita al tratar con PUFA n-3. Esto estaría en concordancia con nuestros resultados, donde observamos que la dieta de manteca de cerdo produce un descenso de la proteína antiapoptótica BCL-2, mientras que produce un aumento de proteínas relacionadas con el desencadenamiento de la apoptosis dependiente de caspasas, como

Resumen

citocromo *c* en citosol o caspasa-9, mientras que parecen tener una menor inducción de la apoptosis independiente de caspasas. En este caso la sobreexpresión de CYB5R3 parece paliar la inducción de apoptosis por la dieta de manteca. Nuestros resultados también reproducen el efecto positivo de los PUFA n-3 paliando la inducción de la apoptosis muscular, ya que los animales alimentados con la dieta de aceite de pescado muestran una menor liberación de citocromo *c* y AIF al citosol. La combinación de la dieta de aceite de pescado con la sobreexpresión de CYB5R3 parece no tener efectos adicionales. Por su parte, los MUFA también se han propuesto como protectores frente a la apoptosis inducida por SFA en células musculares. En nuestro estudio, la dieta de aceite de oliva, rica en MUFA, también tiende a incrementar los niveles de la proteína antiapoptótica BCL-2 mientras que disminuye los niveles de caspasa-9 en citosol, lo que podría reflejar el efecto protector de los MUFA documentado en la bibliografía.

Por otro lado, se ha encontrado que algunos de los efectos beneficiosos de la RC sobre la salud podrían estar relacionados, al menos en parte, con la inducción de CYB5R3, ya que algunos de estos efectos son imitados en ratones TG que sobreexpresan CYB5R3. Sin embargo, los mecanismos implicados en la adaptación metabólica de los ratones TG podrían ser independientes de los descritos para la RC. En este sentido, resultaba interesante estudiar si algunas de las adaptaciones metabólicas inducidas por la sobreexpresión de CYB5R3 se ven afectadas por la RC, ya que la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC modifican en formas opuestas aspectos clave del metabolismo energético y el perfil lipídico de los tejidos. Según nuestros resultados, en lo que respecta a la ETC, la sobreexpresión de CYB5R3 por sí misma aumentó los niveles de complejos II y III en ratones alimentados *ad libitum*, y la RC, por su parte, produjo un aumento generalizado en los niveles de los complejos mitocondriales en músculo esquelético, aunque este efecto parecía ser abolido cuando se combinó esta intervención dietética con la sobreexpresión de CYB5R3. Se ha comprobado que el aumento del complejo I que tiene lugar en músculo esquelético por la RC no produce un aumento en las ROS. Por lo tanto, el aumento de complejos ETC podría indicar una mayor producción de ATP sin mayor producción de ROS en los ratones TG. Para conocer si estos cambios se deben a cambios en la abundancia mitocondrial o en la composición de la membrana mitocondrial, determinamos los niveles de VDAC, como marcador de la masa mitocondrial. Nuestros resultados mostraron un incremento en los niveles de este marcador en los animales WT, indicando una mayor abundancia mitocondrial en condiciones de RC, efecto que se vio anulado al combinar esta intervención con la sobreexpresión de CYB5R3. Por otra

Resumen

parte, el estudio de los marcadores de dinámica mitocondrial reveló un aumento en los niveles de MFN-1 por RC en ambos genotipos, mientras que no se observaron cambios en los niveles de MFN-2. Estudios previos de nuestro grupo habían demostrado un aumento de los niveles de MFN-2 en músculo esquelético de ratones sometidos a RC, lo que podría indicar un efecto de la grasa, ya que en esa intervención los animales fueron alimentados con dieta AIN95G (que contiene un 7% de grasa) mientras que en este estudio se han alimentado con AIN93M (que contiene un 4% de grasa). El aumento de MFN-1 y la ausencia de cambios en los marcadores de fisión, nos podría indicar un aumento de la fusión mitocondrial bajo RC, que protegería a este orgánulo de la degradación mitocondrial. Para corroborar esto se llevó a cabo un estudio de morfología mitocondrial mediante microscopía electrónica, que no reveló cambios en el área mitocondrial ni en FB ni en FR por RC en los ratones WT, a diferencia de estudios previos del grupo, que habían demostrado un descenso en el área de SSM en músculo esquelético. Estas diferencias, de nuevo, podrían deberse a la diferencia de dieta, como hemos señalado anteriormente, poniendo de manifiesto que la cantidad de grasa presente en la dieta juega un papel clave en la determinación de las adaptaciones mitocondriales de los diferentes tejidos a la RC. Por su parte, la combinación de la RC con la sobreexpresión de CYB5R3 lleva a un aumento del área mitocondrial, que estaría en concordancia con el aumento en los niveles de MFN-1 en este grupo experimental. En lo que respecta a la abundancia mitocondrial, no encontramos cambios por RC ni por genotipo en la FR, mientras que en FB la RC disminuyó la abundancia mitocondrial en los ratones WT, produciendo el mismo efecto que la sobreexpresión de CYB5R3 en los animales alimentados *ad libitum*. En este tipo de fibra, la combinación de RC con la sobreexpresión de la enzima lleva a un incremento de la abundancia mitocondrial. Los resultados de dinámica y microscopía muestran que resulta difícil establecer relaciones entre los marcadores bioquímicos y los parámetros de la cuantificación microscópica, ya que los análisis de las proteínas se hacen en homogeneizados de tejido mientras que en el estudio de microscopía se analizan en fibras individuales de cada tipo y se lleva a cabo en gastrocnemio.

Estas discrepancias entre la microscopía y los marcadores bioquímicos se ponen de nuevo de manifiesto en el análisis de la biogénesis mitocondrial, donde nuestros resultados muestran un aumento en los niveles de NRF-1 en el músculo esquelético de ratones WT alimentados con RC, lo que está en consonancia con el aumento similar observado para VDAC, y coincide con lo descrito en la bibliografía. Sin embargo, nuestros resultados de

Resumen

microscopía no indican un aumento de la masa mitocondrial por RC, por lo que el aumento de estos marcadores bioquímicos podría ser específico de algún tipo muscular de la pata trasera y que no tenga lugar en gastrocnemio. Igual que ocurría en el caso de VDAC, el aumento de NRF-1 por RC no se observó al combinar esta intervención con la sobreexpresión de CYB5R3, poniendo de nuevo de manifiesto la interferencia de ambas intervenciones. Dada su relación con la biogénesis mitocondrial, también se midieron los niveles de SIRT3, que se activa cuando aumenta la ratio NAD^+/NADH , por lo que se esperaría que se aumentara por RC, como está documentado, y por la sobreexpresión de CYB5R3. Nuestros resultados coinciden con lo esperado, pero, de nuevo, la combinación de ambas intervenciones anula los efectos observados.

Al medir los niveles de CoQ, nuestros resultados mostraron un descenso por RC independientemente del genotipo, lo que está en contraposición con lo encontrado en la bibliografía, aunque también hay diferencias entre estudios en lo que respecta a tiempo de intervención y a dieta. De acuerdo con esto, sería interesante estudiar el papel del componente graso de la dieta, así como del tiempo de intervención, en la influencia que tiene la RC sobre el sistema de CoQ. La bajada observada en los niveles de CoQ por RC podría implicar al fenómeno de mitohormesis, por el cual la disminución del CoQ podría producir un leve estrés mitocondrial que llevaría a la activación de respuestas fisiológicas y adaptativas en el organismo que contribuyan a extender la longevidad.

Entre las rutas que tienen un papel esencial en el mantenimiento del músculo esquelético cabe destacar la autofagia. Además, se ha encontrado que el efecto antienvjecimiento que produce la RC se ve atenuado cuando se inhibe la autofagia, por lo que resulta interesante el estudio de esta vía bajo condiciones de RC y en combinación con la sobreexpresión de CYB5R3. Nuestros datos parecen indicar un aumento de la autofagia como consecuencia de la RC en los animales WT, lo cual es acorde con la bibliografía. La sobreexpresión de CYB5R3 por sí misma no produjo ningún cambio en los marcadores de autofagia. Sin embargo, su combinación con la RC tendió a disminuir la ratio LC3 II/I, que se relacionaría por tanto con una disminución del flujo autofágico, como también se puede inferir de los resultados de microscopía electrónica, donde ese grupo experimental presenta una bajada en la abundancia de figuras de autofagia. En este caso observamos de nuevo la interferencia que se produce al combinar la RC con la sobreexpresión de CYB5R3.

Por último, también se llevó a cabo un estudio de la ruta de apoptosis, aunque no se encontraron grandes cambios entre los distintos grupos experimentales, posiblemente

debido a que se trata de animales jóvenes/adultos en los que no hay inducción de esta vía. La sobreexpresión de CYB5R3 *per se* solo produjo un incremento en los niveles de BCL-2, que podría indicar un posible papel protector frente a la apoptosis. Por su lado, se ha sugerido que la RC también puede tener un papel protector frente al exceso de apoptosis asociado con la edad, por lo que la mayoría de los estudios se han llevado a cabo en animales viejos. En este sentido, resulta interesante ver el posible efecto de la RC sobre la apoptosis en animales jóvenes/adultos. Un estudio llevado a cabo en músculo de ratas jóvenes alimentadas durante 2 meses bajo condiciones de RC mostró que, mientras que no se encontraron cambios en la fragmentación del ADN ni en los niveles de XIAP y caspasa-3, se observó un descenso en los niveles de procaspasa-3 en músculo por RC, concluyendo que la RC podría tender a disminuir la apoptosis en los tejidos postmitóticos. Nuestros resultados parecen estar en concordancia con este estudio, ya que observamos un descenso en los niveles de la forma activa de caspasa-3 así como un aumento en los niveles de XIAP, inhibidor de la apoptosis. En lo que respecta a la apoptosis independiente de caspasas, que se cree que podría tener un papel más importante en la pérdida de músculo asociada con la edad, nuestro estudio mostró un incremento tanto en los niveles de AIF en núcleo como en los niveles de ENDOG, proteínas clave de esta ruta, por la RC. De acuerdo con estos resultados, la RC podría estar incrementando la ruta de apoptosis más importante en músculo esquelético, ya en animales jóvenes, como un posible efecto protector encaminado a eliminar posibles células dañadas.

Por último, para obtener nuevos conocimientos sobre el papel fisiológico de CYB5R en el contexto del envejecimiento realizamos una comparativa entre ratones jóvenes/adultos (7 meses) y ratones viejos (24 meses). En este sentido, nos resultaba particularmente interesante dilucidar cómo la sobreexpresión de CYB5R3 se dirige a marcadores clave relacionados con la fisiología mitocondrial, la señalización autofágica y la apoptosis en el músculo esquelético de los ratones viejos, dado el papel central que juegan estas vías en la determinación de la tasa de envejecimiento, y la importancia fisiológica que tiene el músculo esquelético como el tejido postmitótico con una mayor contribución al gasto energético global del ratón. El estudio de los marcadores de los complejos mitocondriales reveló un descenso de estos en el músculo esquelético de los animales WT. Mientras que el descenso del CI concuerda con lo observado previamente por el grupo, el descenso en los complejo III, IV y V no se había constatado en nuestros estudios previos, lo cual es posiblemente debido a diferencias de la edad (21 meses en el estudio anterior vs. 24 meses

Resumen

en el presente estudio) y a la cantidad de grasa en la dieta (AIN93G en el estudio anterior vs. AIN93M en el presente estudio). La sobreexpresión de CYB5R3, por su parte, aumentó los niveles de CII en los animales jóvenes. Sin embargo, el efecto más llamativo de la sobreexpresión lo encontramos en los animales viejos TG, que exhibieron aumentos significativos de los complejos I, II y IV. Además, la sobreexpresión de CYB5R3 anuló las disminuciones de los complejos I, III, IV y V relacionadas con el envejecimiento, lo que indica un efecto protector contra la disfunción mitocondrial relacionada con el envejecimiento. A pesar de los cambios observados en los niveles de los complejos de la ETC y del descenso de la abundancia mitocondrial asociada al envejecimiento, no se observaron cambios en los niveles de VDAC, usada como marcador mitocondrial, ni por efecto de la edad ni por la sobreexpresión de CYB5R3. Por lo tanto, los cambios en los complejos mitocondriales parecen estar más relacionados con alteraciones en la composición de las membranas mitocondriales.

De nuevo, estudiamos los procesos de fusión y fisión mitocondrial por su importancia en el mantenimiento de una población mitocondrial saludable y por el cambio morfológico mitocondrial que ocurre como consecuencia del proceso de envejecimiento. En ratones WT, el envejecimiento produjo una disminución sustancial en los niveles de MFN-2 que fue acompañada de un aumento generalizado de marcadores de fisión. Llama la atención que la sobreexpresión de CYB5R3 produjera en los ratones TG jóvenes cambios similares a los causados por el envejecimiento en el grupo de genotipo WT, aunque no se produjeron más alteraciones con el envejecimiento en el grupo TG. Nuestros resultados concuerdan con demostraciones anteriores de que los niveles de MFN-2 disminuyen con el envejecimiento en el músculo esquelético del ratón, lo que conduce a una disfunción mitocondrial y la acumulación de mitocondrias dañadas. La falta de una disminución en los niveles de MFN-2 con el envejecimiento en los ratones TG refuerza la importancia de la expresión de CYB5R3 para prevenir la disfunción mitocondrial asociada al envejecimiento en el músculo esquelético. En relación con estos cambios se llevó a cabo un estudio de morfología y abundancia mitocondrial por microscopía electrónica. Es de destacar que, aunque tanto el envejecimiento como la sobreexpresión de CYB5R3 aumentaron los niveles de marcadores de fisión en músculo esquelético, estos dos factores tuvieron resultados diferentes en la morfología y abundancia mitocondrial. En cortes transversales de FB del gastrocnemio rojo, encontramos que el aumento de los marcadores de fisión asociados con el envejecimiento se acompañó de una disminución del tamaño de las mitocondrias y un aumento del número de mitocondrias en los ratones

Resumen

WT. En FR, el envejecimiento también condujo a una disminución del tamaño de las SSM y las IMFM, lo que indica una prevalencia de la fragmentación mitocondrial con una edad avanzada, y concuerda con los cambios observados en el sóleo. Por el contrario, se ha reportado que el contenido mitocondrial en el gastrocnemio blanco no se modifica con el envejecimiento. La sobreexpresión de CYB5R3 también aumentó la abundancia de marcadores de fisión y disminuyó el tamaño mitocondrial en FB de ratones TG jóvenes. Sin embargo, a diferencia de lo que se encontró con el envejecimiento, la abundancia mitocondrial disminuyó significativamente en músculo esquelético de los ratones TG, lo que sugiere que la fisión está acompañada en este caso por una mayor eliminación autofágica de orgánulos. Con el avance de la edad, encontramos que el número de mitocondrias no cambió en los ratones TG, pero su tamaño aumentó significativamente. En FR, también se observó un mayor tamaño de las SSM e IMFM en animales TG viejos en comparación con los WT de la misma edad. Nuestro grupo había encontrado previamente una disminución de la masa mitocondrial acompañada de un mayor tamaño del orgánulo en el gastrocnemio rojo de ratones alimentados con RC, lo que indica que estas alteraciones podrían representar características comunes de los músculos oxidativos en ratones sometidos a estas intervenciones antienvjecimiento. A vista de nuestros resultados, el mayor tamaño mitocondrial observado en secciones de gastrocnemio de los ratones TG viejos no puede explicarse por un predominio de fusión frente a fisión, sino que indicaría que las mitocondrias más pequeñas generadas estarían siendo eliminadas por autofagia. Distintos estudios muestran un bloqueo de la autofagia con el envejecimiento, ruta que resulta clave para eliminar orgánulos dañados, lo que concuerda con nuestros resultados. Sin embargo, en el caso de los ratones viejos TG se observa un descenso de los niveles de P62 y PARKIN, lo que es compatible con un aumento del consumo de estas proteínas y por tanto con un aumento de la ruta autofágica en músculo esquelético bajo estas condiciones. Unas tasas de autofagia más altas en estos animales, resultando en la eliminación predominante de las mitocondrias más pequeñas, podría conducir a la preservación de las mitocondrias con un área más alta, lo que explicaría la existencia de un aumento en el tamaño medio de los perfiles mitocondriales sin aumento de su número bajo condiciones de predominancia de los marcadores de fisión.

Por otro lado, está ampliamente aceptado que la biogénesis mitocondrial desciende con la edad, lo que se relaciona con la sarcopenia y la disfunción mitocondrial asociada al envejecimiento. Nuestros resultados muestran que este descenso de la biogénesis mitocondrial también ocurre en músculo esquelético, y que no puede ser paliado por la

Resumen

sobreexpresión de CYB5R3. En el caso de los niveles de CoQ, los cambios descritos en la bibliografía no son homogéneos. Mientras que en la mayoría de los órganos los niveles de CoQ disminuyen con el envejecimiento, en el caso del músculo esquelético, algunos estudios no encontraron cambios en los niveles de CoQ con el envejecimiento, mientras que otros estudios mostraron un descenso en los niveles de CoQ en mitocondrias aisladas. Nuestros resultados muestran un descenso de los niveles de CoQ con el envejecimiento, que no se ve afectado por la sobreexpresión de CYB5R3. Cuando se midieron los niveles de COQ7, componente clave de la maquinaria de biosíntesis de CoQ, se observó un aumento con la edad independientemente del genotipo, que podría representar una respuesta compensatoria encaminada a paliar el descenso en los niveles de CoQ que tiene lugar con la edad, aunque finalmente no se consigue tal efecto. Sería interesante profundizar más en las investigaciones centradas sobre los distintos estados de COQ7, ya que esta enzima debe ser desfosforilada por la fosfatasa mitocondrial PPTc7 para ser activa.

El CoQ tiene efecto antiapoptótico, ya que previene la apertura del poro mitocondrial, por lo que el descenso observado en sus niveles con el envejecimiento se podría relacionar con el aumento de apoptosis asociado con la edad. Además, con la edad también aumentan los marcadores inflamatorios, capaces de desencadenar apoptosis. El desencadenamiento de la apoptosis va a depender del balance entre proteínas proapoptóticas, como BAX, y antiapoptóticas, como BCL-2. Nuestros resultados muestran un incremento muy acusado en los niveles de BAX en el grupo de animales viejos TG, y el descenso de la ratio BCL-2/BAX indica una mayor apoptosis en los animales viejos independientemente del genotipo. En lo que respecta al fuerte aumento en los niveles de BAX en los animales TG, los demás marcadores medidos relacionados con la señalización apoptótica parecen indicar que dicho aumento no se relaciona con un incremento de la apoptosis. En relación con esto, diversos estudios han demostrado que BAX juega un papel importante en la maquinaria de importación de proteínas a la mitocondria en músculo esquelético, que también se ve afecta por el envejecimiento y lleva a la acumulación en el citosol de proteínas desplegadas. De acuerdo con esto, y dado que el aumento de BAX en los animales viejos TG parece no relacionarse con un aumento de la apoptosis, podría ser un efecto beneficioso de la sobreexpresión de CYB5R3 para paliar el efecto del envejecimiento sobre la maquinaria de importación de proteínas a la mitocondria.

Resumen

La ruta de apoptosis también se relaciona negativamente con la autofagia en células musculares, llevando a la conclusión de que una correcta señalización autofágica protege frente a los estímulos proapoptóticos, lo que concuerda con nuestros estudios. Los animales viejos TG parecen tener una mayor actividad autofágica y una menor actividad apoptótica. Sin embargo, en el grupo de animales WT viejos, en el que hemos obtenido resultados compatibles con la existencia de un bloqueo de autofagia, podría existir una mayor tasa de apoptosis, como indica el balance entre proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas.

En resumen, los datos presentados en esta Tesis Doctoral suponen una primera aproximación a las alteraciones que produce la combinación de la sobreexpresión de CYB5R3 con dietas de diferente componente graso, RC y envejecimiento en músculo esquelético de ratón. Nuestros resultados son indicativos de que la sobreexpresión de CYB5R3 tiene efectos beneficiosos sobre la disfunción mitocondrial asociada al envejecimiento. Estos efectos parecen ser dependientes del componente graso de la dieta y, en su mayoría, se ven anulados por la combinación de dicha sobreexpresión con la RC. Con vistas a futuras investigaciones, proponemos abordar el impacto de la sobreexpresión de CYB5R3 y/o de la regulación de su actividad en la fisiología del músculo durante el envejecimiento en cuanto a parámetros de resistencia y masa muscular.

Introducción

1 Introducción

1.1 Envejecimiento

El envejecimiento es el declive progresivo dependiente del tiempo que viene acompañado de una disminución de la fertilidad y del aumento de la susceptibilidad del organismo a amenazas tanto endógenas como externas. El envejecimiento está asociado al desencadenamiento de una amplia variedad de enfermedades, tales como trastornos degenerativos y neoplásicos [1].

El proceso de envejecimiento tiene cuatro características clave que fueron definidas por el gerontólogo Strehler: universal, intrínseco, progresivo y perjudicial. Es decir, el envejecimiento es un proceso que ocurre en todos los organismos, aunque en diferentes grados, sus causas son endógenas, ocurre a lo largo de la vida y sus efectos son negativos para el individuo [2]. A estas características Gustavo Barja añade que es un proceso irreversible [3].

El estudio de los mecanismos que subyacen al proceso de envejecimiento ha atraído la curiosidad de los científicos a lo largo de toda la historia de la humanidad, y sigue en auge en la actualidad. El interés por entender el proceso de envejecimiento ha llevado a postular distintas teorías para tratar de explicarlo, algunas de las cuales se van a desarrollar en el siguiente apartado, así como a definir nueve marcadores que definen el fenotipo asociado al envejecimiento [1]. Estos marcadores no sólo se manifiestan durante el envejecimiento, sino que su manipulación experimental, agravándolos o mejorándolos, lleva a acelerar o retrasar el envejecimiento respectivamente [1], y son: inestabilidad genómica, acortamiento de los telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de la proteostasis, desregulación de la detección del estado nutricional, senescencia celular, agotamiento de células madre, alteración de la comunicación intercelular y disfunción mitocondrial [1] (Figura 1).



Figura 1. Marcadores del envejecimiento. Figura cogida de López-Otín et al. 2013 [1].

1.1.1 Teorías del envejecimiento

Como se ha indicado anteriormente, a lo largo de los años han surgido distintas teorías que tratan de explicar el proceso de envejecimiento [4, 5]. En 1956, Denham Harman propuso la *teoría de los radicales libres*, según la cual el envejecimiento y las enfermedades degenerativas asociadas a él se deben al ataque deletéreo que producen los radicales libres en distintos componentes celulares [6]. Unos años más tarde, Miquel *et al.* publicaron una extensión de dicha teoría, en la que se le daba un papel central a la mitocondria como productor principal y diana de los radicales libres, dando lugar a la conocida como *teoría mitocondrial de los radicales libres* [7].

A pesar de toda la controversia que ha surgido en años recientes en torno a esta teoría [8], hoy en día sigue siendo una de las más aceptadas para explicar el proceso de envejecimiento [9].

Además de la producción mitocondrial de especies reactivas, fundamentalmente del oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*), otro factor que se relaciona con el envejecimiento es el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas celulares [3], midiéndose este parámetro por el índice de dobles enlaces (DBI, del inglés

Introducción

double bonds index) de los fosfolípidos de membrana. En este sentido, se ha encontrado que las especies más longevas tienen un menor DBI [10-13]. Dado que los ácidos grasos poliinsaturados son más susceptibles a sufrir daño oxidativo, estas especies con menor DBI se encuentran protegidas frente a este daño [14]. Esta teoría se conoce como la teoría de las membranas, y estaría en estrecha relación con la teoría de los radicales libres.

Por último, otra teoría destacada es la teoría de los telómeros. Los telómeros son estructuras que se encuentran en los extremos de los cromosomas lineales, consistentes en una secuencia nucleotídica repetida en tándem cuya función es mantener la estabilidad e integridad del genoma [15]. Estas estructuras son mantenidas por la acción de la telomerasa, una transcriptasa inversa que es capaz de sintetizar los telómeros en ausencia de una hebra molde de DNA. La mayoría de las células somáticas no tienen expresión de telomerasa, lo que conduce a una pérdida progresiva de los telómeros, poniendo de manifiesto una capacidad proliferativa celular limitada [1]. En este sentido, se ha observado un acortamiento de los telómeros con el envejecimiento normal en humanos y ratones [16]. Los ratones con telómeros alargados o acortados muestran una esperanza de vida aumentada o disminuida respectivamente [1], lo que establece relación entre los telómeros y el envejecimiento.

1.2 Intervenciones antienvjecimiento

1.2.1 Restricción calórica

La restricción calórica (RC) es la intervención no genética mejor caracterizada que resulta en un incremento de la longevidad. Además, es la única que ha demostrado tener efecto en todas las especies en las que ha sido estudiado, que van desde la levadura hasta los primates [17]. Esta intervención consiste en la reducción del consumo de calorías sin llevar a la desnutrición. La RC fue empleada por primera vez en 1935 por McCay, C.M., *et al.*, usando ratas como modelo de estudio, encontrando que los animales mostraban una mayor vida media, así como una mayor vida máxima, cuando eran sometidos a dicha intervención [18]. A pesar de que, como se ha comentado, la RC ha logrado aumentar la longevidad en todas las especies en las que se ha estudiado, esta intervención no ha estado exenta de controversia, particularmente cuando se publicaron los dos primeros estudios llevados a cabo en primates no humanos, que mostraban resultados contradictorios. Estos estudios, llevados a cabo en monos Rhesus, se realizaron en dos instituciones norteamericanas diferentes: la Universidad de Wisconsin Madison (UW) [19, 20], y el National Institute on Aging (NIA, NIH) [21]. La controversia surgió porque el estudio

Introducción

realizado en UW había reportado beneficios de la RC tanto en salud como en supervivencia, mientras que el estudio del NIA mostraba que, aunque sí se produjeron beneficios en la salud de los monos por RC, no se encontraron diferencias significativas respecto a la supervivencia entre el grupo control y el sometido a RC. Posteriormente, se realizaron revisiones para tratar de explicar las diferencias encontradas en ambos estudios. Una de estas revisiones fue la llevada a cabo por Mattison, J. A. *et al.*, en la que destacaron diferencias en los correspondientes diseños experimentales, la procedencia de los animales, la dieta, la forma de alimentación o la edad de inicio del tratamiento, entre otros parámetros, lo cual hacía complicado poder comparar los resultados obtenidos en los distintos laboratorios [22]. En esta revisión se llega a la conclusión de que efectivamente el tratamiento de RC aumenta la supervivencia en primates no humanos, llegándose incluso a alcanzar una longevidad máxima para esta especie en algunos de los animales sometidos a tratamiento. Más aún, se destaca que, en el estudio llevado a cabo en el NIA, en el que no se observaron diferencias significativas entre los controles y los tratados, los animales de ambos grupos tenían una supervivencia por encima de la media para esta especie. El hecho de no encontrar diferencias significativas entre los animales control y los tratados en este estudio podía deberse a la ausencia de diferencias de peso entre ellos y al hecho de que estos pesos eran más bajos que los de los controles del estudio de UW, sumado a que la ingesta de calorías de los animales control del estudio de NIA fue menor que la de los controles del otro estudio. En cuanto a la incidencia de enfermedades asociadas con la edad, como el cáncer o las enfermedades cardiovasculares, en ambos estudios se constató que ésta fue menor en los primates sometidos a RC [22]. Una vez comprobado que el tratamiento de RC era eficaz en primates resultaba interesante estudiar el efecto que tenía este tratamiento sobre humanos. En este sentido, cabe destacar el estudio CALERIE (Comprehensive Assessment of Long term Effects of Reducing Intake of Energy) que se ha llevado a cabo en EE. UU. para investigar el efecto de la RC en pacientes sanos no obesos. Este estudio es el primero que se realiza en humanos y está apoyado por la Sociedad de la Restricción Calórica. El estudio se ha desarrollado en dos fases, en la primera fase (CALERIE 1) se llevó a cabo una intervención de 6 y 12 meses en pacientes con sobrepeso, pero no obesos, hasta lograr un 25% de RC; mientras que en la segunda fase (CALERIE 2) se realizó una intervención de 24 meses con un 11.9% de RC.

Heilbronn LK, *et al.*, publicaron los resultados obtenidos a los 6 meses de intervención de los cuatro grupos en los que se habían dividido los sujetos (control, RC, RC y ejercicio

Introducción

físico, y una dieta muy baja en calorías). En todos los grupos se midieron los niveles de insulina en ayunas, temperatura, glucosa y DHEAS (dehidroepiandrosterona sulfato), que se consideran marcadores inversos de longevidad ya que se han visto disminuidos en distintas especies cuando se someten a RC. Los grupos tratados experimentaron una reducción de peso, así como una reducción de los niveles de insulina en ayunas y de la temperatura, mientras que no se observaron cambios en los niveles de glucosa ni de DHEAS, lo cual puede ser debido a que la intervención duró sólo 6 meses. También se observaron disminuciones en los niveles de hormona T3 y en el gasto energético, que indicaría la relación entre ambos. Por último, también se observó un menor daño en el DNA en los tres grupos sometidos a intervención, lo cual concuerda con la reducción en la producción de ROS [23]. Dentro de esta primera fase del estudio también se han publicado varios artículos analizando los efectos tras un año de intervención. En estos estudios se concluye que el seguimiento de una dieta de 20% de RC lleva a reducción de la adiposidad total así como del tejido adiposo visceral y subcutáneo, pero que tras los primeros 6 meses disminuye la adherencia a la intervención [24], por lo que se propone que una RC moderada, de entre 10-20%, podría producir los mismos beneficios y tener mayor adherencia a largo plazo [25]. Finalmente, también se demostró que las diferencias en el balance de macronutrientes tienen poco efecto en la pérdida de peso por RC [26].

En la segunda fase del estudio se encontró que los participantes sometidos a RC no experimentaron efectos adversos, haciendo factible llevar a cabo una intervención de RC de forma sostenida en el tiempo. Los sujetos del grupo de RC mostraron mejoras en parámetros fisiológicos y psicológicos, observándose reducciones en factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares y metabólicas, así como en biomarcadores hepáticos, relacionados también con la salud metabólica. En lo que respecta a estos últimos, las mejoras encontradas fueron mayores en hombres [27-29].

En cuanto a la duración de los efectos de la RC, diversos estudios han demostrado que algunos de los efectos beneficiosos persisten 2 semanas después de volver a la dieta normal, pero la totalidad de los efectos beneficiosos desaparecen a los 6 meses de volver a la dieta normal, por lo que sería necesario mantener una dieta de RC para conservar sus efectos [30]. Debido a la dificultad de implementar la RC en la vida cotidiana se han desarrollado alternativas a esta intervención, como pueden ser los miméticos de la RC, enzimas que mimeticen sus efectos, ayuno intermitente, etc. [31].

Respecto a los mecanismos por los que la RC logra aumentar la longevidad, no se conocen aún con exactitud, y es probable que haya varios procesos involucrados de manera

simultánea. La RC produce un aumento de la autofagia, lo que tiene efectos antienvjecimiento al promover el control de calidad de los orgánulos celulares. Este aumento de la autofagia se logra a través de distintas rutas que se describen a continuación y se esquematizan en la Figura 2 [17].

1.2.1.1 Vía AMPK-mTOR

mTOR (diana de la rapamicina en mamíferos) es una serina/treonina quinasa que tiene un papel clave en la regulación del metabolismo y el crecimiento celular, promoviendo la síntesis de proteínas e inhibiendo la autofagia cuando hay disponibilidad de nutrientes [32]. Diversos estudios han demostrado una extensión de la longevidad en múltiples organismos modelo cuando se inhibe esta vía [33]. Por su lado, la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) es un sensor energético celular, de forma que se activa cuando la célula se encuentra en condiciones de baja energía, y estimula la cetogénesis, la oxidación de ácidos grasos, la absorción de glucosa, e inhibe la lipogénesis [31]. Esta activación de AMPK también activa a PGC1 α por fosforilación, promoviendo la biogénesis mitocondrial; y al factor de transcripción FoxO [34]. Una reducción en los niveles de glucosa, así como en la disponibilidad de proteínas y aminoácidos, y en la ratio AMP/ATP lleva a la activación de AMPK, que a su vez inhibe a mTOR [35]. En este caso, es la activación de AMPK la que se ha relacionado con la extensión de la longevidad en organismos modelo [33, 36]. De acuerdo con esto, la RC lleva a una activación de AMPK y una inhibición de mTOR, que se traduce en una reducción de la síntesis de proteínas, activación de la autofagia, reducción de la biogénesis de ribosomas, y activación de mecanismos de respuesta a estrés, entre otros [31].

1.2.1.2 Vía de las Sirtuinas

Las sirtuinas (SIRT) son histona-desacetilasas dependientes de NAD⁺, por lo que su actividad está relacionada con el control del estado energético celular [37]. En mamíferos, la familia SIRT está compuesta por 7 miembros (SIRT1-7), siendo SIRT1 y SIRT3 la que más se ha relacionado con la extensión de la longevidad por RC [38]. Bajo condiciones de RC, aumenta la ratio NAD⁺/NADH [39], lo que lleva a la activación de SIRT, que de nuevo se ha encontrado extiende la longevidad en distintos organismos modelo [33]. El incremento de la actividad de las SIRT se ha relacionada con un descenso de la inflamación, ya que tienen efectos inhibitorios sobre NF- κ B, así como un aumento de la biogénesis mitocondrial, al actuar sobre PGC1- α [38]. Además de esto, debido a la gran cantidad de proteínas reguladas por desacetilación, desde proteínas implicadas en

Introducción

procesos clave del metabolismo hasta proteínas de la respuesta antioxidante, se pone de manifiesto el importante papel de las sirtuinas en la regulación del incremento de la longevidad mediado por la RC [36].

1.2.1.3 Vía Insulina- Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I)

La activación de la vía de señalización IGF-I lleva a la activación de TOR y de la proteína quinasa ribosomal 6 (S6K), que desencadena en un incremento en la síntesis de proteínas. La activación de esta ruta también inhibe la actividad transcripcional de FoxO, al producir su traslocación del núcleo al citosol [33]. En condiciones de RC se reducen los niveles de GH, insulina, glucosa e IGF-I, lo que lleva al mantenimiento de FoxO en el núcleo, que activa la expresión de genes de respuesta a estrés, así como la autofagia [33, 36]. Esto concordaría con la hipótesis de “Hormesis”, según la cual un estrés moderado da lugar a la inducción de respuestas a estrés que se van a traducir en un efecto beneficioso frente al envejecimiento [40].

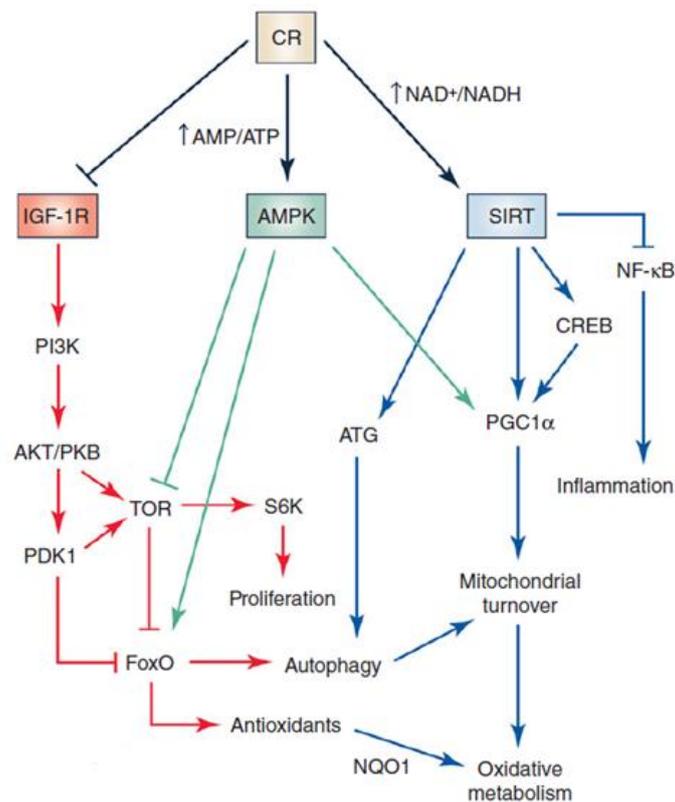


Figura 2. Mecanismos involucrados en los efectos prolongevidad de la RC. Figura cogida de López-Lluch et al. 2016 [36].

1.2.2 Otras terapias antienvjecimiento

El interés en descubrir las causas del envejecimiento se debe, en parte, a querer desarrollar distintas terapias para evitar o retrasar el envejecimiento, así como la aparición de

Introducción

enfermedades relacionadas con la edad. Entre estas terapias se puede mencionar la restricción calórica (RC), miméticos de la RC, ejercicio físico, o incluso el aumento de la expresión de enzimas que mimetizan los efectos de algunas de estas intervenciones [17]. Estos tratamientos se dirigen a las principales vías de señalización, cuya desregulación lleva a la aparición de fenotipos relacionados con el envejecimiento. En la reciente revisión realizada por González-Freire *et al.* se clasifican estas terapias antienvjecimiento en función de su diana, diferenciando siete grupos. El primero de los grupos está formado por compuestos cuya diana son vías de señalización de factores de crecimiento, como es el caso de la rapamicina, un inhibidor de la ruta de mTOR. En el caso del segundo grupo la diana es la vía de señalización de la insulina y el metabolismo de grasa y carbohidratos. Dentro de este grupo cabe destacar la metformina, usada comúnmente para el tratamiento de la diabetes, que se ha comprobado mimetiza los efectos de la RC mejorando la sensibilidad a insulina, aumentando la actividad de AMPK y proporcionando protección antioxidante. Además de la metformina también cabe mencionar el 17α -estradiol, la acarbosa o el factor de crecimiento de fibroblastos- 21. El tercer grupo estaría formado por compuestos dirigidos a las sirtuinas (SIRT) dependientes de NAD^+ , como el resveratrol, compuestos activadores de SIRT (SRT1720, SRT2104 ó SRT3025), o compuestos que intervienen en la síntesis de NAD^+ , como la nicotinamida mononucleótido (NMN) o la nicotinamida ribósido (NR). El cuarto grupo engloba intervenciones que reducen la ingesta de aminoácidos, que se ha comprobado retrasan el envejecimiento por reducción de los niveles de IGF-1 en suero, así como una reducción del estrés oxidativo, aunque los mecanismos exactos aún no están claros. El quinto grupo recoge compuestos cuya diana es la ruta de autofagia, que como se detallará más adelante tiene un papel clave en el proceso de envejecimiento. Un ejemplo de compuesto de este grupo sería la espermidina, que inhibe a histonas acetilasas, y activa la vía de autofagia. El sexto grupo está formado por compuestos dirigidos contra las células senescentes, cuya acumulación se asocia con el envejecimiento. Los compuestos de este grupo, conocidos como agentes senolíticos, inducen la apoptosis de células senescentes. Por último, se menciona un grupo de factores de rejuvenecimiento como son los factores de crecimiento y diferenciación 11 y 8 (GDF11 y GDF8), que se encuentran en la sangre de ratones jóvenes y parecen tener efectos beneficiosos sobre el declive relacionado con la edad cuando se administran en adultos. Cabe mencionar que existe cierta controversia en lo que respecta a los resultados obtenidos con los compuestos de este último grupo [41].

Introducción

Además de todos estos compuestos, también se han desarrollado, entre otras, intervenciones genéticas, que tratan de imitar los efectos de la RC o de alguno de estos compuestos, como puede ser la manipulación sobre enzimas que intervienen en la regulación de los niveles de NAD^+ . A continuación, se describen algunas de las principales terapias antienvjecimiento relacionadas con este trabajo.

1.3 Citocromo b_5 reductasa 3

Como se ha señalado anteriormente, la dificultad para mantener una dieta de RC a lo largo del tiempo ha llevado al estudio de distintas intervenciones que logren los mismos efectos. Entre estas intervenciones se encuentra el estudio de enzimas que mimeticen los efectos de la RC, entre las que se encuentra la citocromo b_5 reductasa 3.

Las citocromo b_5 reductasas (CYB5R) (NADH: ferricitocromo b_5 oxidoreductasa, EC 1.6.2.2) son una familia de flavoproteínas oxidoreductasas que catalizan la transferencia de electrones desde el NADH al citocromo b_5 (CYB5), uno de sus principales aceptores, o hacia otros aceptores como el coenzima Q o diversos compuestos exógenos [42, 43].

La familia de CYB5R está compuesta por cuatro miembros en mamíferos (1-4). Este trabajo se centrará en analizar los efectos de la CYB5R3, de la que se encuentran dos isoformas, una anclada a membrana que se localiza en retículo endoplásmico (RE), membrana mitocondrial externa y membrana plasmática, así como una isoforma soluble que se expresa exclusivamente en eritrocitos donde cataliza la reducción de la metahemoglobina, por lo que se suele denominar también *metahemoglobina reductasa* [44]. Mutaciones en esta proteína causan una enfermedad denominada metahemoglobinemia hereditaria recesiva (RHM), que puede ser de dos tipos. La RHM tipo I es benigna, en ella se ha producido la sustitución de un pequeño número de aminoácidos de forma que la isoforma soluble es inestable, y aparece cianosis, fatiga y dolor de cabeza. Sin embargo, la RHM tipo II es mucho más severa, ya que afecta a ambas isoformas, y se caracteriza por trastornos neurológicos graves [44].

Por otro lado, se han realizado numerosos estudios acerca de las funciones de las distintas isoformas de CYB5R3. La isoforma de CYB5R3 anclada al RE interviene en la elongación y desaturación de ácidos grasos [45], la biosíntesis de colesterol [46] y el metabolismo de drogas [47]. La isoforma de CYB5R3 unida a la membrana plasmática se induce bajo condiciones de estrés para mantener reducidos los antioxidantes como coenzima Q, α -tocoferol y ascorbato extracelular, confiriendo protección frente a la

Introducción

oxidación [48]. Por último, la isoforma de CYB5R3 unida a la membrana mitocondrial interna, que interacciona con la isoforma mitocondrial del CYB5, interviene en la regeneración del ascorbato citosólico [49].

La oxidación del NADH llevada a cabo por la CYB5R3 hace que aumente la relación citosólica NAD^+/NADH . Este aumento también se observa bajo condiciones de RC [39]. Como ya se ha indicado, el aumento de la relación NAD^+/NADH hace que se activen las SIRT, que intervienen en la regulación de ciertas rutas metabólicas asociadas con un aumento de la longevidad y un envejecimiento saludable [50]. Las SIRT conectan el metabolismo con el envejecimiento [51] ya que promueven el metabolismo aeróbico, que es necesario para la extensión de la vida [52]. Todo esto ha llevado a la hipótesis de que el NAD^+ está en el centro de los beneficios que se obtienen de la RC, así como las reacciones de oxidación de NADH, como las llevadas a cabo por CYB5R3, que, junto con la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, contribuyen a mantener la ratio NAD^+/NADH y a regular la función de distintos consumidores de NAD^+ [42].

La isoforma CYB5R3 unida a membrana es además un componente del sistema redox transmembrana de la membrana plasmática (PMRS, del inglés *trans-plasma membrane redox system*) que protege frente a oxidantes extracelulares [53]. Esta isoforma se encuentra sobreexpresada en condiciones de RC, por lo que los beneficios inducidos por esta intervención podrían deberse, al menos en parte, a la inducción de CYB5R3 [54]. Además, se ha comprobado que esta isoforma tiene un papel positivo en la respiración mitocondrial, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis redox celular [42].

También se ha demostrado recientemente que la sobreexpresión de CYB5R3 causa la mejora de distintos parámetros metabólicos que llevan a un aumento de la extensión de la vida en animales transgénicos como *Drosophila melanogaster* y *Mus musculus* [55]. El aumento de la expresión de CYB5R3 también lleva a una menor tumorigénesis hepática inducida por dietilnitrosamina en ratones [55], por lo que esta enzima podría tener un papel en la prevención frente al cáncer hepático. Además, los ratones que sobreexpresan CYB5R3 se caracterizan por la existencia de altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, mejora de la función mitocondrial, disminución del daño oxidativo e inhibición de rutas proinflamatorias crónicas. Todo esto parece indicar que la CYB5R3 actúa como regulador del metabolismo y de patologías asociadas a la edad [42], aunque son aún necesarios más estudios para conocer la extensión de sus beneficios.

1.4 Componente graso de la dieta

Las grasas y aceites presentes en los alimentos son compuestos derivados de ácidos grasos, que son ácidos carboxílicos con cadenas hidrocarbonadas de una longitud de entre 4 y 36 carbonos, teniendo comúnmente un número par de carbonos, ya que su síntesis se produce a través de la unión de unidades de acetato. En función de la presencia o no de dobles enlaces, y del número de dobles enlaces que presente se clasifican en distintos tipos:

-Ácidos grasos saturados (SFA, del inglés *saturated fatty acids*): son aquellos en los que no aparecen dobles enlaces. Diversos estudios han demostrado en efecto lipotóxico de estos ácidos grasos, produciendo un aumento en el riesgo de desarrollar distintas enfermedades [56-58]. Dentro de estos, el ácido palmítico, con 16 átomos de carbono, es el que se encuentra más comúnmente en el cuerpo humano [57].

-Ácidos grasos insaturados: cuentan con al menos un doble enlace en su cadena hidrocarbonada. Dentro de este grupo se diferencian dos tipos de ácidos grasos en función del número de dobles enlaces que presenten en su cadena. Si solo presentan un doble enlace se denominan ácidos grasos monoinsaturados (MUFA, del inglés *monounsaturated fatty acids*), mientras que si presentan más de un doble enlace se denominan ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, del inglés *polyunsaturated fatty acids*). Dentro de los PUFA, tienen especial importancia en la nutrición humana los ácidos grasos omega-3 (ω -3) y omega-6 (ω -6), que cuentan con un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 ó 6 y 7, respectivamente, contando desde el carbono del extremo metilo. Como PUFA ω -3 se puede mencionar el ácido α -linolénico (ALA), a partir del cual se sintetizan el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). Estos ácidos grasos se obtienen principalmente del pescado y tienen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antiapoptóticas, jugando por tanto un papel clave en la prevención de enfermedades cardiovasculares, diabetes, hipertensión o cáncer [59]. Sin embargo, los PUFA ω -6, entre los que se pueden mencionar el ácido linoleico (LA) o el ácido araquidónico (ARA), se han asociado con efectos proinflamatorios [60-63]. En lo que respecta a los MUFA, como el ácido oleico (OA), se ha encontrado que mejoran enfermedades inflamatorias humanas y protegen frente a enfermedades cardiovasculares [56].

Además de esta clasificación, los ácidos grasos también se pueden clasificarse en función de si pueden o no ser sintetizados por las células. En este caso, se dividen en ácidos grasos

no esenciales, aquellos que se sintetizan en el interior celular; y ácidos grasos esenciales, aquellos que deben ser ingeridos con la dieta, puesto que no es posible sintetizarlos.

De acuerdo con la teoría de las membranas anteriormente explicada, el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas celulares influye en la longevidad [11], y dado que la grasa de la dieta altera los fosfolípidos de las membranas celulares [64], los cambios en la composición lipídica de la dieta pueden tener efectos sobre la longevidad. Además, estudios previos han revelado que la composición grasa de la dieta también modula los efectos producidos por la RC, observándose una mayor longevidad en los animales sometidos a RC con una dieta con una alta proporción de SFA y MUFA frente a los sometidos a RC con una dieta alta en PUFA [65]. También se han encontrado cambios en la composición lipídica de las membranas bajo RC con diferente componente graso tanto en hígado [66] como en músculo esquelético [67, 68], lo que a su vez ha conllevado cambios tanto en la actividad de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (ETC, del inglés *electron transport chain*), la peroxidación lipídica, la señalización apoptótica, y la dinámica mitocondrial. En este sentido, investigaciones previas de nuestro grupo llevadas a cabo en ratones de laboratorio han demostrado que la RC junto con el consumo de una dieta con aceite de pescado como componente graso principal produce un ambiente antiapoptótico en músculo esquelético [69], así como un incremento en los niveles de los complejos II, III y IV, y del flujo autofágico en músculo [70]. Por su parte, la RC con una dieta basada en aceite de pescado como componente graso principal produce un aumento de la peroxidación lipídica en músculo esquelético [67, 68]. Todos estos resultados indican la importancia que tiene la composición de la dieta, especialmente de la fuente grasa, en el envejecimiento, convirtiéndose en una herramienta o “terapia” que ayude a paliar los efectos nocivos que se producen en los tejidos con la edad [65, 67-69, 71, 72].

1.5 Procesos celulares relevantes en el envejecimiento

1.5.1 Función y dinámica mitocondrial

Como se ha indicado anteriormente, López-Otín *et al.* identifican la disfunción mitocondrial como uno de los marcadores clave del proceso de envejecimiento [1], poniendo por tanto el foco en el estudio de este orgánulo para entender este proceso.

La mitocondria es el único orgánulo de la célula animal que posee su propio DNA [73]. El DNA mitocondrial (mitDNA) de mamíferos es una molécula circular de DNA

denomina espacio intermembrana, y el interior mitocondrial se denomina matriz mitocondrial [76].

La mitocondria tiene un papel clave en el metabolismo, ya que en su interior tienen lugar distintas rutas como el ciclo de Krebs o la β - oxidación de ácidos grasos. También es considerada la fuente de energía de la célula ya que en ella se genera ATP a través de la fosforilación oxidativa. Además de este papel, en la actualidad se conoce también su importancia en rutas de señalización celular y en la síntesis de diversos metabolitos [77].

1.5.1.1 Cadena de transporte de electrones

Como se ha indicado anteriormente, en la mitocondria se producen distintas reacciones metabólicas generándose NADH y FADH₂, que van a ceder sus electrones a la cadena de transporte de electrones (ETC), que llevará finalmente a la producción de ATP.

La ETC mitocondrial está formada por cuatro complejos proteicos, que se encuentran en la IMM. En los complejos del I al IV se producen una serie de reacciones redox, de forma que se transportan los electrones desde el NADH y el FADH₂ hasta el O₂, para generar H₂O (Figura 4). El NADH cede sus electrones al complejo I, denominado NADH-ubiquinona oxidorreductasa o NADH deshidrogenasa, que los transfiere a la ubiquinona, y bombea cuatro protones al espacio intermembrana. Por su parte, el FADH₂ cede sus electrones al complejo II o succinato deshidrogenasa, que de nuevo transfiere los electrones a la ubiquinona. Este complejo no bombea protones. A continuación, en el complejo III, también denominado complejo citocromo *bc*₁ o ubiquinona:citocromo *c* oxidorreductasa, se transfieren los electrones del ubiquinol al citocromo *c* y se bombean cuatro protones al espacio intermembrana. El citocromo *c* pasa los electrones al complejo IV, también llamado citocromo oxidasa, que va a reducir el oxígeno molecular a agua y bombear cuatro protones al espacio intermembrana por molécula de oxígeno. El bombeo de protones que ha ido teniendo lugar durante el paso de los electrones por la ETC genera un gradiente electroquímico, y dado que la IMM es impermeable al paso de los iones, estos protones vuelven a la matriz mitocondrial a favor de gradiente a través del complejo V, también denominado ATP sintasa, generándose así energía en forma de ATP [78] (Figura 4). Los protones también pueden volver a la matriz mitocondrial a través de las proteínas desacoplantes (UCPs, del inglés *uncoupling proteins*), que son proteínas transmembrana que se encuentran en la IMM. En este paso se disipa el gradiente de protones sin formación de ATP. En mamíferos se han identificado 6 UCPs con distintas

Introducción

funciones, que van desde la termogénesis hasta la regulación de la producción de ROS [79].

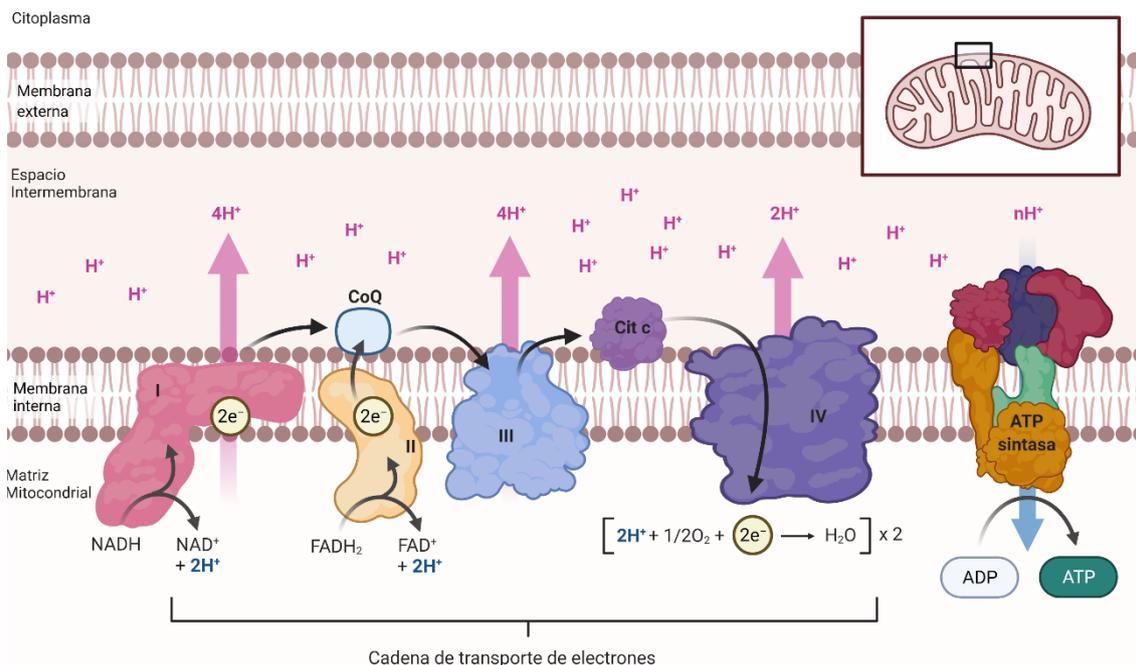


Figura 4. Cadena de transporte de electrones mitocondrial. Adaptada de “*Electron Transport Chain*”, por BioRender.com (2022). Obtenido de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

A lo largo de los años se han propuesto distintos modelos para tratar de explicar la organización de los complejos de la ETC en la IMM. Por un lado, se encuentra el modelo fluido, que propone que los complejos respiratorios se distribuyen aleatoriamente en la IMM, se mueven a través de esta membrana y el flujo de electrones se produce por CoQ y el citocromo *c*. Por otro lado, se encuentra el modelo sólido, según el cual los complejos respiratorios se asocian en estructuras mayores en la IMM para realizar un transporte rápido y eficiente de los electrones [80].

Los complejos de la ETC se agrupan formando estructuras supramoleculares denominadas supercomplejos o *respirasoma*, cuya función aún no está clara. Estos supercomplejos han sido descritos en distintos organismos que van desde mamíferos hasta bacterias, hongos o levaduras [81]. Se han observado distintas asociaciones en supercomplejos, como puede ser CI+CIII, CIII+CIV o CI+CIII+CIV. En lo que respecta a la asociación de CII y CV, aunque estos también se pueden asociar en supercomplejos, la mayor parte de ellos se encuentra en forma no asociada [82]. Estas observaciones han llevado a postular otro modelo sobre la organización de los complejos respiratorios en la IMM, y que sería una combinación entre los modelos fluido y sólido explicados

anteriormente. Este modelo se denomina el modelo de plasticidad, y sostiene que los complejos de la ETC se pueden encontrar agrupados, pero también de forma libre en la IMM. En este sentido se han encontrado diferencias en distintos tipos celulares, así como en distintas situaciones fisiológicas [82].

Aunque en la actualidad no está totalmente clara la finalidad de estos supercomplejos, se cree que podrían hacer más eficiente el transporte de electrones, así como tener funciones estabilizadoras [83].

Con el envejecimiento se produce una reducción en la actividad de algunos de los complejos de la ETC, especialmente CI y CIV, aunque no siempre se relaciona con un descenso en los niveles de proteínas, sino de la eficiencia, posiblemente debido a un mayor número de mutaciones en el mitDNA [84]. En este sentido, hemos demostrado previamente en nuestro grupo un descenso en los niveles de CI en músculo esquelético con el envejecimiento [70]. En contraposición, se ha demostrado que la RC produce aumentos los niveles de CIV en hígado [85] y en músculo [86], pudiendo contrarrestar los efectos del envejecimiento sobre la ETC.

1.5.1.2 Dinámica mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos tremendamente dinámicos que forman una red compleja y están constantemente sometidas a ciclos de fusión y fisión en función de las necesidades energéticas de la célula [87]. Las principales proteínas involucradas en el proceso de dinámica mitocondrial pertenecen a la familia de dinamina guanosina trifosfatasa (GTPasas), y son las mitofusinas 1 y 2 (MFN-1 y MFN-2), la proteína de atrofia óptica 1 (OPA1), y la proteína relacionada con la dinamina 1 (DRP-1) [88].

La elongación mitocondrial se produce a través del proceso de fusión, de forma que primero se produce la fusión de OMM y en segundo lugar ocurre la fusión de la IMM. La fusión de la OMM supone en primer lugar el contacto entre mitocondrias adyacentes, que se consigue gracias a la hidrólisis de GTP llevada a cabo por las mitofusinas, que se encuentran en la OMM; y seguidamente la fusión propiamente dicha, de nuevo con la hidrólisis de GTP. La fusión se completa con la acción de OPA1 llevando a cabo la fusión de la IMM (Figura 5) [77].

Las mitofusinas también intervienen en la señalización de la mitofagia así como en el tráfico mitocondrial a través de la célula, lo que permite la distribución de las mitocondrias en aquellas zonas donde haya unos mayores requerimientos de ATP [88]. Este papel de las mitofusinas en el tráfico mitocondrial podría facilitar la comprensión de

Introducción

ciertas patologías como la enfermedad de Charcot-Marie Tooth tipo 2A (CMT2A), que es una neuropatía causada por mutaciones en MFN-2, caracterizada por distrofia muscular distal [89], que siempre se ha analizado desde la perspectiva de una fusión mitocondrial alterada y sin embargo también podría estar relacionada con alteraciones en el tráfico mitocondrial [88]. Por su lado, OPA1, además de en la fusión, participa en otros procesos como en el mantenimiento del mitDNA [90], estabilización de los supercomplejos de la ETC [91], o en la liberación del citocromo *c* tras la inducción de la apoptosis [92]. Alteraciones en esta proteína producen atrofia óptica autosómica dominante (ADOA), una neuropatía óptica hereditaria caracterizada por degeneración de las células ganglionares de la retina y del nervio óptico, que desencadena una ceguera progresiva. En células linfoblastoides de estos pacientes se han encontrado alteraciones de la morfología mitocondrial y de la capacidad respiratoria, un descenso de las proteínas codificadas por mitDNA, así como un aumento en la producción de ROS [93].

El proceso contrario a la fusión, por el que se van a generar mitocondrias más pequeñas es la fisión mitocondrial. Una proteína clave en este proceso es DRP-1, una GTPasa citosólica que oligomeriza formando un anillo contráctil alrededor de la mitocondria. No obstante, como este anillo no es lo suficientemente ancho para envolver la mitocondria se necesita un paso previo de constricción [94], que es llevado a cabo por el retículo endoplasmático (RE), y está mediado por actina y miosina [95]. En este sentido, la forma asociada a RE de la formina invertida 2 (INF2) y la isoforma de Spire1, Spire1C, sirven como centros de nucleación de la actina, interactuando ambas proteínas para producir la constricción mitocondrial [94]. Una vez que esto se ha producido, DRP-1 puede formar el anillo contráctil alrededor de la mitocondria. Al hidrolizar GTP sufre una serie de cambios conformacionales que van a producir un descenso en el diámetro del anillo contráctil, llevando a una nueva constricción de la membrana mitocondrial. Para que DRP-1 se una a la mitocondria son necesarios unos adaptadores o receptores, entre los que se encuentran la proteína de fisión mitocondrial 1 (FIS1), el factor de fisión mitocondrial (MFF), y las proteínas de dinámica mitocondrial MiD49 y MiD51 (Figura 5) [93, 94, 96]. Una vez que DRP-1 ha causado la constricción de la membrana mitocondrial, la escisión propiamente dicha depende de la dinamina 2 (DNM2), cuyas mutaciones también se han relacionado con CMT2A [94]. Además de esta, distintas mutaciones en proteínas implicadas en el proceso de fisión se han relacionada con distintas patologías como es el caso de MFF con la encefalomiopatía mitocondrial [93]. En ratones se ha visto que suprimir MFF lleva a la muerte a las 13 semanas de edad debido

Introducción

a una miocardiopatía severa, observándose una baja densidad mitocondrial y actividad de la ETC, así como un incremento de la mitofagia [97].

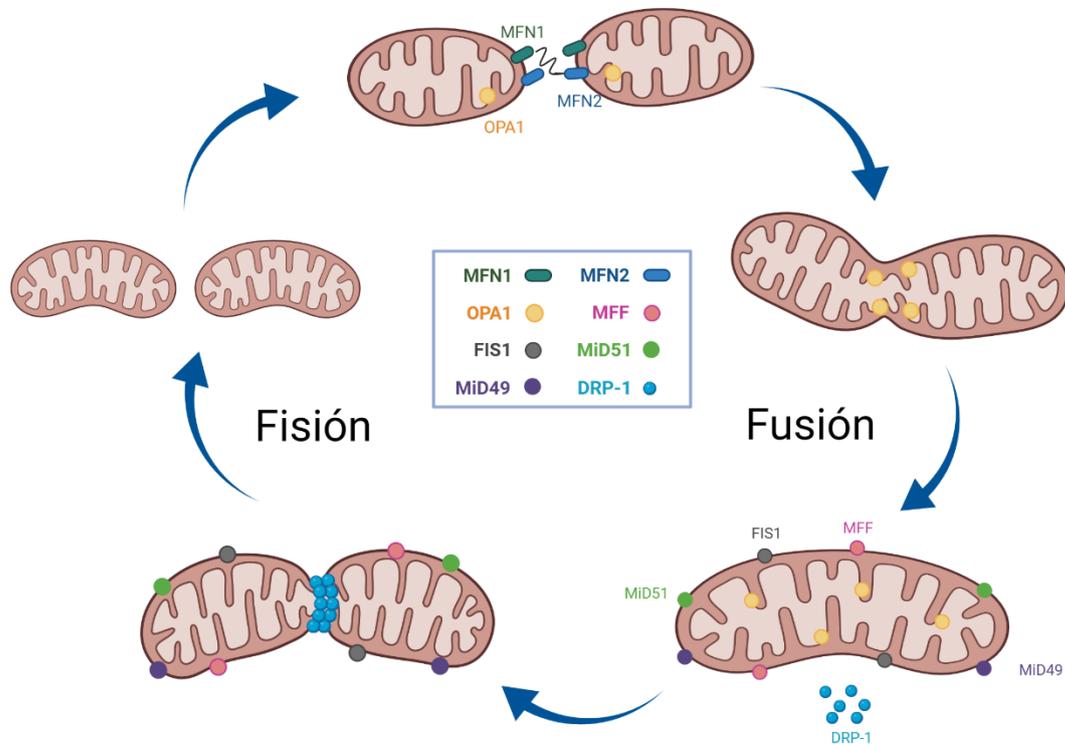


Figura 5. Dinámica mitocondrial. Representación de los procesos de fisión y fusión mitocondrial
Figura creada con BioRender.com

Por último, todas estas proteínas, además de producir cambios en la estructura mitocondrial, juegan un papel muy importante en el mantenimiento del control de calidad mitocondrial [77]. Este proceso de control de la calidad mitocondrial, que juega con la fusión y fisión mitocondrial, fisionando mitocondrias gravemente dañadas para que sean eliminadas por mitofagia, o fusionando mitocondrias dañadas más levemente para diluir mutaciones, garantiza la homeostasis de este orgánulo y es especialmente importante en tejidos postmitóticos, como es el caso del músculo esquelético [98]. Durante el envejecimiento, se producen alteraciones en este sistema de control, que varían en función del tejido estudiado y resultan en disfunción mitocondrial y acumulación de mitocondrias aberrantes, debido también a la disminución en la autofagia [99].

1.5.1.3 Biogénesis mitocondrial

La biogénesis mitocondrial se define como el proceso por el cual las mitocondrias se forman a partir del crecimiento y división de orgánulos preexistentes [100]. Este proceso

Introducción

se produce constantemente en la célula, al igual que las mitocondrias dañadas se eliminan también de forma constante por mitofagia [101]. El balance entre estos dos procesos es necesario para mantener la homeostasis celular y mitocondrial, lo que pone de manifiesto la importancia de conocer la biogénesis mitocondrial [102].

La biogénesis mitocondrial implica la síntesis de IMM y OMM, de proteínas codificadas por el mitDNA, así como de proteínas codificadas por el DNA nuclear, y en este caso su importación a la mitocondria, y la replicación del mitDNA [100]. Para que se produzca la biogénesis mitocondrial es necesaria la activación del factor PGC1 α , que se considera su regulador maestro. PGC1 α va a aumentar los niveles de los factores de transcripción denominados factor respiratorio nuclear-1 y 2 (NRF-1 y NRF-2). Estos, a su vez, activan la expresión del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) y de subunidades de los complejos de la ETC. Por su parte TFAM se dirige a la mitocondria para activar la duplicación del mitDNA [101]. PGC1 α también se puede translocar a la mitocondria para regular la replicación del mitDNA y la transcripción necesaria para la biogénesis [103]. Por otro lado, PGC1 α también interviene en el metabolismo de lípidos en el músculo esquelético, incrementando la oxidación de ácidos grasos [104]. En este sentido, se han observado beneficios de la sobreexpresión de PGC1 α en ratas Zucker obesas, aumentando la oxidación de palmitato y disminuyendo el contenido de lípidos intramiocelulares [105]. PGC1 α también tiene un papel en la conversión del tipo de fibra muscular, promoviendo el cambio de fibra tipo II a tipo I, sin ser necesario para el desarrollo del músculo esquelético ni para la determinación del tipo de fibra [104]. Además, es también un sensor de ROS, controlando el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes. Por ejemplo, promueve la expresión de SIRT3, que lleva a la activación de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa 2 (SOD2) [106]. Por otro lado, también se cree que podría tener efectos antiinflamatorios, ya que ratones con PGC1 α silenciado en músculo esquelético muestran un aumento en marcadores inflamatorios, mientras que los que sobreexpresan PGC1 α experimentan un descenso en estos marcadores de inflamación [106].

Por su parte, NRF-1 y NRF-2 también activan transcripcionalmente otros genes mitocondriales codificados en el núcleo, como subunidades de los complejos de la ETC, en el caso de NRF-1 [107], así como subunidades del complejo IV concretamente, en el caso de NRF-2 [108]. La pérdida de NRF-1 lleva a bajos niveles de mitDNA y resulta letal en embriones de ratón [109]. Además, NRF-1 y NRF-2 parecen estar implicados en la desregulación metabólica ocurrida en músculo esquelético en varias patologías,

observándose un descenso en la expresión de ambos factores en obesidad inducida por dieta alta en grasa, y de NRF-1 en pacientes con diabetes tipo 2 [104].

En cuanto a los mecanismos responsables de la activación de la biogénesis mitocondrial, para que esta ocurra es necesaria la activación de PGC1 α , que se puede producir por varias rutas, entre las que destaca el eje AMPK- PGC1 α y SIRT1- PGC1 α . La vía de AMPK, que como se ha explicado anteriormente se activa por ejercicio físico y por condiciones de baja energía, puede resultar en la fosforilación directa de PGC1 α , de forma que aumenta su estabilidad y mejora su actividad. Esta vía también puede activar a SIRT1 al aumentar los niveles de NAD⁺. PGC1 α fosforilado se transloca desde el citoplasma al núcleo y desencadena la ruta detallada anteriormente. En el caso de SIRT1, esta produce la activación de PGC1 α por desacetilación [100, 104]. La fosforilación de PGC1 α llevada a cabo por AMPK puede ser un paso previo para la desacetilación, ya que cuando PGC1 α carece de sitios de fosforilación para AMPK, no puede ser desacetilada por SIRT1 [110]. Además de estas vías, la biogénesis mitocondrial también se puede activar por otras vías como la dependiente de PPAR α [100].

La biogénesis mitocondrial desciende con la edad, ya que con el envejecimiento se aumenta la producción de ROS, que van a activar a NF κ B, regulador negativo de PGC1 α [106]. Conocer las vías por las que se activa la biogénesis permite emplear distintos enfoques para incrementarla y paliar así los efectos del envejecimiento [101]. Se ha demostrado que tanto el ejercicio físico [111] como la RC [112] producen un aumento de este proceso a través de la señalización de AMPK y SIRT1, como se ha indicado anteriormente [100]. En músculo esquelético también se ha encontrado un incremento de PGC1 α por exposición al frío [113], mientras que se ha observado un descenso por alimentación con una dieta alta en grasa [104].

1.5.2 Coenzima Q

La ubiquinona o coenzima Q (CoQ) es un lípido compuesto por un anillo benzoquinona y una larga cola poliisoprenoide, que coloca a la molécula en la bicapa lipídica. La longitud de la cadena varía entre las distintas especies, encontrándose la molécula con 10 unidades de isopreno en humanos y en *Schizosaccharomyces pombe* (CoQ₁₀), con 9 unidades en roedores y en *Arabidopsis thaliana* (CoQ₉), con 8 unidades en *Escherichia Coli* (CoQ₈), o con 6 unidades en *Saccharomyces cerevisiae* (CoQ₆). Sin embargo, en algunas especies es posible encontrar más de una forma, como ocurre en humanos, donde

Introducción

también se encuentra CoQ₉, y en roedores, donde también se encuentra CoQ₁₀, aunque en cantidades menores [114].

En cuanto a la biosíntesis de CoQ, esta tiene lugar en la mitocondria y se puede dividir en cuatro fases: la síntesis del anillo, la síntesis de la cola isoprenoide, la unión de ambas moléculas y las modificaciones del anillo (Figura 6) [114]. El precursor del anillo es el ácido *para*-hidroxibenzoico, que en humanos se sintetiza a partir del anillo de los aminoácidos fenilalanina o tirosina. La cola isoprenoide se forma a partir de intermediarios de la ruta del mevalonato como el dimetilalil pirofosfato (DMAPP) y el pirofosfato de isopentenilo (IPP), con la acción del heterotetrámero formado por PDSS1 y PDSS2, que se encargarán también de determinar la longitud de la cola dependiendo del número de isoprenos que posea el producto de estas reacciones enzimáticas (*trans*-poliprenil pirofosfato). Seguidamente se produce la unión de los precursores del anillo y de la cola, paso enzimático que está catalizado por COQ2. Por último, se producen distintas modificaciones químicas del anillo, catalizadas por diversas proteínas COQ, aunque el proceso completo aún no se conoce con exactitud (Figura 6) [114].

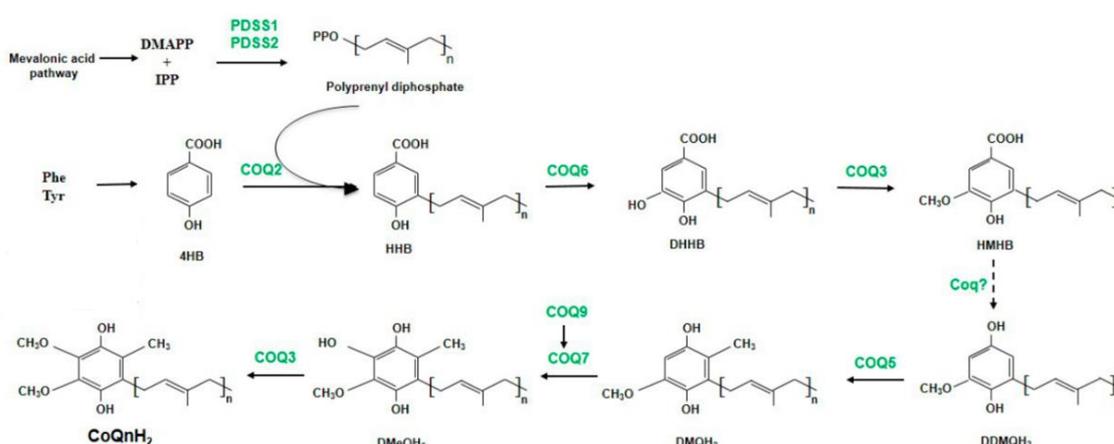


Figura 6. Biosíntesis del Coenzima Q (CoQ). En primer lugar, se muestra cómo se forma la cola isoprenoide, a partir de intermediarios de la ruta del mevalonato. Posteriormente, esta cola se une al anillo, formado a partir de tirosina o fenilalanina. Finalmente, el anillo sufre distintas modificaciones químicas. Adaptada de Díaz-Casado et. al (2019) [114].

Respecto a sus funciones, cabe destacar su papel en la ETC, donde se encarga de transferir los electrones desde los complejos I o II hasta el complejo III; así como su papel antioxidante, previniendo la peroxidación lipídica, la formación de grupos carbonilo en las proteínas y el daño en el DNA [115].

Introducción

Además de estas funciones, se ha encontrado que CoQ actúa como cofactor de proteínas desacoplantes, que translocan protones desde el espacio intermembrana a la matriz mitocondrial, disipando así el gradiente de protones e impidiendo la síntesis de ATP [116]. También previene la apertura del poro mitocondrial, contrarrestando así la apoptosis [117], influye en la ratio NAD^+/NADH , debido a la existencia de NADH deshidrogenasas dependientes de CoQ, como CYB5R3 o NQO1, e interviene en reacciones redox implicadas en distintas rutas como en la oxidación de ácidos grasos o en la biosíntesis de pirimidinas [118].

Los niveles de CoQ dentro de la célula son bastante estables, aunque varían en función del tejido, encontrándose unos mayores niveles de CoQ en riñón y corazón, y menores niveles en hígado, cerebro o músculo esquelético [119]. El balance entre los niveles de CoQ₉ y CoQ₁₀ también varía en función del tejido, siendo mayor esta ratio en hígado y músculo esquelético [118]. Durante el envejecimiento, se produce un descenso de CoQ [114, 119, 120] lo que ha llevado a estudiar los niveles de este lípido en distintas intervenciones. Dado que las mitocondrias son ricas en CoQ, intervenciones que alteran el número o el tamaño de las mitocondrias afectan a los niveles de CoQ, como es el caso del ejercicio físico o la exposición al frío, que se ha comprobado incrementan los niveles de CoQ en músculo esquelético [115]. Por su parte, la RC produce un incremento en los niveles de CoQ, aunque se han encontrado también diferencias en función del organismo modelo, el tejido, el tiempo de intervención, la edad, así como la fracción celular en la que se ha medido [118, 121]. El componente graso de la dieta también influye en los niveles de CoQ, teniendo efecto en condiciones *ad libitum*, en RC y en casos de suplementación. En el caso de la suplementación, los datos parecen indicar que la absorción es mayor cuando la dieta tiene como base aceite de oliva, seguida de aceite de girasol, y obteniéndose la menor absorción con aceite de pescado [114]. En el caso de la RC, el incremento observado en los niveles de CoQ por esta intervención en animales alimentados con una dieta donde el componente graso era aceite de soja se perdía cuando la grasa predominante era aceite de pescado o manteca de cerdo. Sin embargo, en los animales alimentados *ad libitum* el grupo de aceite de soja era el que tenía los menores niveles de CoQ [118]. En este sentido, una investigación previa de nuestro grupo ha mostrado que la dieta de aceite de pescado produce un incremento en los niveles de CoQ en hígado de ratón, siendo este incremento mayor en los niveles de CoQ₁₀. En dicho estudio se propone un mecanismo por el que los PUFA n-3 modulan los niveles de CoQ reduciendo la abundancia de la farnesil difosfato sintasa (FDPS), lo que lleva a la

acumulación de farnesil pirofosfato (FPP); esto junto al conocido efecto inhibitorio de los PUFA n-3 sobre la rama de la ruta del mevalonato que lleva a la síntesis del colesterol, así como al incremento que causan estos ácidos grasos en los niveles de expresión de diversos genes COQ, desencadena en un incremento en los niveles de este antioxidante [122].

1.5.3 Autofagia

La autofagia es un proceso de degradación y reciclaje, que está altamente conservado. En células de mamíferos se han descrito tres tipos de autofagia: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas (CMA) y macroautofagia (Figura 7).

La microautofagia es un proceso por el que directamente el propio lisosoma, a través de invaginaciones de su membrana, engloba material citoplasmático a degradar. En la actualidad se conoce poco sobre el proceso y su regulación. Por su parte la CMA consiste en que chaperonas identifican a proteínas marcadas con un pentapéptido, las despliegan y son introducidas en los lisosomas por el receptor LAMP2A para que tenga lugar su degradación. Por último, la macroautofagia, a la que nos referiremos a partir de ahora como autofagia, consiste en englobar el cargo en una vesícula de doble membrana sintetizada *de novo*, denominada autofagosoma, que se fusionará posteriormente con los lisosomas, formando un autolisosoma (Figura 7). Este proceso se ha estudiado principalmente en levaduras, y posteriormente se han ido descubriendo homólogos en distintos organismos [123].

Introducción

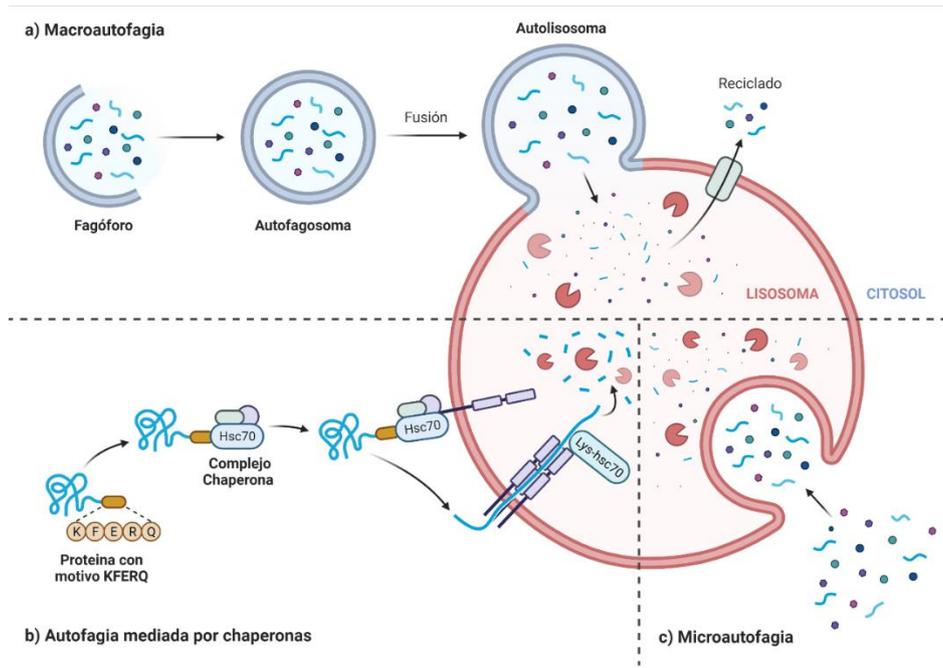


Figura 7. Tipos de autofagia en células de mamíferos. En la figura se muestra la eliminación de distintos componentes celulares mediada por lisosomas: (a) Macroautofagia (autofagia), (b) autofagia mediada por chaperonas y (c) microautofagia. Adaptada de “Three Main Types of Autophagy”, por BioRender.com (2022). Obtenido de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

La autofagia ocurre levemente de forma constitutiva, aunque se puede inducir bajo condiciones de estrés como la falta de nutrientes o energía. En estas situaciones, la degradación de material citoplasmático resulta clave para proporcionar metabolitos que puedan ser empleados en procesos biosintéticos. Esta ruta de degradación de material, también resulta útil en condiciones normales para mantener a la célula en un estado saludable, eliminando orgánulos defectuosos [123], y en el caso del músculo esquelético es necesaria para el mantenimiento de la masa y la integridad muscular [124]. Con el envejecimiento se produce un descenso de la autofagia, que se asocia con distintas patologías, como la neurodegeneración o la sarcopenia [99, 125]

1.5.3.1 Mecanismo molecular de la autofagia

Durante el desarrollo de la autofagia se diferencian distintas fases: inducción, nucleación, elongación y formación y fusión del autofagosoma, que se detallan a continuación.

La inducción de la autofagia ocurre por el complejo ULK1/2, que está formado por ULK1/2, ATG13 y RB1CC1 (también conocida como FIP200). A ATG13 se une C12orf44 (también conocida como ATG101) (Figura 8). Este complejo es necesario para la inducción de la autofagia y está regulado por el estado nutricional de la célula a través del complejo multiproteico de la diana de rapamicina en mamíferos 1 (mTORC1). En

Introducción

condiciones de abundancia de nutrientes, mTORC1 se une al complejo ULK1/2 y fosforila a ULK1/2 y a ATG13, inactivándolas e impidiendo así que tenga lugar la autofagia. Por el contrario, en condiciones de escasez de nutrientes, mTORC1 se disocia del complejo de iniciación, se produce la desfosforilación de las proteínas indicadas anteriormente, teniendo lugar entonces la inducción de la autofagia (Figura 8) [123].

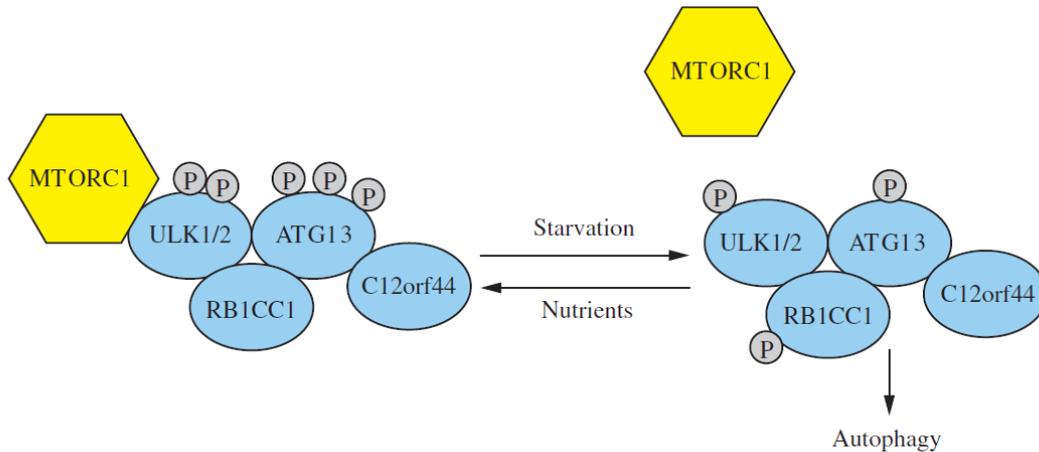


Figura 8. Complejo ULK1/2 de iniciación de la autofagia. El complejo está formado por ULK1/2, ATG13 y RB1CC1 y C12orf44. Figura cogida de Parzych et al. (2014) [123].

El siguiente paso del proceso es la nucleación, que lleva a la formación de una doble membrana que se denomina fagóforo. Para que tenga lugar este proceso se necesita el complejo I de PI3K (fosfatidil inositol 3 quinasa) de clase III (Figura 9). Para la formación de este complejo se necesita la actividad quinasa de ULK1, que va a reclutar a VSP34 (también denominada fosfatidilinositol 3 quinasa, subunidad catalítica 3, PIK3C3). Además, el complejo está también formado por VSP15 (también denominada fosfatidilinositol 3 quinasa, subunidad reguladora 4, PIK3R4), ATG14 y BECLIN1, a través de la cual se produce principalmente la regulación del complejo. La proteína antiapoptótica BCL-2 se une a BECLIN1 impidiendo que esta se una al complejo e inhibiendo por tanto la autofagia (Figura 9). Otra proteína con efecto inhibitorio es RUBICON, mientras que como reguladores positivos se encuentran AMBRA1 y SH3GLB1 (también conocida como BIF-1). La función del complejo I de PI3K de clase III consiste en la síntesis de PI3P en los sitios de iniciación del fagóforo, creando así unas plataformas en el citosol para la unión posterior de maquinarias que permitan elongación del fagóforo y su cierre hasta formar el autofagosoma, al reclutar proteínas de la familia WIPI [123].

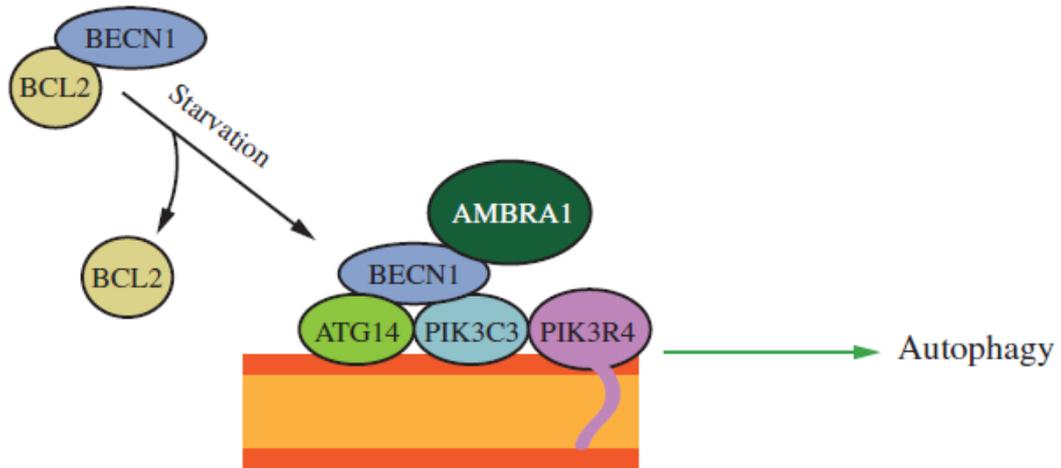


Figura 9. Complejo I de PI3K de clase III para la fase de elongación de la autofagia. Figura adaptada de Parzych et al. (2014) [123].

Como se ha indicado anteriormente, el siguiente paso es la elongación del fagóforo, que de nuevo requiere la formación de un complejo proteico, en este caso compuesto por ATG12, ATG5 y ATG16L1. La localización de este complejo define el sitio de formación del autofagosoma, ya que va a actuar como una proteína E3 catalizando la conjugación de proteínas de la familia ATG8 a fosfatidiletanolamina (PE). Dentro de la familia ATG8 en humanos y ratones se encuentran las proteínas LC3, GABARAP y GATE-16, siendo LC3 la mejor caracterizada. Sobre esta proteína actúa la cisteína proteasa ATG4, que elimina residuos de arginina C-terminal y deja expuesta una glicina C-terminal. La forma de LC3 procesada por ATG4 pasa a denominarse LC3-I, que es activada por ATG7 (similar a E1) y transferida a ATG3 (similar a E2) (Figura 10). Finalmente, ATG3 junto con el complejo ATG12-ATG5-ATG16L1, que actúa como E3 ligasa, facilita la unión de fosfatidiletanolamina (PE) a LC3-I, que entonces pasa a denominarse LC3-II (Figura 10). La lipidación de estas proteínas de la familia ATG8 lleva a la extensión y cierre del fagóforo.

Introducción

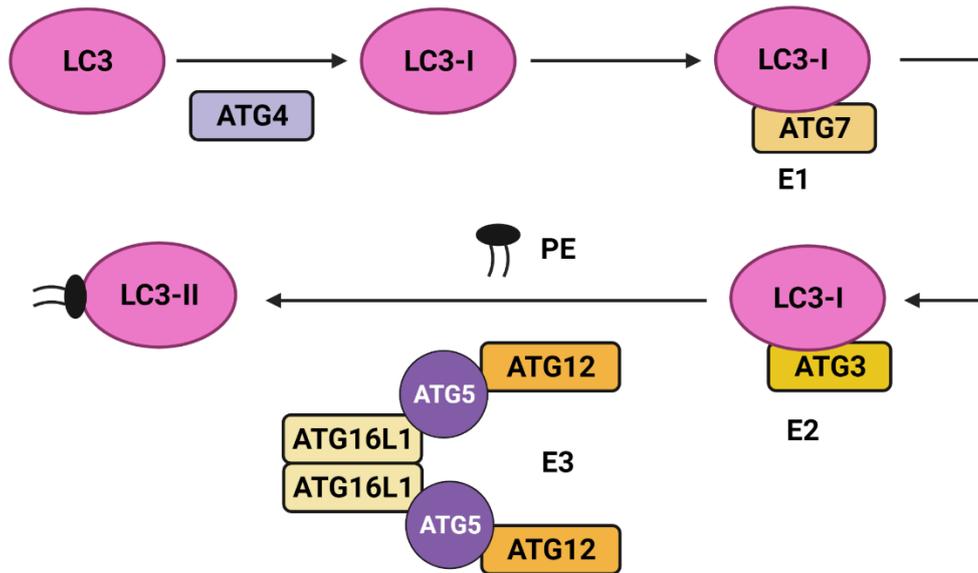


Figura 10. Sistema de conjugación de LC3. Figura adaptada de Parzych et al. (2014) [123].

Otra proteína importante en el proceso autofágico es ATG9, una proteína transmembrana que se encuentra en la membrana plasmática, en la red *trans* del complejo de Golgi, y en endosomas de reciclaje, tempranos y tardíos, que se ha postulado como la proteína que proporciona membranas para la extensión y cierre del fagóforo. Aunque este proceso aún no se conoce con exactitud, parece estar regulado por las proteínas ATG2A y ATG2B [123, 126].

Por último, se debe producir la fusión del autofagosoma con los lisosomas, donde tienen un papel importante los microtúbulos produciendo la aproximación de ambas estructuras. Para la fusión propiamente dicha intervienen complejos SNARE, proteínas RAB GTPasas y factores de anclaje. Los complejos SNARE están formados por STX17 (Qa) que se encuentra en la membrana del autofagosoma, SNAP29 (Qbc) y VAMP8, que se encuentra en la membrana del lisosoma; o por YKT6 en la membrana del autofagosoma, y SNAP29 YSTX7, localizado en la membrana del lisosoma. Para el ensamblaje de estos complejos intervienen proteínas como ATG14. Entre los factores de anclaje que facilitan la fusión con los lisosomas cabe mencionar el complejo HOPS. EPG5, TECPR1 y PLEKHM1. Estos interactúan con proteínas RAB, concretamente con RAB7, que promueve la fusión, así como con otras proteínas de la familia ATG8 [127].

Todo este proceso está altamente regulado, de forma que permite responder a distintos tipos de estrés. Como se ha señalado anteriormente, el complejo ULK1/2 está regulado por mTORC1, que actúa como sensor nutricional inhibiendo la autofagia en condiciones

de abundancia de nutrientes. En estas condiciones, PKA también inhibe la autofagia al fosforilar a LC3, además de fosforilar y activar también a mTORC1, e inhibir a AMPK, que es el otro gran sensor nutricional junto a mTORC1. En el caso de AMPK, esta se activa cuando aumenta la ratio AMP/ATP, es decir, cuando los niveles energéticos de la célula son bajos, y produce la inducción de la autofagia por varias vías. Por un lado, AMPK actúa inhibiendo a mTORC1 de manera directa y de manera indirecta a través de la fosforilación y activación del complejo de esclerosis tuberosa (TSC 1/2), que inhibe a mTORC1. Por último, AMPK también puede activar a ULK1 promoviendo así la iniciación de la autofagia. El incremento de calcio citosólico que tiene lugar como consecuencia de estrés del RE activa las proteínas quinasas dependientes de Ca^{2+} /calmodulina CAMKK2/CaMKK β , que a su vez fosforilan y activan a AMPK, desencadenando la activación de la autofagia por las vías descritas anteriormente [30, 123, 128].

1.5.3.2 Mitofagia

La autofagia, además de ocurrir de forma inespecífica como se ha detallado en el apartado anterior, también puede ser específica, dirigida a peroxisomas, mitocondrias o proteínas ubiquitiniladas. En el caso de la degradación autofágica de mitocondrias, el proceso recibe el nombre de mitofagia, y puede ocurrir para eliminar mitocondrias dañadas, para permitir el recambio de este orgánulo, e incluso para el desarrollo de algunos tipos celulares [123].

La mitofagia puede desencadenarse por distintas vías, siendo la vía PINK1-PARKIN la más estudiada. PINK1 es una Ser/Thr quinasa que se encuentra en la OMM y en condiciones normales entra a la matriz mitocondrial a través del complejo TOM/TIM y es degradada por la peptidasa de procesamiento de la matriz mitocondrial (MPP) y por la proteína de tipo romboide asociada a las presenilinas (PARL), que se encuentra en la IMM [129]. Bajo condiciones de estrés, PINK1 se acumula en la OMM, homodimeriza, se autofosforila y activa a PARKIN, que tiene actividad ubiquitina ligasa. Esta activación de PARKIN por PINK puede llegarse a cabo de dos formas: por un lado, se puede producir a través de la fosforilación directa de PARKIN, por otro lado, PINK puede fosforilar a la ubiquitina, que compite con un dominio autoinhibitorio de PARKIN, de forma que esta se estabiliza en una conformación activa. Una vez activa, PARKIN lleva a cabo la ubiquitinilación de otras proteínas de la OMM que contienen un dominio LIR (región intermedia de interacción con LC3), las cuales van a servir como receptores para

Introducción

la maquinaria de autofagia, interaccionando con LC3 y reclutando así a las membranas autofagosómicas para envolver a la mitocondria dañada. Entre estos receptores se encuentra la proteína p62 o también llamada sequestosoma 1 (SQSTM1), la proteína de unión a Tax1 (tax1bp1) o la proteína optineutin (OPTN) (Figura 11) [129, 130].

Otro tipo de rutas por las que se desencadena la mitofagia son las vías dependientes de receptores. Dentro de estas cabe mencionar la vía BNIP3-NIX, que median la mitofagia inducida por hipoxia y la empleada para eliminar mitocondrias en células inmaduras, respectivamente. BNIP3 se encuentra en la mitocondria y, mientras que en condiciones normales se expresa en bajos niveles, su expresión se induce por HIF-1. Esta proteína de nuevo interacciona con LC3 reclutando la maquinaria de autofagia. Aunque recientemente se ha encontrado que la fosforilación de dos residuos de Ser de BNIP3 potencia su interacción con LC3, los mecanismos regulatorios aún no se conocen (Figura 11). En el caso de NIX, esta proteína se encuentra en la OMM y también tiene dominios para interaccionar con LC3 [130]. Zheng *et al.* han propuesto tres modelos por los que NIX puede promover la autofagia. El primero de ellos se basa, de nuevo, en un papel como receptor para la maquinaria de autofagia al interaccionar con LC3. El segundo modelo propone que NIX también puede interaccionar con PARKIN. Por último, se propone que NIX compite con BECLIN-1 por unirse a BCL-2. Cuando NIX consigue unirse a BCL-2, existe más BECLIN-1 libre para formar el complejo I de PI3K de clase III y que tenga lugar la autofagia [131]. Además de estas, se conocen otras proteínas que actúan como receptores para la maquinaria autofágica como BCL2L13, PHB2, MsrB2, o la recientemente identificada FUNDC1 (proteína 1 conteniendo el dominio FUN14), que se encuentra en la OMM y su interacción con LC3 está muy regulada por su estado de fosforilación. En condiciones de hipoxia, se fomenta su desfosforilación y se mejora su interacción con LC3 [132].

Introducción

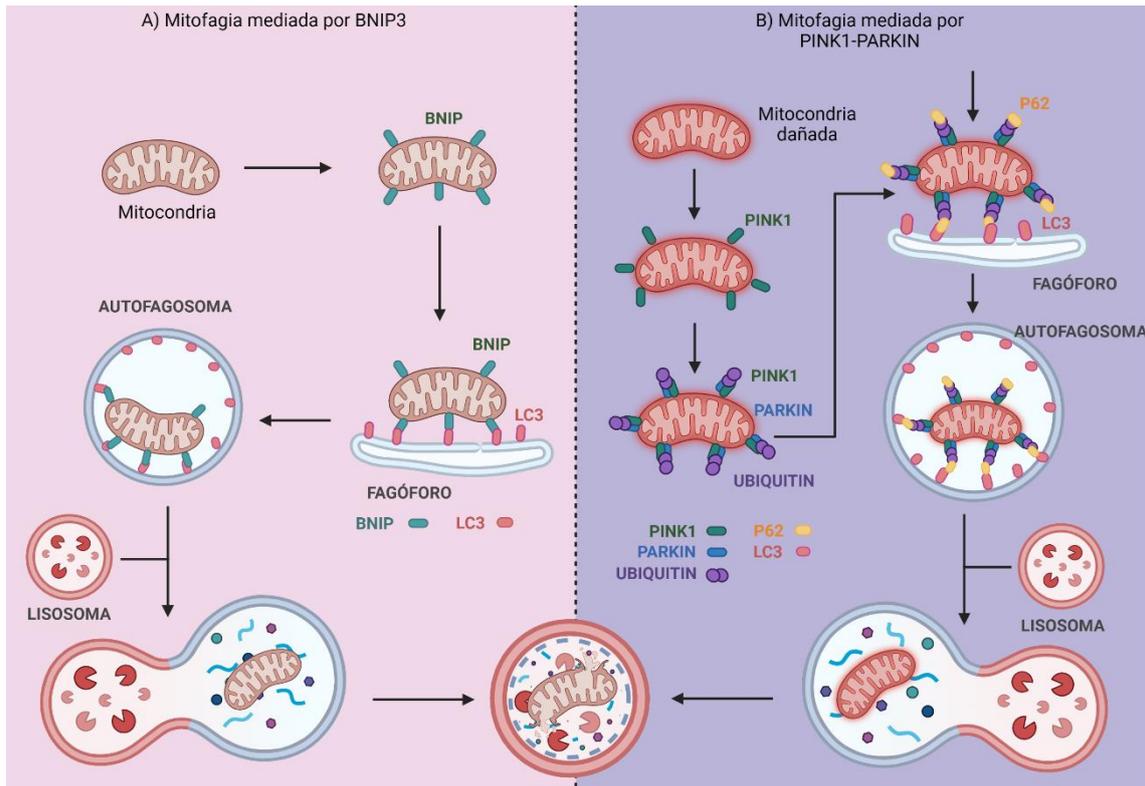


Figura 11. Mecanismo de mitofagia. A: Mitofagia mediada por la proteína BNIP3L. B: Mitofagia mediada por la vía PINK1-PARKIN. Figura creada con BioRender.com.

1.5.4 Apoptosis

La apoptosis es un proceso celular activo altamente regulado que lleva a la degradación controlada de la célula, sin que haya liberación del material al medio circundante. La finalidad de este proceso es mantener la homeostasis de los tejidos, equilibrando la producción de nuevas células con la eliminación de otras cuando ya no son necesarias, están dañadas o son peligrosas para el organismo [133]. Este tipo de muerte celular programada se describió por primera vez en 1842, pero no fue hasta 1972 cuando se introdujo el término de apoptosis por John Kerr [134]. Su estudio sigue siendo de gran interés ya que en la actualidad se relacionan muchas enfermedades con un exceso (ej. Parkinson o Alzheimer) o con un defecto de la apoptosis (ej. cáncer) [135]. Además, también se ha comprobado que la apoptosis está relacionada con el envejecimiento, observándose un incremento de la muerte celular programada a medida que se alcanza una edad avanzada [99, 136], mientras que la RC produce un descenso de esta ruta, lo que podría tener efectos beneficiosos sobre el desarrollo de la sarcopenia [69]. Bajo esta intervención, nuestro grupo ha demostrado que someterse a RC con una dieta donde el principal componente graso es el aceite de pescado, maximiza los efectos antiapoptóticos

Introducción

de la RC [69], por lo que el componente graso es otro factor a tener en cuenta. En este sentido también está documentada una inducción de la apoptosis por SFA, mientras que los PUFA ω -3 muestran un papel protector [137].

La apoptosis lleva a una serie de cambios visibles en la célula como la pérdida de volumen, la rotura del núcleo, la condensación de la cromatina y la formación de invaginaciones de la membrana que permiten la división de la célula en cuerpos apoptóticos que posteriormente serán fagocitados por células del sistema inmune [138]. En el caso concreto del músculo esquelético, durante la atrofia muscular se produce apoptosis, que durante mucho tiempo se ha pensado que lleva a la reducción del número de mionucleos. Sin embargo, existe cierta controversia en este sentido, ya que algunos estudios recientes han demostrado que no ocurre dicha pérdida de mionucleos [139].

A nivel molecular la apoptosis puede llevarse a cabo por dos vías: *extrínseca e intrínseca*. La **vía extrínseca** o vía mediada por receptor se desencadena por receptores pertenecientes a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R), como Fas, TRAIL-R1/2 o el propio TNF-R, que se encuentran en la membrana plasmática y que se activan por ligandos extracelulares. Cuando a estos receptores se unen sus ligandos (FasL, TRAIL o TNF- α), trimerizan y reclutan a proteínas adaptadoras que se unen a los “dominios de muerte” (DD, del inglés *death domains*) del receptor. En el caso del receptor Fas estas proteínas adaptadoras son las FADD; y en el caso del receptor TNF-R estas proteínas son TRADD. Las proteínas adaptadoras tienen “dominios efectores de muerte” (DED, del inglés *death effector domain*), a través de los cuales reclutan a la procaspasa-8. En el caso de los receptores Fas y TRAIL, la unión de esos con sus proteínas adaptadoras y la procaspasa-8 forma el “complejo señalizador inductor de muerte” (DISC, del inglés *death inducing signaling complex*). Las procaspasas-8 próximas a DISC pueden transactivarse y escindir directamente la caspasa-3, caspasa efectora. La caspasa-8 también puede romper la proteína BID, dando lugar a BID truncada, que desencadenarían la vía intrínseca como se describe a continuación (Figura 12) [138, 140].

La **vía intrínseca** tiene lugar con intervención de la mitocondria y se desencadena bajo diversas condiciones de estrés de origen tanto extracelular como intracelular, llevando a la activación de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2. El equilibrio entre proteínas proapoptóticas (BAX, BAK, BID y otros) y antiapoptóticas (BCL-2, BCL-XL, MCL-1 y otros) de esta familia en la membrana externa mitocondrial condicionará la apertura o no

Introducción

de poros en dicha membrana, permitiendo la liberación de una serie de proteínas del espacio intermembrana mitocondrial al citosol. Entre estas proteínas se encuentra el citocromo *c*, que se une a APAF-1 para formar el apoptosoma que, consumiendo ATP, activa a la caspasa-9. Una vez activada, la caspasa-9 puede activar a la caspasa-3 y a otras caspasas efectoras (caspasa-6 y caspasa-7), que llevarán a la alteración de los sustratos celulares y a la muerte de la célula (Figura 12). Al activarse esta vía, se liberan al citosol otras moléculas proapoptóticas además del citocromo *c*. Dentro de estas moléculas proapoptóticas se encuentran Smac/Diablo, inhibidor de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs); AIF, factor inductor de la apoptosis de forma independiente de caspasas o la endonucleasa G (ENDOG). Entre las principales IAPs, se encuentra la proteína Xiap, inhibidor de la apoptosis ligado al cromosoma X, que inhibe la actividad de varias caspasas [140].

La apoptosis independiente de caspasas anteriormente mencionada es la llevada a cabo por AIF y ENDOG, que cuando se liberan de la mitocondria se translocan al núcleo y causan la degradación del DNA [141], aunque no se conoce el mecanismo por el que llevan a cabo esta degradación [142].

Introducción

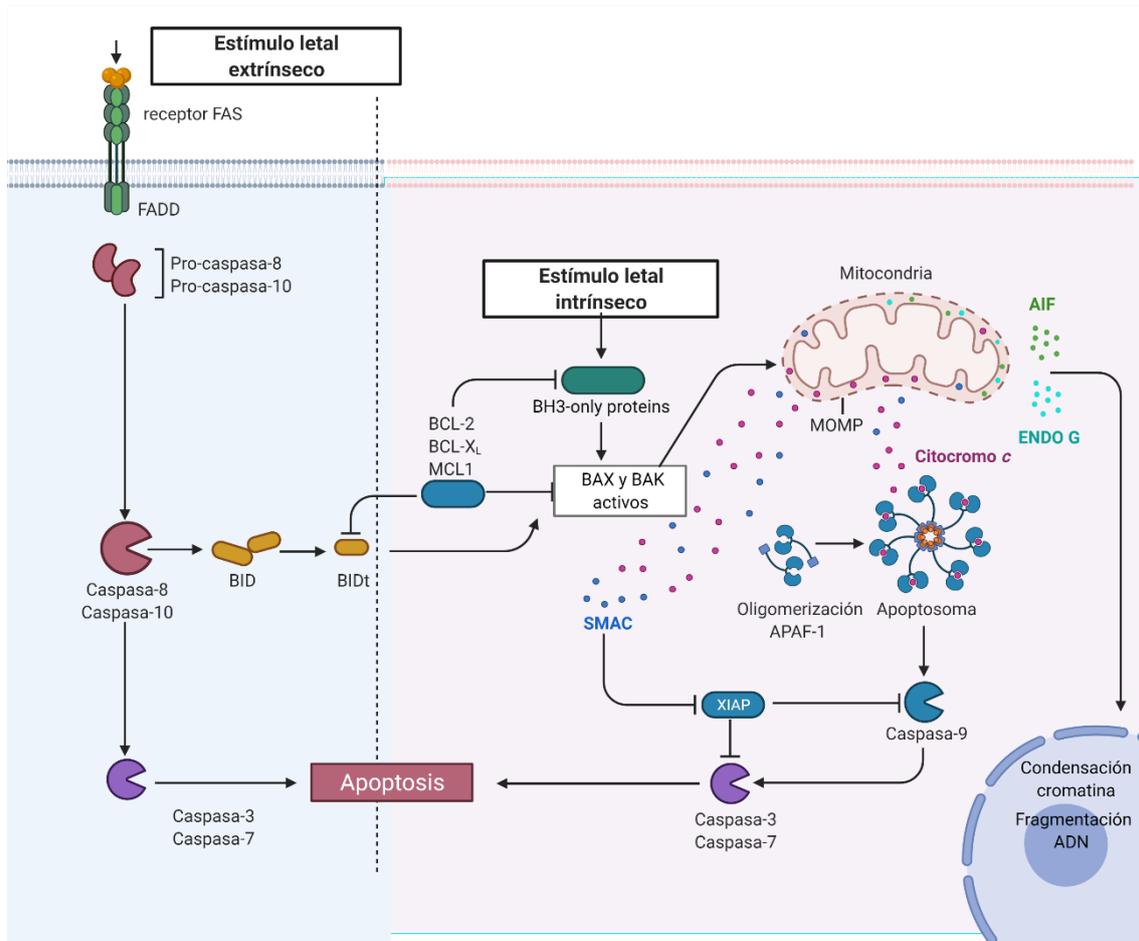


Figura 12. Principales rutas de señalización apoptótica, iniciada por señalización externa a través de receptores específicos (vía extrínseca) o por daño celular (vía intrínseca). Adaptada de “Apoptosis Extrinsic and Intrinsic Pathways”, por BioRender.com (2022). Obtenido de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

Además de intervenir en la apoptosis, muchas de estas proteínas tienen otras funciones no relacionadas con la muerte celular. Entre estas funciones cabe mencionar el caso de APAF-1, que está implicada en la regulación del ciclo celular en respuesta a daño en el DNA [143]; el citocromo *c*, que como ya hemos indicado interviene en la ETC; BCL-2, que actúa sobre BECLIN-1 inhibiendo así la autofagia; o AIF, que es requerida para la estabilidad del complejo I [144]. En lo que respecta a las caspasas, se ha asociado la procaspasa-3 con la regulación de la biogénesis mitocondrial en neuronas [145] y se ha descrito un papel de la caspasa-3, y de la caspasa-9 para la activación de esta, en la diferenciación de mioblastos en miotubos [146]. También se han descrito funciones no apoptóticas para la caspasa-8. En este caso, se ha encontrado que interviene en la formación de vasos del saco vitelino en ratones, de forma que su eliminación resulta letal durante el desarrollo embrionario, y en la diferenciación de los monocitos a macrófagos y en la homeostasis de células T, entre otras funciones [147, 148].

1.6 El tejido muscular y su envejecimiento

El músculo esquelético es un tejido postmitótico que constituye el 45% del peso corporal [57], considerándose el tejido metabólico más grande del cuerpo [149]. El músculo esquelético está formado por tres tipos de fibras musculares. Las fibras tipo I o fibras rojas son de contracción lenta, oxidativas y metabolizan preferentemente ácidos grasos. Estas fibras tienen un mayor número de mitocondrias, y por tanto son más resistentes a la fatiga [150]. Las fibras de tipo IIa son de contracción rápida y son oxidativas-glucolíticas. Finalmente, las fibras de tipo IIb son de contracción rápida y glucolíticas [149, 151, 152]. Como se explicará en el siguiente apartado, los distintos tipos de fibra se afectan de forma diferente por el envejecimiento, siendo las fibras de tipo II las que más se ven más afectadas por este proceso [153].

Las mitocondrias constituyen entre 2-10% del volumen celular en el músculo esquelético de mamíferos [154], diferenciándose distintas subpoblaciones que son distinguibles tanto funcional como estructuralmente [155]. Una de estas subpoblaciones son las denominadas mitocondrias intermiofibrilares (IMFM, del inglés *intermyofibrillar mitochondria*), que tienen forma alargada y se disponen envolviendo la banda I de la sarcómera. Estas mitocondrias forman redes que se distribuyen por la matriz intermiofibrilar y tienen una alta relación superficie-volumen, todo lo cual facilita una rápida difusión del ATP hacia la ATPasa miofibrilar, así como la distribución de la energía por toda la fibra [155]. El otro tipo de mitocondrias encontrado en el tejido muscular son las que comúnmente se les ha llamado mitocondrias subsarcolémicas (SSM, del inglés *subsarcolemmal mitochondria*), aunque no se encuentran localizadas en todo el espacio subsarcolémico, si no que están acumuladas principalmente en la zona del núcleo, o cerca de capilares [155]. En cuanto a su morfología, las SSM son más grandes y menos ramificadas que las IMFM, teniendo un mayor volumen de crestas mitocondriales y matriz [154, 156].

En lo que respecta al metabolismo, el músculo esquelético puede usar ácidos grasos, cuerpos cetónicos y glucosa como fuente de energía, y empleará unos u otros en función de los requerimientos energéticos. En condiciones de reposo, utiliza preferentemente ácidos grasos procedentes del tejido adiposo, y cuerpos cetónicos del hígado. Los músculos en actividad moderada utilizan, además de estos sustratos, glucosa sanguínea como fuente de energía. En todos estos casos, los sustratos se oxidan a acetil-CoA, que entrará al ciclo de Krebs, y posteriormente por la fosforilación oxidativa generará ATP.

Cuando se lleva a cabo una actividad intensa, los requerimientos de ATP son tan altos que el O₂ y los sustratos suministrados por el flujo sanguíneo no son suficientes, por lo que se complementa la oxidación comentada anteriormente con la degradación del glucógeno almacenado en el músculo hasta lactato, por fermentación. El músculo cuenta también con otro sistema de generación de ATP, que es la creatina quinasa, ya que los depósitos de glucógeno en músculo son bajos, y la acumulación de lactato lleva a una bajada del pH. Tras el ejercicio intenso, se regeneran las reservas de glucógeno en músculo gracias al Ciclo de Cori, por el que el lactato producido en el músculo es transportado por la sangre hasta el hígado, donde vuelve a formar glucosa por gluconeogénesis. Esta glucosa se transporta al músculo para regenerar las reservas de glucógeno [157].

El estudio del músculo esquelético resulta especialmente interesante al tratarse de uno de los órganos más consumidores de energía y al ser un tejido postmitótico, en los que son especialmente pronunciadas las disminuciones de la función mitocondrial asociadas a la edad [158].

1.6.1 Envejecimiento del músculo

El envejecimiento lleva al declive de las funciones fisiológicas de los órganos [159]. La disminución progresiva de la masa y función muscular asociada al envejecimiento se denomina sarcopenia [99]. El término sarcopenia fue definido por primera vez en los años 80 por Rosenberg [160], aunque su definición se ha ido modificando hasta como se conoce hoy en día [161]. La sarcopenia supone un factor de riesgo para muchas de las afecciones asociadas a la edad [99], y dado que en 2050 se estima que más de 200 millones de pacientes padezcan esta patología resulta muy interesante su estudio [162, 163].

Aunque no se conoce claramente la patogénesis de la sarcopenia, se sabe que en su desarrollo se produce inflamación, degeneración neuromuscular y disfunción mitocondrial, siendo este último uno de los principales factores implicados en la degeneración muscular dependiente de la edad y en el que se centra este trabajo [161]. Dentro de esta disfunción mitocondrial como consecuencia del envejecimiento se puede mencionar un descenso en la masa mitocondrial [164], así como una reducción de la actividad de la ETC [165]. Esta menor actividad de la ETC lleva a una menor síntesis de ATP, y con ello se produce un descenso en la síntesis de proteínas musculares [166].

Por otro lado, la disfunción mitocondrial conduce a distintos procesos que se relacionarían con el desarrollo de la sarcopenia [99]. Entre estos procesos cabe destacar

Introducción

la alteración del mecanismo de control mitocondrial (MQC, del inglés *mitochondrial quality control*) debido a alteraciones en la dinámica mitocondrial, descenso de biogénesis mitocondrial y autofagia, que llevan a la acumulación de las mitocondrias disfuncionales; y activación de la apoptosis, que también se ve activada por el incremento en la inflamación [99, 159].

Objetivos

2 Objetivos

El **objetivo general** de este trabajo es determinar los mecanismos por los cuales CYB5R3 promueve una extensión de la longevidad en ratones, empleando para ello ratones transgénicos que sobreexpresen esta proteína, y realizando un diseño experimental de intervenciones dietéticas para analizar los efectos de la RC y de distintas fuentes grasas. Los estudios se centrarán en músculo esquelético, tejido postmitótico que tiene una contribución mayor al gasto metabólico en los animales.

Para lograr este objetivo general se definen los siguientes objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Determinar la influencia de la sobreexpresión de CYB5R3 sobre procesos ligados a la mitocondria relevantes para la pauta de envejecimiento: señalización apoptótica, ultraestructura mitocondrial, biogénesis y dinámica mitocondrial, autofagia, así como niveles de coenzima Q.

Objetivo específico 2: Determinar las condiciones dietéticas que maximizan la preservación metabólica por sobreexpresión de CYB5R3. Se estudiarán los efectos de la RC y del contenido graso de la dieta.

Objetivo específico 3: Analizar el efecto de la edad estudiando los efectos de la sobreexpresión de CYB5R3 en animales viejos.

Materiales y métodos

3 Materiales y métodos

3.1 Modelo animal

3.1.1 Animales

Para la realización de este trabajo se emplearon ratones macho silvestres (WT) y transgénicos (TG) para la CYB5R3, de la cepa C57BL/6J.

Los animales TG fueron generados como se detalla en Martin-Montalvo, 2016 [55]. El gen CYB5R3 de rata se clonó en el plásmido pRC/CMV-rDTD [167] y posteriormente, el inserto correspondiente al transgen fue escindido del vector de clonación de DNA por digestión con las enzimas de restricción SwaI y NruI. El transgen purificado (bajo el control del promotor temprano del citomegalovirus humano y secuencias de poliadenilación SV40) fue microinyectado en óvulos fertilizados C57BL/6J en la instalación básica de animales transgénicos modelo de la Universidad de Michigan (<https://brcf.medicine.umich.edu/cores/transgenic-animal-model/>).

Los óvulos supervivientes fueron transferidos a ratonas B6D2F1 pseudopreñadas. La incorporación estable de la construcción en el genoma fue validada como se describe en Martin-Montalvo, 2016 [55]. Los ratones macho TG, generados como se ha descrito, se cruzaron con hembras WT de la cepa C57BL/6J obtenidas de los laboratorios Charles River (Barcelona, España) para establecer una colonia que fue mantenida en el Servicio de Animales de Experimentación (SAEX) de la Universidad de Córdoba.

Se establecieron grupos experimentales con machos de los dos genotipos (WT y TG en el fondo C57BL/6J). Los animales se alojaron en jaulas estériles con tapa con filtro por grupos, excepto los sometidos a RC que se encontraban en jaulas individuales para poder llevar un control más preciso de la ingesta. El mantenimiento se llevó a cabo en un ambiente controlado, con un ciclo de luz / oscuridad de 12 h y una temperatura de 22 ° C con acceso libre a agua y pienso estándar hasta que alcanzaron una edad de 3 meses.

3.1.2 Genotipado de los animales

Los ratones WT y TG se distinguieron por genotipado mediante PCR con DNA obtenido de tejido de la cola.

3.1.2.1 Extracción de DNA

Las muestras procedentes de la cola de los ratones se trataron con un tampón de lisis cuya composición fue: Tris 1M pH 8,5, EDTA 0,5M pH 8, SDS al 10% y NaCl 1M. Justo en el momento de uso se suplementó con Proteinasa K (Qiagen, Hilden, Alemania) en proporción 1/200.

Una vez añadido el tampón, las muestras se incubaron en el termobloque a 55°C agitándolas cada 30 minutos, hasta que el tejido quedaba deshecho por completo. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 13000g durante 30 minutos a temperatura ambiente, y al finalizar la centrifugación se transfirió el sobrenadante a un tubo con isopropanol, de forma que la mezcla muestra:isopropanol quedaba en proporción 1:1. Se mezcló todo bien por inversión y se volvió a centrifugar a 13000g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó entonces el sobrenadante, y el pellet resultante se lavó con etanol al 70%. Por último, se eliminó el etanol y se dejaron secar los tubos a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Una vez que los tubos estuvieron secos, se resuspendió el pellet en 100µl de agua tratada con DEPC y se conservaron las muestras a -20°C hasta la realización del procedimiento de genotipado propiamente dicho.

3.1.2.2 PCR para el genotipado

A partir del DNA extraído de las colas de los animales, se llevaron a cabo PCRs convencionales para el genotipado. Las condiciones de la amplificación fueron 40 ciclos de 1 minuto a 95°C, para la desnaturalización del DNA; 1 minuto a 55°C, para la hibridación de los cebadores; y 1 minuto a 72°C, para la extensión.

Los cebadores empleados para identificar el transgén fueron:

CACCAAATCAACGGGACTT (forward)

AGACCGGGGAGAGTACCACT (reverse)

Por otro lado, como control interno de la reacción, llevamos a cabo la amplificación del gen interleuquina-2 (IL-2) utilizando con los siguientes cebadores:

CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT (forward)

GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC (reverse)

Los productos de la PCR se separaron en una electroforesis en gel de agarosa al 1%, observándose dos bandas en los animales TG: de 325 pares de bases (pb) correspondiente

Materiales y métodos

a IL-2 y de 250pb correspondiente a CYB5R3; mientras que en los animales WT solo se obtuvo la banda correspondiente a IL-2 (Figura 13).

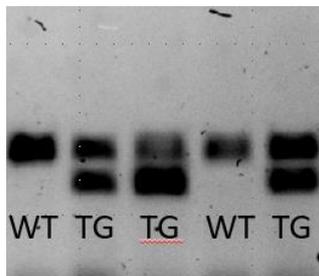


Figura 13. *Electroforesis en gel de agarosa para el genotipado de los ratones.* En los animales WT sólo se observa una banda, correspondiente a la IL-2 (325pb), mientras que, en los TG, además de la banda anterior, se observa otra banda, correspondiente a CYB5R3 (250pb).

3.1.3 Grupos experimentales y dietas

Los animales fueron alimentados con pienso estándar desde el destete hasta los 3 meses de edad. A partir de ese momento empezaron a alimentarse con dietas basadas en la composición AIN93M (elaboradas en el Servicio de Producción de Dietas de la Universidad de Granada), cuya fuente principal de grasa fue diferente en función del grupo experimental al que fueron asignados. En el caso del grupo experimental de animales jóvenes, estos estuvieron 4 meses en intervención, por lo que fueron sacrificados a los 7 meses de edad.

Dentro de este grupo de animales jóvenes se establecieron cuatro subgrupos, en función de si la fuente principal de grasa era aceite de soja (alto en PUFA n-6), manteca de cerdo (alta en SFA y MUFA), aceite de pescado (alto en PUFA n-3: 18% ácido eicosapentaenoico y 12% de ácido docosahexaenoico) o aceite de oliva (alto en MUFA). En los animales jóvenes se estableció también un grupo sometido a una RC con un 40% reducción de la ingesta *ad libitum*. Para conseguir esta reducción del 40% de la ingesta, se fue reduciendo un 10% semanalmente.

Por otro lado, se mantuvo un grupo de envejecimiento en el cual los animales fueron alimentados desde los 3 meses de edad con la dieta AIN93M estándar (con aceite de soja) durante un periodo total de intervención de 21 meses, siendo por tato sacrificados a una edad de 24 meses.

La composición de cada una de las dietas de la intervención se muestra en la tabla 1, así como su perfil de ácidos grasos en la tabla 2. Como se puede apreciar en la tabla 1, las

Materiales y métodos

dietas cuyo componente graso mayoritario fue manteca de cerdo, aceite de pescado o aceite de oliva se suplementaron con la cantidad necesaria de aceite de soja para asegurar así una ingesta adecuada de ácido linolénico, de acuerdo con la cantidad de este ácido graso determinada en cada una de las grasas, y los requerimientos nutricionales del ratón [67, 68]. Por otra parte, la cantidad del antioxidante t-butilhidroquinona presente en la dieta basada en aceite de pescado se duplicó respecto a la incorporada en las otras dietas, para contrarrestar la mayor susceptibilidad a la oxidación de los PUFA n-3 [68].

Ingredientes	Dieta con aceite de soja (g/kg dieta)	Dieta con manteca de cerdo (g/kg dieta)	Dieta con aceite de pescado (g/kg dieta)	Dieta con aceite de oliva (g/kg dieta)
Almidón de maíz	465,692	465,692	465,692	465,692
Caseína	140	140	140	140
Maltodextrina	155,00	155,00	155,00	155,00
Sacarosa	100,00	100,00	100,00	100,00
Aceite de soja	40,00	9,00	12,00	2,90
Manteca de cerdo	0	31	0	0
Aceite de pescado	0	0	28,00	0
Aceite de oliva	0	0	0	1,10
Celulosa	50,00	50,00	50,00	50,00
Mezcla de minerales	35,00	35,00	35,00	35,00
Mezcla de vitaminas	10,00	10,00	10,00	10,00
L-cisteína	1,80	1,80	1,80	1,80
Bitartrato de colina	2,50	2,50	2,50	2,50
t-butilhidroquinona	0,008	0,008	0,016	0,008

Tabla 1. Composición de las dietas utilizadas para cada grupo de estudio.

Materiales y métodos

Ácidos grasos	Dieta con aceite de soja (%)	Dieta con manteca de cerdo (%)	Dieta con aceite de pescado (%)	Dieta con aceite de oliva (%)
Saturados	15,08	39,55	31,95	14,58
Monoinsaturados	22,08	52,12	29	80,54
Poliinsaturados n-6	55,26	7,81	2,47	4,24
Poliinsaturados n-3	7,57	0,5	36,57	0,65
Ratio n-6/n-3	7,29	15,62	0,06	6,52

Tabla 2. Contenido de ácidos grasos de cada una de las dietas utilizadas para los distintos grupos experimentales.

Al final de la intervención correspondiente y tras 24 horas de ayuno, los animales de cada grupo experimental fueron anestesiados con isoflurano, se extrajo la sangre mediante punción cardíaca para otros análisis [168], y finalmente fueron sacrificados por dislocación cervical. Se extrajo el músculo esquelético de las extremidades posteriores, que fue congelado por inmersión en nitrógeno líquido en un tampón de congelación (Tris-HCl 25mM pH 7.6, manitol 0.21M, sacarosa 0.07M y 10% DMSO como crioprotector) y almacenado posteriormente a -80°C hasta el momento de su uso para las distintas determinaciones bioquímicas.

También se tomaron muestras de músculo gastrocnemio que fueron fijadas en glutaraldehído al 4% preparado en tampón cacodilato 0,1M pH 7.0, para su posterior procesamiento (ver más adelante) y estudio con el microscopio electrónico de transmisión.

Todos los procedimientos llevados a cabo con los animales de experimentación fueron aprobados por el comité de bioética de la Universidad de Córdoba, de acuerdo con la normativa vigente de la Unión Europea y autorizados por la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Junta de Andalucía (código de autorización: 20/04/2016/053).

3.1.4 Preparación de extractos de tejidos

Se prepararon dos tipos de extractos a partir del tejido, un extracto total en *tampón de homogeneización*, que posteriormente se usaría para llevar a cabo fraccionamiento subcelular y la extracción de lípidos; y un extracto en *tampón de lisis* RIPA (del inglés *radioimmunoprecipitation assay*).

3.1.4.1 Homogeneización y fraccionamiento subcelular

La preparación de homogeneizados totales se llevó a cabo a partir del tejido limpio de grasa y tejido conjuntivo, que fue troceado y homogeneizado con un disruptor de tejido mecánico (Ultra-Turrax T25, IKA, Staufen, Alemania) durante 30 s a 4°C, en un tampón de homogeneización cuya composición fue: Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, KCl 40 mM, sacarosa 0,2 M, EDTA 10 mM. Se empleó un volumen de 700µl de tampón por cada media pata de ratón. En el momento del uso, el tampón se suplementó con (se indican a continuación las concentraciones finales en el medio de homogeneización): fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM, DTT 1 mM y 40 µg/ml de una mezcla que contenía quimostatina, leupeptina, antipaina y pepstatina A, en adelante, CLAP. A partir de este homogenado total se llevó a cabo un fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial para obtener las distintas fracciones celulares como se describe a continuación. En primer lugar, se sometió el homogeneizado a centrifugación durante 10 minutos a 420g en una microfuga (MiniSpin, Eppendorf, Alemania) a 4°C, con el fin de sedimentar los núcleos y las células sin romper. El pellet así obtenido se trató para extracción nuclear, que se detalla más adelante, mientras que el sobrenadante se traspasó a un tubo limpio y se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 6700g en la microfuga a 4°C. Tras esta centrifugación, el pellet se resuspendió en tampón de homogeneización y se conservó a -80°C como fracción enriquecida en mitocondrias. El sobrenadante generado en este paso de centrifugación, que contiene los restos de membranas ligeras y citosol, se transfirió a un tubo de ultracentrífuga y se sometió a centrifugación durante 15 minutos a 100000g a 4°C, usando el rotor basculante SW60Ti y una ultracentrífuga L-70 (Beckman Coulter, EE. UU.). El pellet obtenido se resuspendió en tampón de homogeneización y se conservó a -80°C como membranas extramitocondriales. El sobrenadante, que contenía la fracción citosólica, también se conservó a -80°C hasta su utilización.

3.1.4.1.1 Extracción de núcleos

A partir del pellet obtenido en la primera centrifugación del fraccionamiento se procedió a la extracción de proteínas nucleares, siguiendo un protocolo adaptado a partir de Wadman, 1997 [169].

En primer lugar, el pellet nuclear se resuspendió en un tampón cuya composición fue: Hepes 20mM pH 7.9, MgCl₂ 1.5mM, NaCl 420mM, y glicerol al 25% (v/v). En el momento de uso se añadieron PMSF 1mM y 10 µg / ml de CLAP. La mezcla resultante se incubó en hielo durante 30 minutos, sometiéndose a agitación durante 10 segundos

cada 2 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 4°C en la microfuga durante 10 minutos a 9600g. El sobrenadante así obtenido se retiró y se conservó a -80°C como fracción nuclear.

3.1.4.2 Extractos proteicos totales de tejido (extractos en *tampón de lisis RIPA*)

Para la preparación de los extractos en RIPA, de nuevo se partió del tejido limpio de grasa y tejido conjuntivo, el cual se homogenizó con un disruptor de tejido mecánico (Ultra-Turrax T25, IKA, Staufen, Alemania) durante 30 s a 4°C. En este caso la extracción se realizó en tampón RIPA, que contiene Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, desoxicolato al 0.5%, SDS al 0.1%, y Tritón X-100 al 1%. Al igual que con el tampón de homogeneización, en el momento de uso se suplementó el tampón RIPA con DTT 1 mM, PMSF 1 mM, 10 µg / ml de CLAP y cócteles de inhibidores de fosfatasa 2 y 3 (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:100.

Una vez homogeneizado el tejido, la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante 15 segundos en vortex y posteriormente se centrifugó a 10.000 g durante 15 min a 4°C, con el fin de separar el sobrenadante, que contenía las proteínas extraídas, del residuo no extraíble que queda en el pellet. Este sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y se almacenó a -80°C hasta el momento de su uso.

3.2 Determinación de la cantidad de proteína en las muestras

La cantidad de proteína se determinó en todos los casos utilizando la modificación de Stoscheck [170] del método de Bradford [171]. Se tomaron triplicados de cada una de las muestras (2-5µl) y se mezclaron con 50µl de NaOH, que ayuda a la solubilización, mejora la sensibilidad del ensayo y disminuye la variabilidad entre distintos tipos de proteínas [170]. A continuación, se añadió 1 ml de reactivo de Bradford (Bio-Rad, Hércules, California, Estados Unidos) y la mezcla resultante se agitó con vórtex. Tras una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, se midió la absorbancia a 595nm en un espectrofotómetro DU-640 (Beckman Coulter, EE. UU.). La concentración de proteína en la muestra se determinó extrapolando los valores de absorbancia obtenidos en una recta patrón realizada con concentraciones conocidas de γ -globulina bovina (0 a 20 µg/ml).

3.3 Determinación de proteínas mediante western-blot

3.3.1 Preparación de muestras

Para proceder a la separación electroforética, se prepararon las muestras a partir de 30µg de proteína procedente de los extractos de RIPA o de la fracción celular correspondiente en cada caso que se mezclaron con tampón de carga SDS-DTT 1X (Tris-HCl 60 mM, pH 6,8, sacarosa al 10%, EDTA 2 mM, SDS al 1,5%, DTT 20 mM y azul de bromofenol al 0,01 %), al que se añadieron los inhibidores de proteasas PMSF (stock a 100mM) y CLAP (stock a 5mg/ml) en proporción 18:1:1.

Posteriormente las muestras fueron hervidas a 100°C durante 5 minutos. En caso de que las muestras se fueran a utilizar para detectar proteínas de membrana, el calentamiento de las muestras se limitó a 45°C durante 15 min para evitar las agregaciones que se producen en las proteínas con dominios hidrofóbicos cuando se someten a hervido en presencia de SDS. Excepcionalmente, cuando lo que se quería medir eran las subunidades de los complejos de la cadena de transporte de electrones, el calentamiento de las muestras se limitó aún más (5 min a 37°C), para evitar la pérdida de la señal del complejo IV, que disminuye con el aumento de la temperatura, de acuerdo con las indicaciones del fabricante del kit inmunológico de detección (<https://www.thermofisher.com/antibody/product/OxPhos-Rodent-WB-Antibody-clone-Cocktail-Cocktail/45-8099>).

3.3.2 Electroforesis

La separación de proteínas se realizó mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) en geles prefabricados de poliacrilamida con un gradiente del 4% al 20%, usando la tecnología Stain Free (Geles Criterion Stain Free de Bio-Rad), que permite la visualización directa de las bandas de proteína en el gel tras una activación de 45 segundos con luz UV, al incrementarse de esta forma la fluorescencia derivada de los residuos de triptófano de las proteínas.

Se emplearon geles de 18 o 26 pocillos, en función del número de muestras a comparar, utilizando siempre uno de los carriles para cargar 3µl de los marcadores de peso molecular (Precision Plus Protein All Blue Standards, Bio-Rad).

La separación electroforética se llevó a cabo en una cubeta Criterion System (Bio-Rad), aplicando un voltaje de 200V y un amperaje máximo de 150mA durante

aproximadamente 40 minutos, en un tampón que contenía Tris 25mM pH 8.3, glicina 192mM y 0.1% SDS.

3.3.3 Transferencia y control de carga

Una vez completada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa incluida en el kit Trans-blot Turbo (Bio-Rad), utilizado con el sistema de transferencia del mismo nombre con un programa rápido de 25 voltios y un amperaje máximo de 2,5A durante 7 minutos.

Finalizada la transferencia, se procedió a la tinción de la membrana con el colorante rojo Ponceau S diluido al 0,1% en ácido acético al 5%, durante 5 minutos en agitación a temperatura ambiente. El exceso de colorante se eliminó con lavados sucesivos con ácido acético al 1%. La imagen de la membrana teñida con rojo Ponceau S, que posteriormente se utilizaría para cuantificar la carga de proteína en las bandas, se digitalizó en el sistema de documentación de geles ChemiDoc Touch Imaging System de Bio-Rad.

Seguidamente se procedió al bloqueo de la membrana mediante dos lavados de 30 minutos en agitación y a temperatura ambiente con TTBSL (Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl al 0,85%, Tween 20 al 0,05% y leche en polvo desnatada al 5%).

3.3.4 Inmunotinción y revelado

Una vez que se completó el bloqueo de la membrana, se procedió a incubarla con el anticuerpo primario frente a la proteína de interés diluido en TTBSL. Esta incubación se prolongó toda la noche (aproximadamente 12 horas) en agitación a 4 °C.

Posteriormente se procedió a la retirada del anticuerpo primario, y se sometió a la membrana a 3 lavados de 5 minutos cada uno en agitación y a temperatura ambiente con TTBS (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, NaCl al 0,85%, y Tween-20 al 0,05%), para retirar el anticuerpo primario no unido. Tras los lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario adecuado para detectar el primario, acoplado con la enzima peroxidasa y diluido en TTBSL según correspondiera. La incubación con el anticuerpo secundario se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora en agitación. A continuación, se retiró dicho anticuerpo, volviéndose a realizar 3 lavados de 5 minutos cada uno en agitación a temperatura ambiente con TTBS, seguidos de un lavado adicional con TBS (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 y NaCl al 0,85%) a temperatura ambiente durante 10 minutos y en agitación, para eliminar los restos de detergente del tampón TTBS antes de proceder al revelado mediante reacción quimioluminiscente, como se describe a continuación.

Materiales y métodos

En la tabla 3 se muestran los anticuerpos utilizados, la concentración de uso y su referencia comercial.

Anticuerpo 1 ^{ario}	Dilución	Referencia	Anticuerpo 2 ^{ario}	Dilución	Referencia
CYB5R3	1:50000	10894-1-AP	Anti Ig-G de conejo	1:5000	Sigma A-9169
Anti-Cit c	1:5000	Ph 65981-A	Anti Ig-G de ratón	1:2000	Sigma A-9044
Anti-BCL-2	1:500	SC-492	Anti Ig-G de conejo	1:2000	Sigma A-9169
Anti-AIF	1:1000	SC-9416	Anti Ig-G de cabra	1:5000	Sigma A-5420
Anti-Caspasa 3	1:1000	Cell signaling #9662S	Anti Ig-G de conejo	1:2500	Sigma A-9169
Anti-Caspasa 9	1:1000	Cell signaling #9504	Anti Ig-G de conejo	1:2500	Sigma A-9169
Anti-Caspasa 8	1:1000	Cell signaling #4790	Anti Ig-G de conejo	1:2000	Sigma A-9169
Anti-APAF-1	1:1000	SC-33870	Anti Ig-G de cabra	1:5000	Sigma A-5420
Anti-BAX	1:1000	SC-7480	Anti Ig-G de ratón	1:5000	Sigma A-9044
Anti-XIAP	1:1000	SC-8789	Anti Ig-G de cabra	1:2000	Sigma A-5420
Anti-BID	1:1000	SC-11423	Anti Ig-G de conejo	1:2000	Sigma A-9169
Anti- ENDOG	1:1000	SC-26923	Anti Ig-G de cabra	1:10000	Sigma A-5420
Anti-BECLIN	1:1000	SC-10086	Anti Ig-G de cabra	1:5000	Sigma A-5420
Anti-PINK1	1:1000	SC-33796	Anti Ig-G de conejo	1:5000	Sigma A-9169
Anti-PARKIN	1:100	Cell signaling #2132	Anti Ig-G de conejo	1:5000	Sigma A-9169
Anti-P62	1:3000	P0067	Anti Ig-G de conejo	1:5000	Sigma A-9169
Anti-LC3 AB	1:1000	4108	Anti Ig-G de conejo	1:5000	Sigma A-9169
Anti-Complejos mitocondriales*	1:4000	Life Technologies	Anti Ig-G de ratón	1:5000	Sigma A-9044

Materiales y métodos

Anticuerpo 1 ^{ario}	Dilución	Referencia	Anticuerpo 2 ^{ario}	Dilución	Referencia
		#458099			
Anti-MFN-1	1:1000	SC-50330	Anti Ig-G de conejo	1:5000	Sigma A-9169
Anti-MFN-2	1:500	SC-50331	Anti Ig-G de conejo	1:5000	Sigma A-9169
Anti-TFAM	1:1000	SC-2358	Anti Ig-G de cabra	1:5000	Sigma A-5420
Anti-VDAC	1:1000	SC-98708	Anti Ig-G de conejo	1:5000	Sigma A-9169
Anti-FIS1	1:500	SC-98900	Anti Ig-G de conejo	1:5000	Sigma A-9169
Anti-DRP-1	1:500	SC-32898	Anti Ig-G de conejo	1:5000	Sigma A-9169
Anti-NRF-1	1:2000	SC-33771	Anti Ig-G de conejo		Sigma A-9169
Anti-MFF	1:1000	Cell signaling #84580	Anti Ig-G de conejo	1:5000	Sigma A-9169
Anti-BIP	1:1000	Cell signaling #3177	Anti Ig-G de conejo	1:2000	Sigma A-9169
Anti-IREα	1:1000	Cell signaling #3294	Anti Ig-G de conejo	1:2000	Sigma A-9169
Anti-FDPS	1:1000	ab153805	Anti Ig-G de conejo	1:5000	Sigma A-9169
Anti-COQ7	1:1000	15083-1-AP	Anti Ig-G de conejo	1:5000	Sigma A-9169

Tabla 3. Lista de anticuerpos primarios y secundarios usados en este estudio. Se muestra la concentración a la que se ha usado cada anticuerpo y la referencia comercial. * Esta mezcla de anticuerpos detecta la subunidad NDUFB8 del complejo I (subunidad B8 de la NADH:ubiquinona oxidoreductasa), la subunidad SDHB del complejo II (subunidad B del complejo succinato deshidrogenasa), la subunidad UQCRC2 del complejo III (subunidad 2 del complejo citocromo b-c1), la subunidad MTCO1 del complejo IV (citocromo c oxidasa I codificada mitocondrialmente) y la subunidad ATP5A del complejo V (subunidad α del complejo V).

Para el revelado se empleó la solución Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad), que contiene el sustrato de la peroxidasa (a la que están conjugados los anticuerpos secundarios) más un potenciador, que permiten que ocurra la reacción quimioluminiscente donde se haya unido el anticuerpo secundario. La membrana se incubó con esta solución a temperatura ambiente durante 5 minutos y en oscuridad e.

Posteriormente, se procedió al revelado de la señal quimioluminiscente en el sistema de documentación de geles ChemiDoc Touch Imaging System de Bio-Rad.

Tras el revelado las membranas se conservaron a -20 °C para posibles usos posteriores.

3.3.5 Cuantificación de la señal

La cuantificación de la señal correspondiente a las bandas obtenidas en el revelado de la inmunotinción se realizó con el software Image Lab™ (Bio-Rad), normalizando los valores respecto a la cantidad de proteína cargada en cada pocillo, la cual fue calculada a partir de la imagen de la membrana teñida con el colorante rojo Ponceau S. Los resultados se representan como densidad integrada en unidades arbitrarias (u.a.).

3.4 Determinación de los niveles de Coenzima Q

3.4.1 Extracción de lípidos

Para la extracción de lípidos se partió de 60µl de homogenado total, que se solubilizó añadiendo 10 µl de SDS al 10%, seguido de 200 µl de etanol-isopropanol en proporción 95:5. Se agitó vigorosamente, se añadieron 500 µl de hexano, se volvió a agitar y se centrifugó durante 5 minutos a 10.000g a 4°C. Tras la centrifugación, se recogió la fase superior de hexano, donde se encuentran los lípidos, y se repitió la adición de hexano a la fase inferior y la centrifugación para optimizar el rendimiento. De nuevo se recogió la fase de hexano, que se combinó con la anterior y se evaporó el solvente en un concentrador de vacío o “speed-vac” Univapo 150H (Uniequip, Alemania). El residuo lipídico seco se almacenó a -80°C hasta su uso.

3.4.2 Medida de los niveles de Coenzima Q mediante HPLC

Las medidas de HPLC se llevaron a cabo con el equipo Beckman System Gold (Beckman Coulter, EE. UU.) conectado a un detector electroquímico Coulochem II (ESA, Chelmsford, Massachusetts, EE. UU.). La separación cromatográfica se realizó en una columna de fase reversa C18 (4.6 mm × 25 cm, Ultrasphere ODS, de 5 µm de tamaño de partícula), con una fase móvil cuya composición fue metanol-isopropanol-acetato de amonio 1M pH 4,4 en proporción 53:45:2, y con un flujo de 1ml/min. Los potenciales fijados en los electrodos 1 y 2 de la célula analítica (ESA, modelo 5010) fueron -500mV y +300mV, respectivamente.

Los extractos lipídicos se resuspendieron en 30µl de metanol y se sometieron entonces a un proceso de reducción previo a la inyección mediante la adición de 1µl de borohidruro

sódico 50mM, generándose así las hidroquinonas correspondientes. Este procedimiento no sólo disminuye el tiempo de la cromatografía (el tiempo de retención de las hidroquinonas es sensiblemente menor que el de las quinonas), sino que aumenta considerablemente la sensibilidad en la detección de los analitos en el electrodo 2 (oxidante) de la célula analítica. De acuerdo con esta metodología, el tiempo de retención de las hidroquinonas generadas fue de 10-11 minutos para el Q₉ y de 13-14 minutos para el Q₁₀, como se puede comprobar en el cromatograma que se muestra en la figura 14. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente.

Para la cuantificación de Q₉ y Q₁₀, las unidades de área de los picos generados se refirieron a un patrón de Q₁₀ de concentración conocida, inyectado antes y después de las muestras. Por último, los datos se normalizaron respecto a la cantidad de proteína de cada muestra para expresar el contenido cuantificado como pmoles de CoQ/ mg proteína.

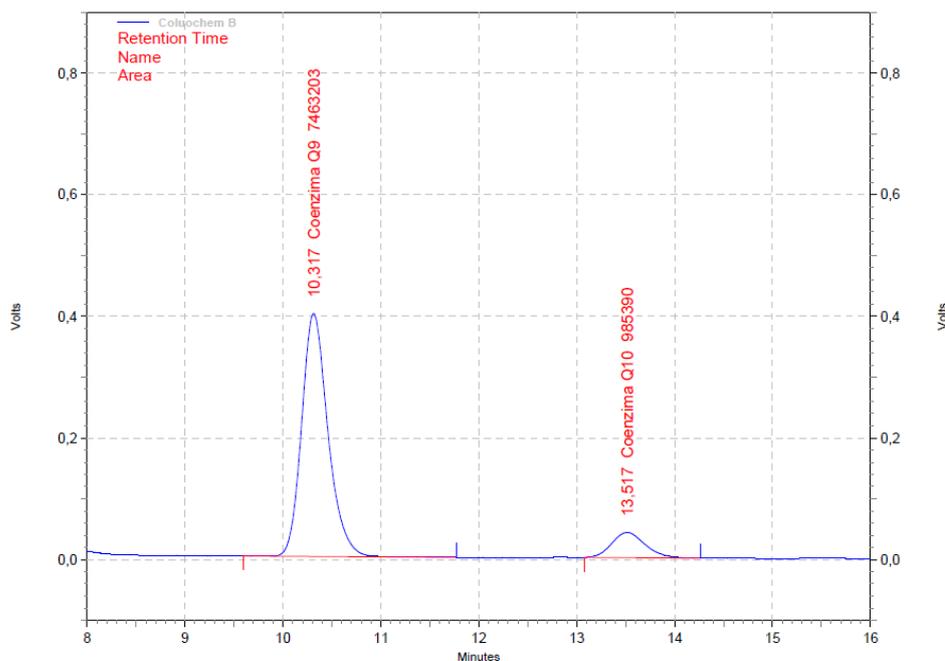


Figura 14. Cromatograma representativo de la detección electroquímica del CoQ en extractos lipídicos de músculo esquelético. El primer pico observado corresponde a CoQ₉ y el segundo a CoQ₁₀.

3.5 Microscopía electrónica

3.5.1 Inclusión de las muestras de tejido

Tras sacrificar a los animales, el músculo de la pata trasera se lavó en PBS y se limpió de grasa y tejido conjuntivo. Se tomaron muestras de gastrocnemio, que se trocearon en bloques de 1mm³ y se fijaron durante al menos 12 horas a 4°C en una solución que

contenía 2% de paraformaldehído, 2,5% de glutaraldehído en tampón cacodilato de sodio 0.1M pH 7.4. Transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron tres veces durante 20 minutos cada vez, en tampón cacodilato, y se postfijaron durante 1 hora a 4°C en una solución de tetróxido de osmio al 1% preparada en tampón cacodilato. Seguidamente, las muestras se volvieron a lavar tres veces en tampón cacodilato y se deshidrataron en una serie de alcoholes de gradación creciente (50° - 70° - 90° - 100°, este último por triplicado) durante 20 minutos en cada uno a 4°C. A continuación, las muestras se incubaron con óxido de propileno, que actúa como vehículo con el medio de inclusión, y se fueron infiltrando a 4°C secuencialmente en resina Embed812 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, Estados Unidos) en proporciones óxido de propileno: resina 2:1, 1:1 y 1:2. Cada uno de los pasos tuvo una duración de 8 horas. Finalmente, las muestras se transfirieron a resina pura, donde se mantuvieron 24 horas más, antes de realizar los bloques.

Los bloques se realizaron orientando las muestras en el borde de los moldes de silicona y empleando resina fresca. Una vez elaborados, se llevaron al horno a 65°C donde se dejaron polimerizar durante 48 horas.

3.5.2 Tallado, corte y obtención de imágenes

Durante el tallado, en primer lugar, se les retiró a los bloques el exceso de resina con ayuda de una cuchilla de metal y seguidamente, se realizó el tallado propiamente dicho con una cuchilla de vidrio en el ultramicrotomo Ultracut Reicher (Leica, Wetzlar, Alemania).

Una vez tallados los bloques, se procedió a la obtención de cortes semifinos (0,5-1 µm de grosor), que se montaron sobre un portaobjetos para su tinción durante 20 segundos con azul de toluidina (preparada al 1% en una solución de borax al 1%). Estos cortes permitían una primera visualización del material para seleccionar los bloques de interés. A continuación, se realizaron los cortes finos (40-60 nm de grosor), que se montaron sobre rejillas de níquel.

El contraste de las muestras se realizó a temperatura ambiente mediante tinciones sucesivas de dos minutos en las soluciones metálicas de acetato de uranilo y citrato de plomo (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EE. UU.). Por último, las muestras se visualizaron y fotografiaron en el microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM

1400 del Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba, España.

3.5.3 Análisis ultraestructural

Para el análisis ultraestructural se tomaron micrografías a 20.000 aumentos, y en ellas se analizaron mitocondrias y figuras de autofagia, con el software ImageJ (NIH; Bethesda, MD, USA) obteniéndose parámetros planimétricos y estereológicos como área, circularidad, número de figuras por área (Na) y área fraccional (FA).

Debido al gran tamaño de las células musculares se tomaron como promedio 8 micrografías aleatorias por célula de forma que las medidas realizadas fueran representativas de la célula completa. Para llevar a cabo las medidas propiamente dichas, se delimitó en primer lugar el espacio ocupado por célula, y seguidamente se fueron marcando las distintas mitocondrias o figuras de autofagia, en caso de que las hubiera, como se muestra en la figura 15. De esta forma se obtuvieron valores de área y circularidad, y se procedió al cálculo de Na y área fraccional, como se detalla a continuación.

$$Na = \frac{\text{número de mitocondrias o figuras de autofagia}}{\text{área de célula } (\mu m^2)}$$

$$FA = \frac{\Sigma \text{ área mitocondrias o figuras de autofagia}}{\text{área de célula } (\mu m^2)}$$

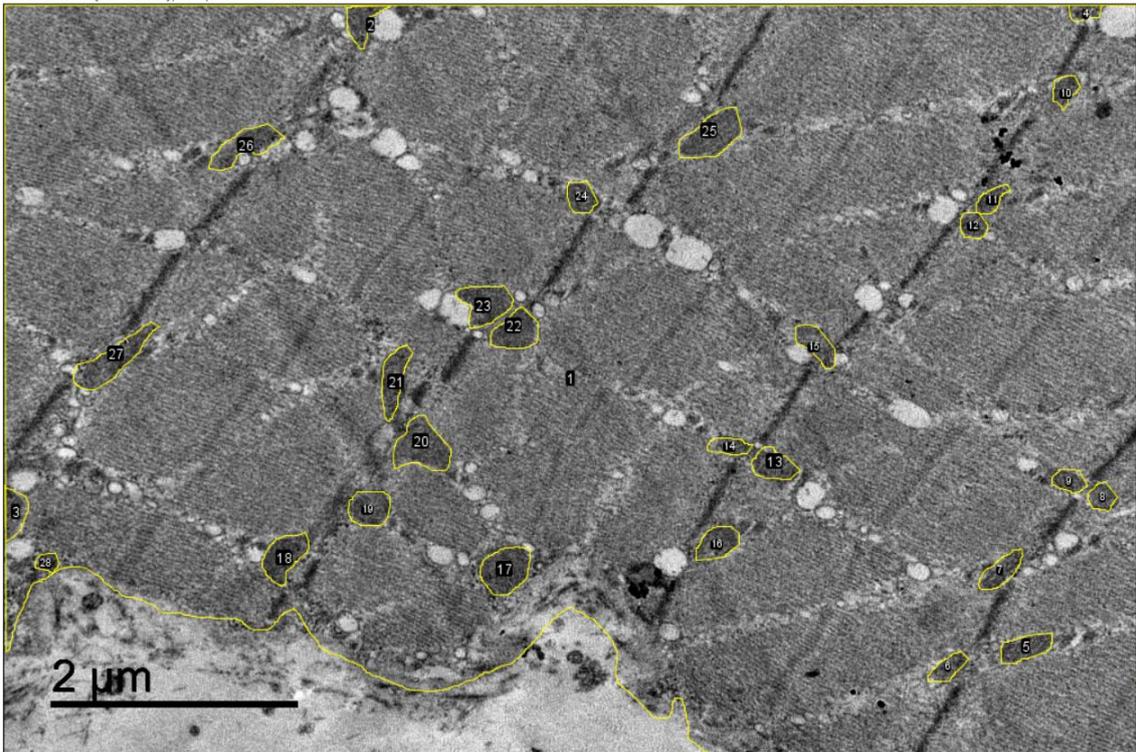


Figura 15. Análisis de ultraestructura mitocondrial en músculo esquelético con el software *ImageJ*. La imagen ejemplifica cómo se delimitaron el área celular y el área de las distintas mitocondrias en las micrografías analizadas. Imagen tomada a 20 000 aumentos.

Para los análisis estereológicos se empleó el método de “Análisis de puntos” de Weibel [172], por el cual se superpone sobre la micrografía una plantilla de puntos, como se muestra en la figura 16, y se lleva a cabo un recuento del número de puntos que caen dentro de las figuras de interés (mitocondrias o figuras de autofagia, en nuestro caso) y se refiere al número de puntos totales dentro de la célula, permitiendo calcular la densidad de volumen (V_v), expresada en $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$, cuya fórmula se muestra a continuación.

$$V_v = \frac{\text{número de puntos ocupados por mitocondrias o figuras de autofagia}}{\text{número de puntos ocupados por célula}}$$

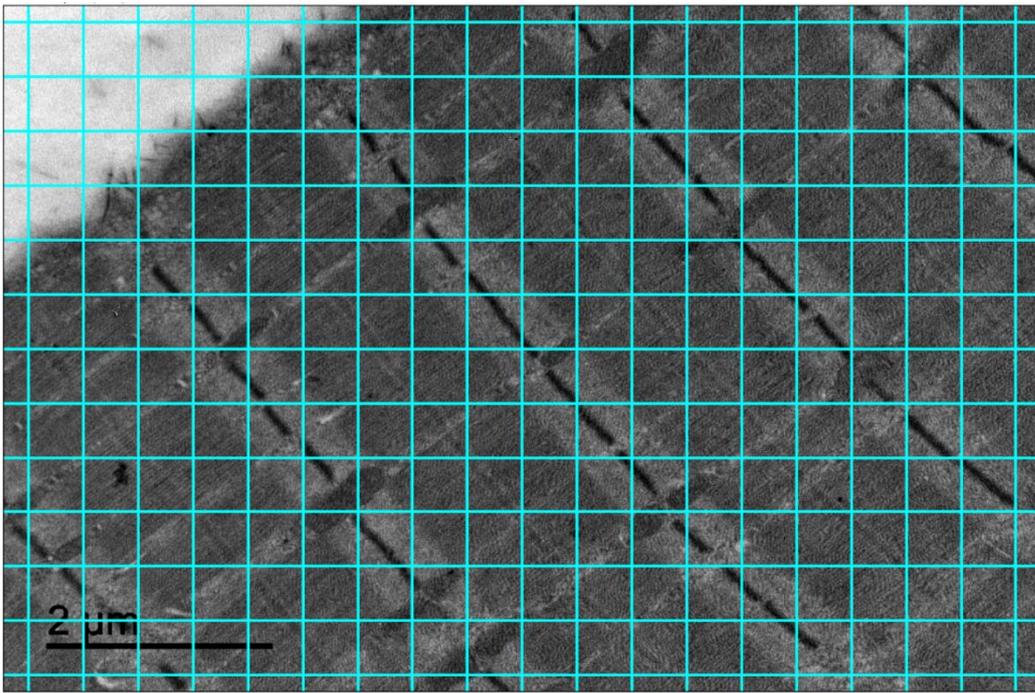


Figura 16. Análisis estereológico mitocondrial en músculo esquelético con el software ImageJ. La imagen muestra cómo se superpuso la plantilla de puntos descrita sobre las distintas micrografías analizadas para llevar a cabo el estudio estereológico. Imagen tomada a 20 000 aumentos.

3.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados y su representación gráfica, se empleó el software GraphPad Prism8 (Graphpad Software Inc, San Diego, CA, EE. UU.).

Todos los datos que se muestran en este documento son medias \pm el error estándar de la media (SEM) de al menos 4 réplicas biológicas. La normalidad de los datos se verificó utilizando los tests estadísticos de Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino-Pearson y Shapiro-Wilk.

Las medias se compararon mediante el test paramétrico t-student de dos colas cuando los datos seguían una distribución normal. En caso de que los datos no se ajustaran a una distribución normal, se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney de dos colas. Los efectos globales de la edad, la dieta o el genotipo se obtuvieron con el test ANOVA bidireccional. Las diferencias significativas se expresaron de la siguiente manera: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) y **** ($p < 0.0001$). Las diferencias que sólo fueron estadísticamente significativas cuando se aplicó un test con una sola cola se marcaron como tendencia.

Materiales y métodos

Las diferencias en los tamaños mitocondriales entre los distintos grupos experimentales se evaluaron mediante un análisis de distribución de frecuencias. Para obtener las distribuciones de frecuencias se pasaron los valores de área a nm^2 y a escala logarítmica, tras lo que se realizó el análisis de frecuencias mostrando las frecuencias acumuladas. Estas distribuciones de frecuencias se compararon mediante la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov.

Capítulo 1:
Influencia del
componente graso de
la dieta sobre la
adaptación
metabólica en
ratones transgénicos
CYB5R3

4 Capítulo 1: Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

4.1 Resultados

4.1.1 Sobreexpresión de CYB5R3

Previamente a los distintos estudios llevados a cabo en nuestra investigación quisimos comprobar el grado de sobreexpresión CYB5R3 en el tejido muscular de los diferentes grupos dietéticos experimentales. Como se puede observar en la figura 17A en todos los casos se consiguió la sobreexpresión de la enzima de manera exitosa en los animales TG independientemente de la dieta, lo cual hace del músculo esquelético un tejido idóneo para estudiar los efectos directos de la sobreexpresión de CYB5R3. Respecto a los animales TG, encontramos que el componente graso mayoritario de la dieta tuvo un impacto significativo sobre los niveles de CYB5R3, de modo que los ratones TG alimentados con la dieta de aceite de oliva fueron los que mostraron unos menores niveles de CYB5R3 en músculo esquelético, en comparación con los animales del mismo genotipo alimentados con dietas basadas en manteca, aceite de soja o de pescado (Figura 17A). Debido a los bajos niveles de CYB5R3 encontrados en unos de los animales TG alimentados con la dieta de aceite de olive (ver Figura 17A), se ha procedido a eliminar los valores obtenidos para este animal en todos los marcadores analizados.

Por otro lado, dado que las condiciones para cuantificar los niveles de CYB5R3 en los animales TG hacían que la proteína fuera prácticamente indetectable en los animales WT, se procedió a la sobreexposición de la membrana para poder cuantificar los niveles del polipéptido en estos últimos. Los resultados obtenidos revelaron que los animales alimentados con la dieta basada en manteca de cerdo tenían unos niveles de CYB5R3 significativamente mayores que los alimentados con las dietas de aceite de soja y aceite de pescado (Figura 17B).

Cuando se midieron los niveles de la enzima en extractos mitocondriales, de nuevo se observó claramente la sobreexpresión en los animales TG de todos los grupos experimentales, sin observarse en este caso diferencias debidas a la dieta (Figura 17C). Como ya se ha comentado, se sobreexpuso la membrana para poder cuantificar los niveles

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

de CYB5R3 en los animales WT. En este caso, se observó que los animales WT alimentados con la dieta de aceite de pescado tenían niveles significativamente mayores de CYB5R3 que los animales alimentados con la dieta de aceite de soja (Figura 17D), lo cual contrasta con lo encontrado para los extractos completos de tejido (ver Figura 17B).

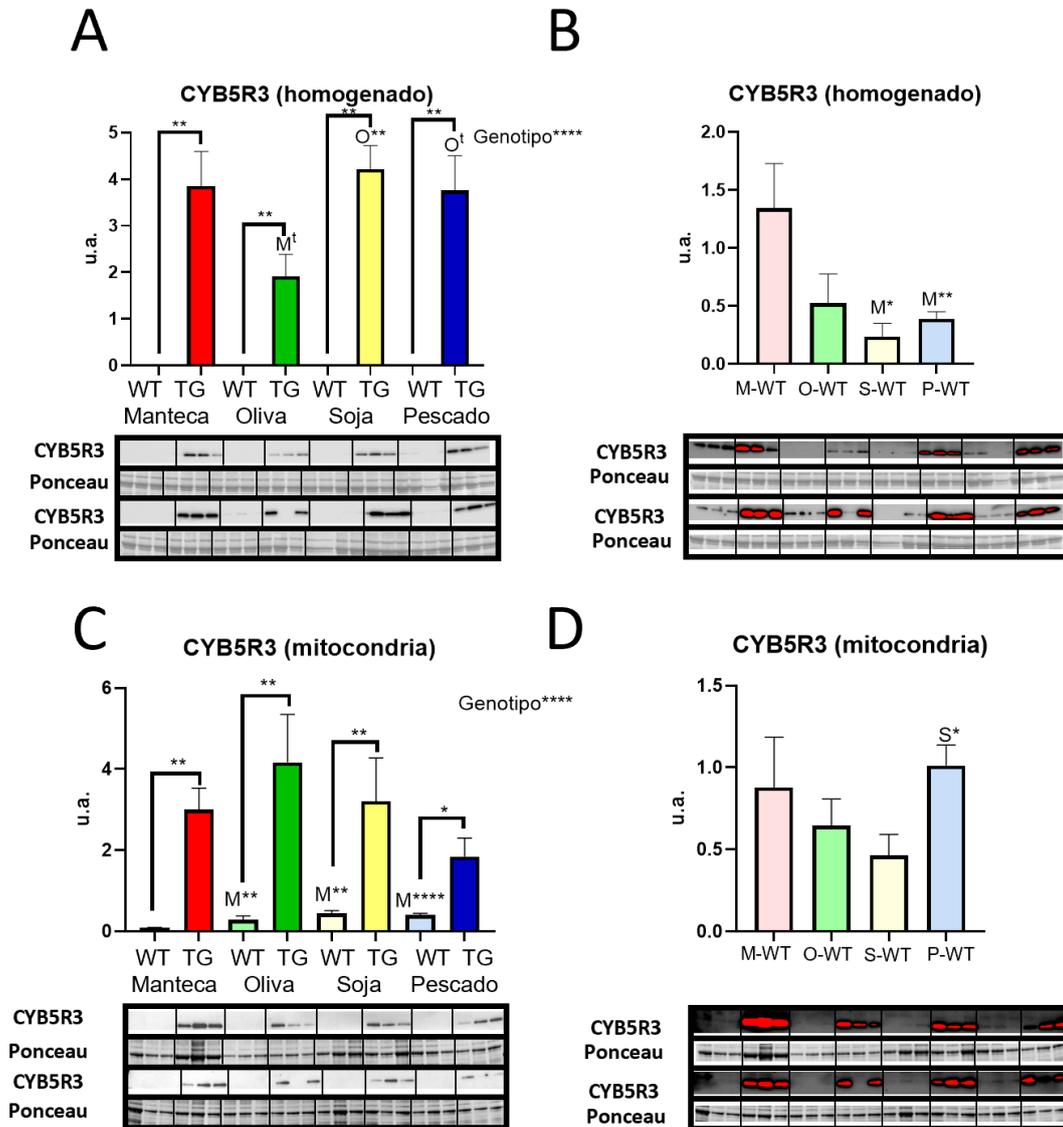


Figura 17. Niveles de expresión de CYB5R3 en músculo esquelético de las extremidades traseras de ratones alimentados con dietas de diferente componente graso. Los niveles de CYB5R3 están medidos en homogenados totales (A y B), y fracciones enriquecidas en mitocondrias (C y D). Las figuras 1B y 1D muestran las mismas transferencias de Western que las que se muestran en las Figuras 1A y 1C, pero las imágenes se obtuvieron después de la sobreexposición en la reacción de quimioluminiscencia para revelar la señal de los ratones WT mientras se satura la señal de los ratones TG (visto como bandas rojas). Debajo de cada gráfica se muestran las transferencias de Western teñidas con anticuerpos y con Ponceau S. Los datos representados son la media \pm SEM de 6 repeticiones. (u.a. = unidades arbitrarias).

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

4.1.2 Niveles de complejos mitocondriales

Para profundizar en el estudio de la respuesta fisiológica mitocondrial en función de la sobreexpresión de CYB5R3 y del componente graso de la dieta, se midieron los niveles de los complejos mitocondriales en muestras de músculo esquelético procedentes de los distintos grupos experimentales. En lo que respecta a los efectos de la sobreexpresión de CYB5R3 (TG vs. WT) sobre los niveles de complejos mitocondriales, encontramos una fuerte influencia del componente graso mayoritario de la dieta, de modo que no observamos cambios en función del genotipo en el caso de los ratones alimentados con dietas basadas en manteca o en aceite de oliva, siendo éstas las que contenían unos mayores niveles de ácidos grasos saturados y monoinsaturados (Tabla 2). Por el contrario, se evidenciaron efectos muy marcados de la sobreexpresión de CYB5R3 sobre los niveles de complejos mitocondriales cuando los animales se alimentaron con dietas muy ricas en PUFA. En este caso, los principales efectos se encontraron con la dieta basada en aceite de soja, donde la sobreexpresión de CYB5R3 produjo aumentos significativos en los niveles de los complejos I y II, y una tendencia a incrementar el complejo III, respecto a los animales WT alimentados con la misma dieta (Figura 18A, 18B y 18C). Un incremento similar fue también observado respecto a los niveles de VDAC, marcador de abundancia mitocondrial (Figura 18F) [173]. Sin embargo, en el caso de la dieta basada en aceite de pescado, la sobreexpresión de CYB5R3 produjo una disminución significativa del complejo II, efecto contrario al producido por el aceite de soja (Figura 18B), a pesar de que el marcador de abundancia mitocondrial (VDAC) se incrementó en los ratones TG en comparación con los WT de manera similar a lo observado con aceite de soja (Figura 18F).

Cuando comparamos entre sí los niveles de complejos mitocondriales de los distintos grupos dietéticos de ratones TG encontramos también efectos muy interesantes del componente graso de la dieta. En este sentido, los ratones TG alimentados con la dieta de aceite de soja mostraron los mayores niveles de complejo I, encontrándose también un aumento en los niveles de este complejo en el grupo de manteca respecto al de aceite de pescado (Figura 18A). En el caso del complejo II, fueron también los animales TG alimentados con la dieta de aceite de soja los que presentaron unos mayores niveles de este marcador (Figura 2B) en comparación con los demás grupos dietéticos. En lo que respecta al complejo V también encontramos los mayores niveles en el grupo de aceite

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

de soja, siendo las diferencias significativas respecto al grupo de manteca y de aceite de pescado. Por el contrario, a pesar del aumento significativo del marcador de abundancia mitocondrial indicado anteriormente (VDAC, ver Figura 18F), los menores niveles complejos mitocondriales se encontraron de manera general en los ratones alimentados con la dieta de aceite de pescado (ver Figuras 18A, 18B, 18C, 18D y 18E).

En lo que respecta a la influencia del componente graso mayoritario de la dieta sobre los niveles de complejos mitocondriales en los animales WT, encontramos que la dieta de aceite de pescado produjo un descenso en los niveles de complejo I respecto a la dieta de aceite de oliva y una tendencia hacia la disminución respecto a la dieta de aceite de soja (Figura 18A), mientras que en los niveles de complejo II se produjo un descenso significativo respecto a la dieta de aceite de soja y una tendencia respecto a la dieta de aceite de oliva (Figura 18B). También observamos una tendencia a disminuir los niveles de complejo III respecto a las dietas de manteca y aceite de oliva (Figura 18C), un descenso significativo en los niveles de complejo IV respecto a todas las demás dietas (Figura 18D) y, por último, una disminución en los niveles de complejo V respecto a la dieta de manteca, junto a una tendencia hacia la disminución respecto a las dietas de aceite de soja y oliva (Figura 18E).

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

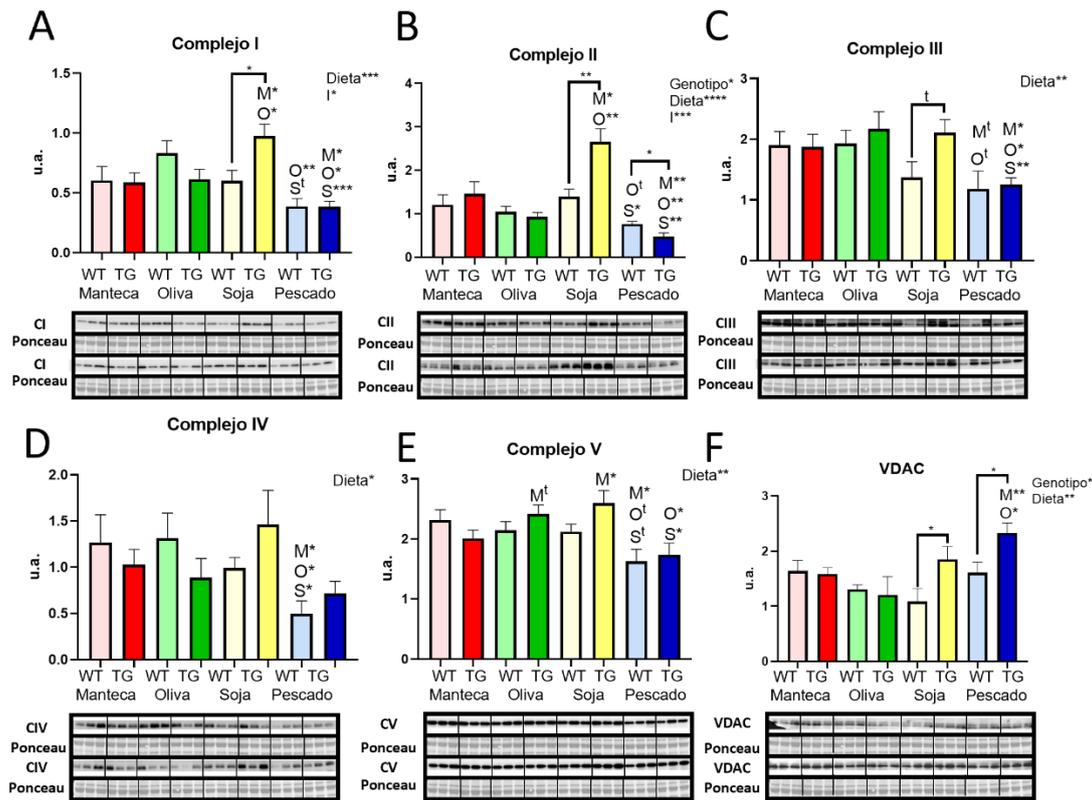


Figura 18. Niveles de los complejos de la ETC y VDAC cuantificado en músculo esquelético de ratones alimentados con dieta de manteca de cerdo, aceite de oliva, aceite de soja y aceite de pescado. Los paneles de A a E representan la cuantificación de subunidades representativas de los cinco complejos de la ETC, y el panel F muestra los niveles de VDAC. Las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y Ponceau S correspondientes se muestran debajo de cada gráfica. Los datos representados son la media \pm SEM de 6 repeticiones. (u.a. = unidades arbitrarias).

Las alteraciones en los niveles de varios complejos mitocondriales por la dieta y/o el genotipo que se muestran en la figura anterior podrían deberse a cambios en la abundancia mitocondrial del tejido o modificaciones en la composición intrínseca de las membranas mitocondriales. Para distinguir entre estas dos posibilidades, calculamos los niveles de complejos mitocondriales relativos a VDAC, como se muestran en Grünewald *et al.* [173]. Los resultados obtenidos muestran que al dividir los complejos mitocondriales entre VDAC se pierden los efectos causados por el genotipo en los animales sometidos a la dieta de aceite de soja (Figura 19A, 19B, 19C, 19D y 19E), observándose solo un efecto de la dieta de pescado disminuyendo los niveles de los distintos complejos, independientemente del genotipo (Figura 19A, 19B, 19C, 19D y 19E).

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

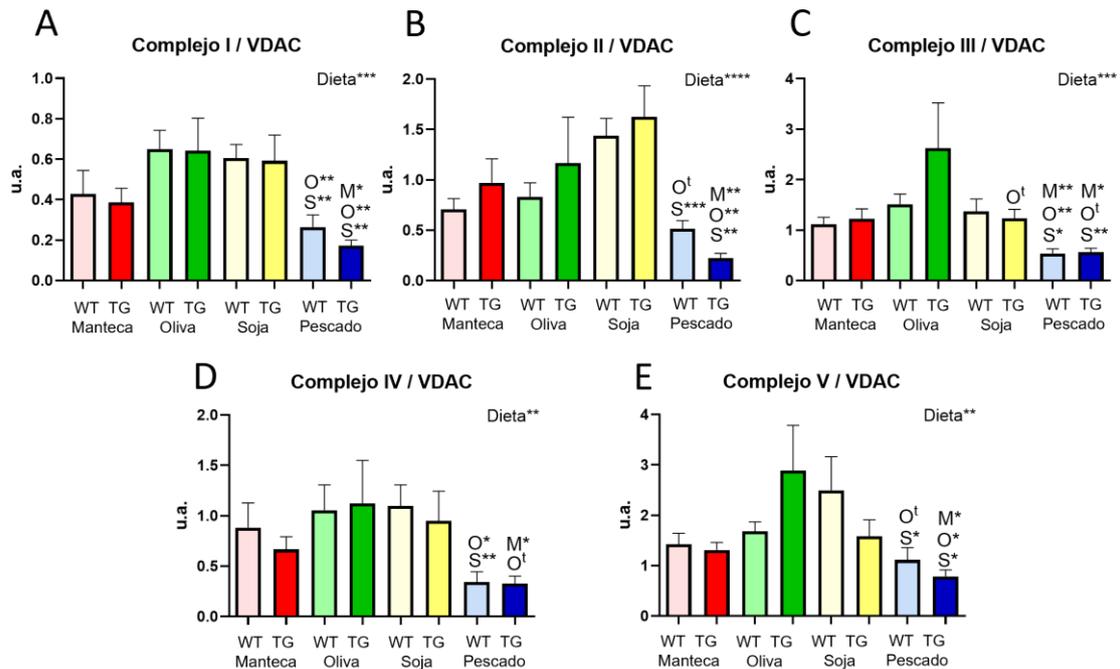


Figura 19: Niveles de los complejos mitocondriales referidos a VDAC en animales sometidos a dietas con diferente componente graso. Los datos representados son la media \pm SEM de 6 repeticiones. (u.a. = unidades arbitrarias).

4.1.3 Marcadores de dinámica mitocondrial

A continuación, se procedió al estudio de marcadores de dinámica mitocondrial. Concretamente, se determinaron los niveles de las mitofusinas 1 y 2 como marcadores de fusión, y de FIS1, MFF y DRP-1 como marcadores de fisión mitocondrial.

La sobreexpresión de CYB5R3 produjo un descenso en los niveles de MFN-1 y MFN-2, en los ratones alimentados con la dieta de aceite de soja, pero estos marcadores de fusión no se modificaron por sobreexpresión de CYB5R3 cuando los animales se alimentaron con dietas basadas en manteca, aceite de oliva o aceite de pescado (Figuras 20A y 20B).

Respecto al efecto del componente graso de la dieta sobre los marcadores de fusión en los animales TG, solo se observó un descenso significativo en los niveles de MFN-1 en los ratones alimentados con la dieta de aceite de pescado, respecto a los alimentados con la dieta de aceite de oliva (Figura 20A). En el caso de MFN-2, se evidenció un descenso de sus niveles en los animales TG alimentados con la dieta de aceite de soja respecto a los alimentados con la dieta de manteca y de aceite de oliva (Figura 20B). Este mismo patrón de cambios se observó en los animales alimentados con la dieta de aceite de pescado, siendo los cambios menos acusados (Figura 20B). En el caso de los animales

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

WT, se pudo observar que las dietas de aceite de soja y de oliva incrementaron los niveles de MFN-1, respecto a los alimentados con la dieta de manteca, mientras que los alimentados con la dieta de aceite de pescado experimentaron una disminución en los niveles de MFN-1 respecto a todas las demás dietas (Figura 20A). En los niveles de MFN-2 no se observaron cambios debido al componente graso de la dieta en los animales WT (Figura 20B).

Pasando a los marcadores de fisión, no se encontraron cambios para FIS1 debido a la sobreexpresión de CYB5R3 en ningún grupo dietético (Figura 20C). Comparando los grupos de animales TG entre sí, se observó un descenso en los niveles de FIS1 en los animales alimentados con la dieta de aceite de oliva respecto a todas las demás dietas (Figura 20C). Por su parte, la dieta de aceite de pescado indujo un incremento significativo de los niveles de FIS1 respecto a las demás dietas en el caso del grupo de animales TG (Figura 20C). Por otra parte, en el caso de los ratones WT, la dieta de aceite de pescado aumentó los niveles de FIS1 respecto a los animales alimentados con las dietas de aceite de soja o aceite de oliva (Figura 20C).

Respecto a MFF, la sobreexpresión de CYB5R3 produjo un descenso significativo en los animales alimentados con la dieta de aceite de oliva (Figura 20D), aunque no tuvo efecto en el resto de los grupos dietéticos. La dieta, por su parte, también produjo algunas alteraciones en los niveles de esta proteína. Comparando los grupos de animales TG entre sí, observamos que la dieta de aceite de soja aumentó los niveles de MFF respecto a todas las demás dietas, mientras que la dieta de aceite de pescado produjo un descenso respecto a los animales alimentados con la dieta de manteca (Figura 20D). La dieta de aceite de oliva aumentó los niveles de MFF en los animales WT respecto a los alimentados con las dietas de manteca y aceite de pescado (Figura 20D). Por último, en lo que respecta a DRP-1 la sobreexpresión produjo un aumento de este marcador de fisión mitocondrial en los animales alimentados con la dieta de manteca, teniendo así estos animales mayores niveles de DRP-1 que los ratones TG alimentados con cualquiera de las otras dietas (Figura 20E). No se observó ningún efecto de la dieta sobre los niveles de DRP-1 en los animales WT (Figura 20E).

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

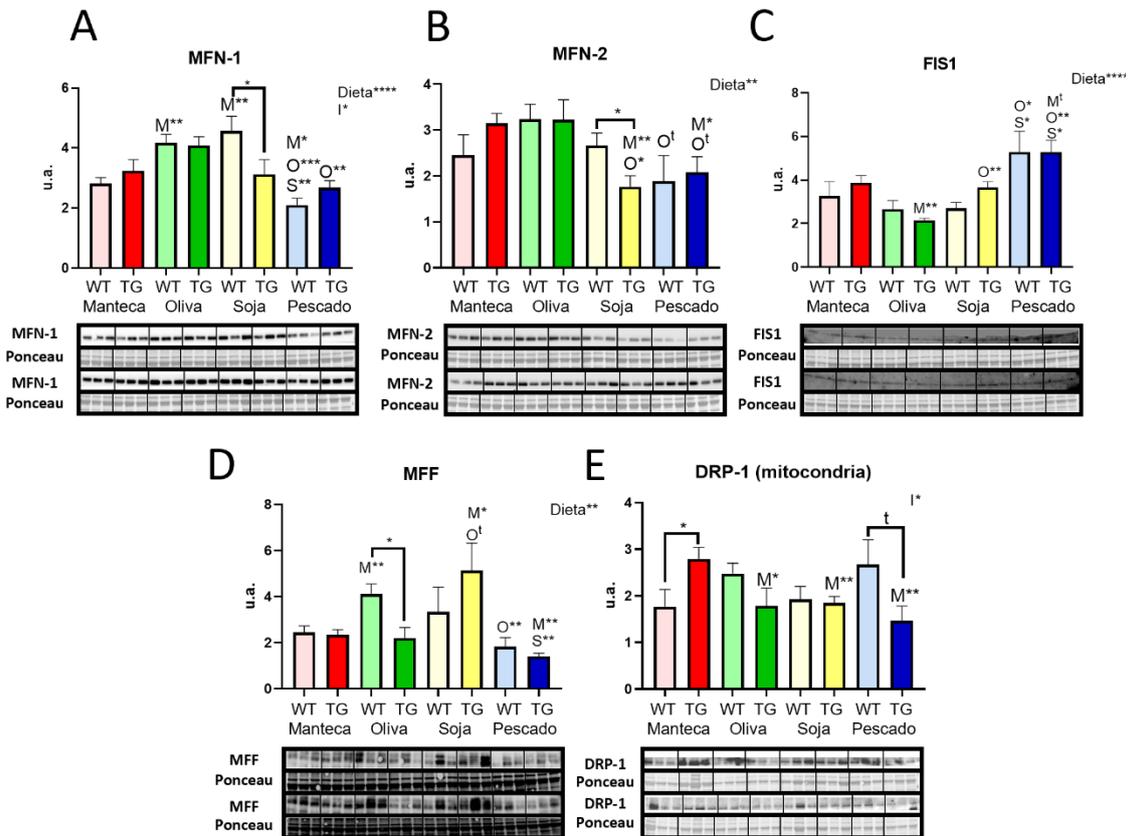


Figura 20. Niveles de expresión de proteínas relacionados con la dinámica mitocondrial en animales alimentados con dietas de diferente componente graso. MFN-1 (A), MFN-2 (B), FIS1 (C), MFF (D) y DRP-1 en fracciones enriquecidas en mitocondrias (E). Cada gráfica contiene debajo las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y con Ponceau S. Los datos se muestran como media \pm SEM de 6 réplicas. (u.a. = unidades arbitrarias).

4.1.4 Marcadores de biogénesis mitocondrial

Como marcadores de biogénesis mitocondrial se determinaron los niveles de NRF-1, TFAM y SIRT3. La sobreexpresión de CYB5R3 produjo un aumento significativo de los niveles de NRF-1 en los ratones alimentados con la dieta de aceite de oliva, y una tendencia hacia el incremento en los ratones alimentados con la dieta de manteca (Figura 21A). Centrándonos en el efecto del componente graso de la dieta, encontramos que el consumo de la dieta basada en aceite de soja produjo un descenso en los niveles de NRF-1 respecto a todas las demás dietas, tanto en los animales WT como en los TG (Figura 21A), mientras que en la dieta de aceite de pescado encontramos un aumento significativo en los niveles de esta proteína respecto a las demás dietas en los animales WT (Figura 21A). En el caso de los animales TG, tanto la dieta de aceite de oliva como la de aceite

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

de pescado produjeron un aumento significativo en los niveles de NRF-1 respecto a los animales alimentados con las dietas de manteca y aceite de soja (Figura 21A).

En el caso de TFAM, la sobreexpresión de CYB5R3 produjo un descenso en los animales alimentados con la dieta de aceite de oliva y un aumento en los alimentados con la dieta de aceite de soja (Figura 21B). Respecto al efecto de la dieta en los animales TG se observó un descenso en los niveles de TFAM en los alimentados con la dieta de aceite de oliva respecto a los alimentados con las dietas de manteca y aceite de soja, mientras que en los animales WT solo se observó una tendencia a incrementar los niveles de esta proteína en los alimentados con la dieta de aceite de pescado, respecto a los alimentados con la dieta de aceite de soja (Figura 21B).

Por último, no se observaron cambios en los niveles de SIRT3 por sobreexpresión de la enzima (Figura 21C). Respecto al efecto del componente graso de la dieta, encontramos que los ratones TG alimentados con la dieta basada en manteca como componente graso principal tuvieron mayores niveles de SIRT3 que los alimentados con dieta de aceite de pescado. Por su parte, los ratones WT alimentados con la dieta de manteca también mostraron unos niveles mayores de SIRT3, en este caso en comparación con los alimentados con cualquier otra dieta (Figura 21C).

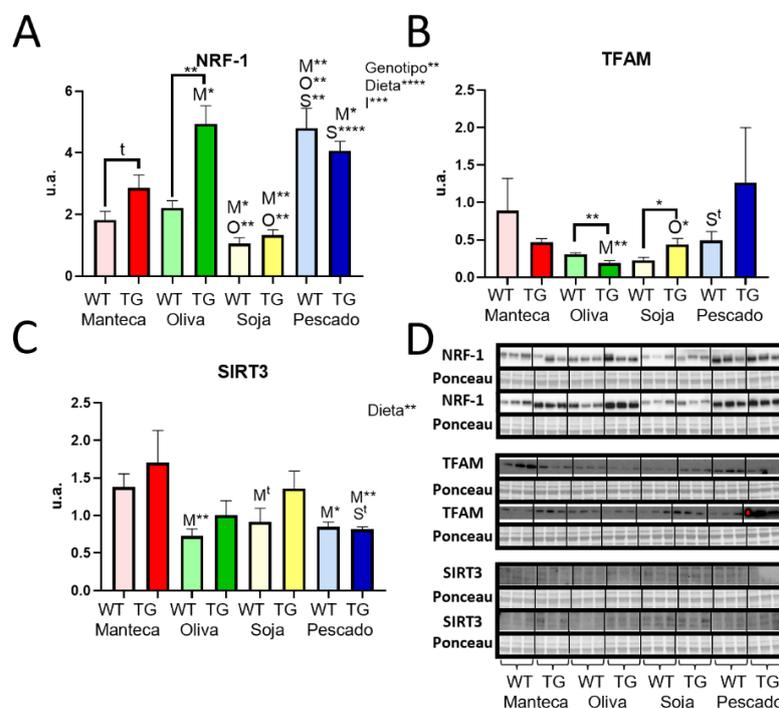


Figura 21. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la biogénesis mitocondrial en animales alimentados con dietas con diferente componente graso. NRF-1 (A), TFAM (B), y SIRT3 (C). El panel D muestra las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y con

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

Ponceau S. Los datos se muestran como media \pm SEM de 4 ó 6 réplicas. (u.a. = unidades arbitrarias).

4.1.5 Alteraciones de la morfología y abundancia mitocondrial por la sobreexpresión de CYB5R3 y por el componente graso de la dieta

A la vista de los cambios encontrados en los marcadores de dinámica y biogénesis mitocondrial quisimos profundizar en el estudio de la influencia que el componente graso de la dieta ejerce sobre el sistema mitocondrial de las fibras musculares esqueléticas, llevando a cabo un análisis de ultraestructura y abundancia mitocondrial por microscopía electrónica. Dado el gran número de grupos experimentales, y teniendo en cuenta la laboriosidad que implica este tipo de análisis, decidimos enfocar nuestras investigaciones ultraestructurales sobre los grupos dietéticos de manteca, aceite de soja y aceite de pescado, como aquéllos en los que encontramos los cambios más patentes, siendo además representativos de dietas enriquecidas en grasa saturada + monoinsaturada (manteca), PUFA n-6 (aceite de soja), y PUFA n-3 (aceite de pescado). El análisis se desarrolló de manera separada sobre FB y FR y, en todos los casos, las medidas se llevaron a cabo sobre fibras cortadas longitudinalmente.

4.1.5.1 Análisis ultraestructural en FB

En el estudio llevado a cabo sobre cortes longitudinales de FB encontramos que la sobreexpresión de CYB5R3 no tuvo efecto sobre el área mitocondrial en ninguno de los grupos dietéticos (Figura 22A). Sin embargo, los animales TG alimentados con la dieta de manteca presentaron el área media mitocondrial menor respecto a las otras dietas (Figura 22A). En cambio, la sobreexpresión sí tuvo efectos significativos sobre la circularidad mitocondrial, causando un descenso de dicho parámetro en los animales alimentados con la dieta de aceite de soja y un aumento en los alimentados con aceite de pescado (Figura 22B). En lo que respecta al efecto del componente graso de la dieta sobre la circularidad mitocondrial, nuestros resultados han mostrado que en los animales TG la dieta de aceite de soja produjo un descenso en la circularidad respecto a las demás dietas, mientras que en el caso de los animales WT fue la dieta de aceite de pescado la que disminuyó dicho parámetro de circularidad respecto a las otras dietas (Figura 22B).

En cuanto a los parámetros estereológicos, se observó un patrón común de cambios en todos los parámetros estudiados: Na, Vv y Fa (Figura 22C, 22D y 22E). En este sentido,

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

la sobreexpresión de CYB5R3 produjo un descenso en estos parámetros en los animales alimentados con la dieta de aceite de soja, mientras que observó un aumento en los animales alimentados con la dieta de manteca, no encontrándose cambios en el grupo de aceite de pescado (Figura 22C, 22D y 22E). En cuanto al efecto del componente graso de la dieta, en el caso de los animales TG se observó que aquellos alimentados con la dieta de manteca mostraron unos mayores valores de Na, mientras que los alimentados con la dieta de aceite de pescado fueron los que dieron unos valores más bajos (Figura 22C). Por su parte, en animales WT se encontraron los menores niveles de estos parámetros en los alimentados con la dieta de manteca, mientras que los mayores niveles correspondieron a los animales alimentados con la dieta de aceite de soja, tanto respecto a la dieta de manteca como a la de aceite de pescado (Figura 22C, 22D y 22E). Por tanto, las dietas de manteca y soja como fuente grasa aparecen como las más sensibles a la sobreexpresión de CYB5R3, respondiendo con cambios del patrón de distribución mitocondrial en FB.

En la figura 22F se muestran micrografías representativas de FB en corte longitudinal de todos los grupos experimentales.

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

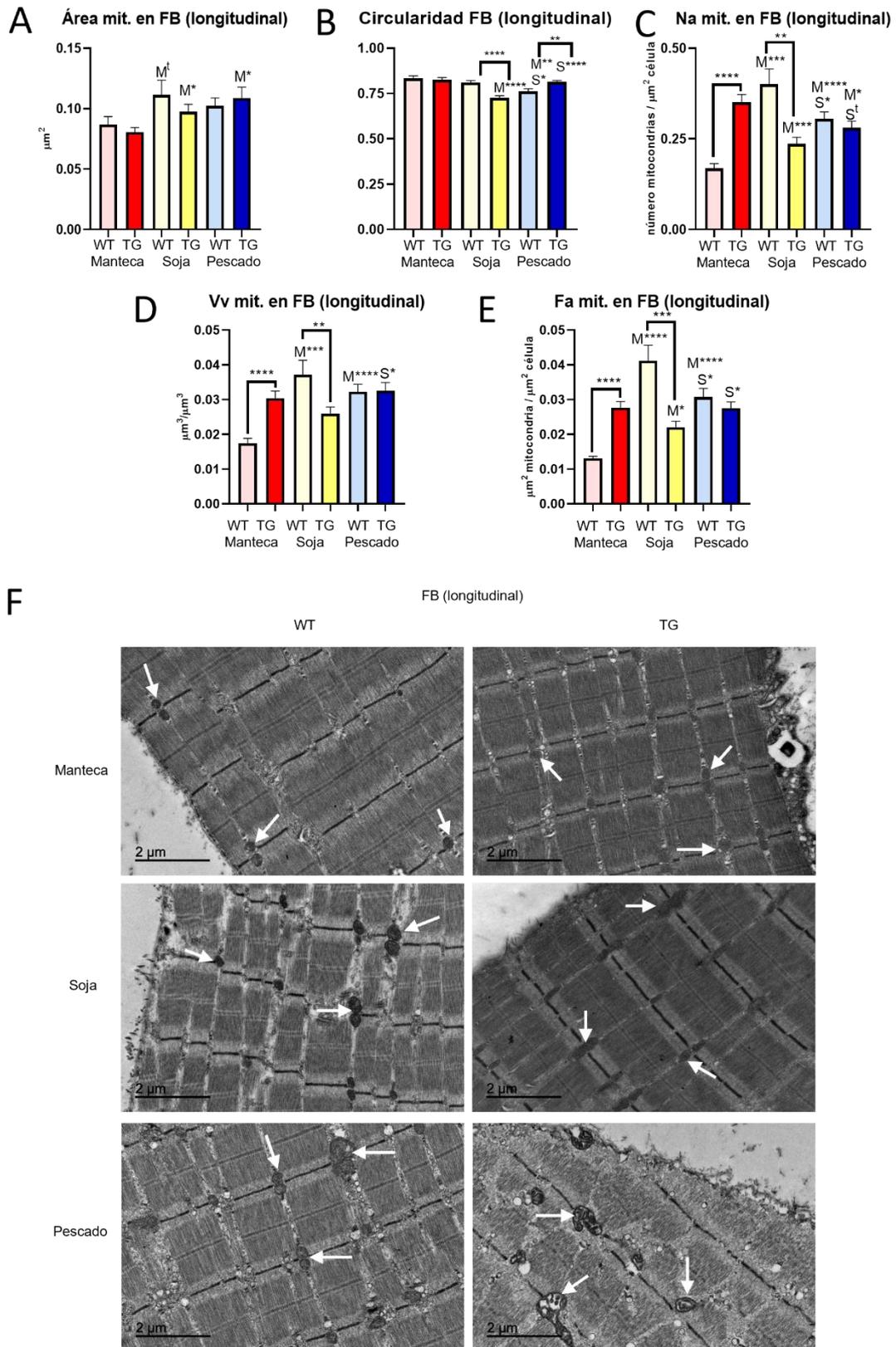


Figura 22. Características morfométricas de las mitocondrias de fibras blancas (FB) del músculo gastrocnemio en ratones alimentados con dietas de diferente componente graso en secciones longitudinales. Área mitocondrial (A), circularidad (B), densidad de perfil numérico (Na) (C), densidad de volumen (Vv) (D) y área fraccional (Fa) (E). El panel F muestra

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

micrografías de microscopía electrónica representativas de cada grupo. Se han marcado con flechas blancas algunas mitocondrias a modo de ejemplo. Los datos se muestran como media \pm SEM de 4 animales.

4.1.5.2 Análisis ultraestructural en FR

Dado que este tipo de fibra muscular contiene dos poblaciones mitocondriales claramente diferenciables, IMFM y SSM, llevamos a cabo un análisis planimétrico de manera separada para ambas subpoblaciones, mientras que el análisis estereológico se llevó a cabo de manera conjunta, como una medida global de abundancia mitocondrial en la FR.

De manera general, se encontraron menos cambios en FR que los observados en FB. Así, no se observaron cambios estadísticamente significativos en los valores de área de SSM ni IMFM por efecto de la dieta ni por el genotipo (Figura 23A y 23B). En lo que respecta a la circularidad, en SSM la sobreexpresión de CYB5R3 produjo un aumento de este parámetro planimétrico en los animales alimentados con la dieta de aceite de pescado, haciendo así que estos mostraran unos valores de circularidad significativamente mayores que los animales del mismo genotipo alimentados con las dietas de manteca o de aceite de soja (Figura 23C). En las IMFM, la sobreexpresión de CYB5R3 produjo un aumento de la circularidad en los animales alimentados con las dietas de manteca y aceite de pescado, mientras que produjo un descenso en los alimentados con la dieta de aceite de soja (Figura 23D). El efecto del componente graso de la dieta observado en este caso fue un aumento en la circularidad de IMFM en los animales TG alimentados con la dieta de pescado respecto a la dieta de aceite de soja, así como una tendencia a aumentar respecto a la dieta de manteca (Figura 23D). En el caso de los animales WT, se observó un aumento de la circularidad en aquellos alimentados con la dieta de aceite de soja respecto a los alimentados con la dieta de manteca, así como una tendencia a aumentar respecto a los alimentados con la dieta de aceite de pescado (Figura 23D).

Respecto a los parámetros estereológicos de abundancia mitocondrial, la sobreexpresión tendió a disminuir el valor de Na en los ratones de los grupos alimentados con dietas basadas en la manteca o el aceite de soja (Figura 23E). En cuanto al efecto del componente graso de la dieta, no se encontraron cambios en los animales TG (Figura 23E). Sin embargo, los animales WT alimentados con la dieta basada en manteca mostraron una abundancia mitocondrial (Na) significativamente mayor que los alimentados con la dieta de aceite de pescado, y una tendencia a ser mayor que los alimentados con la dieta de

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

aceite de soja (Figura 23E). En cuanto a los parámetros estereológicos Vv y Fa, no se observaron cambios debido al genotipo ni a la dieta (Figura 23F y 23G).

En la figura 23H se muestran micrografías representativas de FR en corte longitudinal de todos los grupos experimentales.

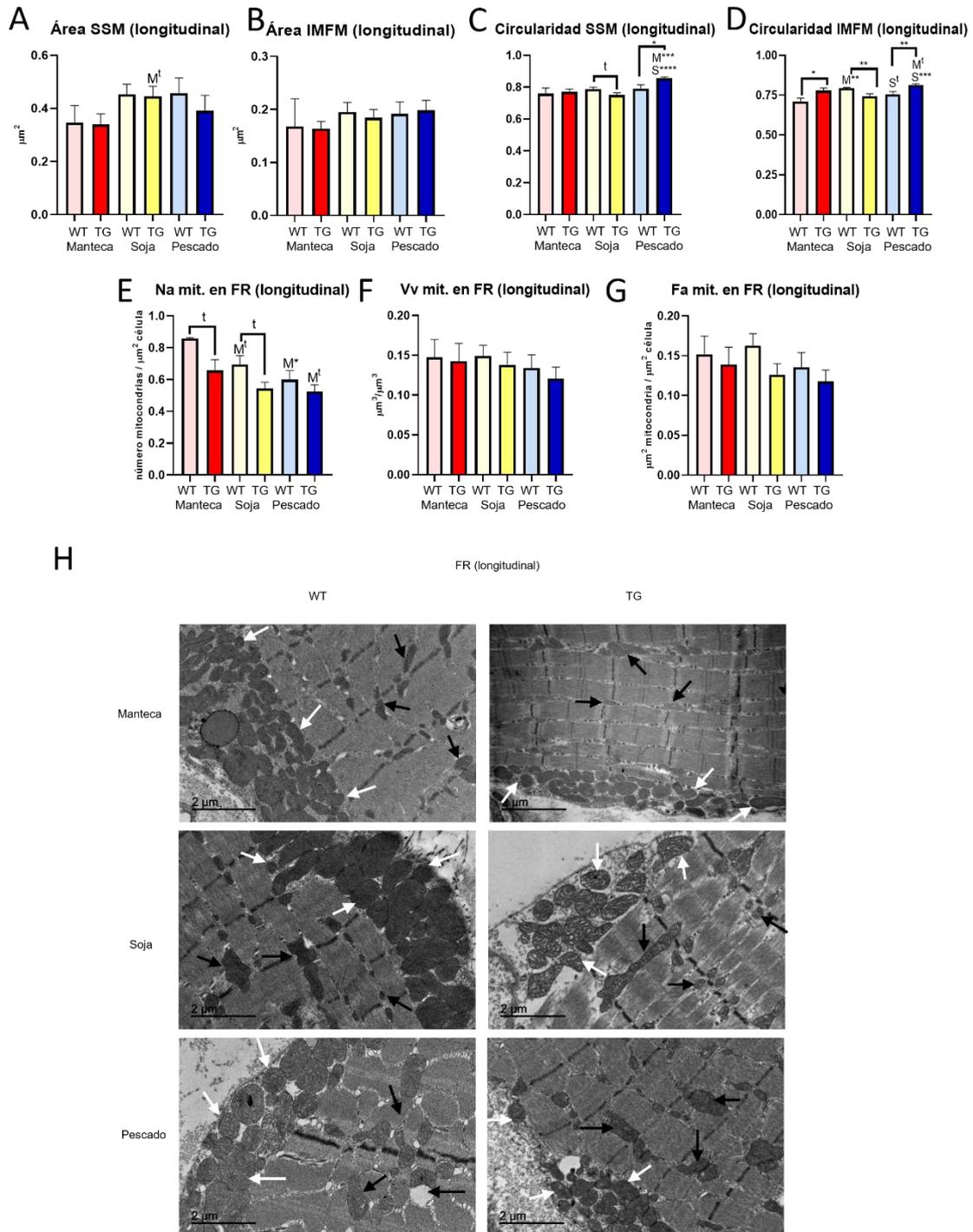


Figura 23. Características morfométricas de las mitocondrias de las fibras rojas (FR) del músculo gastrocnemio en ratones alimentados con dietas de diferente componente graso en

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

secciones longitudinales. Área de mitocondrias subsarcolémicas (SSM) (A), área de mitocondrias intermiofibrilares (IMFM) (B), circularidad de SSM (C), circularidad de IMFM (D), densidad de perfil numérico (Na) (E), densidad de volumen (Vv) (F) y área fraccional (Fa) (G). En el panel H se muestran micrografías representativas de microscopía electrónica de cada grupo. Las flechas blancas marcan SSM y las negras IMFM. Los datos se muestran como media \pm SEM de 4 animales.

4.1.6 Marcadores de autofagia y mitofagia

A continuación, se llevó a cabo un estudio de la ruta de autofagia, determinando los niveles de LC3AB I y II (así como de la ratio entre las dos isoformas) y de P62, como principales marcadores de macroautofagia, y de PINK1 y PARKIN, como principales marcadores de la ruta selectiva de degradación autofágica de las mitocondrias (mitofagia). Los niveles de LC3AB I y II se vieron levemente afectados por la sobreexpresión de CYB5R3 y/o por el componente graso de la dieta. No obstante, en el caso de LC3AB I se observó un incremento en los animales TG alimentados con la dieta de aceite de pescado respecto a sus correspondientes controles WT alimentados con la misma dieta (Figura 24A). No se encontraron diferencias significativas debidas al componente graso de la dieta (Figura 24A). En el caso de LC3AB II solo se observó un aumento en los animales WT alimentados con la dieta de aceite de oliva respecto a los alimentados con la dieta de manteca (Figura 24B). Comúnmente se calcula la ratio LC3AB II/I (Figura 24C) como indicadores del flujo autofágico, donde un descenso en la ratio indica un menor flujo autofágico [136]. Los resultados obtenidos en la ratio LC3AB II/I que la sobreexpresión de CYB5R3 produjo un aumento de la ratio en el músculo esquelético de los animales alimentados con la dieta de manteca (Figura 24C). Respecto al efecto del componente graso de la dieta en los animales WT, aquellas dietas basadas en aceite de oliva o en aceite de pescado produjeron un incremento en la ratio LC3AB II/I tanto respecto a la dieta de manteca como a la de aceite de soja (Figura 24C). En cuanto al efecto de la dieta en los animales TG, la basada en aceite de soja produjo un descenso en la ratio respecto a todas las demás dietas (Figura 24C). Por su lado, en lo que respecta a P62, solo se observó un descenso en sus niveles en los ratones WT alimentados con la dieta basada en aceite de pescado respecto a los animales del mismo genotipo alimentados con la dieta basada en aceite de oliva (Figura 24D).

Por último, centrándonos en las proteínas relacionadas con la mitofagia, mientras que no se observaron cambios, ni por dieta ni por genotipo, en lo que respecta a los niveles de PINK1 (Figura 24E), sí se encontraron cambios muy patentes en los niveles de PARKIN (Figura 24F). En este sentido, encontramos que la sobreexpresión de CYB5R3 produjo

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

un descenso significativo en los niveles de PARKIN de los ratones alimentados con la dieta basada en aceite de soja, mientras que se produjo un incremento en los alimentados con la dieta basada en aceite de pescado (Figura 24F). En lo que respecta al efecto del componente graso de la dieta, en el caso de los animales TG, la dieta basada en aceite de pescado produjo un aumento notable en los niveles de PARKIN respecto a todas las demás dietas (Figura 24F). Por su parte, los animales WT alimentados con la dieta basada en manteca mostraron unos niveles de PARKIN significativamente menores que los encontrados para los restantes grupos dietéticos (Figura 24F). En este sentido, los animales TG alimentados con la dieta basada en aceite de oliva también experimentaron un descenso significativo en los niveles de PARKIN respecto a los de la dieta basada en aceite de soja (Figura 24F).

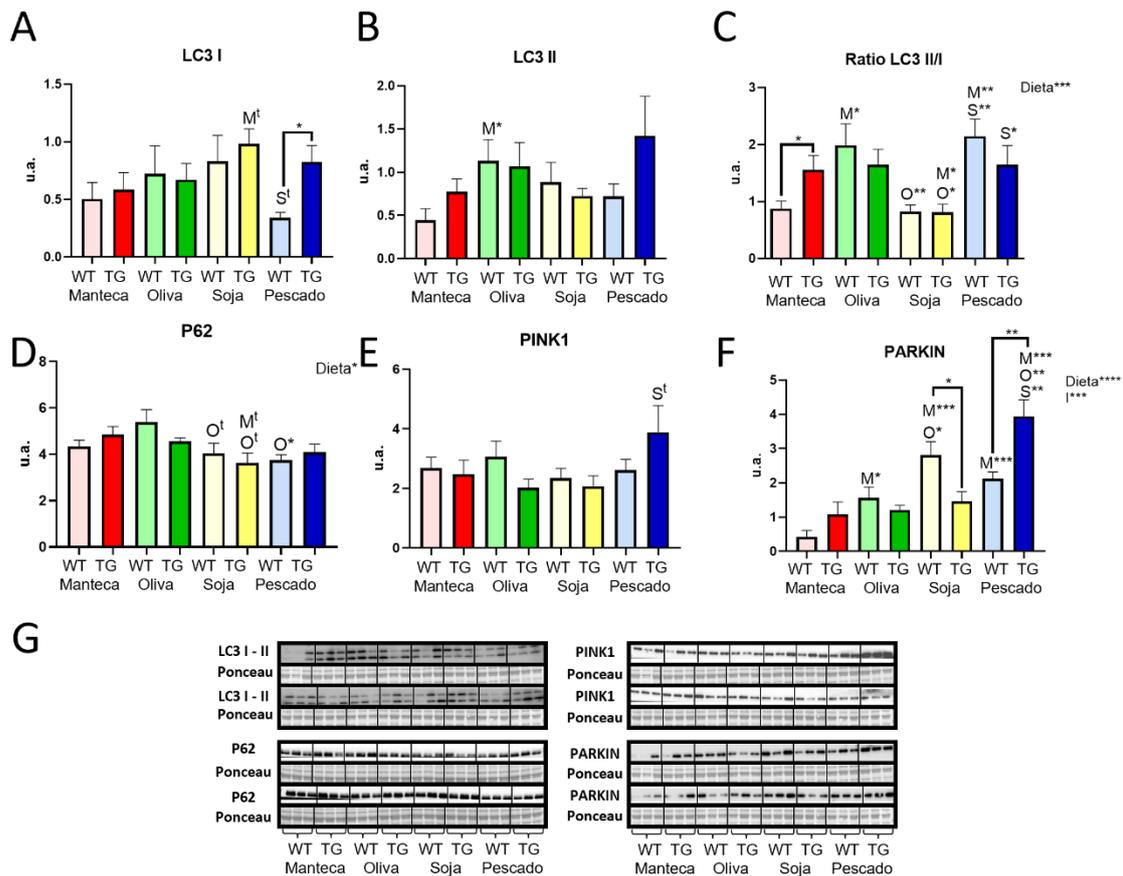


Figura 24. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con autofagia en músculo esquelético de ratones alimentados con dietas con diferente componente graso. LC3 A/B I (A) y LC3 AB II (B), la ratio LC3AB II/I (C), P62 (D), PINK1 (E) y PARKIN (F). El panel G muestra las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y con Ponceau S. Los datos se muestran como media \pm SEM de 6 animales.

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

4.1.7 Estudio de la abundancia de figuras de autofagia por microscopía electrónica

El estudio de autofagia se completó con el análisis ultraestructural de figuras de autofagia por microscopía electrónica de transmisión. De nuevo, los cambios encontrados en FB en función de la dieta o la sobreexpresión de CYB5R3 fueron similares para todos los parámetros estereológicos calculados (Na, Fa y Vv) (Figura 25A, 25B y 25C). La sobreexpresión de CYB5R3 causó una disminución en la abundancia de figuras de autofagia en los animales alimentados con las dietas de manteca y aceite de soja, que por el contrario se encontraron aumentadas en los ratones TG alimentados con la dieta de aceite de pescado (Figura 25A, 25B y 25C). Cuando comparamos entre sí los distintos grupos dietéticos encontramos que en el caso de los animales TG la dieta basada en aceite de soja produjo un descenso en la abundancia de figuras de autofagia respecto a todas las demás dietas (Figura 25A, 25B y 25C). Por su parte, en el caso de los animales WT la dieta de manteca produjo un aumento en las figuras de autofagia respecto a las demás dietas (Figura 25A, 25B y 25C).

El estudio realizado en FR reveló resultados muy similares para todos los parámetros analizados (Na, Vv y Fa). La sobreexpresión de CYB5R3 tendía a aumentar la abundancia de figuras de autofagia en los ratones alimentados con la dieta de aceite de pescado (Figura 25D, 25E y 25F). En cuanto al efecto de la dieta en los animales TG, la dieta de aceite de soja disminuía la abundancia de figuras de autofagia respecto a las demás dietas estudiadas (Figura 25D, 25E y 25F). Por su parte, en los animales WT no se observó efecto de la dieta (Figura 25D, 25E y 25F).

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

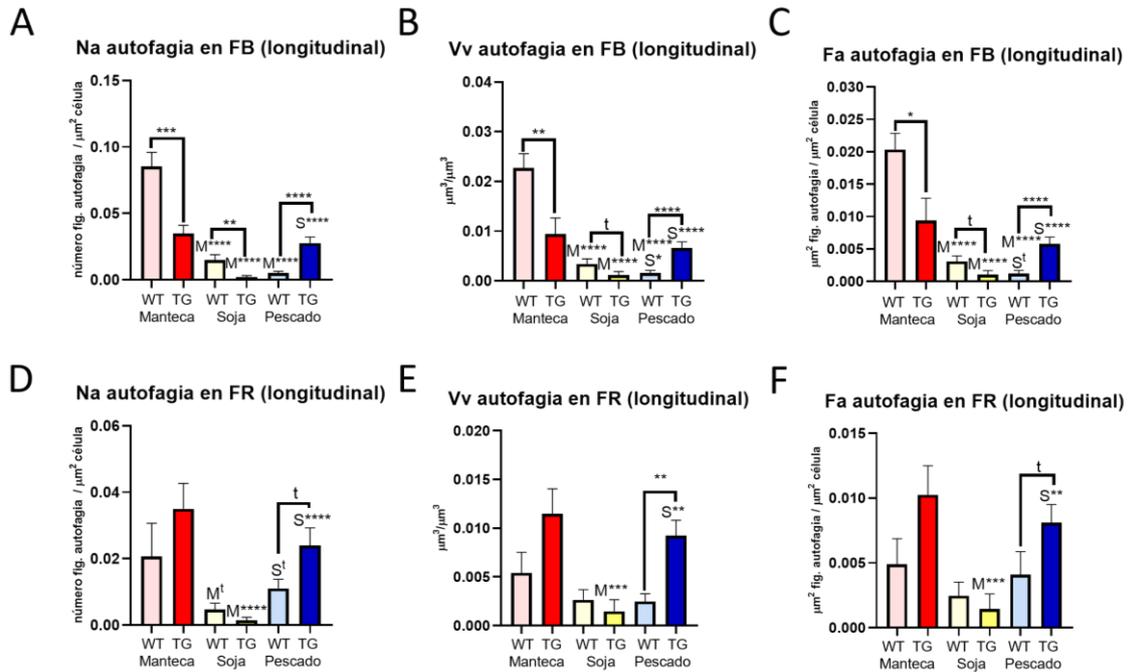


Figura 25. Esterología de las figuras de autofagia de FB y FR en músculo esquelético de ratones alimentados con dietas con diferente componente graso. Densidad de perfil numérico (Na) (A) y densidad de volumen (Vv) (B) y área fraccional (Fa) (C) en FB, y Na (D), Vv (E) y Fa (F) en FR. Los datos se muestran como media ± SEM de 4 animales.

4.1.8 Apoptosis

Por último, también se llevó a cabo un estudio de la ruta de apoptosis, determinando marcadores de las distintas vías por las que se puede desencadenar la muerte celular programada.

Quisimos evaluar los niveles de procaspasa y caspasa-8 como marcadores de la ruta extrínseca. En el caso de la procaspasa-8, sus niveles se vieron incrementados significativamente por la sobreexpresión de CYB5R3 en los animales alimentados con la dieta de aceite de soja respecto a los correspondientes controles WT alimentados con la misma dieta (Figura 26A). Sin embargo, no encontramos efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 cuando los ratones fueron alimentados con las dietas basadas en manteca, aceite de oliva, o aceite de pescado (Figura 26A). Continuando con el efecto de la grasa, los ratones TG alimentados con la dieta de aceite de pescado mostraron niveles significativamente mayores que los ratones del mismo genotipo alimentados con dietas de manteca o de aceite de oliva (Figura 26A). El fuerte incremento en los niveles de procaspasa-8 producido por sobreexpresión de CYB5R3 en el grupo de ratones alimentados con la dieta de aceite de soja hizo que estos animales mostraran también unos niveles de este marcador significativamente mayores a los encontrados con las dietas de

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

manteca o de aceite de oliva para el mismo genotipo (Figura 26A). En el caso de los ratones WT, aquellos alimentados con la dieta basada en aceite de pescado mostraron unos niveles de procaspasa-8 significativamente mayores que los animales del mismo genotipo pertenecientes a los demás grupos dietéticos (Figura 26A). No fue posible detectar caspasa-8 activa (escindida) en ninguno de los grupos experimentales.

Como se ha indicado en la Introducción, la caspasa-8 enlaza la vía extrínseca con la intrínseca a través del procesamiento proteolítico de BID (proteína proapoptótica) [174]. El hecho de no poder detectar la caspasa-8 escindida en nuestras muestras de músculo esquelético podría deberse tanto a la ausencia de esta forma procesada de la proteína, como a una dificultad relativa a la técnica utilizada. Por tanto, para profundizar en nuestras investigaciones sobre la influencia de la sobreexpresión de CYB5R3 y/o el componente graso de la dieta sobre esta ruta de señalización apoptótica, nos enfocamos sobre el estudio de los niveles de BID y de su forma procesada por la caspasa-8 (BID truncado). No se observaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de BID en mitocondria debidos al genotipo (Figura 26B). En el caso de los ratones TG, la dieta de aceite de pescado tendió a disminuir los niveles de esta proteína respecto a los animales alimentados con las dietas basadas en manteca o en aceite de soja, siendo este descenso estadísticamente significativo respecto a los ratones del mismo genotipo alimentados con la dieta de aceite de oliva (Figura 26B). Esta última dieta tendió a disminuir los niveles de BID en los animales WT respecto a aquellos alimentados con la dieta de manteca, mientras que los disminuyó de manera significativa respecto a los animales alimentados con la dieta de aceite de soja (Figura 26B). En lo que respecta a BID truncado, la forma activa de BID, no se encontraron cambios debido a la sobreexpresión de CYB5R3 (Figura 26C); solo se observó efecto de la dieta de aceite de pescado, que produjo un descenso estadísticamente significativo en los ratones TG respecto a los del mismo genotipo alimentados con las dietas de manteca o de aceite de oliva, y tendió a disminuir los niveles de esta proteína en los ratones WT respecto a los del mismo genotipo alimentados con la dieta de manteca (Figura 26C).

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

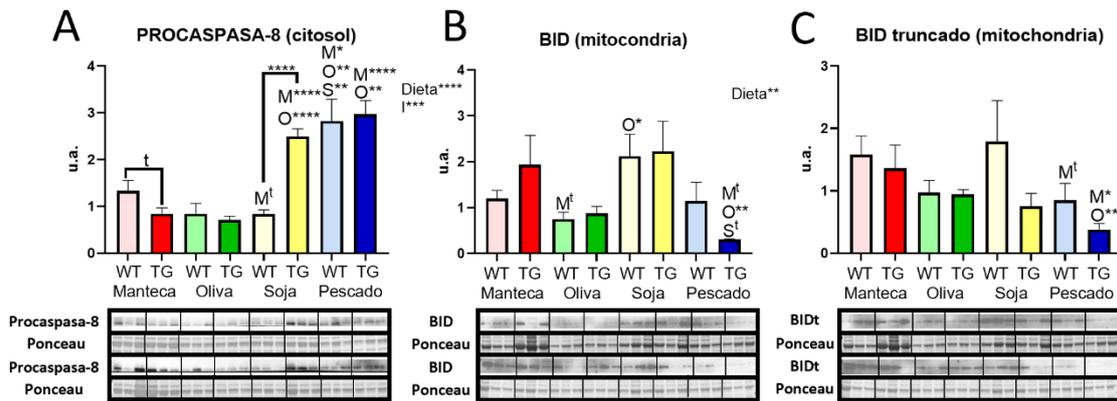


Figura 26. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la vía extrínseca de apoptosis por transferencias de Western en músculo esquelético de animales alimentados con dietas con diferente componente graso. Procaspasa-8 (A), BID (B), y BID truncado en fracciones enriquecidas en mitocondrias (C). Cada gráfica tiene debajo las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y con Ponceau S. Los datos se muestran como media \pm SEM de 6 réplicas. (u.a. = unidades arbitrarias).

Dado que el desencadenamiento de la apoptosis va a depender del balance entre proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas [175], se determinaron también los niveles de BAX y BCL-2 y se calculó la ratio entre ambas. En el caso de BAX, proteína proapoptótica, solo se observó que los animales TG alimentados con la dieta de aceite de soja tendían a tener mayores niveles que los alimentados con la dieta de aceite de oliva, y significativamente mayores que los alimentados con la dieta de aceite de pescado (Figura 27A). En el caso de BCL-2, proteína antiapoptótica, la sobreexpresión de CYB5R3 incrementó los niveles de esta proteína en los animales alimentados con la dieta de manteca respecto a los WT que habían consumido la misma dieta (Figura 27B).

En cuanto al efecto del componente graso de la dieta, no se encontraron cambios en los animales TG, mientras que en los WT alimentados con la dieta de manteca se encontraron niveles de BCL-2 significativamente menores que en los ratones alimentados con las demás dietas objeto de estudio (Figura 27B). A pesar de los cambios indicados, la ratio BCL-2/BAX no se vio alterada por el genotipo ni por el componente graso de la dieta en ningún caso (Figura 27C).

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

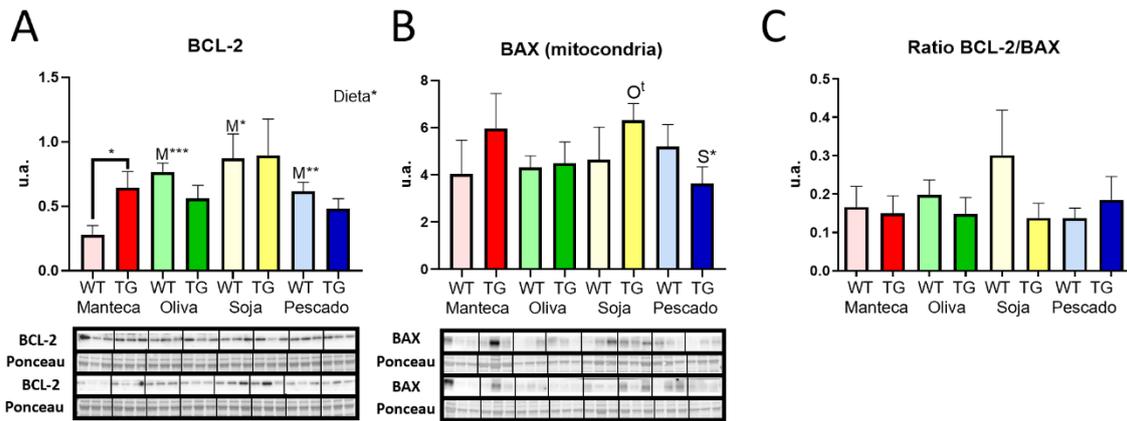


Figura 27. Niveles de expresión de proteínas desencadenantes de apoptosis en animales WT y TG alimentados con dietas con diferente componente graso. BCL-2 (A), BAX en fracciones enriquecidas en mitocondrias (B), y ratio BCL-2/BAX (C). Cada gráfica tiene debajo las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y con Ponceau S. Los datos se muestran como media \pm SEM de 6 réplicas. (u.a. = unidades arbitrarias).

El balance entre estas proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas determinará el desencadenamiento de la apoptosis por vía intrínseca, que lleva a la permeabilización de la membrana mitocondrial con la consiguiente liberación de citocromo *c* y APAF-1 [175]. El efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 sobre los niveles de citocromo *c* en citosol solo se observó en el grupo de los animales alimentados con la dieta de aceite de pescado, donde causó un aumento (Figura 28A). A pesar de dicho aumento, cuando fueron alimentados con la dieta basada en aceite de pescado tanto los ratones TG como los WT mostraron unos niveles más bajos de citocromo *c* en comparación con las otras dietas, mientras que los ratones TG alimentados con la dieta de manteca mostraron unos niveles de citocromo *c* en citosol significativamente mayores que los alimentados con cualquiera de las otras dietas (Figura 28A). Por su parte, los niveles de APAF-1 solo se vieron afectados por la sobreexpresión de CYB5R3 en los animales alimentados con la dieta de aceite de soja, donde los de genotipo TG mostraron un incremento significativo en los niveles de esta proteína en comparación con los WT (Figura 28B). Respecto al efecto de la dieta, los animales TG alimentados con la dieta de aceite de oliva mostraron unos niveles muy bajos de APAF-1 que fueron significativamente menores que los determinados en los ratones del mismo genotipo alimentados con las dietas de aceite de soja y de aceite de pescado (Figura 28B). En los ratones WT no se encontró ningún efecto del componente graso de la dieta en los niveles de APAF-1 (Figura 28B).

Tras su liberación al citosol, citocromo *c* y APAF-1 forman el apoptosoma para activar a la caspasa-9 [176]. La sobreexpresión de CYB5R3 produjo un descenso en los niveles de

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

caspasa-9 en los animales alimentados con la dieta de aceite de oliva (Figura 28C). En lo que respecta al efecto de la dieta, los ratones de genotipo TG alimentados con la dieta de aceite de oliva experimentaron un descenso significativo en los niveles de caspasa-9 respecto a los demás grupos experimentales (Figura 28C). Por su parte, en el caso de los ratones WT fueron los animales alimentados con la dieta de manteca los que mostraron unos niveles de caspasa-9 significativamente mayores que los alimentados con las demás dietas (Figura 28C).

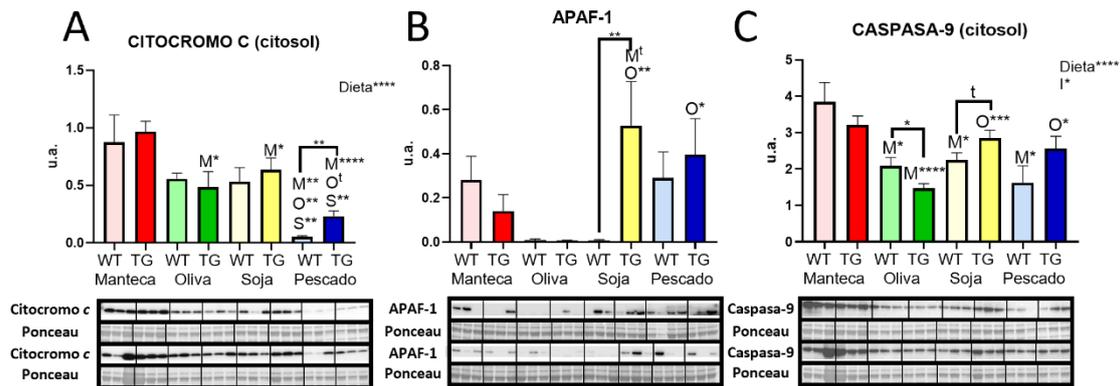


Figura 28. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la vía intrínseca de apoptosis en animales WT y TG alimentados con dietas con diferente componente graso. Citocromo c en fracciones citosólicas (A), APAF-1 (B) y Caspasa-9 en fracciones citosólicas (C). Cada gráfica tiene debajo las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y con Ponceau S. Los datos se muestran como media \pm SEM de 6 réplicas. (u.a. = unidades arbitrarias).

Por último, también resulta interesante tener en cuenta la ruta de apoptosis independiente de caspasas, llevada a cabo por AIF, que también se libera de la mitocondria, y ENDOG. Tras determinar los niveles de AIF en fracciones mitocondriales solo se observó un aumento significativo en los animales WT alimentados con la dieta de aceite de pescado respecto a los del mismo genotipo alimentados con la dieta de manteca (Figura 29A). Cuando se permeabiliza la mitocondria se libera AIF al citosol, y de ahí al núcleo, donde promueve la fragmentación de la cromatina [177], por lo que procedimos a determinar la abundancia de AIF en estos compartimentos celulares. En lo que respecta al citosol, encontramos de nuevo que los niveles de AIF no se alteraron debido a la sobreexpresión de CYB5R3 (Figura 29B). Sin embargo, sí se observó un importante efecto de la dieta basada en aceite de pescado, produciendo un descenso en este marcador que fue patente en los animales de ambos genotipos. En el caso de los ratones TG alimentados con esta dieta encontramos que los menores niveles de AIF en citosol fueron estadísticamente significativos en comparación con resto de grupos dietéticos (Figura 29B), mientras que

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

en el caso de los ratones WT las diferencias significativas sólo se encontraron respecto a los animales del mismo genotipo alimentados con las dietas basadas en aceite de soja o en aceite de oliva (Figura 29B). La cuantificación de AIF en el compartimento nuclear reveló la ausencia de efectos en función del genotipo. Sin embargo, estas determinaciones pusieron en evidencia un claro efecto de la dieta de manteca disminuyendo los niveles de AIF en extractos nucleares tanto para los animales WT como para los TG respecto a cualquiera de las demás dietas (Figura 29C). Por último, en lo que respecta a ENDOG en extractos nucleares, el genotipo solo tuvo efecto en los animales alimentados con la dieta de manteca, donde la sobreexpresión de CYB5R3 causó un incremento significativo en los niveles de esta proteína (Figura 29D). La dieta, por su parte, mientras que no tuvo ningún efecto en los niveles de ENDOG nuclear en los animales TG, sí produjo un descenso significativo de los niveles de esta proteína en los ratones WT alimentados con la dieta basada en manteca respecto a todas las demás dietas. La dieta de aceite de pescado también produjo un descenso significativo en los niveles de ENDOG en los ratones WT respecto a los alimentados con la dieta de aceite de soja (Figura 29D).

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

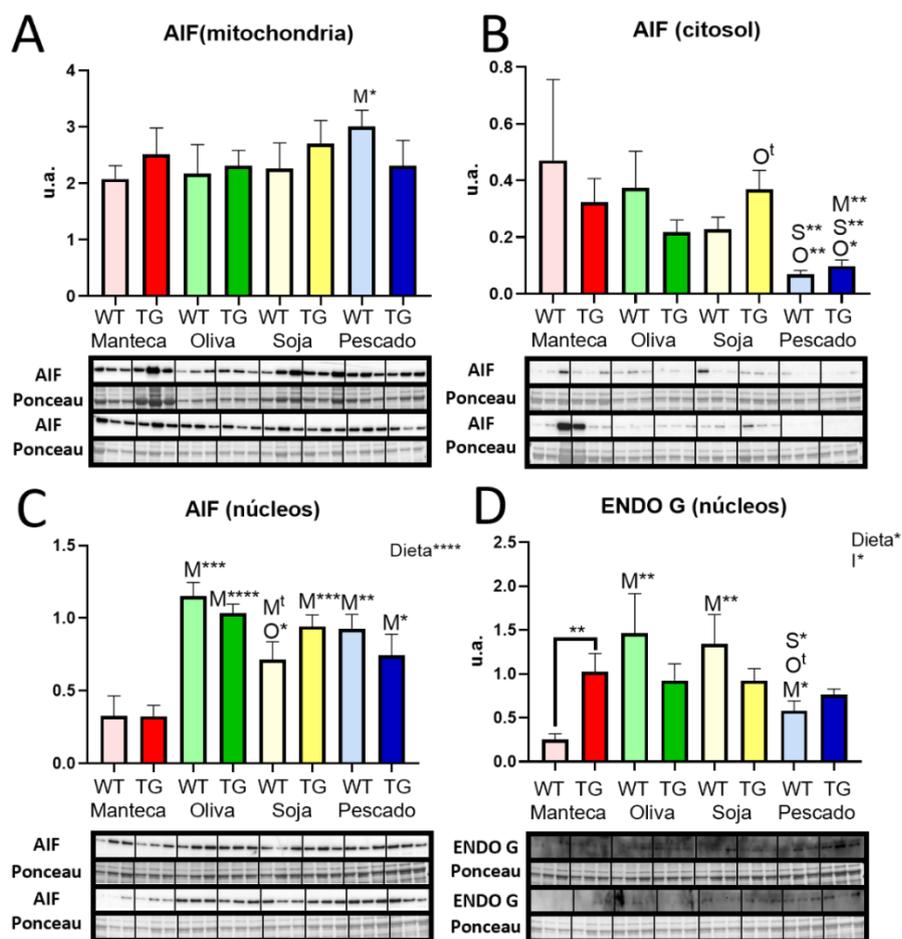


Figura 29. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis independiente de caspasas músculo esquelético de ratones alimentados con dietas de diferente componente graso. AIF en fracciones enriquecidas en mitocondria (A), AIF en fracciones citosólicas (B), AIF en fracciones enriquecidas en núcleo (C) y ENDO G en fracciones enriquecidas en núcleo (D). Cada gráfica tiene debajo las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y con Ponceau S. Los datos se muestran como media \pm SEM de 6 réplicas. (u.a. = unidades arbitrarias).

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

4.2 Discusión

El envejecimiento se puede definir como el declive progresivo de la funcionalidad a lo largo del tiempo, acompañado de menor fertilidad y mayor susceptibilidad a agresiones [178]. Como se muestra en el último informe de Naciones Unidas (<https://population.un.org/wpp/>), se está produciendo a nivel mundial un rápido crecimiento de la población envejecida, lo que está poniendo en auge el estudio de los mecanismos del envejecimiento, así como la búsqueda de medidas para retrasarlo [179]. Dicha búsqueda ha llevado al diseño de intervenciones anti-envejecimiento como la RC, que es la intervención no genética mejor caracterizada capaz de prolongar la longevidad y de retrasar la aparición de enfermedades asociadas a la edad avanzada [180]. La investigación centrada en la RC ha permitido identificar rutas metabólicas relevantes para entender la pauta de envejecimiento lo cual, a su vez, ha llevado a la identificación de pequeñas moléculas que tienen estas rutas como dianas, y que poseen un potencial farmacológico como sustancias anti-envejecimiento, conocidas como miméticos de la RC [41]. Asimismo, esta investigación ha llevado a la identificación de enzimas que mimeticen, al menos parcialmente, los efectos de la RC, entre las que destaca la CYB5R3 [55].

La RC lleva a cabo su acción, en gran medida, optimizando la función mitocondrial [181]. Asimismo, se ha encontrado también que la RC altera la composición de las membranas disminuyendo el contenido de PUFA n-3 y el grado de insaturaciones. Debido a la mayor susceptibilidad de los PUFA a la oxidación [10, 11], estas alteraciones pueden llevar a una menor susceptibilidad de las estructuras membranosas al daño oxidativo, lo cual podría constituir uno de los mecanismos por los que la RC produce sus efectos beneficiosos sobre el metabolismo y la longevidad [182]. Estos cambios en la composición lipídica de las membranas también influyen en la actividad de proteínas de membrana, así como en la permeabilidad y fluidez de estas estructuras. Todo esto es acorde con la Teoría de las membranas del envejecimiento, según la cual la longevidad se relaciona inversamente con el grado de insaturación de las membranas, especialmente con la cantidad de PUFA n-3 que, como se ha indicado anteriormente, son los más sensibles a la oxidación. En concordancia con esto, los estudios comparativos de distintas especies de mamíferos con distinta longevidad han mostrado que las especies más longevas son aquellas que tienen menor grado de insaturación en sus membranas [10-13].

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

Por otro lado, se conoce que distintos factores externos como la dieta pueden afectar al envejecimiento de los tejidos [183], por lo que resulta interesante estudiar la influencia que producen estos factores en distintas rutas relacionadas con el envejecimiento. Los cambios en el componente graso de la dieta producen alteraciones en la composición de ácidos grasos de la membrana mitocondrial [67, 68]. Estudios previos llevados a cabo en nuestro grupo, en los que se ha analizado el efecto de la RC con diferente componente graso de la dieta sobre marcadores mitocondriales y de autofagia [70], así como de apoptosis en músculo esquelético [69], han demostrado que una dieta que contiene manteca como componente graso principal maximiza la extensión de la longevidad por RC [65], y potencia los efectos positivos de esta intervención en hígado y en músculo esquelético [67]. En concreto, los animales sometidos a RC con la dieta de manteca muestran una menor producción de ROS y fuga de protones en las mitocondrias del músculo esquelético [67, 68]. También se concluyó que en los animales sometidos a RC con una dieta que contenía manteca como componente graso principal se preserva mejor con la edad la estructura fibrilar del músculo, así como la ultraestructura mitocondrial [70]. Sin embargo, en lo que respecta a la señalización apoptótica, fueron los animales jóvenes sometidos a RC con la dieta de pescado los que mostraron un efecto protector frente a la apoptosis en músculo esquelético [69]. Sin embargo, cuando la intervención se llevaba a cabo en animales viejos, los animales sometidos a RC con dieta de aceite de pescado mostraban un aumento en la actividad de caspasa-9 con la edad, que no se observaba en los animales sometidos a RC con la dieta de manteca de cerdo [184].

Por su parte, se ha demostrado que la sobreexpresión de CYB5R3 en ratones TG incrementa la longevidad, mejora la sensibilidad a insulina, disminuye el daño oxidativo y protege frente al cáncer inducido [55]. Además, en ese mismo estudio se encontró que en estos animales TG se produce un incremento de la expresión de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos, así como un aumento en los niveles de PUFA de cadena larga [55], efecto relacionado posiblemente con la actividad desaturasa de CYB5R3 [45]. Sin embargo, no se conoce si las alteraciones en el perfil lipídico contribuyen al efecto prolongevidad de la sobreexpresión de CYB5R3.

De acuerdo estos antecedentes, el objetivo de nuestro estudio consistió en elucidar el papel desempeñado por las alteraciones de la composición lipídica de las membranas en las adaptaciones metabólicas responsables de la extensión de la longevidad que se producen en ratones que sobreexpresan CYB5R3, usando para ello un abordaje

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

nutricional con dietas que varían en su componente graso principal. En concreto, nuestro trabajo se ha centrado sobre el músculo esquelético, como el tejido responsable de una mayor parte del gasto energético en reposo del organismo [158], siendo además un modelo de tejido postmitótico que es clave para entender el proceso de envejecimiento debido a la acumulación de daño oxidativo que se produce en él a medida que se alcanza una edad cada vez más avanzada [185].

Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que los niveles de CYB5R3 son dependientes del componente graso mayoritario de la dieta, tanto en riñón, donde los animales alimentados con la una dieta basada en manteca o en aceite de oliva mostraron los mayores niveles de la enzima [186], como en hígado, donde una dieta basada en aceite de pescado produjo un descenso significativo en los niveles del polipéptido [168], lo cual posiblemente representa una medida compensatoria relacionada con la actividad desaturasa de la enzima. Sin embargo, no se observó efecto del componente graso la dieta cuando se midieron los niveles de CYB5R3 en corazón, lo que podría ser indicar que el efecto que la grasa produce sobre los niveles de CYB5R3 varía en función del carácter mitótico o postmitótico del tejido objeto de análisis [168]. En el caso del músculo esquelético, nuestros datos han mostrado que los ratones WT alimentados con la dieta de manteca mostraron los mayores niveles de CYB5R3, mientras que, en el caso de los TG, fueron los ratones alimentados con la dieta de aceite de oliva los que tenían menores niveles de la enzima. De acuerdo con esto podemos concluir que la influencia que el componente graso de la dieta ejerce sobre los niveles de CYB5R3 es dependiente de tejido, y no solamente de su carácter mitótico o postmitótico, como previamente se había sugerido [168], ya que esta influencia de la grasa sobre los niveles de CYB5R3 no tiene el mismo efecto en músculo esquelético y corazón, a pesar de ser ambos tejidos postmitóticos.

Nuestros resultados muestran que la dieta que contiene aceite de pescado como componente graso principal produce un descenso en la fusión mitocondrial, así como un aumento en la fisión, tanto en animales WT como TG. Sin embargo, nuestro estudio de microscopía electrónica no reveló cambios en el tamaño mitocondrial en los animales alimentados con dicha dieta. Esto nos podría estar indicando que las mitocondrias más pequeñas generadas a través de procesos de fisión están siendo eliminadas por autofagia, como revela el incremento encontrado en la ratio LC3 II/I, que es un parámetro indicativo del flujo autofágico [136]. Este incremento de autofagia por PUFA n-3 es consistente con

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

lo encontrado en diversos estudios previos [187]. De igual modo, resulta esperable que, con el fin de regenerar esta población mitocondrial que está siendo degradada, una dieta rica en PUFA n-3 también produzca un incremento en los marcadores de biogénesis mitocondrial, tal y como está recogido en la bibliografía [188]. Este incremento en la biogénesis mitocondrial por una dieta que contiene aceite de pescado como componente graso principal también se observó en riñón [186], mientras que no se encontró en hígado ni en corazón [168], lo cual apunta de nuevo a la importancia del modelo tisular objeto de estudio. Centrándonos sobre el músculo esquelético, Rossignoli *et al.* han demostrado que la suplementación de la dieta con aceite de pescado produce un aumento de la densidad mitocondrial, así como del mRNA de PGC1 α en sóleo [189]. En nuestro caso, hemos encontrado que una dieta basada en aceite de pescado produce un llamativo incremento en los niveles del factor de transcripción NRF-1 tanto en los animales WT como en los TG, que podría deberse a un posible incremento en los niveles de PGC1 α . Sin embargo, no hemos encontrado aumentos similares en los demás marcadores de biogénesis medidos.

Respecto a la abundancia de marcadores de los complejos de la cadena de transporte de electrones, mientras que en corazón y en riñón se observó un incremento de éstos con la dieta de aceite de pescado [168, 186] y en hígado no se observaron cambios [168], en músculo esquelético hemos observado un descenso significativo en los niveles de dichos complejos en los animales alimentados con la dieta de aceite de pescado. Resulta complicado comparar estos resultados con lo recogido en la bibliografía ya que se encuentran muchos resultados contradictorios debido a las diferencias en el tipo de intervención, dieta, edad, modelo de estudio, etc. Auon *et al.* mostraron un descenso en la actividad de los complejos II + III, así como en la del complejo IV en hígado de ratas alimentadas durante 6 semanas con dieta de aceite de pescado [190]. Kucharska *et al.* demostraron en un modelo de artritis reumatoide que el tratamiento con PUFA n-3 producía una mejora de la respiración y la generación de ATP en mitocondrias musculares [191], que podría deberse a modificaciones en la estructura de las membranas así como a la regulación de genes metabólicos. Sin embargo, Lalia *et al.* demostraron que el envejecimiento en humanos producía un descenso en la expresión de genes relacionados con la fosforilación oxidativa y el ciclo de Krebs, siendo dicho descenso mayor cuando esos pacientes eran suplementados con PUFA n-3 [192]. Resulta interesante tener en cuenta que en ciertos estudios no se han encontrado beneficios de los PUFA n-3 sobre

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

marcadores inflamatorios [192], a pesar de su ampliamente aceptado papel antiinflamatorio [193-195]. Esto se justifica por el hecho de que estos casos en los que no se encuentran beneficios tras la suplementación con PUFA n-3 pudieran deberse a que se trata de una cohorte de animales o pacientes saludables, en los que no hay un estado proinflamatorio alto [192]. De acuerdo con esto, nuestros animales objeto de estudio también se pueden considerar una cohorte saludable, lo que puede traer consigo que no se lleguen a evidenciar ciertos beneficios del aceite de pescado en lo que respecta a los complejos de la ETC. Por su parte, la sobreexpresión de CYB5R3 en los animales alimentados con la dieta de aceite de soja produce un aumento en los complejos de la ETC, lo que podría estar produciendo un aumento en la producción de ATP, como ya se ha demostrado ocurre en hígado, donde los animales TG mostraron una mayor eficiencia bioenergética sin mayor producción de ROS [55]. En nuestro estudio también observamos un incremento en los niveles de VDAC en músculo esquelético de los animales TG sometidos a la dieta de aceite de soja, lo que hace que el dividir los niveles de los complejos de la ETC entre los niveles de este marcador se pierda este efecto del genotipo. Lo que estaría indicando que el incremento de los niveles de los complejos en los animales TG alimentados con la dieta de soja podrían deberse a una mayor abundancia mitocondrial en este grupo. Sin embargo, el estudio de microscopía electrónica no mostró cambios ni en el área ni en la abundancia mitocondrial en este grupo, si no que se observó un descenso de la abundancia mitocondrial. Todo esto no lleva a que el incremento en los niveles de los complejos de la ETC así como de VDAC en los animales TG alimentados con la dieta de soja se deba posiblemente a cambios en la composición de las membranas mitocondriales, afectando tanto a la OMM como a la IMM.

La autofagia también se ha propuesto como un mecanismo esencial en la regulación del metabolismo mitocondrial [196]. Además, se ha comprobado la existencia de una inhibición de la autofagia en músculo esquelético con la edad y con el aumento de la inflamación [99], por lo que resulta interesante estudiar si distintos ácidos grasos con acciones pro- o antiinflamatorias tienen efecto sobre la autofagia del músculo esquelético cuando se ingieren con la dieta. Sadeghi *et al.* llevaron a cabo un estudio con células musculares C2C12 a las que trataron con palmitato para simular la lipotoxicidad que se produce con la obesidad. Su estudio demostró un aumento en la proteína LC3B II, asociado con un mayor número de autofagosomas, así como un aumento en los niveles de P62, que indicaría un descenso del flujo autofágico tras el tratamiento con palmitato

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

[197]. Nuestro estudio muestra unos resultados similares en los animales alimentados con la dieta de manteca ya que, mientras que la microscopía electrónica nos muestra un mayor número de figuras de autofagia, observamos un descenso en las ratios de las isoformas de LC3, lo que es indicativo de un menor flujo autofágico que haría que los autofagosomas se acumulen, condiciones en las que, por tanto, se pueden observar más figuras de autofagia en el estudio de microscopía electrónica. Resulta muy interesante que la sobreexpresión de CYB5R3 parece paliar el efecto de la dieta rica en SFA a nivel de la ratio LC3. Sin embargo, nuestro estudio de microscopía electrónica revela que este efecto solo se produce en fibra blanca, donde tiene lugar un descenso en el número de figuras de autofagia encontradas. Las diferencias entre los resultados de proteínas y de la microscopía electrónica pueden estar debidos también al hecho de que los distintos marcadores proteicos se han determinado en un homogeneizado total obtenido del músculo de la pata trasera, mientras que nuestro estudio ultraestructural se ha llevado a cabo sobre gastrocnemio. De acuerdo con esta posibilidad, se ha demostrado que la autofagia se ve alterada por la dieta de forma diferente en los distintos tipos de músculo [196]. El bloqueo de la autofagia por SFA también se ha encontrado en células β pancreáticas [198] y células mononucleares de sangre periférica [199]. Por otro lado, se ha comprobado en hígado y en hepatocitos de corvina que la suplementación con PUFA n-6, como los presentes en la dieta basada en aceite de soja usada en nuestra intervención nutricional, induce la autofagia en comparación con la suplementación con PUFA n-3 [200]. Nuestros resultados obtenidos en músculo esquelético de ratón indicarían lo contrario ya que, como hemos indicado anteriormente observamos un incremento en los marcadores indicativos de un mayor flujo autofágico en aquellos animales alimentados con la dieta de aceite de pescado. Sin embargo, la gran cantidad de diferencias entre ambos estudios (a nivel de especie modelo, órgano o dieta) dificulta su comparación. Por último, también resulta interesante prestar atención a la ruta de apoptosis, por su importante papel en el desarrollo de la sarcopenia relacionada con el envejecimiento y la obesidad [175]. Existen muchas evidencias de que los SFA inducen apoptosis en distintos tipos celulares como células β pancreáticas [201], cardiomiocitos [202], hepatocitos [203] y células musculares [57, 204]. Profundizando en el estudio de las células musculares, Saini *et al.* demostraron que el palmitato induce apoptosis de forma dependiente de caspasas, y que este efecto se puede paliar, al menos parcialmente, por la administración de EPA [205]. En sintonía con el estudio anterior, Tachtsis *et al.* también demostraron un

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

incremento de la apoptosis en células C2C12 al tratarlas con palmitato, y dicho incremento se evitaba al tratar con PUFA n-3 como DHA, EPA y DPA [137]. Estos hallazgos estarían en concordancia con nuestros resultados, donde encontramos que en aquellos animales alimentados con la dieta de manteca de cerdo se observa un descenso en los niveles de la proteína antiapoptótica BCL-2, y en los niveles de procaspasa-8, pudiendo estar relacionada esta última observación con un mayor procesamiento hacia la forma activa de esta proteína, que, no obstante, no fue posible detectar mediante western blot. En este sentido, bajo estas mismas condiciones hemos encontrado también un aumento en los niveles de citocromo *c* en citosol, así como de caspasa-9 activa, lo que podría estar indicando un aumento de la apoptosis dependiente de caspasas por el consumo de la dieta de manteca. Nuestros resultados también parecen indicar que los animales sometidos a esta dieta muestran una menor progresión de la señalización apoptótica a través de la ruta independiente de caspasas, lo cual se evidencia a partir del descenso observado en los niveles de AIF y ENDOG en extractos nucleares. Por su parte, la sobreexpresión de CYB5R3 parece paliar inducción de la apoptosis causada por la dieta de manteca, ya que en los animales TG alimentados con esta dieta se aumentan los niveles de BCL-2 y no se observa incremento en los niveles de caspasa-9 respecto a los animales del mismo genotipo alimentados con las demás dietas de estudio.

Por otro lado, junto con Saini *et al.*, diversos estudios han demostrado que los PUFA n-3 ejercen un efecto protector frente a la apoptosis muscular [58, 137]. De nuevo, estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en nuestro estudio, donde hemos constatado que los animales alimentados con la dieta de aceite de pescado tienen unos niveles aumentados de procaspasa-8 en músculo esquelético, lo cual (a la inversa de lo que ocurre con la dieta basada en manteca) podría ser indicativo de una acumulación de la forma no fragmentada por un menor procesamiento hacia su forma activa, así como una menor liberación de citocromo *c* y AIF hacia el citosol. A su vez, esto respaldaría los menores niveles de caspasa-9 activa encontrados en este grupo dietético. Hemos demostrado previamente en nuestro grupo de investigación que la combinación de RC con una dieta basada en aceite de pescado produce un efecto protector frente a la apoptosis en músculo esquelético de ratones adultos [69]. Sin embargo, la combinación de una dieta de aceite de pescado (en condiciones de ingesta *ad libitum*) con la sobreexpresión de CYB5R3 no parece traer beneficios adicionales a los ya producidos por la dieta. Por otro lado, también se ha propuesto que los MUFA tienen un efecto protector frente a la apoptosis inducida

Capítulo 1. Influencia del componente graso de la dieta sobre la adaptación metabólica en ratones transgénicos CYB5R3

por SFA en células musculares C2C12, produciendo un incremento en la oxidación de FA [58]. En nuestro estudio, los animales alimentados con la dieta de aceite de oliva mostraron un incremento en la proteína antiapoptótica BCL-2 y un descenso en los niveles de caspasa-9 activa en citosol, que podrían estar reflejando el efecto protector mostrado por Henique *et al.* [58]. No obstante, sería interesante en el futuro profundizar en el estudio de la β -oxidación en estos animales.

En resumen, la dieta de aceite de pescado produce una mejora en el flujo autofágico en el músculo esquelético de los ratones jóvenes, así como un aumento de la biogénesis mitocondrial y un efecto protector frente a la muerte celular programada, sin observarse beneficios adicionales al combinar esta dieta con la sobreexpresión de CYB5R3. Sin embargo, la dieta de manteca parece producir un bloqueo de la autofagia, que en el caso de FB se ve paliado por la sobreexpresión de CYB5R3; y un aumento de la apoptosis dependiente de caspasas, que también parece estar mitigado en los animales TG. En lo que respecta a la bioenergética, la sobreexpresión de CYB5R3 produce un incremento de los complejos de la ETC que podría relacionarse con una mayor producción de ATP, como ya se ha descrito en la bibliografía para otros tejidos [55]. Este efecto parece ser dependiente de la grasa, de modo de sólo se observa en los animales alimentados con la dieta en la que el componente graso principal es el aceite de soja.

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

5 Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

5.1 Resultados

5.1.1 Sobreexpresión de CYB5R3

En primer lugar, estudiamos los niveles de polipéptido CYB5R3 en extractos obtenidos del músculo esquelético de las extremidades traseras de ratones WT y TG alimentados con las dos dietas experimentales (*ad libitum* y RC). La sobreexpresión del gen CYB5R3 condujo a un aumento drástico en los niveles del polipéptido CYB5R3 en tejido muscular independientemente de la ingesta de calorías, y dicha sobreexpresión no se vio afectada por la RC (Figura 30A). Para poder cuantificar los niveles de CYB5R3 en los animales WT fue necesario llevar a la saturación de la señal proporcionada por los animales TG. En este caso encontramos que la RC produjo un incremento en los niveles de CYB5R3 en los animales WT (Figura 30B).

Debido a la amplia distribución de CYB5R3 en las distintas membranas celulares, también se determinaron los niveles de esta enzima en fracciones mitocondriales, membranas extramitocondriales, y en citosol. Tanto en fracciones mitocondriales como en membranas extramitocondriales se seguía observando claramente la sobreexpresión de CYB5R3 en los ratones TG. Sin embargo, a diferencia de lo encontrado en los extractos totales, se observó un descenso en los niveles de CYB5R3 en los animales TG sometidos a RC respecto a los alimentados *ad libitum* (Figura 30C y 30E). De nuevo, en ambas fracciones, sobreexpusimos la membrana para poder cuantificar el polipéptido en los animales WT y determinar así el efecto que producía la RC sobre los niveles de CYB5R3 en estos animales. En ambas fracciones se observó que la RC no producía cambios en los niveles de CYB5R3 en los animales WT (Figura 30D y 30F). Como era de esperar, no se observó señal de CYB5R3 en extractos citosólicos para ningún grupo experimental (Figura 30G).

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

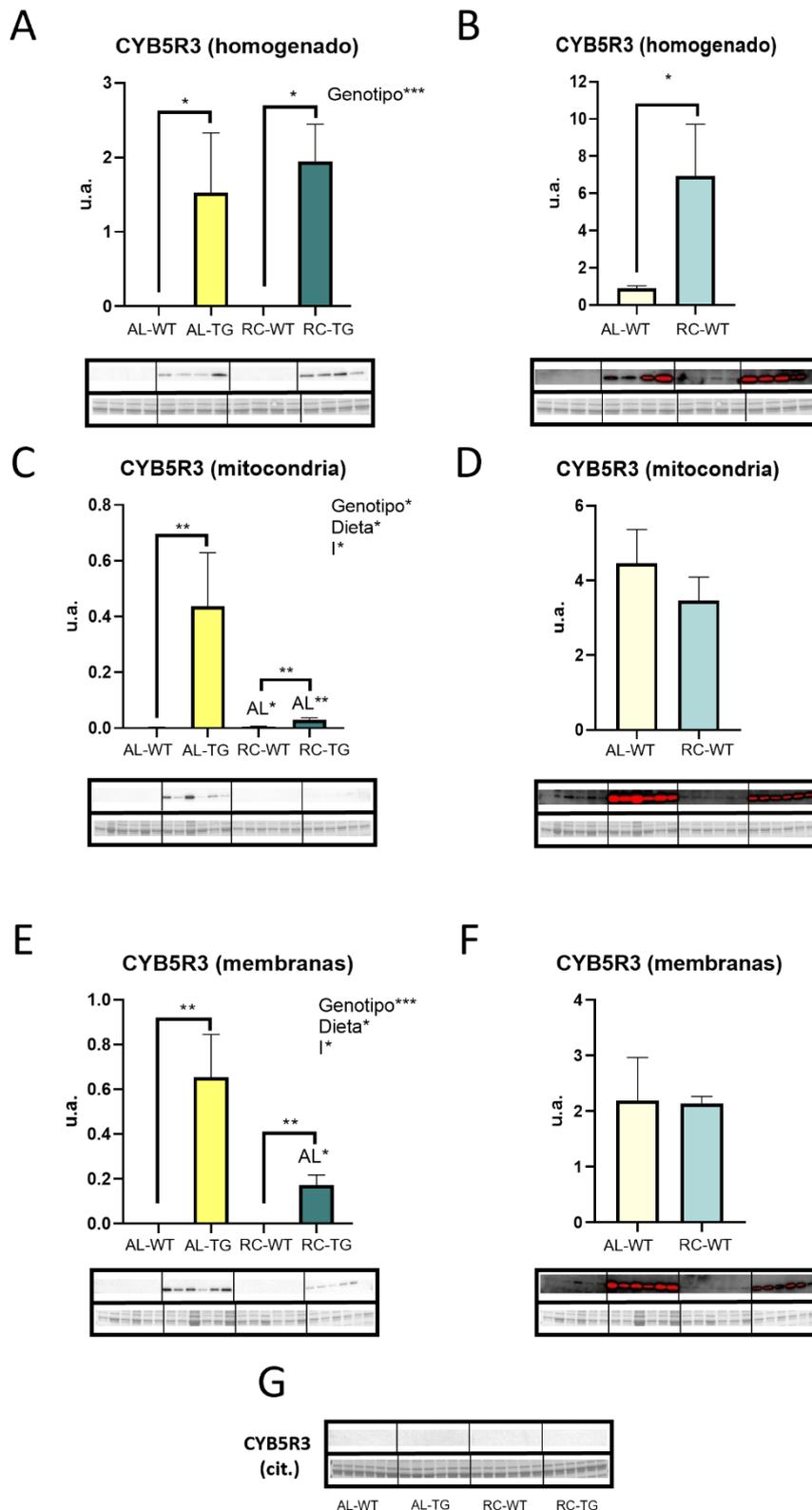


Figura 30. Niveles de expresión de CYB5R3 en músculo esquelético de ratones WT y TG alimentados ad libitum o bajo condiciones de RC. Se muestran los niveles de CYB5R3 en homogeneizados totales (A y B), fracciones enriquecidas en mitocondrias (C y D), membranas ligeras (E y F) y citosol (G). Los datos representados son la media \pm SEM de 4 ó 6 repeticiones. (u.a. = unidades arbitrarias).

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

5.1.2 Niveles de complejos mitocondriales de la cadena de transporte de electrones (ETC)

Para estudiar más a fondo el impacto que la sobreexpresión de CYB5R3 y/o la RC ejercen sobre las mitocondrias, medimos en extractos totales los niveles de VDAC (porina), una proteína de la membrana externa que se considera como un marcador bioquímico de la abundancia mitocondrial [173], así como los niveles de varias subunidades marcadoras de los complejos de la cadena de transporte de electrones (ETC) en la IMM.

La RC incrementó fuertemente los niveles de VDAC en músculo esquelético de ratones WT (AL-WT *vs.* RC-WT) (Figura 31F). Es de destacar que el efecto de la RC se redujo en los ratones que sobreexpresan CYB5R3, de modo que los niveles de VDAC en los ratones TG alimentados bajo condiciones RC no solo fueron mucho más bajos que los de los ratones WT alimentados con la misma dieta (WT-RC *vs.* TG-RC), sino que tienden a ser menores que los de los ratones TG alimentados *ad libitum* (AL-TG *vs.* RC-TG) (Figura 31F).

En el caso de los complejos mitocondriales, evidenciamos un efecto global de la RC independiente del genotipo para aumentar la abundancia de subunidades marcadoras de los complejos I (Figura 31A) y IV (Figura 31D). Por otro lado, los complejos II y III compartieron otro patrón de cambios en función de la dieta y/o genotipo; es decir, la abundancia de estos complejos fue aumentada en los ratones WT alimentados con una dieta en RC (AL-WT *vs.* RC-WT), y en ratones TG alimentados *ad libitum* en comparación con sus controles WT alimentados con la misma dieta (AL-WT *vs.* AL-TG) (Figura 31B y 31C). Sin embargo, no se encontraron diferencias al comparar los dos grupos dietéticos de ratones TG, así como tampoco se encontraron diferencias significativas debidas a la RC en los complejos II y III en estos ratones (Figura 31B y 31C). Finalmente, el patrón de cambios del complejo V con la dieta y/o el genotipo fue similar al exhibido por VDAC (Figura 31F); es decir, la RC produjo un aumento significativo en los ratones WT (AL-WT *vs.* RC-WT), pero este aumento fue disminuido por la sobreexpresión de CYB5R3 (RC-WT *vs.* RC-TG) (Figura 31E). La abundancia del complejo V fue, por tanto, significativamente menor en los ratones TG alimentados bajo condiciones de RC en comparación con los ratones WT alimentados con misma dieta, y no se produjo ningún cambio en función del genotipo observado en ratones alimentados *ad libitum* (Figura 31E).

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

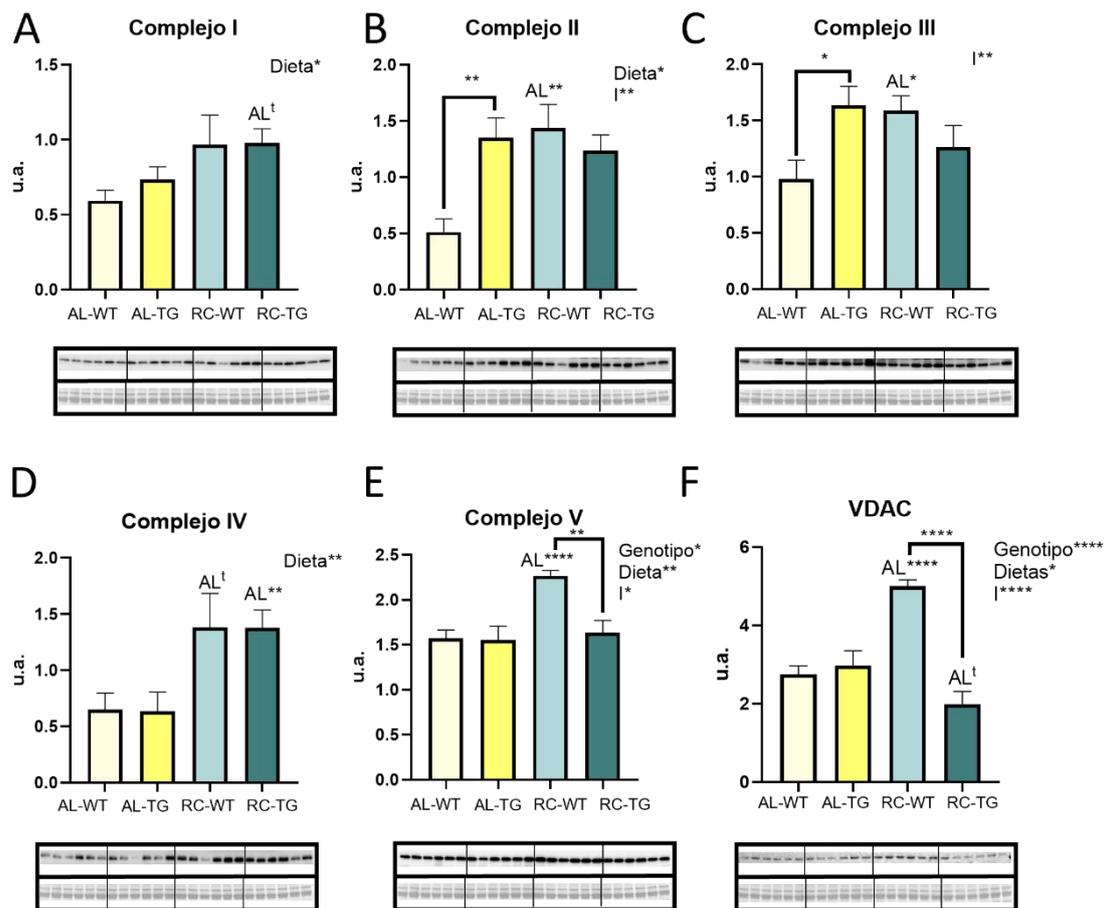


Figura 31. Niveles de los complejos de la ETC y VDAC cuantificado en músculo esquelético de ratones alimentados *ad libitum* y bajo condiciones de RC. Los paneles de A a E representan la cuantificación de subunidades representativas de los cinco complejos de la ETC, y el panel F muestra los niveles de VDAC. Las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y Ponceau S correspondientes se muestran debajo de cada gráfica. En todos los gráficos, los asteriscos sin letra se refieren a diferencias estadísticamente significativas debidas al genotipo. Los datos representados son la media \pm SEM de 6 repeticiones. (u.a. = unidades arbitrarias).

Las alteraciones en los niveles de varios complejos mitocondriales por la dieta y/o el genotipo que documentamos aquí podrían explicarse por cambios en la abundancia mitocondrial del tejido en los diferentes grupos experimentales y/o por modificaciones en la composición intrínseca de las membranas mitocondriales. Para distinguir entre estas dos posibilidades, calculamos los niveles de complejos mitocondriales relativos a VDAC, como había publicado Grünwald *et al.* [173], y los resultados se muestran a continuación (Figura 32). Los resultados mostraron un patrón de cambios constante cuando la abundancia de cada complejo mitocondrial fue referida a VDAC. Nuestros resultados muestran que para la mayoría de los complejos la sobreexpresión de CYB5R3 no causó cambios en los ratones alimentados *ad libitum* (Figura 32A, 32C, 32D y 32E), con la excepción de complejo II (Figura 32B). Al combinar la intervención de RC con la

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

sobreexpresión de CYB5R3, se incrementó la abundancia de los complejos I, II, IV y V referidos a VDAC (Figura 32A, 32B, 32D y 32E), en comparación con los WT sometidos a la misma dieta. Estas diferencias fueron también estadísticamente significativas respecto a los animales TG alimentados *ad libitum* en el caso de los complejos I, IV y V (Figura 32A, 32D y 32E).

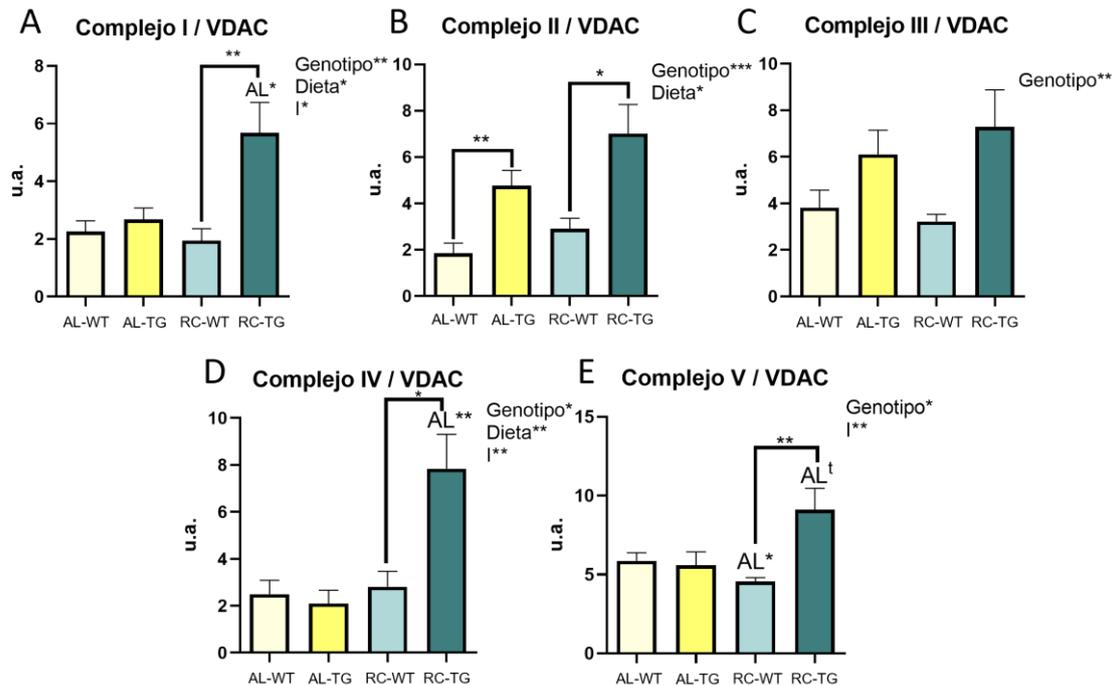


Figura 32. Niveles de los complejos mitocondriales relativos a VDAC en músculo esquelético de animales alimentados *ad libitum* o bajo condiciones de RC. Los datos representados son la media \pm SEM de 6 repeticiones. (u.a. = unidades arbitrarias).

5.1.3 Estudio de los marcadores de dinámica mitocondrial

Dada la importancia del balance entre fusión y fisión mitocondrial para mantener una población mitocondrial saludable, procedimos a investigar el impacto que la RC y/o la sobreexpresión del gen CYB5R3 imponen sobre la dinámica mitocondrial, mediante el estudio de los niveles de proteínas clave relacionados con los fenómenos de fusión y fisión mitocondrial.

La RC produjo un aumento significativo de los niveles de MFN-1 en los ratones de ambos genotipos, sin encontrar ningún cambio que fuera atribuible a la sobreexpresión de CYB5R3 (Figura 33A), mientras que los niveles de MFN-2 (Figura 33B), FIS1 (Figura

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

33C), MFF (Figura 33D) y DRP-1, este último medido en fracciones mitocondriales (Figura 33E), no se vieron afectados por la RC o por la sobreexpresión de CYB5R3.

En lo que respecta a los niveles de VDAC en fracciones mitocondriales, se observó un aumento como consecuencia de la sobreexpresión de CYB5R3 en los ratones alimentados *ad libitum* (AL-WT vs. AL-TG). La RC también produjo un aumento en los niveles mitocondriales de VDAC en los animales WT; sin embargo, se observó un descenso en los animales TG, tanto respecto a los WT alimentados con la misma dieta (RC-WT vs. RC-TG) como a los del mismo genotipo alimentados *ad libitum* (AL-TG vs. RC-TG) (Figura 33F).

Ya que la proteína DRP-1 se transloca desde el citosol a la mitocondria para llevar a cabo la fisión [94], quisimos calcular la ratio DRP-1/VDAC como una estimación de la cantidad de DRP-1 asociado al orgánulo. Los cambios relativos de los distintos marcadores nos llevaron a constatar una bajada de dicha ratio como consecuencia de la RC en animales WT, y un drástico aumento en los TG bajo la misma intervención tanto respecto a los animales del mismo genotipo alimentados *ad libitum* (AL-TG vs. RC-TG) como a los controles WT alimentados con la misma dieta (RC-WT vs. RC-TG) (Figura 33G).

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

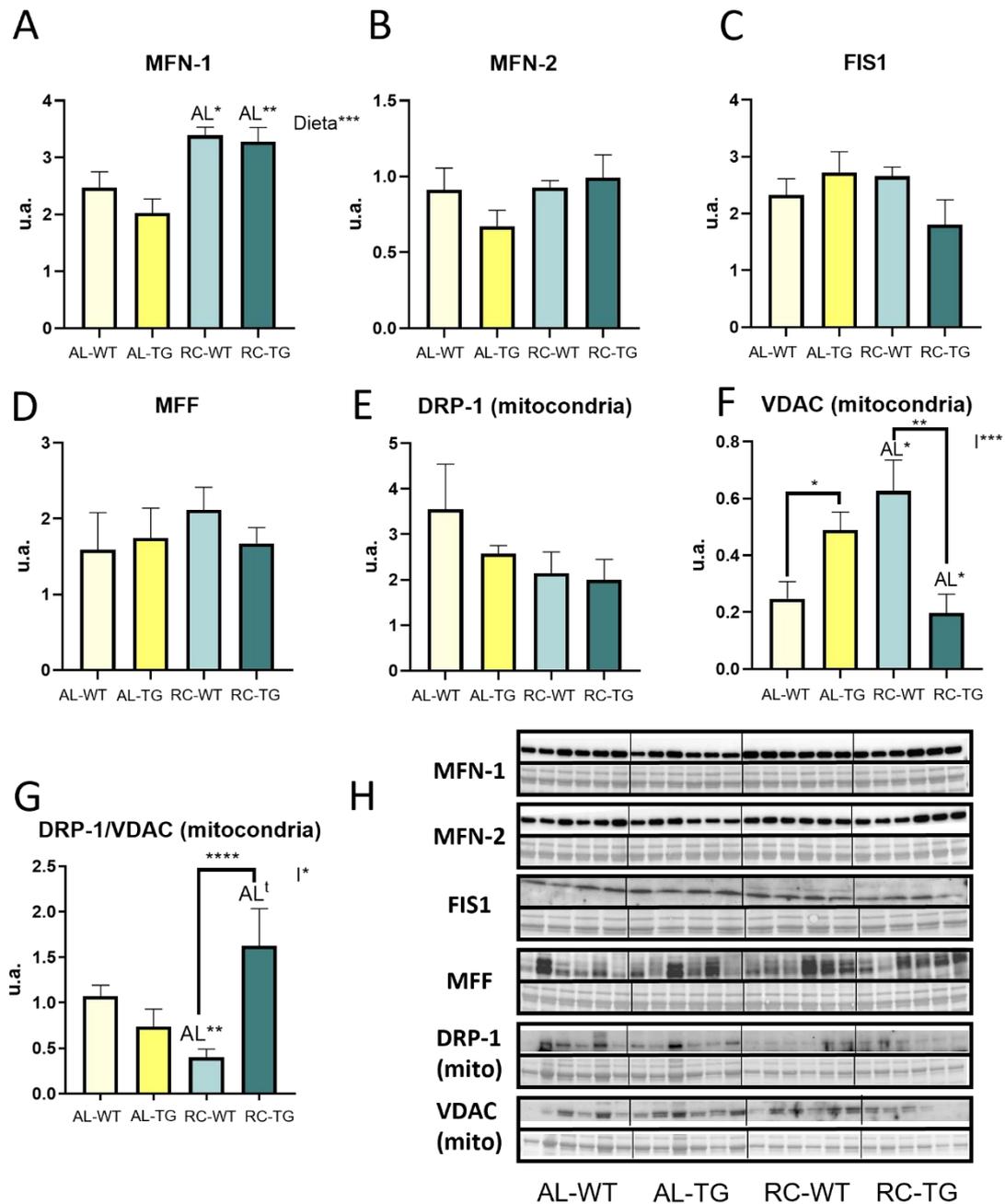


Figura 33. Niveles de expresión de proteínas relacionados con la dinámica mitocondrial en músculo esquelético de animales WT y TG alimentados ad libitum o bajo condiciones de RC. MFN-1 (A), MFN-2 (B), FIS1 (C), MFF (D), DRP-1 en fracciones enriquecidas en mitocondrias (E), VDAC en fracciones enriquecidas en mitocondrias (F) y la relación DRP-1/VDAC (G). Las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y con Ponceau S se muestran en el panel H. Los datos se muestran como media \pm SEM de 6 réplicas. (u.a. = unidades arbitrarias).

5.1.4 Marcadores de biogénesis mitocondrial y Coenzima Q

Continuamos con el estudio de marcadores de biogénesis mitocondrial, entre los que determinamos TFAM, NRF-1, y SIRT3, por su relación con la biogénesis mitocondrial.

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

En cuanto a los niveles de TFAM se encontró un efecto global de la sobreexpresión de CYB5R3 a incrementar dichos niveles independientemente de la dieta (Figura 34B), mientras que NRF-1 fue sustancialmente aumentado por la RC en ratones WT (AL-WT vs. RC-WT), y mostró una tendencia a incrementarse en los ratones TG bajo la misma dieta (AL-TG vs. RC-TG) (Figura 34A).

Por último, los niveles de SIRT3 mostraron una tendencia a incrementarse por la sobreexpresión de la enzima en animales alimentados *ad libitum* (AL-WT vs. AL-TG). Por su lado, la RC también tendió a aumentar los niveles de SIRT3 en los ratones WT (AL-WT vs. RC-WT); sin embargo, este efecto se vio anulado por la sobreexpresión de CYB5R3 (RC-WT vs. RC-TG). La combinación de la sobreexpresión de la enzima y la RC produjo también un descenso significativo de SIRT3 en comparación con los animales alimentados *ad libitum* (AL-TG vs. RC-TG) (Figura 34C).

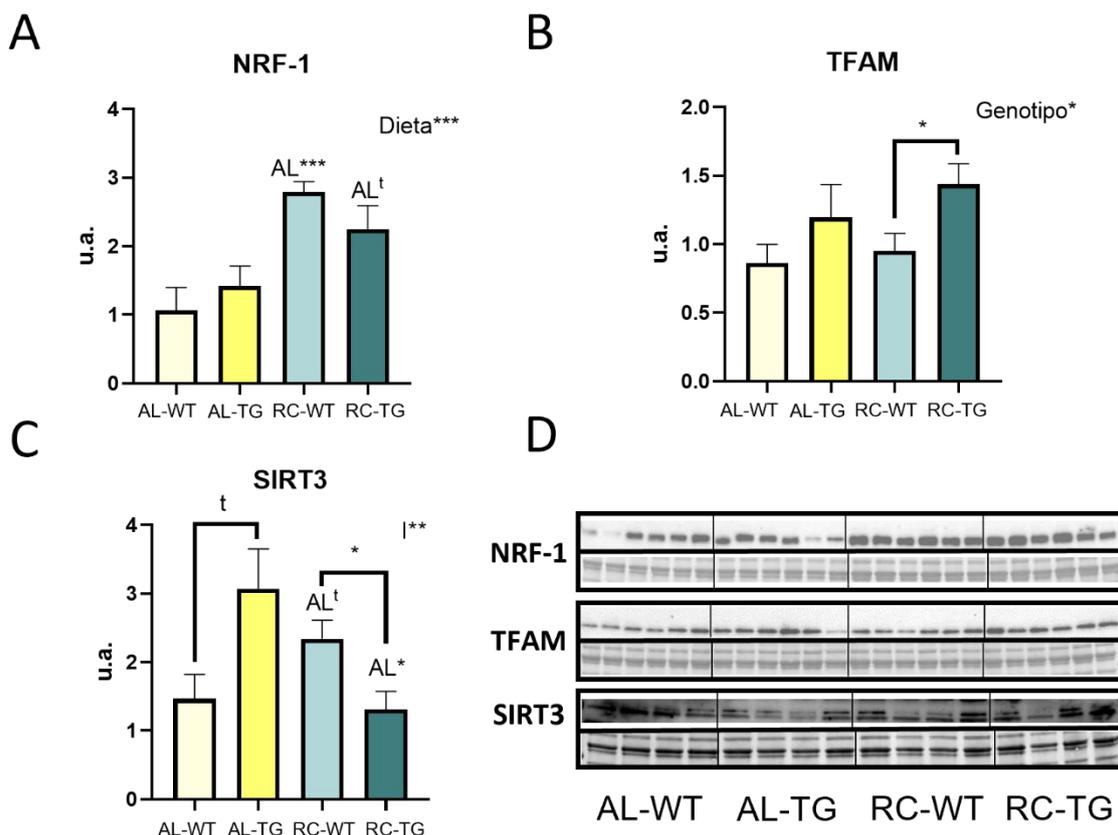


Figura 34. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la biogénesis mitocondrial en músculo esquelético de animales WT y TG alimentados *ad libitum* o bajo condiciones de RC. NRF-1 (A), TFAM (B), y SIRT3 (C). El panel D muestra las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y con Ponceau S. Los datos se muestran como media \pm SEM de 4 ó 6 réplicas. (u.a. = unidades arbitrarias).

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

También se midieron los niveles de coenzima Q, observándose un descenso tanto en los niveles de CoQ₉ como de CoQ₁₀ por la RC, independientemente del genotipo (Figura 35A y 35B), y por tanto en los niveles de CoQ_{total} (Figura 35C). No se encontraron cambios en los niveles de CoQ por la sobreexpresión de CYB5R3 en los ratones alimentados *ad libitum* (Figura 35A, 35B y 35C). La ratio CoQ₉/CoQ₁₀ no mostró cambios en función del genotipo ni de la dieta (Figura 35D). En relación con los niveles de coenzima Q se midieron los niveles de COQ7, como enzima clave en la síntesis de coenzima Q. En este sentido, los niveles de COQ7 no se vieron afectados por la sobreexpresión de CYB5R3 en condiciones *ad libitum* (AL-WT vs. AL-TG). Sin embargo, la RC produjo un aumento de COQ7 en los ratones WT (AL-WT vs. RC-WT) viéndose este efecto paliado por la combinación de RC y sobreexpresión de CYB5R3 (RC-WT vs. RC-TG) (Figura 35E).

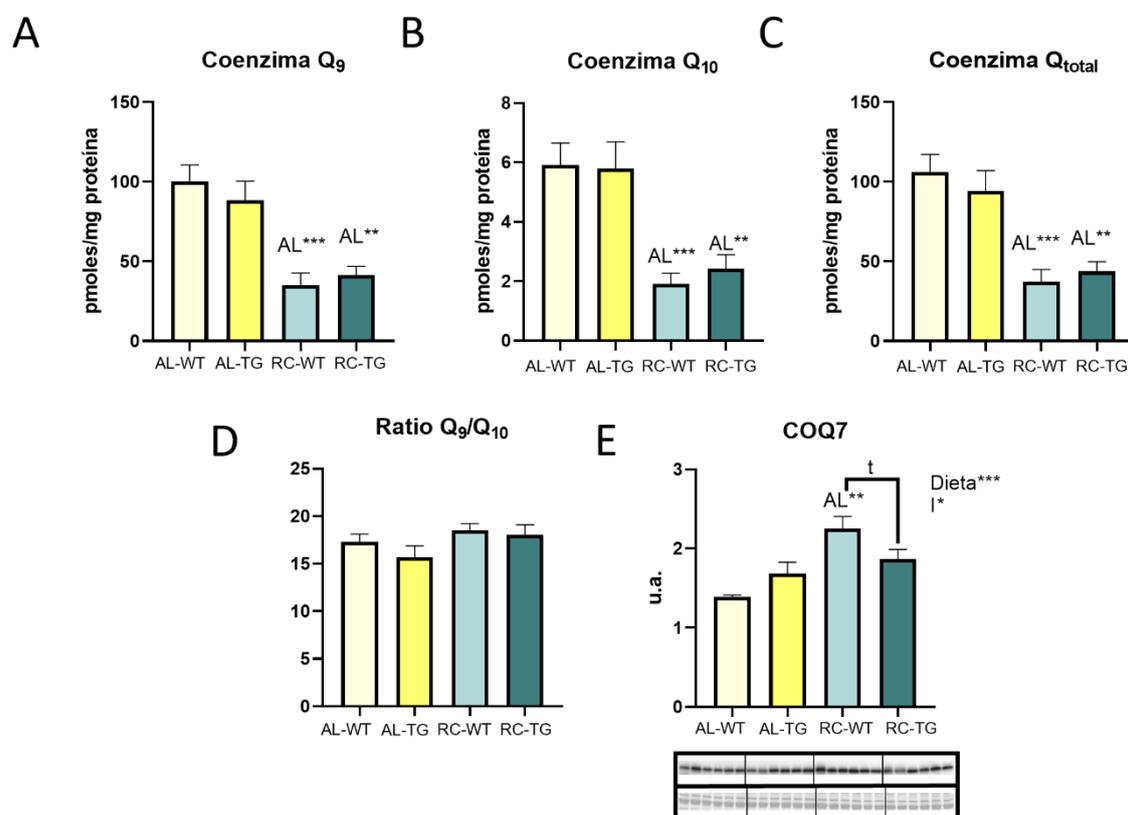


Figura 35. Niveles de coenzima Q medidos con HPLC en músculo esquelético de animales WT y TG alimentados *ad libitum* o bajo condiciones de RC. coenzima Q₉ (A), coenzima Q₁₀ (B), coenzima Q_{total} (C), la relación coenzima Q₉/Q₁₀ (D); y niveles de expresión de la proteína COQ7 (E). Los datos se muestran como media ± SEM de 6 réplicas. (u.a. = unidades arbitrarias).

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

5.1.5 Ultraestructura, planimetría y estereología de las mitocondrias del músculo esquelético bajo condiciones *ad libitum* y de RC en ratones jóvenes

Los cambios encontrados en los marcadores de dinámica y biogénesis mitocondrial medidos hasta el momento incitaron a realizar un análisis de ultraestructura, planimetría y estereología de dicho compartimento mitocondrial del músculo esquelético. Este análisis se realizó en cortes longitudinales de los dos tipos de fibra muscular, blanca y roja, para los grupos experimentales.

5.1.5.1 -Estudio de cortes longitudinales de FB

En el estudio llevado a cabo en FB, encontramos que la sobreexpresión de CYB5R3 no produjo cambios en el área mitocondrial bajo condiciones *ad libitum* (AL-WT vs. AL-TG). Sin embargo, cuando la sobreexpresión de la enzima se combinó con la RC se observó un drástico aumento en el área mitocondrial, tanto respecto a los ratones WT en las mismas condiciones dietéticas (RC-WT vs. RC-TG), como respecto a los animales TG alimentados *ad libitum* (AL-TG vs. RC-TG) (Figura 36A). Cuando se realizó el análisis de distribución de frecuencias del área de todas las mitocondrias medidas se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos experimentales. En músculo esquelético de los ratones TG alimentados *ad libitum* se evidenció la existencia de mitocondrias más pequeñas con comparación con los ratones WT alimentados con la misma dieta. Sin embargo, bajo condiciones de RC fueron los ratones TG los que mostraron los perfiles mitocondriales de mayor tamaño. En cuanto a la comparación entre animales del mismo genotipo alimentados con distinta dieta, el grupo de RC presentó mayor número de mitocondrias pequeñas en el caso de los animales de genotipo WT (AL-WT vs. RC-WT), mientras que se encontraron más mitocondrias de mayor tamaño en el caso de los ratones de genotipo TG (AL-TG vs. AL-WT) (Figura 36B).

La circularidad disminuyó con la sobreexpresión de CYB5R3 bajo condiciones *ad libitum* (AL-WT vs. AL-TG); sin embargo, no se encontraron cambios de este parámetro en función del genotipo para los ratones alimentados bajo condiciones de RC (Figura 36C).

En lo que respecta a los parámetros estereológicos, N_v disminuyó tanto por la sobreexpresión de la enzima en condiciones de ingesta *ad libitum* (AL-WT vs. AL-TG), como por la RC en los animales de genotipo WT (AL-WT vs. RC-WT), no observándose

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

una bajada mayor en los animales TG al someterlos a RC (Figura 36D). Por su parte, Fa disminuyó con la sobreexpresión de CYB5R3 en los ratones alimentados en condiciones *ad libitum* (AL-WT vs. AL-TG), y también disminuyó con la RC en los ratones WT (AL-WT vs. RC-WT) (Figura 36E). En este caso la combinación de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC aumentó los valores de Fa, tanto en comparación con los ratones WT alimentados con la misma dieta (RC-WT vs. RC-TG), como con los TG control (AL-TG vs. RC-TG) (Figura 36F). Los cambios observados en Fa se constatan con los obtenidos en los valores de Vv (Figura 36E).

En la figura 36G se muestran micrografías representativas de FB en corte longitudinal de todos los grupos experimentales.

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

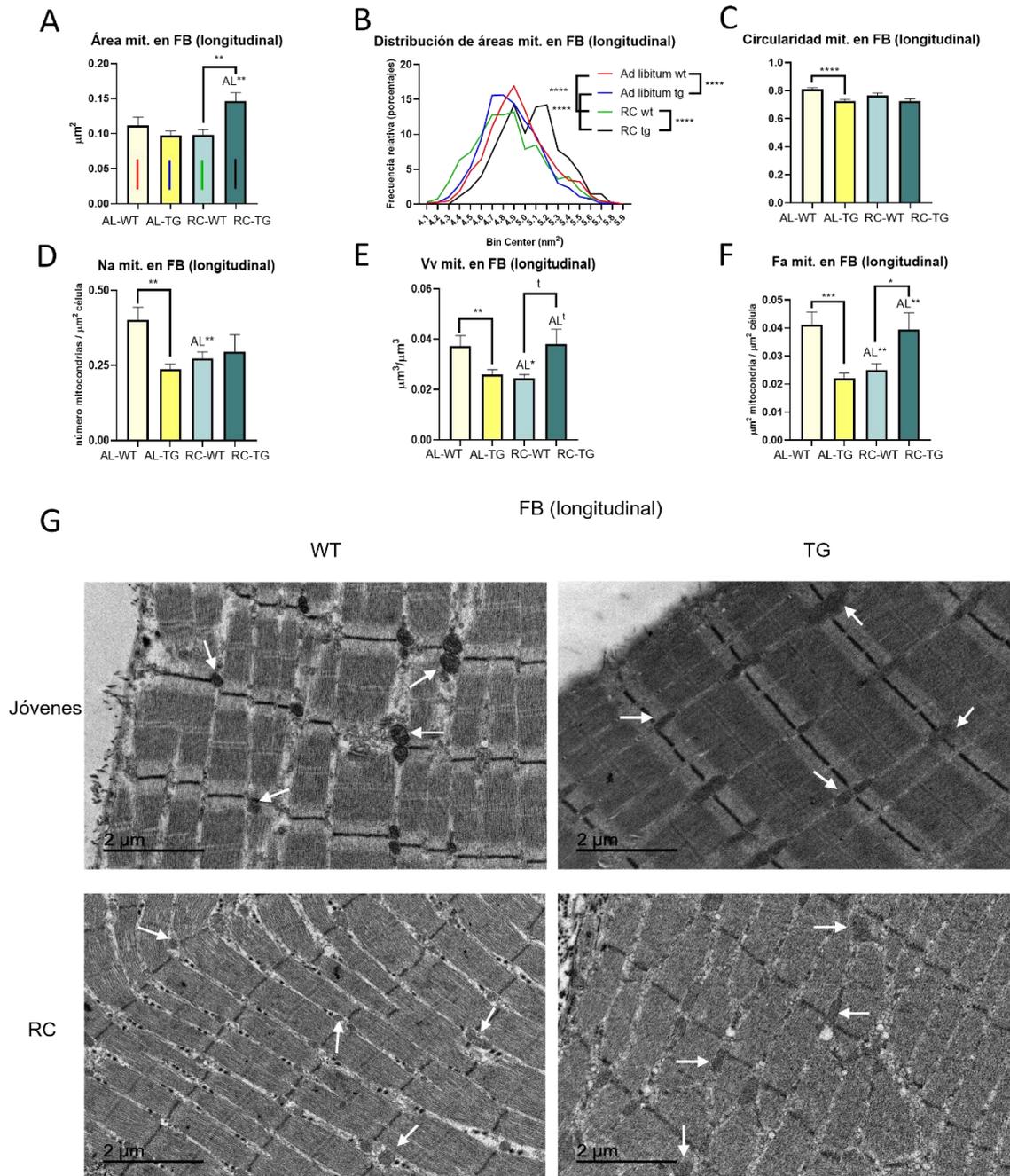


Figura 36. Características morfométricas de las mitocondrias de fibras blancas (FB) del músculo gastrocnemio en ratones alimentados ad libitum y bajo condiciones de RC en secciones longitudinales. Área mitocondrial (A), distribución del tamaño mitocondrial (B), circularidad (C), densidad de perfil numérico (Na) (D), densidad de volumen (Vv) (E) y área fraccional (FA) (F). En la gráfica del panel A se ha añadido un segmento dentro de cada barra del color correspondiente a cada grupo en la gráfica B. El panel G muestra micrografías de microscopía electrónica representativas de cada grupo. Las flechas blancas señalan mitocondrias. Los datos se muestran como media \pm SEM de 4 animales.

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

5.1.5.2 Estudio de cortes longitudinales de FR

A continuación, se procedió a realizar el estudio ultraestructural de la población mitocondrial en FR, usando de nuevo cortes longitudinales, pero distinguiendo en este caso entre las dos subpoblaciones de mitocondrias presentes en este tipo de fibra: intermiofibrilares (IMFM) y subsarcolémicas (SSM). El tamaño medio de las SSM no se vio afectado ni por la sobreexpresión de CYB5R3 ni por la RC (Figura 37A). En cambio, en el caso de las IMFM se observó un aumento del área cuando se combinaron la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC, respecto a los animales del mismo genotipo alimentados *ad libitum* (AL-TG vs. RC-TG) (Figura 37B). La sobreexpresión, por su parte, no causó ningún efecto en el área de las IMFM en los ratones alimentados *ad libitum* (AL-WT vs. AL-TG) (Figura 37B). La distribución de frecuencias de los perfiles mitocondriales de nuevo mostró que no había ningún cambio en los tamaños de las SSM (Figura 37C). Sin embargo, la distribución de los perfiles de IMFM mostró diferencias entre todos los grupos experimentales, destacando el grupo de animales TG sometidos a RC, donde se observaron más mitocondrias de mayor tamaño en comparación tanto con los animales del mismo genotipo alimentados *ad libitum* (AL-TG vs. RC-TG) como con los WT alimentados con la misma dieta (RC-WT vs. RC-TG) (Figura 37D).

En lo que respecta a la circularidad, este parámetro disminuyó tanto en SSM como en IMFM con la sobreexpresión de la enzima (AL-WT vs. AL-TG) (Figura 37E y 37F). En el caso de las SSM, cuando se combinaron la sobreexpresión y la RC tendió a incrementarse la circularidad (AL-TG vs. RC-TG) (Figura 37E). Por su parte, la RC disminuyó la circularidad de las IMFM en los ratones de genotipo WT (AL-WT vs. RC-WT) (Figura 37F).

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

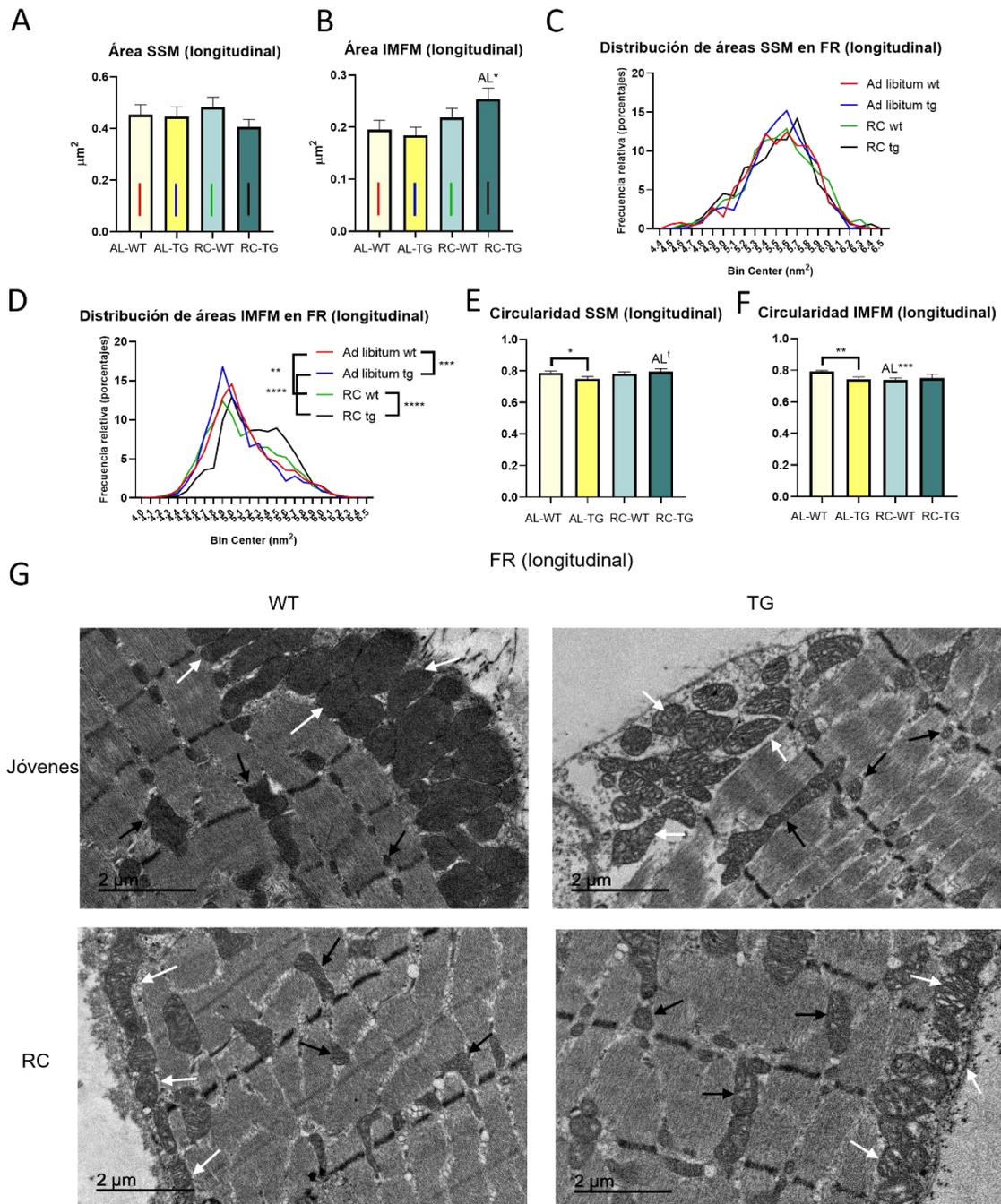


Figura 37. Características planimétricas de las mitocondrias de las fibras rojas (FR) del músculo gastrocnemio en ratones alimentados ad libitum o bajo RC en secciones longitudinales. Área de mitocondrias subsarcolémicas (SSM) (A), mitocondrias intermiofibrilares (IMFM) área (B), distribución de tamaños SSM (C), distribución de tamaños IMFM (D), circularidad de SSM (E), circularidad de IMFM (F). En las gráficas de los paneles A y B se ha añadido un segmento dentro de cada barra del color correspondiente a cada grupo en las gráficas C y D. En el panel G se muestran micrografías representativas de microscopía electrónica de cada grupo. Las flechas blancas señalan SSM y las flechas negras IMFM. Los datos se muestran como media \pm SEM de 4 animales.

Los parámetros estereológicos en las FR no mostraron grandes cambios entre los distintos grupos experimentales. Se observó una tendencia a disminuir Na con la sobreexpresión

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

de CYB5R3 (AL-WT vs. AL-TG) (Figura 38A), y una tendencia a incrementar Fa cuando se combinaron sobreexpresión y RC (AL-TG vs. RC-TG) (Figura 38C). No se encontró ningún cambio en los valores de Vv (Figura 38B).

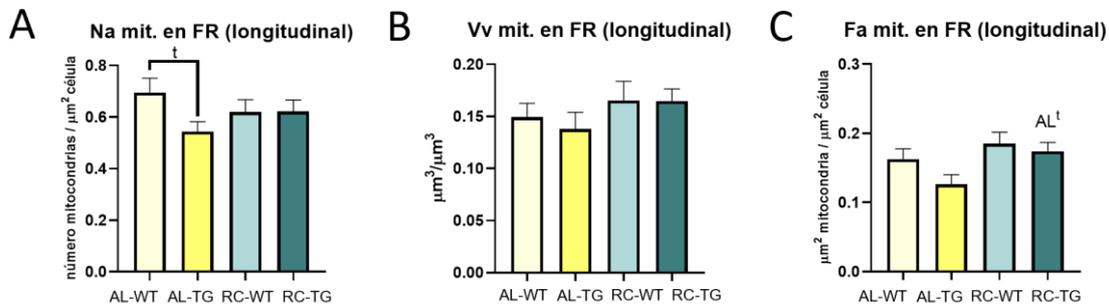


Figura 38. Esterología de las mitocondrias de FR del músculo gastrocnemio en ratones alimentados ad libitum o bajo RC en secciones longitudinales. Densidad de perfil numérico (Na) (A) y densidad de volumen (Vv) (B) y área fraccional (FA) (C).

En la figura 37G se muestran micrografías representativas de FR en corte longitudinal de todos los grupos experimentales.

5.1.6 Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y RC sobre marcadores de autofagia y mitofagia

Debido a que diversos estudios han relacionada los beneficios de la RC con una inducción de la autofagia [124, 125], llevamos a cabo un estudio de esta vía bajo nuestras condiciones experimentales. Para ello estudiamos marcadores de macroautofagia como LC3AB I y II y P62, así como PINK1 y PARKIN, marcadores de mitofagia.

La sobreexpresión de CYB5R3 tendió a incrementar los niveles de LC3AB I (AL-WT vs. AL-TG), al igual que tendió a incrementarlos la RC (AL-WT vs. RC-WT) (Figura 39A). No se observó ningún efecto cuando se combinaron ambas intervenciones ya que los animales TG ya mostraron unos mayores niveles de LC3AB I cuando se alimentaron *ad libitum*.

En el caso de LC3AB II no se encontraron diferencias significativas como consecuencia de la sobreexpresión de la enzima en animales alimentados *ad libitum* (AL-WT vs. AL-TG) ni en condiciones de RC (RC-WT vs. RC-TG), aunque la RC produjo un aumento en los niveles de LC3A/B II en los animales WT (Figura 39B).

Con respecto a la ratio LC3AB II/ I (Figura 39C), que es indicadora del flujo autofágico [38], se observó una tendencia hacia la disminución cuando se combinaron RC y

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

sobreexpresión de CYB5R3. En lo que respecta a los niveles de P62 no se observaron cambios ni por dieta ni por genotipo (Figura 39D).

En cuanto a los marcadores de mitofagia, encontramos un aumento como consecuencia de la RC en animales WT (AL-WT vs. RC-WT) en los niveles de PINK1, sin observar ningún cambio por la sobreexpresión o por la combinación de ambas intervenciones (Figura 39E). Los niveles de PARKIN no se vieron afectados por la dieta o el genotipo (Figura 39F).

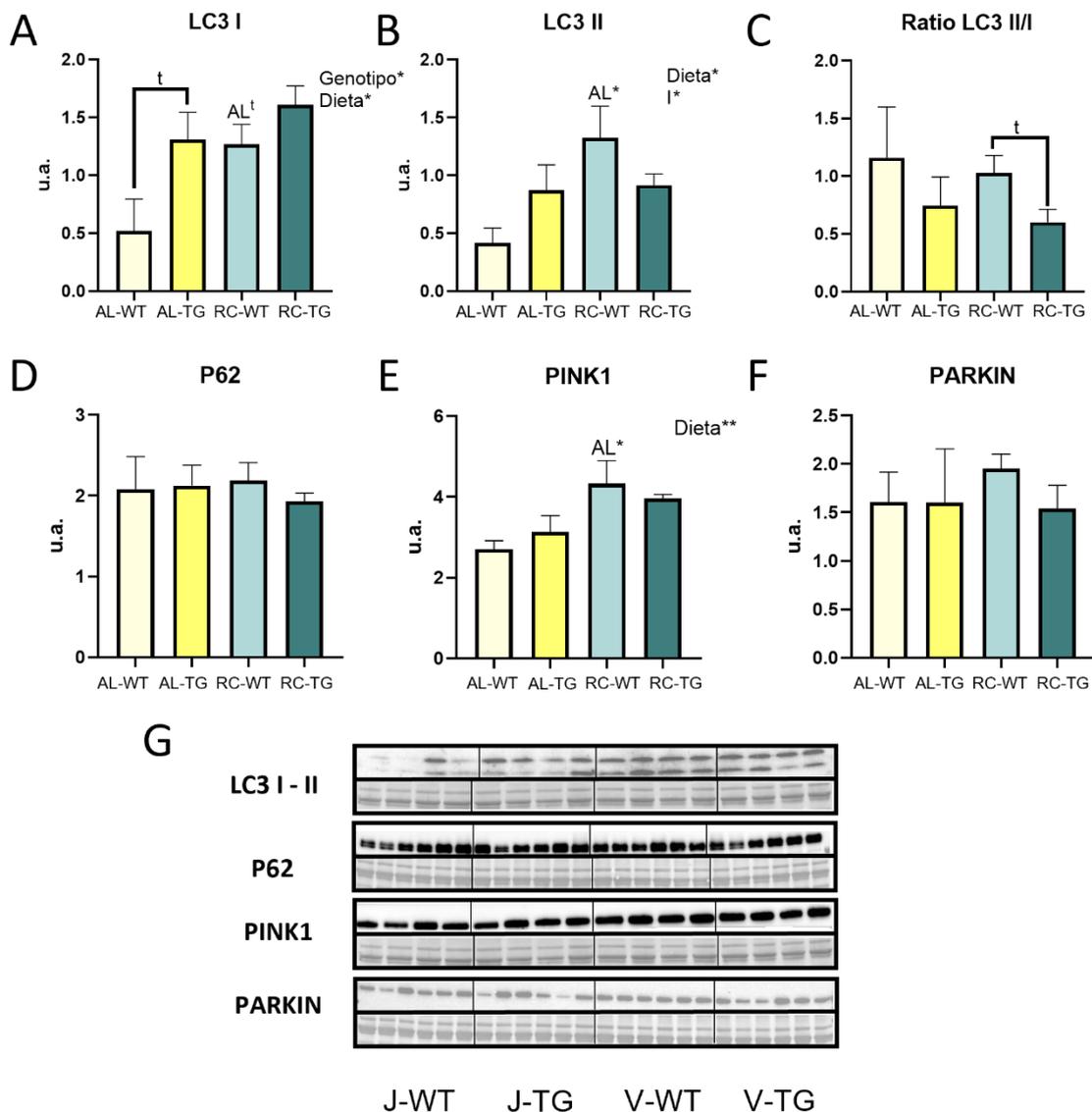


Figura 39. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con autofagia en músculo esquelético de animales WT y TG alimentados ad libitum o bajo condiciones de RC. LC3 AB I (A) y LC3 AB II (B), la ratio LC3AB II/I (C), P62 (D), PINK1 (E) y PARKIN (F). El panel G muestra las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y con Ponceau S. Los datos se muestran como media \pm SEM de 4 ó 6 animales.

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

5.1.7 Estudio de la abundancia de figuras de autofagia por microscopía electrónica

Para completar el estudio de autofagia, se llevó a cabo un estudio de las figuras de autofagia encontradas en los distintos grupos experimentales por microscopía electrónica de transmisión. Dada la diversidad de formas y tamaños de las figuras de autofagia, no se ha llevado a cabo cuantificación de áreas, sino parámetros indicadores de su abundancia en el tejido, tanto en fibras blancas como rojas.

Nuestros resultados mostraron que la sobreexpresión de la enzima disminuyó la cantidad de figuras de autofagia en FB tanto en los animales alimentados *ad libitum* como en los alimentados bajo condiciones de RC (Figura 40A, 40B y 40C).

El estudio realizado en FR reveló resultados muy similares, aunque en este caso las diferencias aparentes entre los distintos grupos experimentales no alcanzaron la significación estadística (Figura 40D, 40E y 40F).

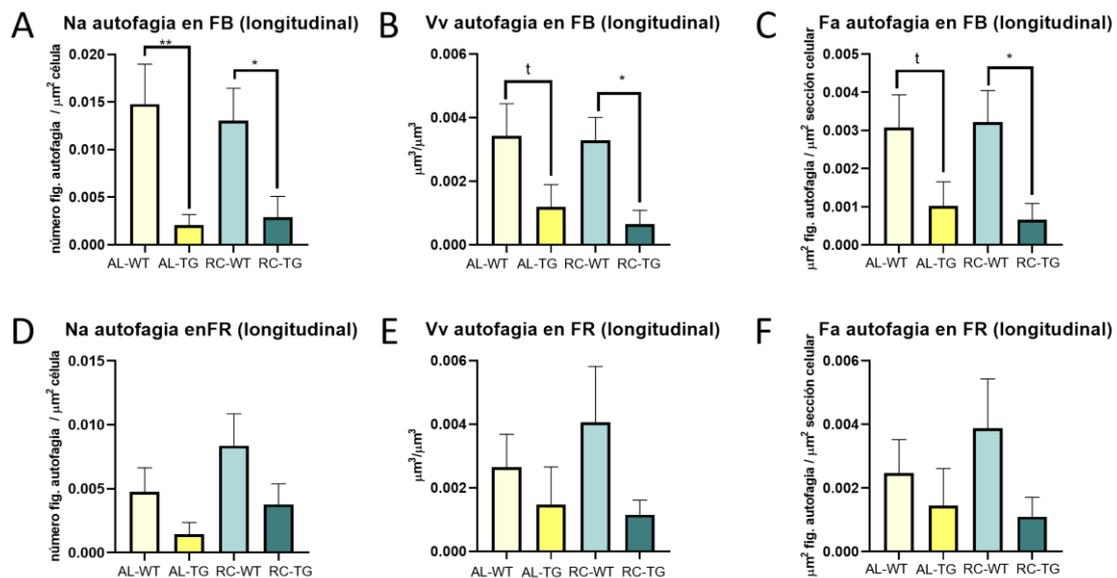


Figura 40. Esterología de las figuras de autofagia de FB y FR en músculo esquelético de animales WT y TG alimentados *ad libitum* o bajo condiciones de RC. Densidad de perfil numérico (Na) (A) y densidad de volumen (Vv) (B) y área fraccional (FA) (C) en FB, y Na (D), Vv (E) y FA (F) en FR. Los datos se muestran como media \pm SEM de 4 animales.

5.1.8 Marcadores relacionados con la vía de apoptosis

La inducción de la autofagia, que como se ha comentado anteriormente se relaciona con los beneficios de la RC, parece llevar a un descenso de la muerte celular programada [99], poniendo de relevancia el estudio de las distintas vías por las que se desencadena la

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

apoptosis. Para el estudio de la vía extrínseca se midieron los niveles de procaspasa-8, en los que no se encontraron diferencias de ningún tipo, ni por sobreexpresión de CYB5R3 ni por la RC (Figura 41A). La caspasa-8 enlaza la vía extrínseca y la intrínseca a través de BID, proteína proapoptótica [174]. Los niveles de BID en mitocondria fueron significativamente menores en los animales sometidos a RC independientemente de su genotipo (AL-WT vs. RC-WT, AL-TG vs. RC-TG) (Figura 41B). Sin embargo, en cuanto a los niveles de BID truncado, forma activa de BID, solo se observó una tendencia a bajar en los animales TG alimentados en condiciones de RC, en comparación con los WT alimentados con la misma dieta (RC-WT vs. RC-TG) (Figura 41C).

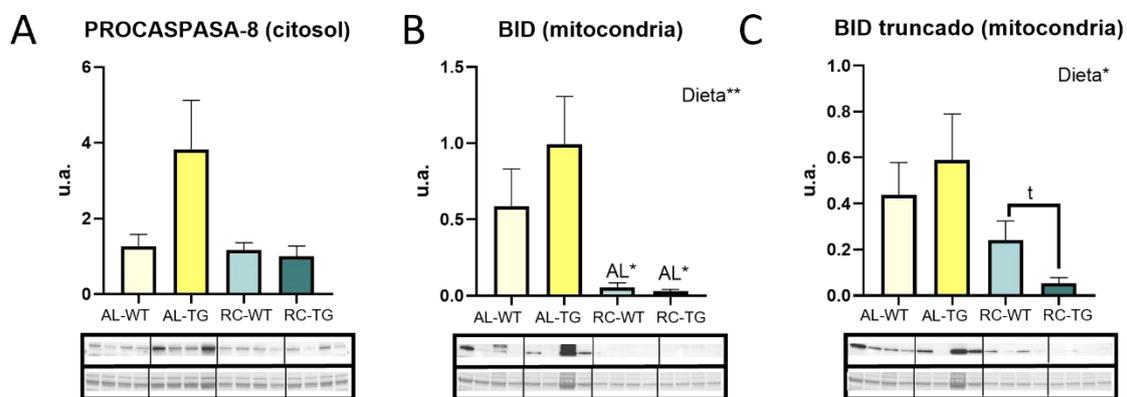


Figura 41. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la vía extrínseca de apoptosis por transferencias de Western en animales alimentados ad libitum o bajo condiciones de RC. Procaspasa-8 (A), BID (B), y BID truncado en fracciones enriquecidas en mitocondrias (C). Cada gráfica tiene debajo las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y con Ponceau S. Los datos se muestran como media \pm SEM de 4 réplicas. (u.a. = unidades arbitrarias).

El desencadenamiento de la vía intrínseca va a depender del balance entre proteínas proapoptóticas, como BID y BAX, y antiapoptóticas, como BCL-2 [175]. La sobreexpresión de CYB5R3 incrementó los niveles de BCL-2 (AL-WT vs. AL-TG) pero al someter a estos animales TG a RC se produjo un descenso en los niveles de BCL-2 (AL-TG vs. RC-TG) (Figura 42A). En el caso de BAX, se observó un descenso significativo en sus niveles cuando se combinaron sobreexpresión de CYB5R3 y RC (AL-TG vs. RC-TG) (Figura 42B). Como una estimación del balance entre proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas se recurre frecuentemente al cálculo de la ratio BCL-2/BAX, en la que se encontró una tendencia a incrementarse como consecuencia de la sobreexpresión de CYB5R3 (AL-WT vs. AL-TG). Sin embargo, la RC no produjo ningún cambio en dicha ratio (Figura 42C).

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

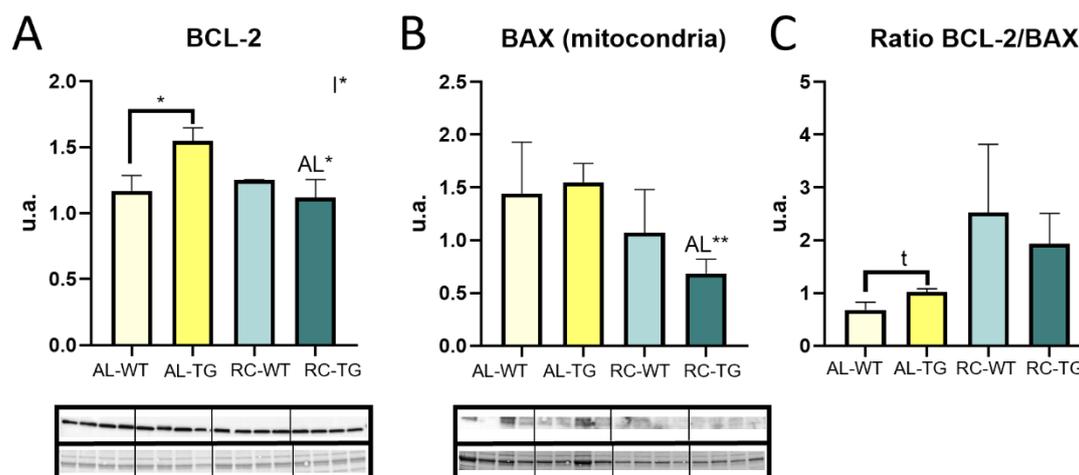


Figura 42. Niveles de expresión de proteínas desencadenantes de apoptosis en músculo esquelético de animales WT y TG alimentados *ad libitum* o bajo condiciones de RC. BCL-2 (A), BAX en fracciones enriquecidas en mitocondrias (B), ratio BCL-2/BAX (C). Cada gráfica tiene debajo las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y con Ponceau S. Los datos se muestran como media \pm SEM de 4 réplicas. (u.a. = unidades arbitrarias).

La permeabilización de la mitocondria llevará a la liberación de APAF-1 y citocromo *c* [175]. Los niveles de APAF-1 no se vieron afectados por la sobreexpresión de CYB5R3 en los animales alimentados *ad libitum* (AL-WT vs. AL-TG). Sin embargo, la RC tendió a disminuir los niveles de APAF-1 en los animales WT (AL-WT vs. RC-WT) y a incrementarlos en los TG (AL-TG vs. RC-TG). Al combinar la RC con la sobreexpresión de CYB5R3 se produjo un incremento significativo en los niveles de esta proteína en comparación con los WT alimentados con la misma dieta (RC-WT vs. RC-TG) (Figura 43B). APAF-1 también cumple funciones en el núcleo, por lo que también se midieron sus niveles en esta fracción. Se observó un descenso significativo de los niveles de APAF-1 en núcleo, cuando se combinaron RC y sobreexpresión de CYB5R3, tanto respecto a los ratones WT alimentados con la misma dieta (RC-WT vs. RC-TG) como respecto a los TG alimentados bajo condiciones *ad libitum* (AL-TG vs. RC-TG) (Figura 43B).

Para estudiar el efecto de la permeabilización mitocondrial sobre la liberación de citocromo *c*, se midieron los niveles de esta proteína en citosol, sin observarse diferencias significativas por dieta ni por genotipo (Figura 43A). El citocromo *c* junto con APAF-1 forman el apoptosoma, al que se une la procaspasa-9 para activarse [176]. Los niveles de procaspasa-9 tendieron a disminuir con la RC en los animales WT (AL-WT vs. RC-WT) y a incrementarse en los TG (AL-TG vs. RC-TG). El incremento observado en los animales TG bajo condiciones de RC fue estadísticamente significativo respecto a los animales WT alimentados bajo las mismas condiciones (RC-WT vs. RC-TG) (Figura

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

43C). Por su lado, la forma activa de la caspasa-9 tendió a incrementarse por la RC en los ratones TG respecto a los animales del mismo genotipo alimentados *ad libitum* (AL-TG vs. RC-TG) (Figura 43D).

Tanto la caspasa-8 como la caspasa-9 activan a la caspasa-3 como una de las principales caspasas efectoras que ejecutan el programa de muerte celular [206]. Los niveles de procaspasa-3 no sufrieron cambios por ninguna de las intervenciones (Figura 43F); sin embargo, en los niveles de caspasa-3 se observó un descenso como consecuencia de la RC en los ratones WT (AL-WT vs. RC-WT) (Figura 43G). Este efecto se vio anulado por la sobreexpresión de CYB5R3 en las mismas condiciones (AL-TG vs. RC-TG) (Figura 43G). En consecuencia, la sobreexpresión de CYB5R3 condujo a un incremento significativo de caspasa-3 cuando se compararon los grupos de ratones alimentados bajo condiciones de RC (RC-WT vs. RC-TG) (Figura 43G).

Entre las proteínas inhibidoras de apoptosis se determinaron los niveles de XIAP, en los que se observó un incremento significativo por la RC tanto en los animales WT como en los TG (AL-WT vs. RC-WT, AL-TG vs. RC-TG), así como una tendencia a incrementar los niveles de este inhibidor de la apoptosis por la combinación de sobreexpresión y RC respecto a los ratones WT alimentados con la misma dieta (RC-WT vs. RC-TG) (Figura 43H).

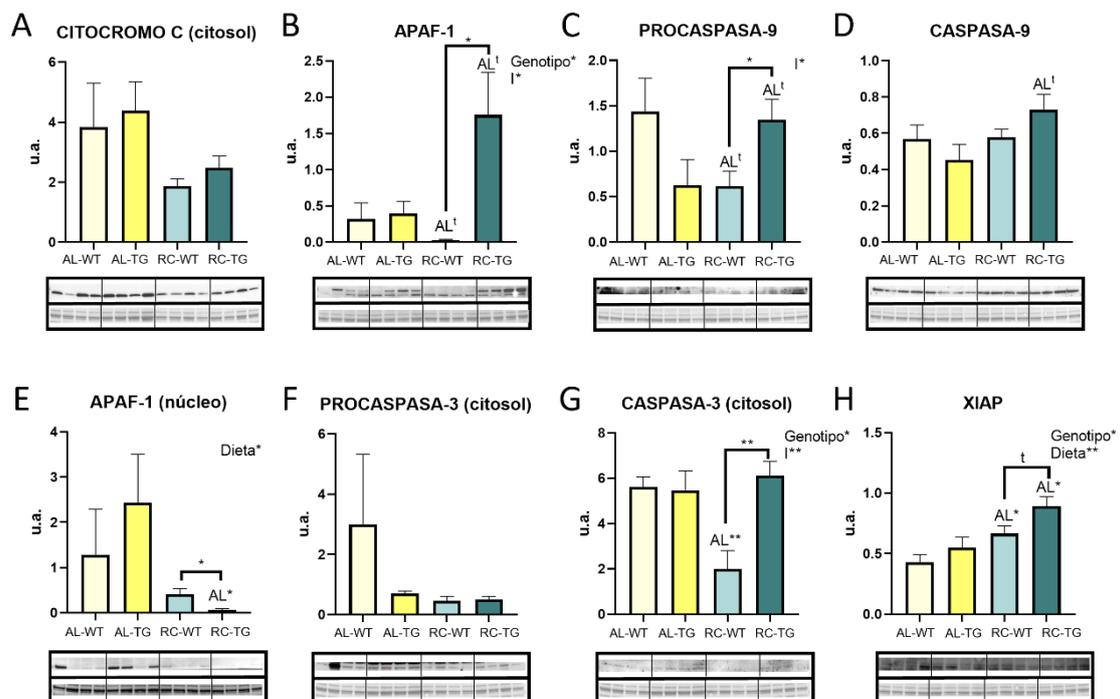


Figura 43. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la vía intrínseca de apoptosis en músculo esquelético de animales WT y TG alimentados *ad libitum* o bajo condiciones de RC. Citocromo c en fracciones citosólicas (A), APAF-1 (B), Procaspasa-9 en fracciones citosólicas

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

(C), Caspasa-9 en fracciones citosólicas (D), APAF-1 en fracciones enriquecidas en núcleo (E), Procaspasa-3 en fracciones citosólicas (F), Caspasa-3 en fracciones citosólicas (G) y Xiap (H). Cada gráfica tiene debajo las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y con Ponceau S. Los datos se muestran como media \pm SEM de 4 réplicas. (u.a. = unidades arbitrarias).

La permeabilización mitocondrial también lleva a la liberación de proteínas que desencadenan la apoptosis independiente de caspasas, como AIF y ENDOG. Los niveles de AIF en mitocondrias, donde se encuentra inicialmente, fueron similares para todos los grupos experimentales (Figura 44A). En cuanto a su liberación al citosol, encontramos que la RC en animales TG tendió a disminuir los niveles de AIF en citosol, respecto a los animales alimentados *ad libitum* (AL-TG vs. RC-TG). Los animales TG sometidos a RC mostraron unos mayores niveles de AIF en citosol que los WT alimentados con la misma dieta (RC-WT vs. RC-TG) (Figura 44B). Esto estaría en concordancia con los niveles de AIF observados en núcleo, donde va para llevar a cabo la degradación del DNA. En núcleo encontramos que la RC incrementó los niveles de AIF en los animales WT (AL-WT vs. RC-WT), y que la combinación de RC y sobreexpresión de CYB5R3 llevó a un descenso de estos en comparación con los WT alimentados bajo las mismas condiciones (RC-WT vs. RC-TG) (Figura 44C). En lo que respecta a los niveles de ENDOG en núcleo, estos tendieron a incrementarse como consecuencia de la RC en los ratones WT (AL-WT vs. RC-WT) sin observarse ningún efecto del genotipo (Figura 44D).

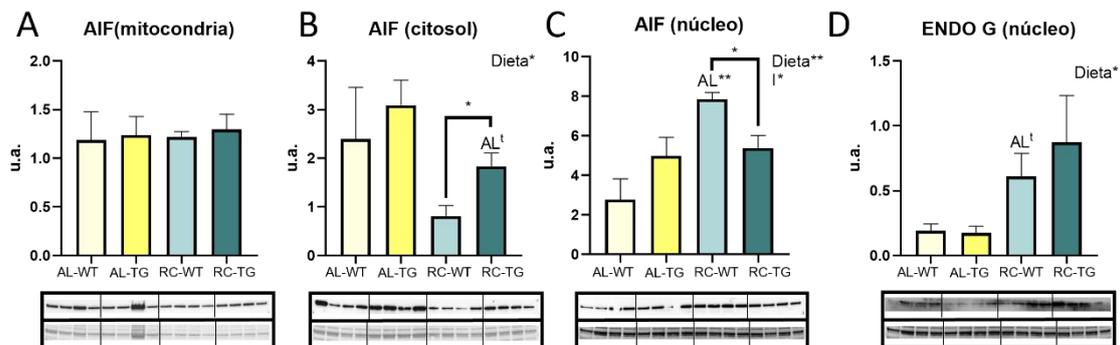


Figura 44. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis independiente de caspasas en músculo esquelético de animales alimentados *ad libitum* o bajo condiciones de RC. AIF en fracciones enriquecidas en mitocondria (A), AIF en fracciones citosólicas (B), AIF en fracciones enriquecidas en núcleo (C) y ENDOG en fracciones enriquecidas en núcleo (D). Cada gráfica tiene debajo las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y con Ponceau S. Los datos se muestran como media \pm SEM de 4 réplicas. (u.a. = unidades arbitrarias).

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

5.2 Discusión

La NADH deshidrogenasa CYB5R3 tiene implicaciones directas en la protección celular contra el estrés oxidativo y en la regulación de los niveles de NAD⁺ y, por lo tanto, se ha propuesto un papel para esta enzima en el metabolismo y el envejecimiento [42, 207]. Además, se ha considerado que algunos de los efectos beneficiosos que la RC ejerce sobre la salud podrían estar relacionados, al menos en parte, con la inducción de CYB5R3 [53, 54, 208]. Sin embargo, aunque algunos de los efectos saludables de la RC son imitados en ratones TG que sobreexpresan CYB5R3 [55], los mecanismos implicados en la adaptación metabólica de los ratones TG podrían ser independientes de los descritos para la RC. En este sentido, los ratones TG alimentados con una dieta estándar *ad libitum* poseían más masa grasa, pero no eran más pesados, que los controles WT correspondientes, y utilizaban preferentemente los carbohidratos para satisfacer sus necesidades energéticas. Estos dos rasgos claramente diferencian a los ratones TG del fenotipo típico de la RC, que se caracteriza por la disminución del peso corporal, de la adiposidad, y por el uso predominante de grasas como fuente de energía [209, 210]. Dado que se necesitan ácidos grasos saturados para permitir la β -oxidación mitocondrial [211], las adaptaciones metabólicas provocadas por la sobreexpresión de CYB5R3 podría estar relacionado con la acción de esta enzima en mejorar la elongación y la desaturación de ácidos grasos, que puede conducir a la inhibición de la β -oxidación de ácidos grasos y, por tanto, al uso preferencial del metabolismo de carbohidratos [55]. La composición lipídica de las membranas también es modificada por la RC, pero los cambios nuevamente difieren de los producidos por sobreexpresión de CYB5R3. En este sentido, la RC disminuye los niveles de PUFA de cadena larga y aumenta los ácidos grasos monoinsaturados sin ningún cambio en los ácidos grasos saturados, como resultado de una reprogramación metabólica que conduciría a niveles más bajos de daño oxidativo que podrían contribuir a la extensión de la longevidad [212-214].

Debido a que la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC modifican aspectos clave del metabolismo energético y el perfil lipídico de los tejidos en formas opuestas, es importante estudiar si algunas de las adaptaciones metabólicas inducidas por la sobreexpresión de CYB5R3 se ven afectadas por la RC. De acuerdo con esta idea, nuestra investigación anterior ha demostrado que aumentar los PUFA n-3 en los tejidos puede ser beneficioso para los ratones alimentados *ad libitum* [215], mientras que acorta la longevidad en ratones alimentados con una dieta de RC [71].

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

En lo que respecta al peso de estos animales, hemos publicado recientemente que después de recibir una dieta estándar durante 4 meses *ad libitum*, los ratones CYB5R3 no mostraron diferencias significativas en peso corporal con respecto a sus controles WT [216], lo que está de acuerdo con nuestra investigación previa en ratones que se alimentaron con dieta estándar o con dieta rica en grasas [55]. Sin embargo, aunque la RC produjo una disminución significativa del peso corporal en ambos genotipos, la sobreexpresión de CYB5R3 condujo a una mayor preservación del peso corporal, sugiriendo un papel clave de la CYB5R3 como determinante en el control del peso corporal en ratones bajo RC [216].

La cuantificación de los niveles CYB5R3 en homogeneizados de músculo esquelético de ratones alimentados *ad libitum* confirmó nuestras observaciones previas [55], de un aumento espectacular en el músculo esquelético de los ratones TG en comparación con los WT. Este incremento en los niveles de CYB5R3 en los animales TG también se observó en las distintas fracciones analizadas, haciendo del músculo esquelético un modelo adecuado para estudiar los efectos directos de la sobreexpresión de CYB5R3 en la fisiología celular. La RC no afectó los niveles de CYB5R3 en homogeneizados totales de músculo esquelético en animales TG, a diferencia de la disminución que causó en los niveles de CYB5R3 en el hígado de estos mismos animales, particularmente en los TG [216]. En el caso del músculo esquelético de los ratones WT, se evidenció un aumento en los niveles de CYB5R3 por RC en los homogeneizados totales. Sin embargo, se observó la disminución en los niveles de CYB5R3 cuando se midieron sus niveles en fracciones mitocondriales y en membranas extramitocondriales de animales TG, sin encontrarse cambios en los ratones WT. En la actualidad, no tenemos una explicación concluyente sobre la bajada observada en los niveles de CYB5R3 en fracciones mitocondriales y de membranas en los animales TG sometidos a RC por lo que serán necesarias más investigaciones para tratar de dilucidarlo.

La disminución hepática de CYB5R3 en ratones jóvenes sometidos a RC está de acuerdo con la investigación previa realizada en ratas Fischer- 344 [54] y ratones C57BL/6J [208], lo que ha permitido documentar que la RC tiene un doble efecto sobre los niveles de CYB5R3 en membrana plasmática del hígado. Es destacable que, mientras que se observó un descenso en la actividad dependiente de CYB5R3 en animales jóvenes alimentados con una dieta de RC, se observó un aumento notable en animales viejos alimentados con la dieta de RC de forma prolongada. Además, la expresión hepática y niveles de

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

polipéptido de CYB5R también disminuyeron en ratones C57BL/6J después de 18 h de ayuno, lo que se confirmó en las líneas celulares HepG2 y Hepa1.6 cultivadas bajo privación de glucosa [217]. En cerebro, los niveles de CYB5R3 no mostraron cambios por RC en animales jóvenes, pero fueron notablemente aumentados en ratas viejas Ficher-344 alimentadas con una dieta de RC. Sin embargo, en músculo esquelético de los animales WT se ha observado un aumento en los niveles de CYB5R3, que también se ha encontrado en células neuroblásticas SH-SY5Y cultivadas con suero obtenido de ratas que habían sido alimentadas bajo RC, en comparación con las células cultivadas con suero obtenido de ratas alimentadas *ad libitum* [218]. En conjunto, estas observaciones demuestran la existencia de mecanismos específicos de tejido y edad que regulan los niveles de CYB5R3 por RC.

Investigaciones anteriores han establecido firmemente que la RC da como resultado un aumento en el número y la masa de mitocondrias, y puede reducir la producción de ROS sin disminuir la respiración celular [112, 181]. Sin embargo, no se conoce cómo la RC afecta al metabolismo mitocondrial en ratones que sobreexpresan CYB5R3. Para dilucidar el efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en la regulación de masa y función mitocondrial, usamos una batería de anticuerpos contra proteínas mitocondriales clave, incluyendo VDAC, diferentes subunidades de los complejos mitocondriales, las mitofusinas MFN-1 y MFN-2, el factor de fisión FIS1, el factor de fisión mitocondrial, MFF, DRP-1 y dos factores de transcripción implicados en la biogénesis mitocondrial: NRF-1 y TFAM.

En lo que respecta a la ETC, la sobreexpresión de CYB5R3 por sí misma aumentó los niveles de complejos II y III en ratones alimentados *ad libitum*, y la RC, por su parte, produjo un aumento generalizado en los niveles de los complejos mitocondriales en músculo esquelético, aunque este efecto parecía ser anulado cuando se combinó la intervención dietética con la sobreexpresión de CYB5R3. Para conocer si estos cambios se debían a cambios en la abundancia mitocondrial o en la composición de la membrana mitocondrial, procedimos a determinar VDAC, proteína abundante de la membrana mitocondrial externa cuyos niveles sirven como marcador bioquímico de estimación de la masa mitocondrial [173]. Mientras que en hígado no se encontraron diferencias debidas a la intervención de RC [216], en el músculo esquelético de ratones WT sí se observó un aumento en los niveles de VDAC en comparación con sus controles *ad libitum*, sugiriendo una mayor abundancia mitocondrial en este tejido bajo condiciones de RC. De acuerdo

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

con nuestras investigaciones anteriores [184], nuestros resultados apoyan que el metabolismo mitocondrial se adapta rápidamente a la RC en el músculo esquelético en comparación con otros tejidos como el hígado. Se ha encontrado que otras vías que también afectan la tasa de envejecimiento, como la señalización de mTOR y la vía de ubiquitina-proteasoma, no se alteran por RC en músculo esquelético en ratas jóvenes, pero al alcanzar una edad mediana se produce una inhibición sustancial [219]. Como se ha descrito en resultados y recientemente hemos publicado, normalizamos estos niveles de los complejos de la ETC frente a los niveles de VDAC, para analizar los cambios independientemente de la abundancia mitocondrial. En este estudio se encontró que, tanto en músculo como en hígado, la sobreexpresión de CYB5R3 producía un aumento generalizado en los niveles de los complejos mitocondriales [216], siendo este efecto especialmente llamativo en músculo esquelético. Se ha demostrado que el aumento del complejo I por RC en músculo esquelético no produce un aumento concomitante en las ROS [67]. Por lo tanto, el aumento de complejos ETC podría indicar una mayor producción de ATP sin mayor producción de ROS en los ratones TG, como ya se ha demostrado ocurre en hígado [55].

Curiosamente, la sobreexpresión de CYB5R3 mitigó el aumento de los niveles de VDAC en el músculo esquelético de ratones alimentado bajo RC, un efecto que podría estar relacionado con la inhibición de la β -oxidación mitocondrial y el uso preferencial del metabolismo de carbohidratos en los ratones TG [55].

En cuanto a los cambios encontrados en los marcadores de dinámica mitocondrial en músculo esquelético, evidenciamos un aumento en los niveles de la proteína MFN-1 por RC en ambos genotipos, aunque los niveles de MFN-2 no se vieron afectados. En este contexto se ha demostrado que la RC aumenta los niveles de MFN-2 en músculo esquelético de ratones hembra Swiss alimentados durante 6 meses con la misma dieta utilizada aquí (AIN93M) a partir de 1 mes de edad [86]. Esta discrepancia puede ser causada por diferencias de sexo y cepa [220]. Resultados anteriores de nuestro propio grupo también demostraron un aumento de los niveles de MFN-2 en el músculo esquelético de ratones C57BL/6 alimentados con la dieta AIN93G bajo condiciones de RC durante 6 meses a partir de los 3 meses de edad [70]. Este hecho revela la importancia de la cantidad de grasa en la dieta. Los niveles de MFN-2 también se vieron incrementados por RC en el hígado de los ratones WT de este mismo estudio [216], lo cual está de acuerdo con una investigación previa que documentó la regulación positiva

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

de MFN-2 en hígado de ratones alimentados bajo condiciones de RC durante 3 o 12 meses a partir de los 2 meses de edad [85]. Sin embargo, en el caso del hígado, no se observaron cambios por la RC en los niveles de MFN-1 [216], indicando que los cambios encontrados en músculo esquelético fueron diferentes a los presentes hígado bajo las mismas condiciones de RC, lo que pone de manifiesto que existe una especificidad tisular para adaptaciones mitocondriales a las intervenciones.

El aumento de MFN-1 en músculo esquelético de ratones de ambos genotipos alimentados bajo RC podría indicar un aumento de la fusión mitocondrial, necesaria para proteger contra la degradación autofágica de estos orgánulos [221]. El aumento en la fusión también estaría en concordancia con la ausencia de cambios en los marcadores de fisión, como FIS1, MFF o DRP-1, que hemos encontrado en nuestro estudio. Para corroborar los cambios asociados a la RC sobre los perfiles y la abundancia mitocondrial, así como investigar el impacto que las alteraciones en los marcadores bioquímicos tienen sobre la ultraestructura de este orgánulo, se llevó a cabo un estudio cuantitativo utilizando microscopía electrónica. Estudios previos de nuestro grupo reportaron que una intervención de RC de 6 meses basada en la dieta AIN93G no afectó al área mitocondrial en hígado de ratón [72, 222], aunque produjo un descenso en el área de las SSM en músculo esquelético [70]. Sin embargo, mientras que el estudio llevado a cabo en hígado de los animales sometidos a la misma intervención que la seguida en este trabajo de tesis doctoral coincidía con los resultados obtenidos previamente por el grupo [168]; en músculo esquelético de ratones WT no se encontraron cambios en el área mitocondrial por RC ni en FB ni en FR. Dado que la cantidad de grasa constituye la principal diferencia entre las dietas AIN93G (7% de grasa) y AIN93M (4% de grasas), existe la posibilidad de que este factor juegue un papel clave en la determinación de las adaptaciones mitocondriales de los diferentes tejidos a la RC. Por su parte, la combinación de la RC con la sobreexpresión de CYB5R3 lleva a un aumento del área mitocondrial, que estaría en concordancia con el aumento en los niveles de MFN-1 en este grupo experimental.

También encontramos diferencias entre tejidos en los marcadores de abundancia mitocondrial, ya que mientras en el estudio anteriormente mencionado se observó un incremento tanto en Vv como en Fa por la RC en hígado [72, 222], estos cambios no se encontraron en músculo esquelético de ratones sometidos a la misma intervención, concretamente en FR [70], poniendo de manifiesto la diferencia entre tejidos. En este caso, nuestros resultados sobre abundancia mitocondrial concordarían con lo publicado

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

anteriormente por nuestro grupo en FR [70], donde evidenciamos que la abundancia mitocondrial no se afecta ni por la RC ni, en nuestro caso, por la sobreexpresión de CYB5R3. Sin embargo, cuando analizamos los cambios encontrados en FB encontramos que la RC disminuye la abundancia mitocondrial en los ratones WT, produciendo el mismo efecto que la sobreexpresión de la enzima. En lo que respecta a hígado, en este caso existen discrepancias con el estudio previo, ya que en los animales de nuestra intervención la RC no produjo alteraciones en la abundancia mitocondrial [168]. Estos resultados nos indican que cada tejido, y concretamente cada tipo de fibra en el caso del músculo esquelético, responde de forma distinta a la RC, poniendo de manifiesto la importancia de realizar los estudios en distintos órganos y, en el caso del músculo, tener en cuenta los distintos tipos de fibra. Sorprendentemente, la combinación de la RC con la sobreexpresión de CYB5R3 lleva a un incremento de la abundancia mitocondrial (Vv y Fa) en FB, tanto respecto a los WT de la misma dieta, como a los TG alimentados *ad libitum*, lo cual concordaría con el mayor tamaño mitocondrial encontrado en fibra blanca en este grupo.

La variabilidad de resultados en cuanto a la cuantificación de la abundancia mitocondrial en respuesta a la intervención de RC y al envejecimiento también puede surgir de la heterogeneidad en los métodos utilizados para evaluar el contenido mitocondrial [223], como se discutió en nuestra publicación anterior [70]. Por otro lado, resulta difícil establecer relaciones entre los marcadores bioquímicos y los parámetros de la cuantificación microscópica, ya que los análisis bioquímicos de los distintos marcadores proteicos se llevan a cabo en homogeneizados de tejido muscular de la pata trasera, mientras que el estudio de microscopía se lleva a cabo en gastrocnemio y se analizan fibras individuales de cada tipo.

El estudio de marcadores de biogénesis mitocondrial reveló que los niveles de TFAM no fueron afectados por la RC pero, curiosamente, evidenciamos un efecto general de la sobreexpresión de CYB5R3 a aumentar este factor, independientemente de la dieta, a diferencia de lo encontrado en hígado, donde era la RC la que producía un aumento en los niveles de este marcador para ambos genotipos [216]. Mientras que Civitarese *et al.* han demostrado que el mRNA de TFAM aumenta en el músculo de humanos sanos bajo RC, la intervención no se evaluó para los niveles del polipéptido [112]. En el caso de hígado, sí que se ha observado un aumento en los niveles de TFAM en ratones bajo RC [85]. El significativo aumento del polipéptido NRF-1 en el músculo esquelético de

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

ratones WT alimentados con RC está en consonancia con el aumento similar observado para el marcador de abundancia mitocondrial VDAC. Sin embargo, nuestros resultados de microscopía electrónica no indican un aumento de la masa mitocondrial por RC, por lo que este aumento observado en VDAC y en NRF-1 podría ser específico de algún tipo muscular y no manifestarse en gastrocnemio donde, como se ha señalado anteriormente, se ha llevado a cabo el estudio ultraestructural. Cabe destacar que, como también se encontró para VDAC, el aumento de los niveles de NRF-1 por RC no se observó en los ratones TG, reforzando la interferencia de ambas intervenciones. Por otra parte, el aumento observado en nuestro estudio para los niveles de NRF-1 en músculo esquelético de animales sometidos a RC está de acuerdo con resultados previos en los que los niveles de mRNA de NRF-1 aumentaron en células HeLa cultivadas con suero de RC, efecto que fue inhibido por la insulina [181]. Además, se ha puesto también de manifiesto que los niveles proteicos de TFAM y NRF-1 disminuyen con el envejecimiento en hígado de rata, y que esta disminución puede prevenirse mediante RC [224]. Sin embargo, en hígado de los ratones usados en el presente estudio solo se observó una tendencia a incrementar los niveles de NRF-1 por RC [216].

Dada la relación encontrada en músculo entre PGC1 α y SIRT3, y por tanto con la biogénesis mitocondrial en células musculares [225], se determinaron los niveles de esta proteína como marcador relacionado con la biogénesis mitocondrial. Las sirtuinas se activan cuando se incrementa la ratio NAD⁺/NADH, por lo que su expresión aumenta con la RC [226] y se esperaría que se aumentara también con la sobreexpresión de CYB5R3 [36]. Concretamente en el caso de SIRT3 se ha encontrado un incremento en músculo esquelético de ratones C57BL/6 tras 12 meses de RC [227], lo cual concuerda con nuestros resultados donde observamos una tendencia a incrementar SIRT3 por RC. Como era de esperar, la sobreexpresión de la CYB5R3 en condiciones *ad libitum* produce el mismo efecto que la RC. De nuevo, este efecto se ve totalmente anulado por la combinación de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC. Este incremento de SIRT3 con la sobreexpresión y la RC se podría relacionar, además de con la biogénesis mitocondrial como hemos señalado anteriormente, con un menor estrés oxidativo debido a la activación de la superóxido dismutasa 2 (SOD2) por esta proteína [228, 229], la potenciación de la ETC, la activación de la isocitrato deshidrogenasa, que produce NADPH que se usa como reductor, y la activación de FOXO3A, implicado en mecanismos antioxidantes [230].

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

Respecto a los niveles de CoQ, estudios previos de nuestro grupo habían mostrado un incremento en los niveles de CoQ₉ y CoQ₁₀ en músculo esquelético de ratones de 4 meses de edad sometidos a 1 mes de RC [119]. Sin embargo, en el presente estudio observamos un descenso significativo tanto en los niveles de CoQ₉ como de CoQ₁₀, y por tanto del CoQ_{total}, por la RC independientemente del genotipo. En este caso de nuevo habría que destacar la diferencia de la dieta, AIN93G en el estudio anterior frente a la AIN93M del presente estudio, poniendo de manifiesto que la posible diferencia se deba a la cantidad de grasa de la dieta y/o al tiempo de intervención: 4 meses en el presente estudio, mientras que en Parrado-Fernández *et al.* los animales solo estuvieron 1 mes en condiciones de RC [119]. En este sentido, sería interesante estudiar el papel del componente graso de la dieta, así como del tiempo de intervención en la influencia que tiene la RC sobre el sistema de CoQ. Respecto a la bajada en sí de los niveles de CoQ causada por una RC prolongada, podría estar implicado al fenómeno de mitohormesis, por el cual una disminución de CoQ produciría un leve estrés mitocondrial que llevaría a la activación de respuestas fisiológicas y adaptativas en el organismo que contribuyan a la extensión de la longevidad [231]. También sería interesante estudiar los niveles de CoQ de manera separada en sus formas oxidada y reducida, ya que en este estudio se optó por llevar a cabo una reducción química del CoQ presente en la muestra antes de su inyección en el sistema de detección por HPLC para aumentar así la sensibilidad y disminuir el tiempo de retención. No obstante, dado que es el CoQ reducido el que tiene la función antioxidante [232], sería interesante que la investigación futura se dirija a determinar los niveles que hay inicialmente en cada estado de óxido-reducción.

Para profundizar más en el posible efecto de la RC y la sobreexpresión de CYB5R3 en el sistema de biosíntesis de CoQ se midieron los niveles de la proteína COQ7. La subida observada en los niveles de este marcador como consecuencia de la RC podría deberse a la existencia de una respuesta compensatoria dirigida a compensar el descenso en los niveles de CoQ por RC, aunque finalmente no se llega a obtener tal efecto. COQ7 es un punto de regulación clave en la ruta de biosíntesis de CoQ [118]. En lo que respecta a esta proteína cabe destacar que COQ7 tiene que ser desfosforilado por la fosfatasa PTC7 para ser activo [233]. Por tanto, cabe la posibilidad de que los mayores niveles de COQ7 que encontramos en los animales alimentados bajo condiciones de RC no se correspondan realmente con mayores niveles de la forma activa de la proteína. Aunque la sobreexpresión de CYB5R3 *per se* no tuvo ningún efecto en los niveles de COQ7, al

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

combinar dicha sobreexpresión con la RC observamos una tendencia hacia la disminución de los niveles de esta proteína, poniendo de manifiesto, como ya hemos publicado previamente, la existencia de una interferencia entre la RC y la sobreexpresión de CYB5R3 [216].

Por otro lado, entre las rutas que tienen un papel esencial en el mantenimiento del músculo esquelético cabe destacar la autofagia, que se ha postulado como un mecanismo esencial para mantener la masa muscular y preservar la integridad de las fibras, así como para retrasar la sarcopenia [234, 235]. Además, se ha demostrado que el efecto antienvjecimiento que produce la RC se va atenuado cuando se inhibe la autofagia [236]. Por tanto, dada la importancia de la autofagia en músculo esquelético son muchos los estudios que se han llevado a cabo para tratar de entender el efecto que produce la RC sobre la autofagia en este tejido. Previamente en nuestro grupo, Gutiérrez-Casado *et al.* habían demostrado que la RC en músculo producía un aumento en los niveles de P62, así como un descenso en la ratio LC3 II/I+II, sin observarse cambios en los marcadores de mitofagia [70]. Nuestros resultados no concuerdan con lo observado en el estudio previo ya que, mientras que no encontramos cambios debidos a la RC en los niveles de P62 ni en la ratio LC3 II/I+II, observamos un considerable aumento en los niveles de LC3 I y LC3 II, así como en PINK1 por la RC. Este aumento en los niveles de LC3 por la RC también ha sido recogido por Yang *et al.* en un estudio llevado a cabo en músculo esquelético de humanos, tanto a nivel de proteína como de transcritos [237]. De acuerdo con esto, nuestros resultados parecen indicar un aumento de la autofagia como consecuencia de la RC, que también concordaría con el aumento encontrado en los niveles de PINK1, así como con distintos estudios que muestran un aumento de esta ruta por RC [237, 238]. Sin embargo, cabe destacar la dificultad a la hora de interpretar los cambios encontrado en los niveles de LC3, dado que esta proteína sufre modificaciones post-traduccionales además de ser degradada al final de la autofagia [136]. Tradicionalmente se han usado las ratios LC3 II/I+II o LC3 II/I como indicadores del flujo autofágico, interpretando una bajada de estas ratios como una disminución de la autofagia [136]. Nuestros resultados no muestran cambios como consecuencia de la RC en las ratios de LC3, por lo que sería interesante realizar un estudio a nivel transcripcional, para comprobar si el aumento en los niveles de LC3 se debe a una acumulación de esta proteína, y por tanto se reduciría su transcripción o si, por el contrario, se debe a un

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

aumento del flujo autofágico que hace necesario unos mayores niveles de esta proteína y como consecuencia un aumento en su transcripción.

Cabe destacar que la sobreexpresión de CYB5R3 por sí misma no produjo ningún cambio en los marcadores de autofagia analizados. Continuando con el estudio de las ratios de LC3, una tendencia a disminuir ambas ratios se observó en los animales TG alimentados bajo condiciones de RC respecto a los WT sometidos a la misma dieta. Esta disminución de la ratio podría relacionarse, por tanto, con una disminución del flujo autofágico, como también se puede evidenciarse a partir de los resultados de microscopía electrónica, donde ese grupo presenta una disminución en la abundancia de figuras de autofagia. Más aún, esta interpretación estaría también en concordancia con el mayor tamaño mitocondrial encontrado en las IMM, tanto de FB como de FR, en ese grupo, ya que la fisión mitocondrial es necesaria para que se lleva a cabo el proceso de mitofagia [239, 240]. Estos resultados pondrían de nuevo de manifiesto nuestras conclusiones previas acerca de la existencia de una interferencia al combinar la RC con la sobreexpresión de CYB5R3 [216].

Por último, en lo que respecta a los resultados relacionados con la apoptosis, no se encontraron grandes cambios entre los distintos grupos experimentales, posiblemente debido a que se trata de animales jóvenes/adultos, en los que no hay activación de muerte celular a nivel de músculo esquelético [176]. Por este motivo, la mayoría de los estudios centrados en esta ruta se llevan a cabo en animales viejos, como ya discutimos en López-Domínguez *et al.* [69]. De acuerdo con esto, analizaremos los resultados obtenidos en los animales viejos dentro del siguiente capítulo.

La sobreexpresión de CYB5R3 *per se* parece no producir grandes cambios en los marcadores de apoptosis en animales jóvenes, exceptuando un incremento en los niveles de BCL-2, lo que podría indicar un posible papel protector de CYB5R3 frente a la apoptosis. Este efecto, de nuevo, se ve abolido al combinar la sobreexpresión de CYB5R3 con la RC. Por su lado, se ha sugerido que la RC puede tener un papel protector frente al exceso de apoptosis asociado con la edad [241]. Sin embargo, como se ha señalado anteriormente, la mayoría de los trabajos que estudian este efecto se han llevado a cabo en animales viejos, por lo que resulta interesante estudiar el posible efecto que produce la RC sobre la muerte celular en animales jóvenes/adultos.

De acuerdo con estudios previos, la vía extrínseca se ve inhibida por RC en músculo esquelético [242, 243]. Como marcador de esta vía han determinado los niveles de

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

procaspasa-8, no observándose ningún cambio por la sobreexpresión de CYB5R3 ni por la RC. La caspasa-8 actúa sobre a BID, produciendo su fragmentación proteolítica y generando BID truncado que enlaza la vía extrínseca con la intrínseca [174]. Aunque se observó un descenso significativo en los niveles de BID en mitocondria, no constatamos ningún cambio en los niveles de BID truncado, posiblemente debido a que tampoco se han observado cambios en los niveles de procaspasa-8.

Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo demostraron que la RC no producía cambios en los niveles de BCL-2 en músculo esquelético de ratones jóvenes [69], lo que concuerda con lo observado en el presente estudio. Sin embargo, en el estudio mencionado se mostraba que la RC producía un descenso significativo en los niveles de BAX, que no se ha observado en nuestros resultados. También se mostraba una tendencia a incrementar los niveles de la ratio BCL-2/BAX, lo que tampoco se ha observado en el presente estudio. Estas discrepancias podrían deberse a las diferencias en la cantidad de grasa de la dieta, como ya se ha indicado anteriormente en este capítulo, ya que en el estudio de López-Domínguez *et al.* se empleó la dieta AIN93G mientras que en el presente estudio se empleó la dieta AIN93M. De acuerdo con ello, precisamente López-Domínguez *et al.* demostraron que la grasa de la dieta es un factor clave a la hora de determinar los niveles de BAX en músculo esquelético [69].

El balance entre proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas va a definir si la célula entra o no en apoptosis. En el caso de que el equilibrio se desplace hacia las proteínas proapoptóticas se produce la permeabilización de la mitocondria, con la liberación del citocromo *c*, que se une a APAF-1 para formar el apoptosoma y activar a la caspasa-9 [244]. Continuando con el estudio anterior de nuestro grupo, evidenciamos que la RC producía un descenso en los niveles de AIF y citocromo *c* en citosol, lo que estaba en concordancia con los menores niveles de BAX observados en esas condiciones [69]. Sin embargo, en el presente estudio, aunque parece haber menores niveles de estas proteínas en citosol, no se encontraron diferencias significativas, lo que de nuevo se podría relacionar con la diferente cantidad de grasa en la dieta. En nuestro estudio también se determinaron los niveles de APAF-1 observándose una tendencia hacia su disminución como consecuencia de la RC. Esta tendencia también se observó en los niveles de procaspasa-9, pero no en los niveles de la forma activa, cuya actividad había sido previamente demostrado por nuestro grupo que no cambiaba con la RC [69].

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

Selman *et al.* también llevaron a cabo un estudio en músculo de animales jóvenes/adultos - ratas de 6 meses de edad - que estuvieron sometidos a RC durante dos meses [176]. Los resultados de este estudio mostraron que, mientras que no se encontraron cambios en la fragmentación del DNA ni en los niveles de XIAP y caspasa-3, se constató un descenso en los niveles de procaspasa-3 en músculo esquelético por RC, concluyendo que, de acuerdo con Zhang *et al.* [241], la RC podría tender a disminuir la apoptosis en tejidos postmitóticos, aunque al tratarse de animales jóvenes/adultos no se encontraron diferencias en todos los marcadores medidos [176]. Nuestros resultados parecen estar en concordancia con este estudio, ya que nosotros observamos un descenso en los niveles de la forma activa de caspasa-3 y, en nuestro caso, sí observamos un aumento en los niveles de XIAP, inhibidor de la apoptosis, posiblemente debido al mayor tiempo de intervención.

Por último, también resulta interesante profundizar en la apoptosis independiente de caspasas, que se cree que podría tener un papel más importante en la pérdida de músculo asociada con la edad [141] ya que, aunque hay ciertas discrepancias sobre el efecto que produce la edad en los marcadores de la apoptosis dependiente de caspasas, diversos estudios coinciden en que la edad produce un aumento de la ruta de apoptosis independiente de caspasas [175]. El estudio de los marcadores de esta ruta sorprendentemente mostró un incremento tanto en los niveles de AIF en núcleo como en los niveles de ENDOG, proteínas clave en la apoptosis independiente de caspasas [142, 245], por la RC. De acuerdo con estos resultados, la RC podría estar incrementando la ruta de apoptosis más importante en músculo esquelético, ya en animales jóvenes/adultos, como un posible efecto protector encaminado a eliminar posibles células dañadas.

No obstante, se debe tener en cuenta que todas las determinaciones se han realizado sobre extractos totales de músculo esquelético, por lo que es posible que no se evidencien cambios que ocurran en algún tipo de músculo o fibra en concreto. Por ejemplo, en el caso de BCL-2 y BAX se ha comprobado que sus niveles de expresión pueden ser dependientes del tipo muscular [246].

Por último, cabe destacar que, a pesar del incremento observado en los niveles de APAF-1 en los animales TG bajo RC, este grupo mostró los menores niveles de APAF-1 en núcleo, donde esta proteína participa en un punto de control de daños en el ADN en el ciclo celular [247], indicando un posible efecto negativo de la combinación de la RC con la sobreexpresión de CYB5R3.

Capítulo 2: Efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 y la RC en animales jóvenes

Centrándonos en este último grupo donde se combina la sobreexpresión de CYB5R3 con la RC, cabe destacar que, como ya publicamos previamente en Rodríguez-López *et al.*, esta combinación parece abolir los efectos beneficiosos que produce la RC *per se* en lo que respecta a apoptosis, así como los que parece causar también en esta ruta la sobreexpresión de CYB5R3 aisladamente.

En resumen, nuestros datos apoyan que muchas alteraciones provocadas por la RC en la abundancia y la dinámica mitocondrial pueden verse obstaculizadas por la sobreexpresión de CYB5R3, pero estos efectos se compensan con una mayor abundancia de complejos ETC mitocondriales en ratones TG sometidos a esta intervención dietética. En cuanto a la autofagia en tejido muscular, nuestros resultados apuntan a un papel estimulador de esta ruta por la intervención de RC, efecto que de nuevo se ve abolido por la combinación de ambas intervenciones. Por su parte, la sobreexpresión de CYB5R3 no promueve ningún cambio en la señalización autofágica en músculo esquelético.

Capítulo 3: Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

6 Capítulo 3: Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

6.1 Sobreexpresión de CYB5R3 en músculo esquelético de ratones viejos transgénicos

Como se ha mostrado en los capítulos anteriores y recientemente hemos publicado, los niveles del polipéptido CYB5R3 aumentan drásticamente en el tejido muscular de ratones TG en comparación con ratones WT dentro del grupo de animales jóvenes [216]. Sin embargo, no se conoce si este patrón de sobreexpresión se ve alterado por el envejecimiento, y si la sobreexpresión de CYB5R3 se dirige a las mitocondrias u otras membranas celulares del músculo esquelético. Por lo tanto, procedimos a determinar los niveles de polipéptido CYB5R3 tanto en extractos totales como en fracciones enriquecidas en mitocondrias o en membranas ligeras aisladas a partir del músculo esquelético de las extremidades traseras, de ratones WT y TG con las edades bajo estudio: 7 meses (adulto joven, J) y 24 meses (viejo, V).

Como se muestra en la Figura 45A, se observó un patrón idéntico de sobreexpresión de CYB5R3 independientemente de la edad, haciéndose claramente patente el aumento en los niveles de esta proteína en el músculo esquelético de los ratones TG. En lo que respecta a las distintas fracciones subcelulares examinadas, CYB5R3 se enriqueció de manera similar en mitocondrias aisladas de ratones TG en los dos grupos de edad (Figura 45C), presentando el mismo efecto la fracción de membranas ligeras (Figura 45D).

Dado que las condiciones para revelar y cuantificar los niveles de polipéptido CYB5R3 en muestras obtenidas de ratones TG hizo que la proteína fuera casi indetectable en muestras derivadas de ratones WT, se sobreexpusieron las transferencias de Western para poder cuantificar las señales de WT mientras se saturaban las de los TG, y se encontró que el envejecimiento conducía a un aumento del polipéptido CYB5R3, tanto en homogeneizados totales como en fracciones mitocondriales y de membranas extramitocondriales (Figura 45B, 45D y 45F).

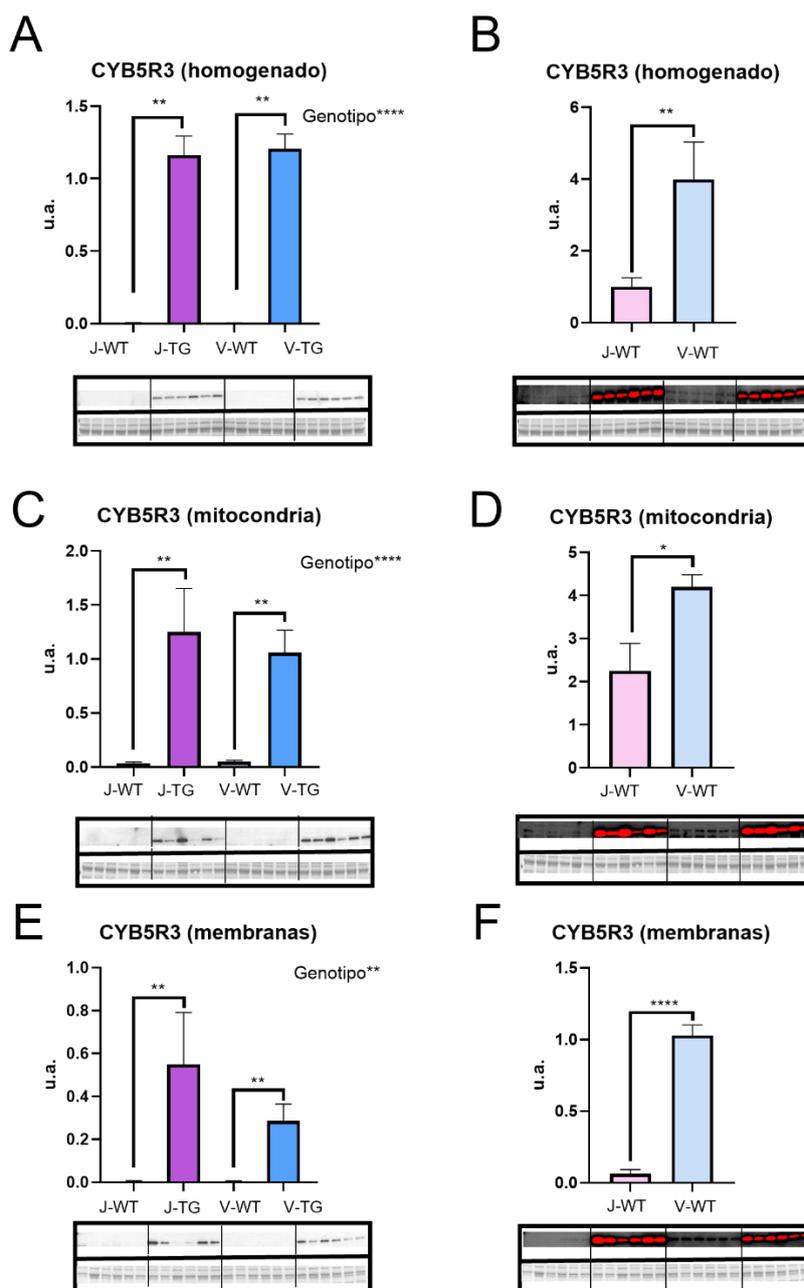


Figura 45. Niveles de expresión del polipéptido CYB5R3 en músculo esquelético de ratones jóvenes y viejos, WT y TG. Los niveles están medidos en homogeneizados totales (A y B), fracciones enriquecidas en mitocondrias (C y D) y membranas ligeras (E y F). Cada gráfica tiene debajo las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y con Ponceau S. Los datos representados son la media \pm SEM de 6 repeticiones. (u.a. = unidades arbitrarias).

6.2 Niveles de los complejos de la ETC

A continuación, estudiamos en extractos totales del tejido el impacto que la edad y/o la sobreexpresión de CYB5R3 producen en los niveles de marcadores proteicos de los complejos de la ETC de la membrana mitocondrial interna (Figuras 46A-E), así como en la proteína de la membrana mitocondrial externa VDAC (porina, Figura 46F). El

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

envejecimiento produjo disminuciones significativas en los niveles de los complejos IV (Figura 46D) y V (Figura 46E) en ratones WT (J-WT *vs* V-WT), y también se observó una tendencia hacia una disminución de los complejos I y III con la edad (Figuras 46A y 46C). Como mostramos en nuestro reciente artículo, la sobreexpresión de CYB5R3 condujo a un aumento de los niveles del complejo II en ratones adultos jóvenes (Figura 46B) [216]. Sin embargo, el impacto de la sobreexpresión de CYB5R3 en la abundancia de marcadores ETC fue mucho más pronunciado en los ratones viejos ya que los animales viejos TG mostraron aumentos generalizados de complejos ETC en comparación con ratones viejos WT, que fueron estadísticamente significativos para los complejos I (Figura 46A), II (Figura 46B), IV (Figura 46D) y V (Figura 46E). Esto hizo que la disminución de los complejos I, IV y V relacionada con el envejecimiento indicada anteriormente fuera revertida completamente por la sobreexpresión de CYB5R3 (Figuras 46A, 46D y 46E). A diferencia de las alteraciones observadas en la abundancia de complejos ETC, no se encontraron cambios en los niveles de VDAC en los homogeneizados de músculo esquelético que pudieran atribuirse a la edad o al genotipo (Figura 46F).

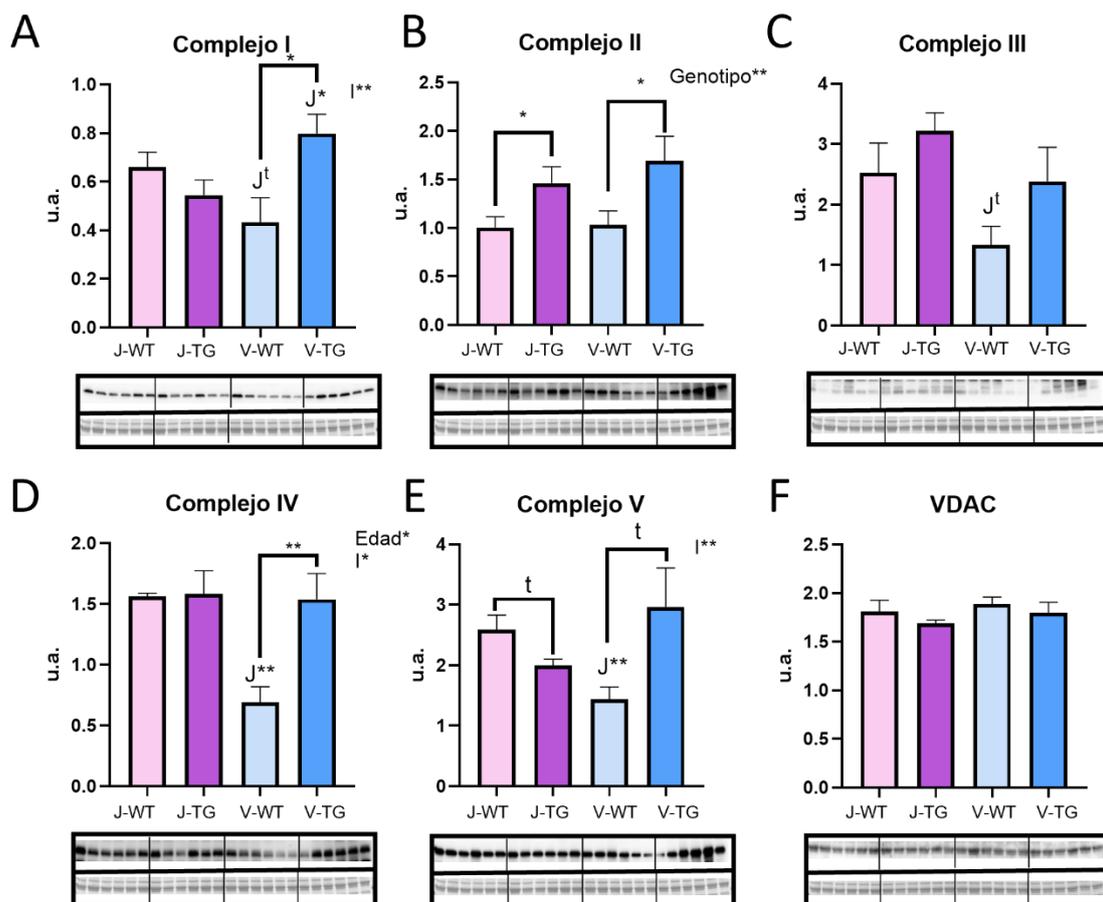


Figura 46. Niveles de los complejos de la cadena de transporte de electrones y VDAC cuantificado en músculo esquelético de ratones jóvenes y viejos, WT y TG. Los paneles de A a E representan la cuantificación de subunidades representativas de los cinco complejos de la ETC, y el panel F muestra los niveles de VDAC. Las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y Ponceau S correspondientes se muestran debajo de cada gráfica. En todos los gráficos, los asteriscos sin letra se refieren a diferencias estadísticamente significativas entre grupos de edad. Los datos representados son la media \pm SEM de 6 repeticiones. (u.a. = unidades arbitrarias).

En concordancia con los capítulos anteriores, dividimos los niveles de los complejos mitocondriales entre VDAC, para ver los cambios debidos a la abundancia mitocondria. Como era de esperar, al no haberse encontrado cambios en VDAC, las diferencias observadas en los niveles de los complejos mitocondriales a cada de la edad y/o el genotipo se mantienen (Figura 47A, 47B, 47C y 47E).

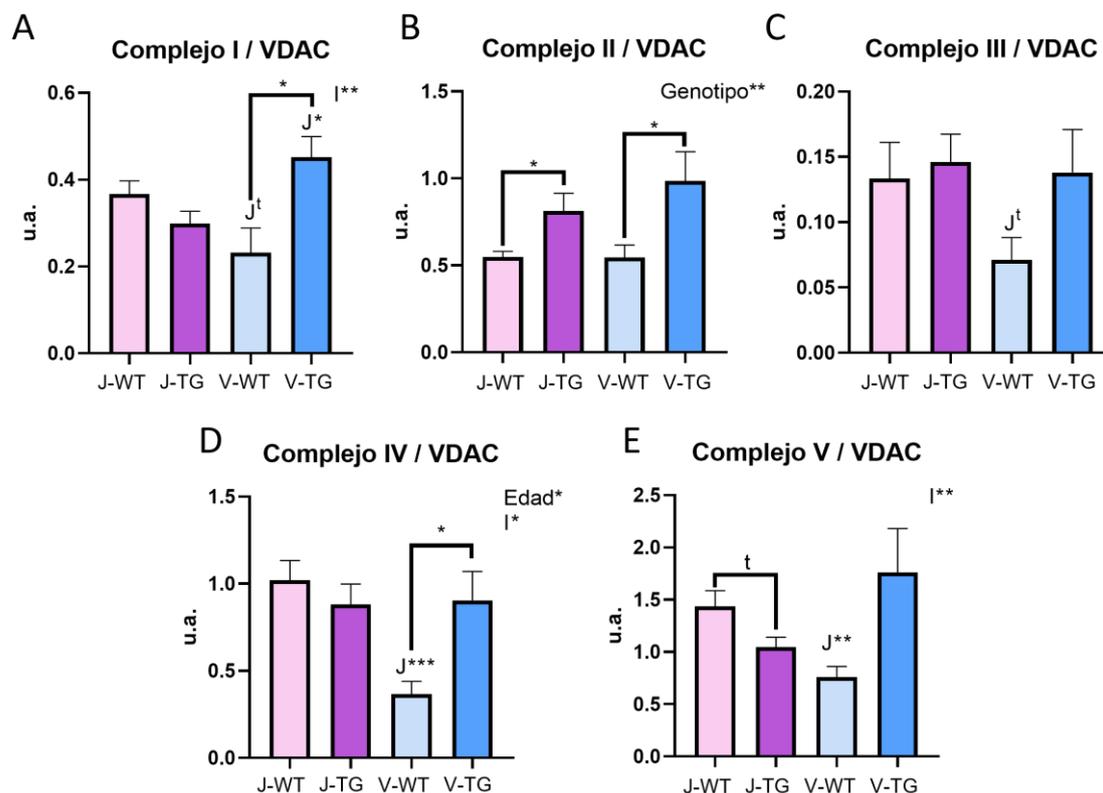


Figura 47. Niveles de los complejos de la ETC referidos a VDAC en músculo esquelético de ratones jóvenes y viejos, WT y TG. Los datos representados son la media \pm SEM de 6 repeticiones. (u.a. = unidades arbitrarias).

6.3 Estudio de marcadores de dinámica mitocondrial

A continuación, estudiamos el efecto del envejecimiento y/o la sobreexpresión de CYB5R3 sobre marcadores proteicos de la dinámica mitocondrial. Estos marcadores se determinaron en extractos totales en el caso de MFN-1 y MFN-2 (fusión), así como FIS1 y MFF (fisión), mientras que la GTPasa DRP-1, relacionada con la fisión, se midió en fracciones de mitocondrias aisladas ya que DRP-1 se transloca del citosol a la membrana externa mitocondrial para producir la fisión mitocondrial [248]. En este último caso, los datos se normalizaron respecto a los de VDAC para corregir las posibles variaciones en el enriquecimiento de membrana mitocondrial externa entre las diferentes preparaciones mitocondriales.

Con relación a las proteínas implicadas en la fusión mitocondrial, no se observaron cambios debido a la edad o el genotipo para MFN-1 (Figura 48A), mientras que los niveles de MFN-2 mostraron una disminución sustancial con el envejecimiento en ratones WT (Figura 48B). También se observó una tendencia hacia una disminución de MFN-2 en ratones jóvenes TG en comparación con jóvenes WT, pero no se mostró ninguna

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

disminución adicional en los ratones viejos TG (Figura 48B). Con relación a las proteínas implicadas en la fisión mitocondrial, los niveles de FIS1 aumentaron significativamente con el envejecimiento en ratones WT (Figura 48C). Es de destacar que la sobreexpresión de CYB5R3 también produjo un aumento de FIS1 en jóvenes TG en comparación con jóvenes WT, pero no se observó ningún aumento significativo adicional en ratones viejos TG (Figura 48C). Resulta llamativo que los cambios de los niveles de MFF con la edad y/o el genotipo resultaron parecidos a los de FIS1 (Figura 48D). La medida directa de DRP-1 en fracciones mitocondriales mostró un aumento en los niveles de esta proteína con la sobreexpresión de CYB5R3 en ratones viejos (V-WT *vs.* V-TG) (Figura 48E). Por su lado, los niveles detectados de VDAC, también en fracciones mitocondriales, no mostraron cambios debidos a la edad ni al genotipo (Figura 48F). Por otra parte, los niveles de DRP-1 asociado a las mitocondrias, corregidos por los niveles de VDAC mitocondrial, también aumentaron por el envejecimiento en ratones WT (V-WT *vs.* J-WT) y por la sobreexpresión de CYB5R3 en ratones adultos jóvenes (J-TG *vs.* J-WT) y nuevamente, no hubo cambios debido al envejecimiento en los ratones TG (V-TG *vs.* J-TG) (Figura 48G). En conjunto, los cambios en los marcadores de proteínas de la dinámica mitocondrial son consistentes con una prevalencia de fisión en los grupos de ratones viejos WT y jóvenes TG, sin un aumento adicional de este proceso debido a la edad en el caso de los ratones TG.

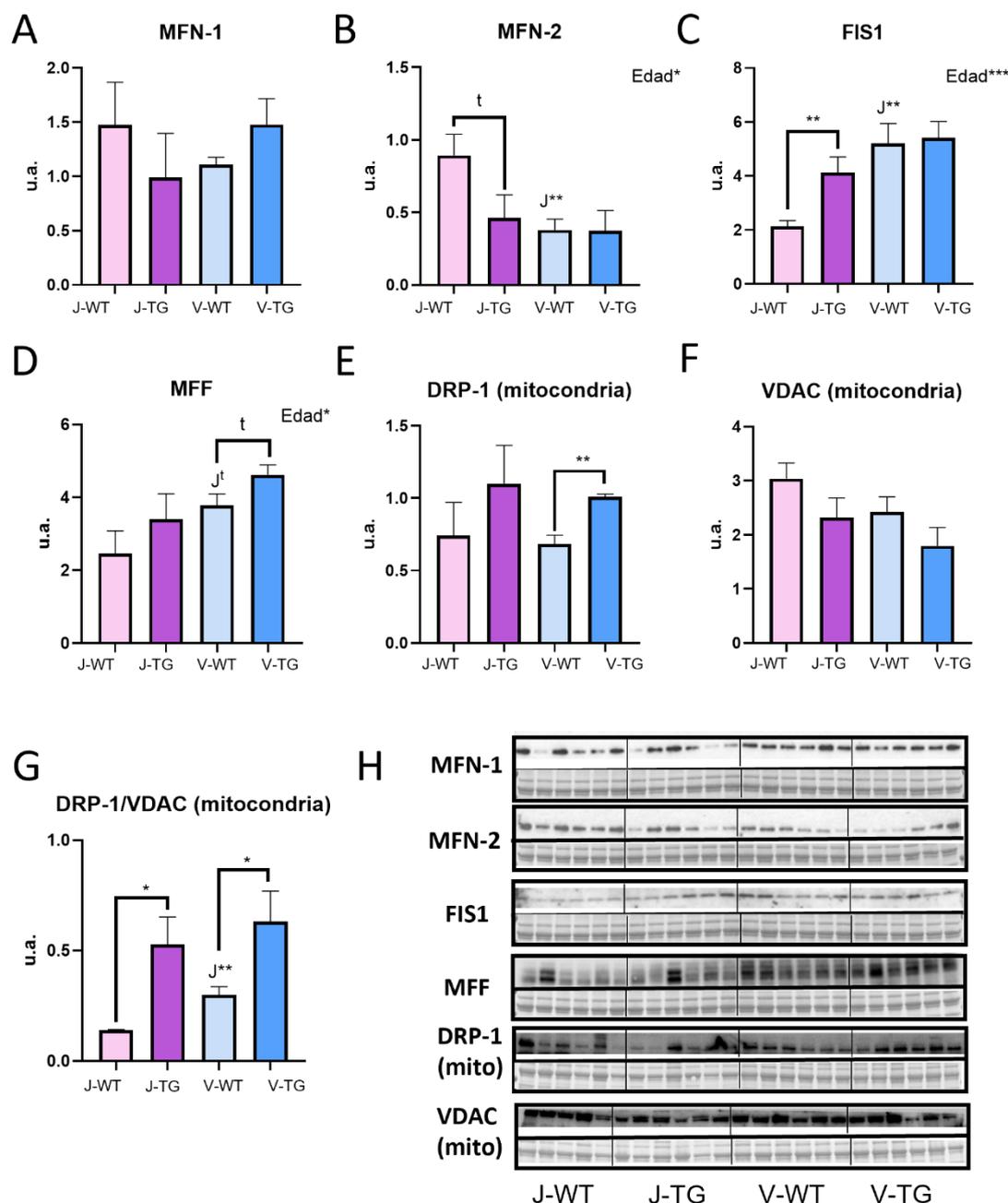


Figura 48. Niveles de expresión de proteínas relacionados con la dinámica mitocondrial. MFN-1 (A), MFN-2 (B), FIS1 (C), MFF (D), DRP-1 en fracciones enriquecidas en mitocondrias (E), VDAC en fracciones enriquecidas en mitocondrias (F) y la relación DRP-1 / VDAC medida en fracciones mitocondriales enriquecidas (G). Las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y con Ponceau S se muestran en el panel H. Los datos se muestran como media \pm SEM de 6 réplicas. (u.a. = unidades arbitrarias).

6.4 Marcadores de biogénesis mitocondrial y coenzima Q

Abordamos también el estudio de marcadores proteicos del proceso de biogénesis mitocondrial. Concretamente, estudiamos los niveles de TFAM y NRF-1, dos factores de transcripción clave que regulan este proceso [103]. Nuestros datos mostraron un efecto consistente del envejecimiento, observándose una clara disminución de ambos

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

marcadores independientemente del genotipo, siendo la correspondiente a NRF-1 especialmente llamativa (Figuras 49A y 49B). En relación con la biogénesis mitocondrial, también se midieron los niveles de la sirtuina SIRT3, observándose que la sobreexpresión de CYB5R3 tiende a incrementar los niveles de SIRT3 en los ratones jóvenes (J-WT vs. J-TG) (Figura 49C). Dicho incremento se encontró también en los ratones viejos de genotipo silvestre (J-WT vs. V-WT), aunque no se observó en el grupo de los ratones viejos de genotipo TG (J-TG vs. V-TG).

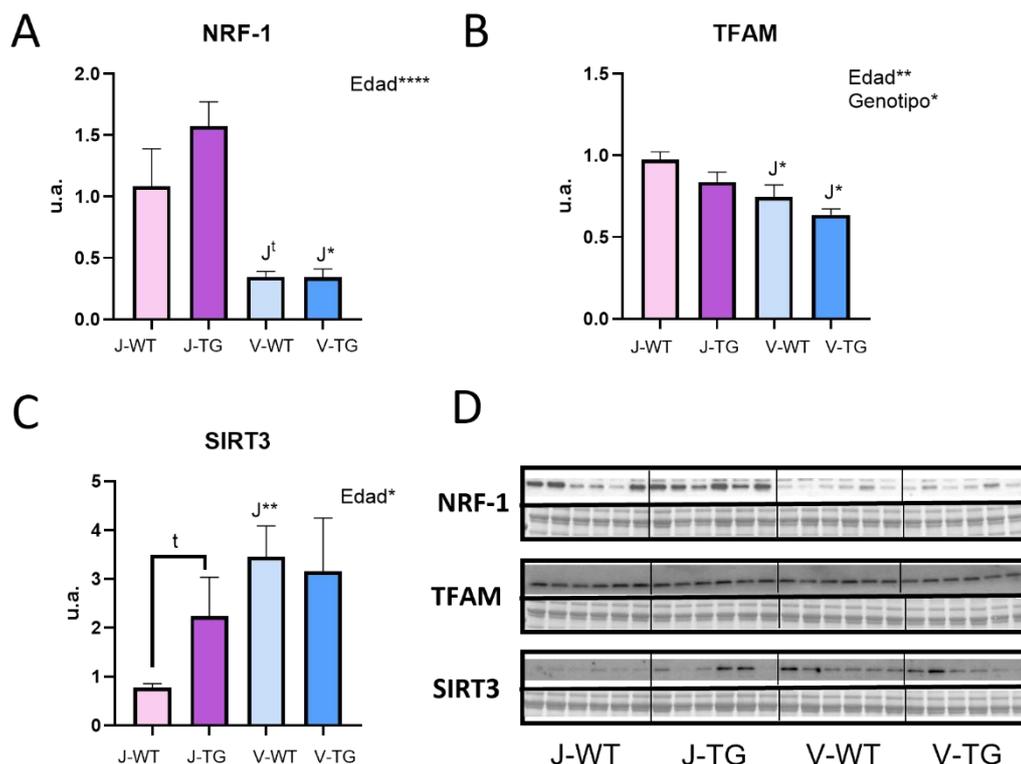


Figura 49. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la biogénesis mitocondrial en animales jóvenes y viejos. NRF-1 (A), TFAM (B), y SIRT3 (C). El panel D muestra las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y con Ponceau S. Los datos se muestran como media \pm SEM de 6 réplicas. (u.a. = unidades arbitrarias).

También determinamos los niveles de coenzima Q en extractos lipídicos obtenidos a partir de homogenados totales de músculo esquelético, ya que existen investigaciones previas que han documentado la disminución en los niveles de este transportador de electrones y antioxidante específicamente con el envejecimiento en este tejido, pero no en otros [249]. En nuestra cohorte de ratones encontramos que el envejecimiento produjo una disminución de CoQ₉ y CoQ_{total} independientemente del genotipo (Figuras 50A y 50B), sin ningún cambio en la relación entre las isoformas de CoQ (Figura 50E), y se

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

comprobó que la sobreexpresión de CYB5R3 no modificó estos cambios (Figuras 50A, 50B, 50C y 50D).

En relación con los niveles de coenzima Q, quisimos determinar también los niveles de la hidroxilasa COQ7, por ser una proteína clave de la ruta de biosíntesis del CoQ a la cual se ha asignado un papel central en la regulación de los niveles de este antioxidante [118]. En nuestro modelo de estudio encontramos que los niveles de COQ7 se vieron aumentados con el envejecimiento, independientemente de la sobreexpresión de CYB5R3 (J-WT vs. V-WT; J-TG vs. V-TG) (Figura 50E).

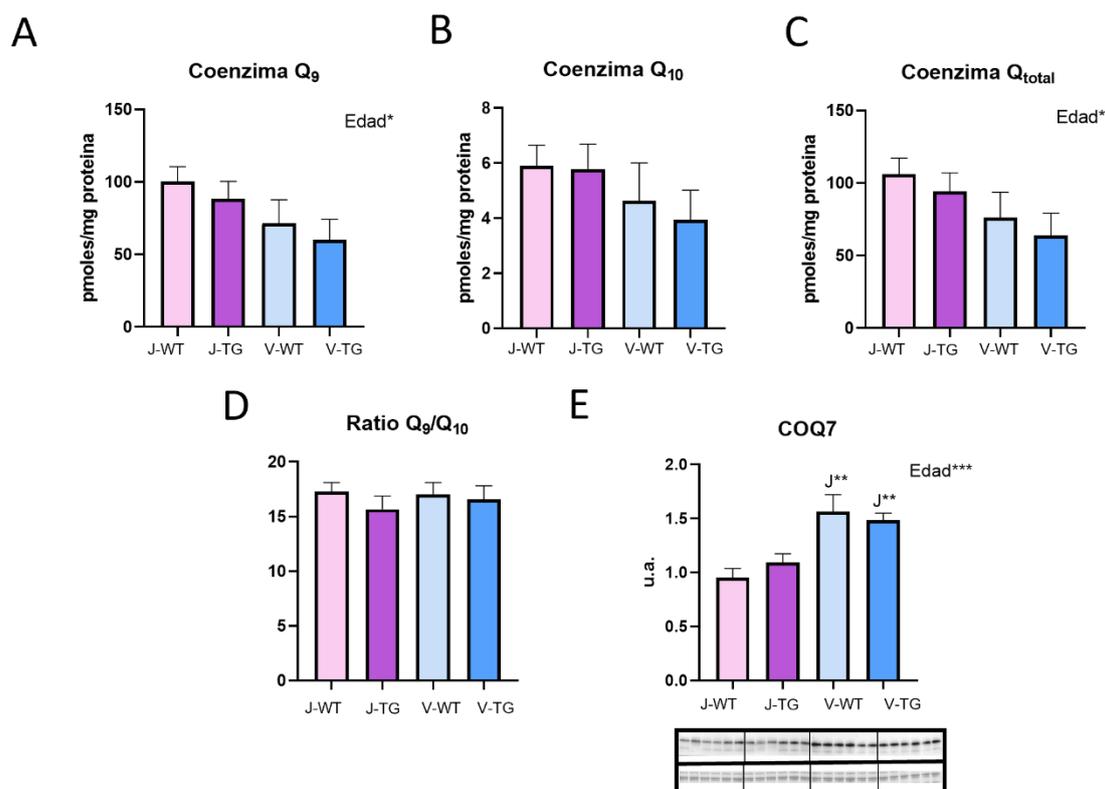


Figura 50. Niveles de coenzima Q medidos con HPLC en ratones jóvenes y viejos. Coenzima Q₉ (A), coenzima Q₁₀ (B), coenzima Q_{total} (C) y relación coenzima Q₉/Q₁₀ (D), y niveles de expresión de la proteína COQ7 (E). Los datos se muestran como media \pm SEM de 6 réplicas. (u.a. = unidades arbitrarias).

6.5 Ultraestructura, planimetría y estereología de las mitocondrias del músculo esquelético

El análisis bioquímico de los marcadores de proteínas mitocondriales descrito en los apartados anteriores, nos indicó la existencia de adaptaciones en este orgánulo que podrían modular la respiración y la dinámica mitocondrial con el envejecimiento y/o la sobreexpresión de CYB5R3. A la vista de estos resultados, decidimos realizar un análisis ultraestructural de la población mitocondrial, por microscopía electrónica de transmisión,

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

para comprobar si los cambios observados hasta el momento, se traducían también en modificaciones en la morfología mitocondrial y/o en la cantidad de mitocondrias. Ya que la ultraestructura observada en el músculo esquelético se ve muy afectada por la orientación en el corte de las fibras [250, 251], llevamos a cabo nuestros estudios tanto en tejido cortado transversal como longitudinalmente. Además, debido a que el gastrocnemio es un músculo mixto, y las alteraciones producidas por el envejecimiento o por las distintas intervenciones pueden ser distintas en fibras blancas (glicolíticas, FB) y rojas (oxidativas, FR), llevamos a cabo nuestros estudios de manera separada en ambos tipos de fibras. Además, en el caso de la FR, analizamos de manera separada las características de los dos tipos de mitocondrias presentes en estas fibras (SSM e IMFM).

6.5.1 Estudio de cortes transversales de FB

En el estudio llevado a cabo con cortes transversales de FB, encontramos que la sobreexpresión de CYB5R3 condujo a una disminución notable del tamaño mitocondrial medio en animales jóvenes (J-WT *vs.* J-TG). El área de las mitocondrias en FB también disminuyó con el envejecimiento en los ratones WT pero, curiosamente, se observó un aumento en ratones viejos TG en comparación con los ratones con los WT de la misma edad (V-TG *vs.* V-WT), así como una tendencia hacia un aumento al comparar ratones viejos TG con jóvenes TG (Figura 51A).

Los efectos del envejecimiento y/o la sobreexpresión de CYB5R3 en el tamaño de las mitocondrias se confirmaron mediante la comparación estadística de las distribuciones de tamaño de todos los perfiles mitocondriales medidos en los grupos experimentales, mostrando que el envejecimiento aumentaba la abundancia de perfiles mitocondriales más pequeños a expensas de los más grandes en los ratones de genotipo WT (J-WT *vs.* V-WT, Figura 51B). El análisis de distribución del tamaño mitocondrial en FB también confirmó que el número de perfiles mitocondriales más pequeños aumentó a expensas de perfiles más grandes en los ratones jóvenes TG en comparación con los WT de la misma edad (J-TG *vs.* J-WT), pero se encontró lo contrario en los ratones viejos TG, que exhibieron un aumento en el número de perfiles más grandes, no solo en comparación con viejos WT (V-TG *vs.* V-WT), sino también en comparación con los ratones jóvenes TG (V-TG *vs.* J-TG) (Figura 51B).

En lo que respecta a la circularidad mitocondrial, encontramos que el envejecimiento incrementó este parámetro en los ratones WT (J-WT *vs.* V-WT), pero lo disminuyó en

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

los ratones transgénicos (J-TG *vs.* V-TG). Por su parte, la sobreexpresión de la enzima no afectó a la circularidad mitocondrial en los ratones jóvenes, mientras que en los ratones viejos produjo una disminución (V-WT *vs.* V-TG) (Figura 51C).

En cuanto a los parámetros estereológicos relacionados con la abundancia mitocondrial, Na disminuyó en FB por la sobreexpresión de CYB5R3, tanto en ratones jóvenes (J-TG *vs.* J-WT) como en los viejos (V-TG *vs.* V-WT) (Figura 51D). La Vv mitocondrial también se redujo por la sobreexpresión de CYB5R3 en ratones jóvenes (J-WT *vs.* J-TG) (Figura 51E), lo que concuerda con las disminuciones tanto del tamaño mitocondrial como del Na en los ratones jóvenes TG (Figuras 51A y 51D). La Vv mitocondrial también disminuyó con el envejecimiento en los ratones WT (Figura 51E), pero la fuerte disminución en el tamaño de las mitocondrias en estos animales se compensó parcialmente aquí por un aumento en el número de mitocondrias, lo cual atenuó parcialmente la disminución de Vv con el envejecimiento en los ratones WT (Figuras 51A, 51D y 51E). Curiosamente, a pesar de que el número mitocondrias disminuyó con el envejecimiento en ratones TG (Figura 51D), el valor de Vv aumentó significativamente en los ratones viejos TG (Figura 51E), no solo en comparación con los animales WT de la misma edad sino también con los jóvenes TG, probablemente debido al aumento significativo en el tamaño de los perfiles mitocondriales observado en los ratones viejos TG (Figura 51A). Los cambios observados en Vv se corroboraron con los datos obtenidos en Fa (Figura 51F).

En la Figura 51G se muestran micrografías representativas de secciones transversales de FB de todos los grupos experimentales.

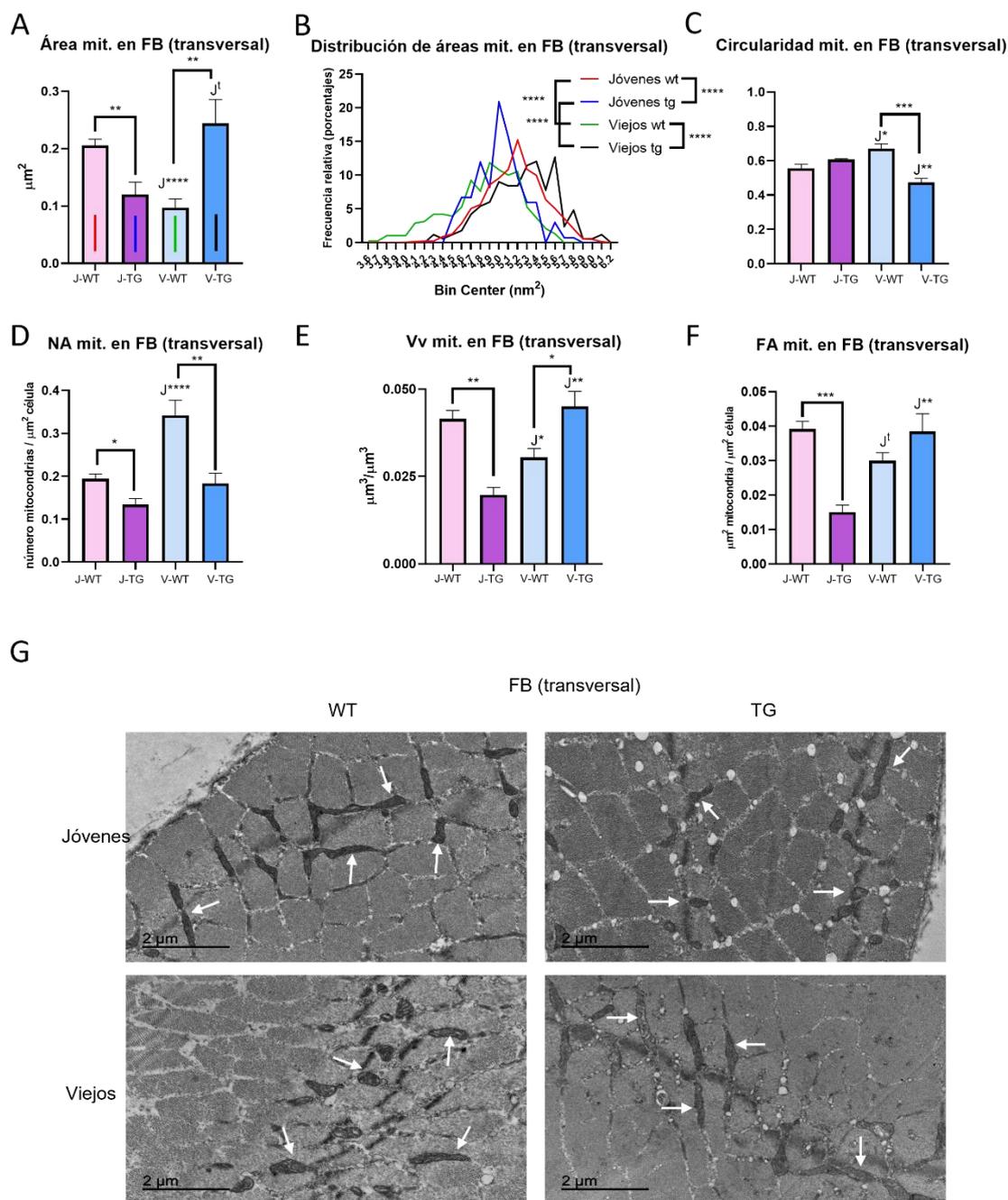


Figura 51. Características morfométricas de las mitocondrias de fibras blancas (FB) del músculo gastrocnemio en ratones jóvenes y viejos en secciones transversales. Área mitocondrial (A), distribución del tamaño mitocondrial (B), circularidad (C), densidad de perfil numérico (Na) (D) y densidad de volumen (Vv) (E) y área fraccional (FA) (F). El panel G muestra micrografías de microscopía electrónica representativas de cada grupo. Las flechas marcan algunas mitocondrias. Los datos se muestran como media ± SEM de 4 animales.

6.5.2 Estudios en cortes longitudinales de FB

Los cambios debidos al envejecimiento y/o la sobreexpresión de CYB5R3 en las características ultraestructurales de las mitocondrias de FB en las secciones longitudinales del gastrocnemio fueron similares a los observados en las secciones transversales, aunque

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

la extensión de estos cambios se encontró atenuada en comparación con las diferencias encontradas en las secciones transversales. Esto se puede observar especialmente en el área mitocondrial, donde no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales (Figura 52A). El análisis de distribución del tamaño de todos los perfiles mitocondriales medidos en secciones longitudinales (Figura 52B) dio resultados similares a los de las secciones transversales (Figura 52B), encontrándose un aumento de mitocondrias pequeñas y un descenso de mitocondrias de mayor tamaño con la edad (J-WT *vs.* V-WT), lo que también ocurrió con la sobreexpresión de la enzima en ratones jóvenes (J-TG *vs.* J-TG). Sin embargo, los animales V-TG mostraron un aumento de mitocondrias de mayor tamaño tanto respecto a los WT de la misma edad (V-TG *vs.* V-WT) como a los jóvenes TG (V-TG *vs.* J-TG) (Figura 52B). No obstante, las diferencias encontradas tras el análisis en cortes longitudinales, aunque fueron estadísticamente significativas, no fueron tan notorias como las encontradas para los cortes transversales, lo que sugiere que el envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3 alteran la morfología mitocondrial en FB.

En lo que respecta a la circularidad, la sobreexpresión de CYB5R3 hizo que las mitocondrias fueran menos circulares en los animales jóvenes (J-WT *vs.* J-TG) (Figura 52C), lo que también se produjo como consecuencia del envejecimiento en ratones de genotipo WT (J-WT *vs.* V-WT). En los ratones transgénicos, que ya tenían mitocondrias menos circulares que los controles a los 7 meses, no se observó ninguna alteración de este parámetro con la edad (J-TG *vs.* V-TG) (Figura 52C).

Entre los cambios más llamativos cabe destacar la disminución del parámetro Vv en los ratones jóvenes TG (Figura 52E), que concuerda con la disminución observada en Fa (Figura 52F), y que probablemente se deba a un menor número de mitocondrias, como indica el valor de Na (J-WT *vs.* J-TG) (Figura 52D). Estas disminuciones se ven paliadas con el envejecimiento (J-TG *vs.* V-TG).

En la figura 52G se muestran micrografías representativas de secciones longitudinales de FB de todos los grupos experimentales.

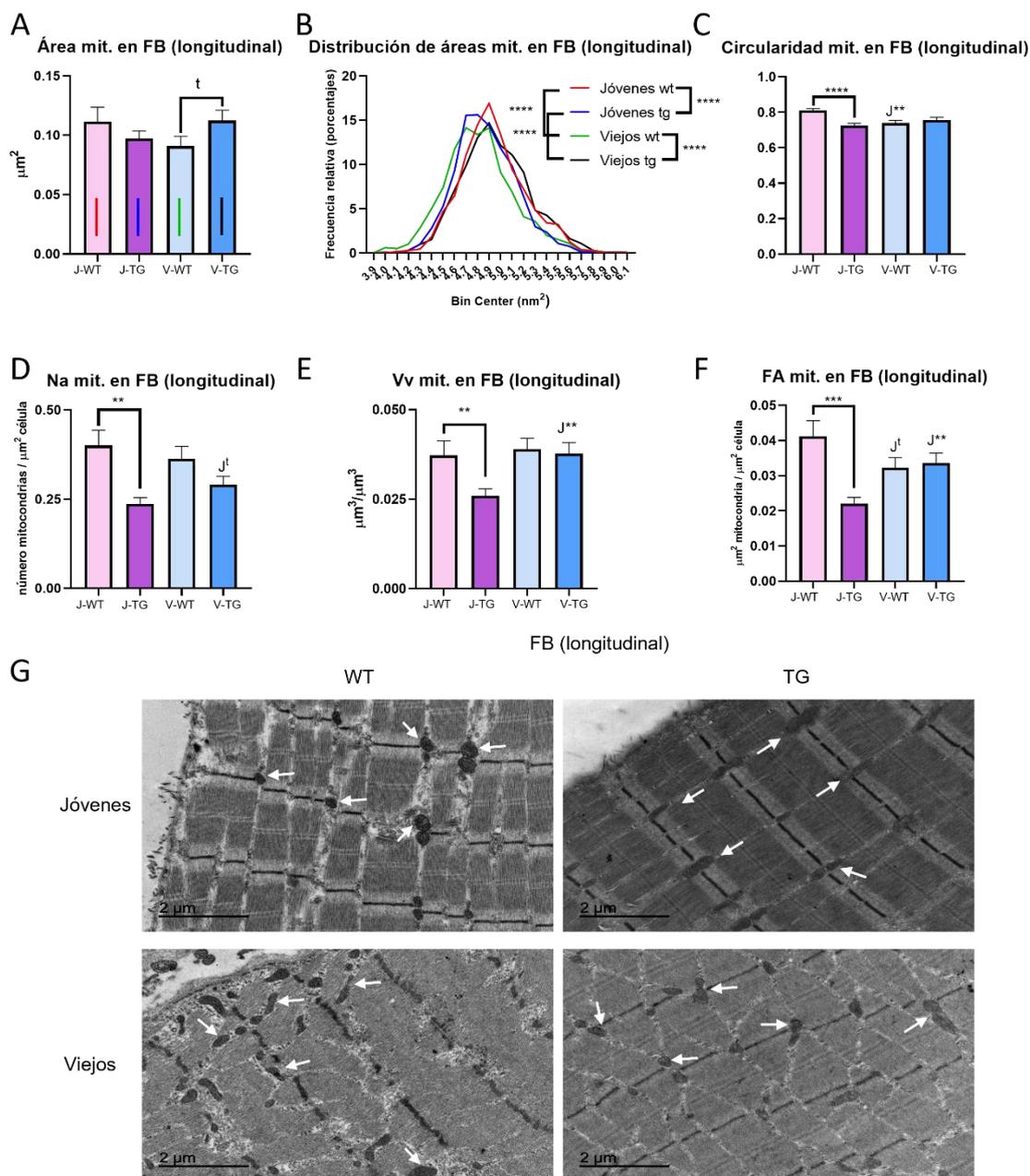


Figura 52. Características morfométricas de las mitocondrias de FB del músculo gastrocnemio en ratones jóvenes y viejos en secciones longitudinales. Área mitocondrial (A), distribución del tamaño mitocondrial (B), circularidad (C), densidad de perfil numérico (Na) (D) y densidad de volumen (Vv) (E) y área fraccional (FA) (F). El panel G muestra micrografías de microscopía electrónica representativas de cada grupo. A modo de ejemplo se han señalado algunas mitocondrias con flechas. Los datos se muestran como media \pm SEM de 4 animales.

6.5.3 Estudio en cortes transversales de FR

En cortes transversales de FR, encontramos que el envejecimiento produjo una disminución en el tamaño medio de las SSM e IMFM en los ratones WT (V-WT vs. J-WT), pero esta disminución dependiente del envejecimiento fue mitigada por la sobreexpresión de CYB5R3, de forma que el tamaño de las mitocondrias fue

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

significativamente mayor en los ratones viejos TG en comparación con los ratones WT de la misma edad (V-TG *vs.* V-WT) (Figuras 53A y 53B).

La comparación estadística de las distribuciones de tamaño de todos los perfiles mitocondriales medidos confirmó que el envejecimiento y la sobreexpresión producían unos perfiles de distribución de tamaños diferentes. Mientras que el envejecimiento aumentó la abundancia de perfiles más pequeños, tanto en el caso de SSM como en las IMFMs (V-WT *vs.* J-WT), la sobreexpresión de CYB5R3 aumentó el número de perfiles de SSM e IMFMs más grandes en los ratones TG viejos en comparación con los WT de la misma edad (V-TG *vs.* V-WT) (Figura 53C y 53D). Además, este análisis mostró un efecto más sutil de la sobreexpresión de CYB5R3, aumentando el número de perfiles mitocondriales más pequeños en los ratones TG jóvenes en comparación con los WT de la misma edad, como también habíamos encontrado en FB (Figura 51B).

La circularidad de las SSM tendió a incrementarse con el envejecimiento en los ratones WT (J-WT *vs.* V-WT) aunque este efecto fue abolido por la sobreexpresión de CYB5R3 (J-TG *vs.* V-TG) (Figura 53E). En este sentido, la sobreexpresión de CYB5R3 causó una disminución de la circularidad de esta población de mitocondrias en los animales viejos (V-WT *vs.* V-TG) (Figura 53E). Por su parte, las IMFMs no sufrieron cambios en la circularidad en ninguno de los grupos experimentales (Figura 53F).

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

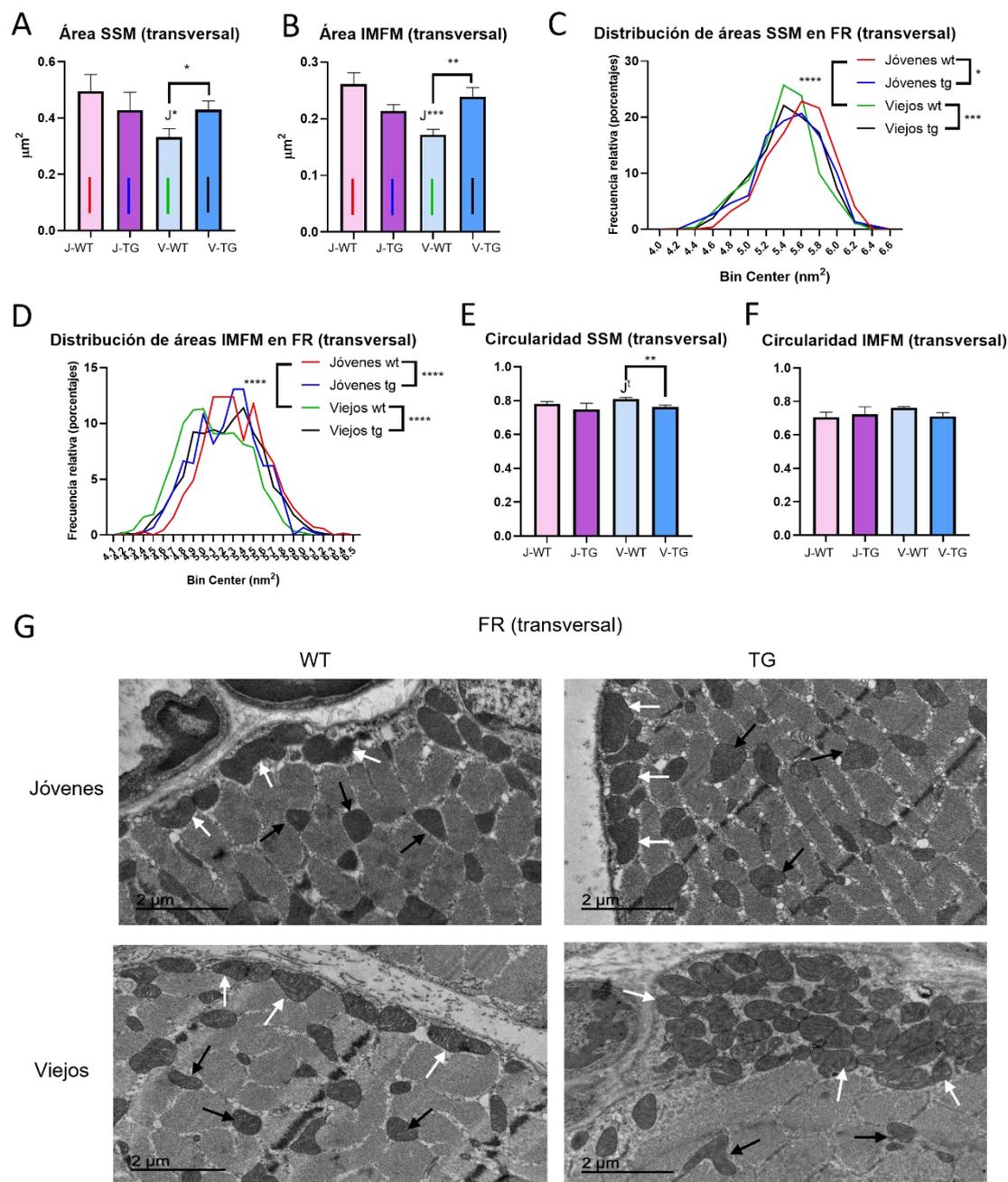


Figura 53. Características planimétricas de las mitocondrias de las fibras rojas (FR) del músculo gastrocnemio en ratones jóvenes y viejos en secciones transversales. Área de mitocondrias subsarcolémicas (SSM) (A), mitocondrias intermiofibrilares (IMFM) área (B), distribución de tamaños SSM (C), distribución de tamaños IMFM (D), circularidad de SSM (E), circularidad de IMFM (F). En el panel G se muestran micrografías representativas de microscopía electrónica de cada grupo. Las flechas blancas muestran SSM y las negras IMFM. Los datos se muestran como media \pm SEM de 4 animales.

Con respecto a la estereología mitocondrial en FR, encontramos que el valor de Na permaneció sin cambios entre los distintos grupos experimentales (Figura 54A). Sin embargo, el de Vv exhibió una disminución con el envejecimiento en los ratones WT, probablemente debido a la disminución en el tamaño de las mitocondrias, pero no en los

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

TG. En consecuencia, el valor de Vv mitocondrial en FR también fue significativamente mayor en los animales TG viejos que en los WT de la misma edad (V-TG vs. V-WT) (Figura 54B). De nuevo, los datos de Vv se corroboraron con los de Fa (Figura 54C).

En la Figura 53G se muestran microfotografías representativas de secciones transversales de FR de todos los grupos experimentales.

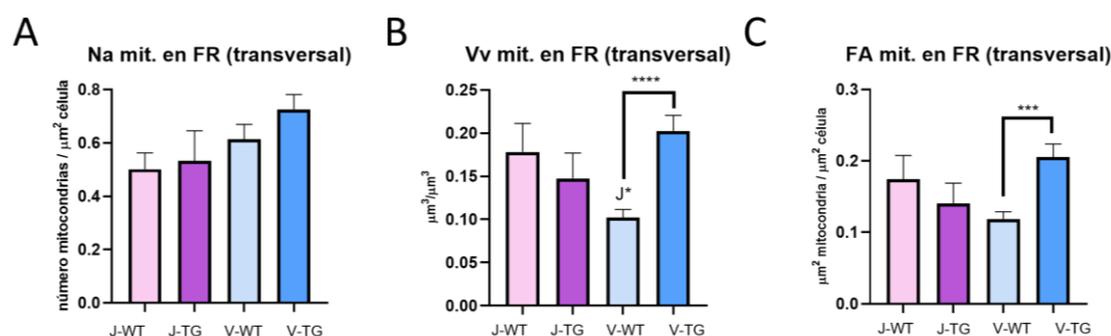


Figura 54. Esterología de las mitocondrias de FR del músculo gastrocnemio en ratones jóvenes y viejos en secciones transversales. Densidad de perfil numérico (Na) (A) y densidad de volumen (Vv) (B) y área fraccional (FA) (C).

6.5.4 Estudio en cortes longitudinales de FR

El análisis de las secciones longitudinales confirmó la disminución del tamaño de las SSM con el envejecimiento en los ratones WT (J-WT vs. V-WT) (Figura 55A). Sin embargo, las IMFM, que fueron de menor tamaño en secciones transversales, no mostraron disminución con la edad en las secciones longitudinales (Figura 55B), lo que indica nuevamente una modificación en la forma de estos orgánulos con el envejecimiento. También se confirmó el aumento del tamaño mitocondrial (tanto en SSM como en IMFM) por la sobreexpresión de CYB5R3 en ratones viejos (V-WT vs. V-TG) (Figuras 55A y 55B).

El análisis de distribución del tamaño de todos los perfiles mitocondriales, tanto SSM como IMFM, medidos en secciones longitudinales mostró nuevamente que el efecto de la sobreexpresión de CYB5R3 sobre el tamaño mitocondrial se maximiza en animales viejos (Figura 55C y 55D).

El parámetro de circularidad mostró más cambios que los observados en cortes transversales. La circularidad, tanto de SSM como de IMFM, disminuyó con la sobreexpresión de CYB5R3 en ratones jóvenes (J-WT vs. J-TG), mientras que aumentó en los viejos (V-WT vs. V-TG). Por su lado, el envejecimiento también causó una

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

disminución de la circularidad para ambos tipos de mitocondrias (J-WT vs. V-WT), efecto que se vio paliado por la sobreexpresión de CYB5R3, anulando así las diferencias en el caso de las IMFM, y causando un aumento de la circularidad en las SSM (J-TG vs. V-TG) (Figura 55E y 55F).

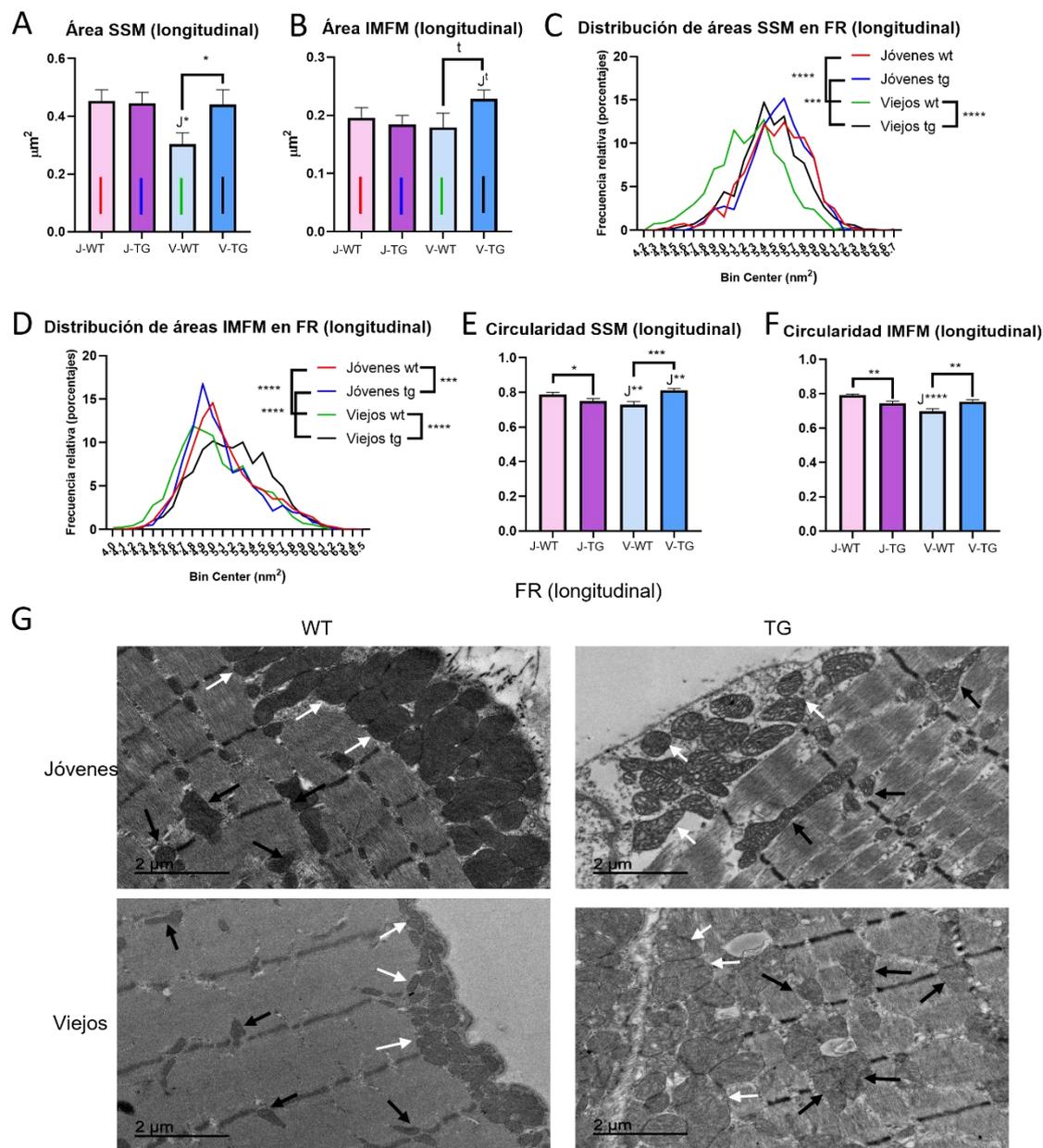


Figura 55. Características planimétricas de las mitocondrias de las FR del músculo gastrocnemio en ratones jóvenes y viejos en secciones longitudinales. Área de mitocondrias subsarcolémicas (SSM) (A), mitocondrias intermiofibrilares (IMFM) área (B), distribución de tamaños SSM (C), distribución de tamaños IMFM (D), circularidad de SSM (E), circularidad de IMFM (F). En el panel G se muestran micrografías representativas de microscopía electrónica de cada grupo. Se han señalado SSM con flechas blancas e IMFM con flechas negras. Los datos se muestran como media \pm SEM de 4 animales.

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

Con respecto a los parámetros estereológicos, también confirmamos el aumento en la abundancia mitocondrial (Vv) (Figura 56B) y en Fa (Figura 56C) en ratones viejos que sobreexpresan CYB5R3 (V-WT vs. V-TG, J-TG vs. V-TG), pero sin cambios estadísticamente significativos en el número de mitocondrias (Na) (Figura 56A).

En la figura 55G se muestran micrografías representativas de secciones longitudinales de FR de todos los grupos experimentales.

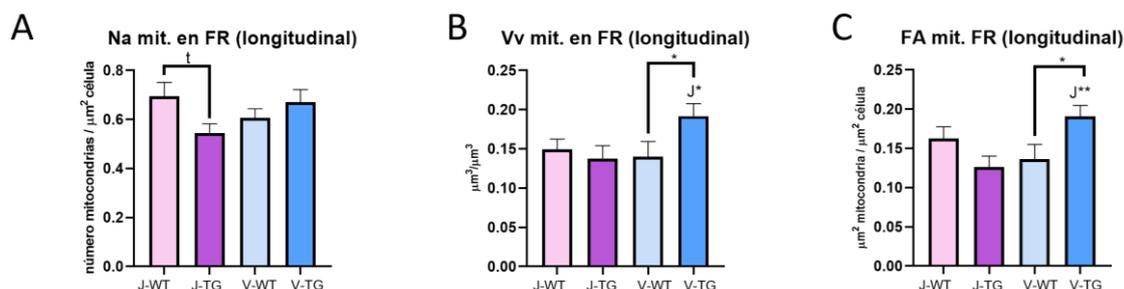


Figura 56. Esterología de las mitocondrias de FR del músculo gastrocnemio en ratones jóvenes y viejos en secciones transversales. Densidad de perfil numérico (Na) (A), densidad de volumen (Vv) (B) y área fraccional (FA) (C).

6.6 Marcadores de autofagia y mitofagia

A continuación, estudiamos marcadores bien establecidos de macroautofagia general, como LC3AB y P62, y de mitofagia, la vía selectiva para el aclaramiento autofágico de mitocondrias dañadas, como PINK1 y PARKIN.

La sobreexpresión de CYB5R3 condujo a un aumento significativo de los niveles de LC3AB I en ratones adultos jóvenes (J-TG vs. J-WT, Figura 57A) y, aunque los niveles de LC3AB II no se vieron afectados (Figura 57B), estos cambios no se tradujeron en modificaciones significativas de la relación LC3AB II a LC3AB I (Figura 57C).

Cabe destacar que el envejecimiento produjo aumentos sustanciales en los niveles de LC3AB I y LC3AB II en ratones WT, y estos aumentos fueron mitigados por la sobreexpresión de CYB5R3 (Figuras 57A y 57B). Nuevamente, estos cambios tuvieron lugar sin alteraciones significativas en la relación LC3AB II/ I (Figura 57C).

En el caso de P62, nuestro hallazgo más destacado fue su disminución sustancial en ratones TG viejos en comparación con los ratones jóvenes del mismo genotipo (V-TG vs. J-TG, Figura 57D). Con respecto a los dos marcadores de mitofagia analizados, no se encontraron diferencias entre ninguno de los grupos experimentales para los niveles de PINK1 (Figura 57E), pero se observó una disminución significativa en los niveles de

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

PARKIN en el grupo de ratones TG viejos en comparación con los ratones de genotipo WT de la misma edad (V-TG vs. V-WT, Figura 57F).

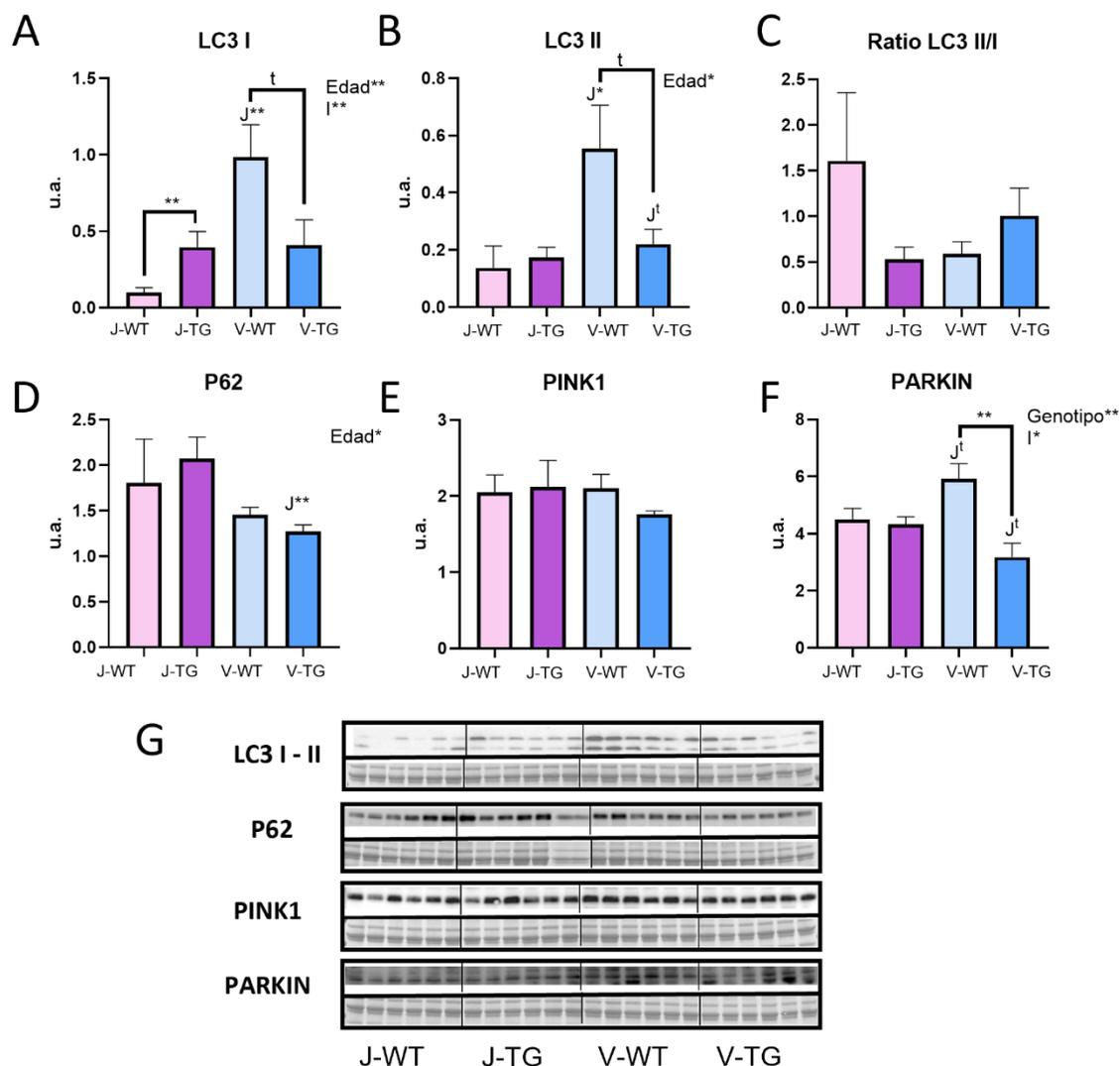


Figura 57. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con autofagia en músculo esquelético de animales WT y TG, jóvenes y viejos. LC3 AB I (A) y LC3 AB II (B), la ratio LC3AB II/I (C), P62 (D), PINK1 (E) y PARKIN (F). El panel G muestra las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y con Ponceau S. Los datos se muestran como media \pm SEM de 6 animales.

6.7 Análisis de figuras de autofagia por microscopía electrónica

Dada la gran diversidad de figuras de autofagia diferentes identificadas en las imágenes y la disparidad de tamaño entre ellas, no se incluye el estudio del área de estas figuras.

Nuestros resultados muestran que los animales jóvenes TG tienen una menor abundancia (Na) de figuras de autofagia respecto a los WT de la misma edad (J-WT vs. J-TG) en fibra blanca (Figura 58A). Este descenso en Na se tradujo en una tendencia a disminuir Fa (Figura 58B) y Vv (Figura 58C) al comparar los dos grupos mencionados. En lo que respecta a la edad, no se encontraron diferencias en la abundancia de figuras de autofagia

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

en los animales WT, mientras que sí se constató un incremento en los ratones TG viejos, respecto a los jóvenes del mismo genotipo (J-TG vs. V-TG) (Figuras 58A-C).

La cuantificación de los parámetros estudiados mostró tendencias similares en los grupos experimentales para FR y FB, si bien en el caso de FR las diferencias debidas a la edad o a la sobreexpresión de CYB5R3 no resultaron estadísticamente significativas (Figuras 58D-F).

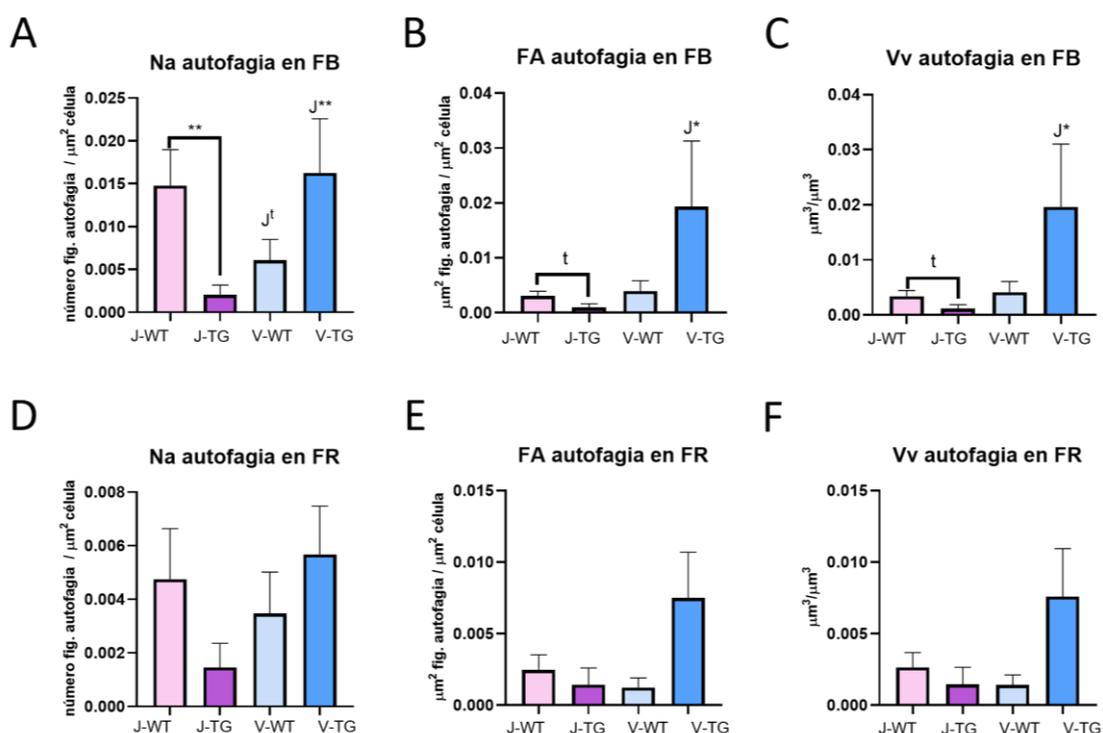


Figura 58. Esterología de las figuras de autofagia de FB y FR en gastrocnemio de animales WT y TG, jóvenes y viejos. Densidad de perfil numérico (Na) (A) y densidad de volumen (Vv) (B) y área fraccional (FA) (C) en FB, y Na (D), Vv (E) y FA (F) en FR. Los datos se muestran como media \pm SEM de 4 animales.

6.8 Marcadores de apoptosis

Por último, se llevó a cabo el estudio de marcadores de las distintas vías de apoptosis (vía extrínseca, vía intrínseca y vía independiente de caspasas), en las que también tiene un papel clave la mitocondria.

Como marcador de la vía extrínseca, se midieron los niveles de procaspasa-8 en citosol, que se vieron aumentados en ratones jóvenes por la sobreexpresión de CYB5R3 (J-WT vs. J-TG). El envejecimiento también aumentó de forma destacada los niveles de procaspasa-8 en los ratones de genotipo WT (J-WT vs. V-WT) y mostró una tendencia a incrementarlos también en los ratones de genotipo TG (J-TG vs. V-TG) (Figura 59A). La caspasa-8 activa produce la rotura de BID, de forma que se genera BID truncado, que se

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

integra en la mitocondria para reclutar y activar a BAX [206]. Los niveles de BID en mitocondria no mostraron diferencias como consecuencia de la sobreexpresión de la enzima (J-WT vs. J-TG, V-WT vs. V-TG). La edad produjo un descenso en los niveles de esta proteína en los ratones transgénicos (J-TG vs V-TG) (Figura 59B). Sin embargo, los niveles de BID truncado no se vieron afectados por la edad ni por la sobreexpresión de CYB5R3 (Figura 59C).

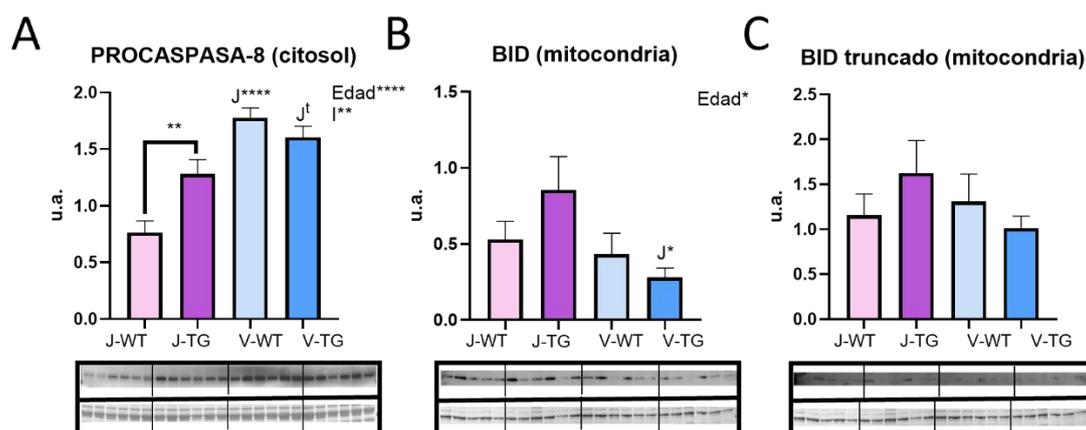


Figura 59. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la vía extrínseca de apoptosis en músculo esquelético de animales WT y TG, jóvenes y viejos. Procaspasa-8 (A), BID (B), y BID truncado en fracciones enriquecidas en mitocondrias (C). Cada gráfica tiene debajo las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y con Ponceau S. Los datos se muestran como media \pm SEM de 6 réplicas. (u.a. = unidades arbitrarias).

En cuanto a la vía intrínseca, se midieron en primer lugar marcadores proapoptóticos y antiapoptóticos. Se determinaron los niveles de BCL-2 en extractos totales, como una de las principales proteínas antiapoptóticas, y de BAX en fracciones mitocondriales, como una de las principales proteínas proapoptóticas. Además, se calculó la ratio BCL-2/BAX, ya que los cambios en esta relación han sido considerados clásicamente como un marcador del destino celular hacia la supervivencia (aumento) o muerte (disminución) [252, 253]. En nuestro modelo de estudio encontramos que los niveles de BCL-2 en extractos totales de músculo esquelético disminuyeron con el envejecimiento, tanto en ratones WT como TG, sin observarse efecto de la sobreexpresión de la CYB5R3 (Figura 60A). Sin embargo, los niveles de BAX mitocondrial, aunque no se vieron afectados por el envejecimiento en los ratones WT (J-WT vs. V-WT), experimentaron un considerable aumento como consecuencia de la edad en los ratones TG (J-TG vs. V-TG) y de la sobreexpresión de CYB5R3 en los ratones viejos (V-WT vs. V-TG) (Figura 60B). Como resultado, la ratio BCL-2/BAX disminuyó significativamente con el envejecimiento, siendo esta bajada aún más acusada en los ratones TG (Figura 60C).

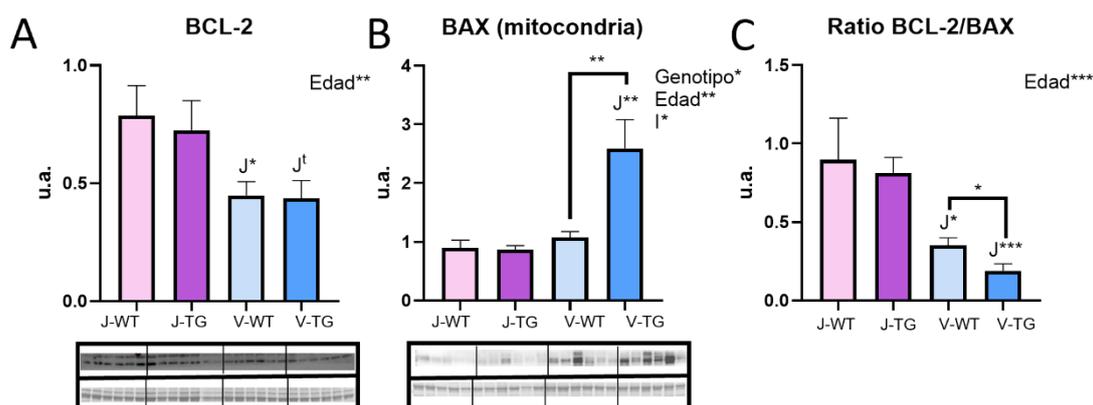


Figura 60. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con el desencadenamiento de la vía intrínseca de apoptosis en músculo esquelético de animales WT y TG, jóvenes y viejos. BCL-2 (A), BAX en fracciones enriquecidas en mitocondrias (B), ratio BCL-2/BAX (C), Cada gráfica tiene debajo las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y con Ponceau S. Los datos se muestran como media \pm SEM de 6 réplicas. (u.a. = unidades arbitrarias).

El balance entre estas proteínas determinará la apertura del poro en la mitocondria permitiendo la liberación de citocromo *c* y APAF-1. La cuantificación del citocromo *c* en citosol mostró una tendencia a aumentar en animales TG viejos respecto a los WT de la misma edad (V-WT vs. V-TG) (Figura 61A). Por su lado, APAF-1 sufrió un gran aumento por la sobreexpresión de CYB5R3 en ratones jóvenes (J-WT vs. J-TG) aunque, curiosamente, el envejecimiento causó un descenso significativo de este factor precisamente en los ratones TG (J-TG vs. V-TG) (Figura 61B).

El apoptosoma, complejo citosólico multiproteico formado por APAF-1 y citocromo *c*, activa a la caspasa-9. Los niveles de procaspasa-9 en citosol disminuyeron con el envejecimiento en los ratones de genotipo WT (J-WT vs. V-WT), efecto que se vio abolido por la sobreexpresión de CYB5R3 (Figura 61C). En cuanto a los niveles de la forma activa, nuestros resultados mostraron una bajada significativa de la caspasa-9 en ratones viejos por la sobreexpresión de CYB5R3 (V-WT vs. V-TG y J-TG vs. V-TG) (Figura 61D).

Dado que APAF-1 cumple también funciones en el núcleo, se midieron los niveles de esta proteína en extractos nucleares. Los niveles de APAF-1 en núcleo bajaron con la edad tanto en animales WT como TG, siendo la bajada más acusada en estos últimos (J-WT vs. V-WT y J-TG vs. TG) (Figura 61E). Además, en los animales viejos la sobreexpresión de CYB5R3 causó un descenso aún mayor de APAF-1 en núcleo (V-WT vs. V-TG) (Figura 61E).

Tanto el desencadenamiento de la apoptosis por la vía intrínseca como por la extrínseca llevan a la activación de caspasas ejecutoras, entre las que se encuentra la caspasa-3, por

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

lo tanto, se midieron los niveles de caspasa-3 y procaspasa-3 en citosol. Mientras que no se detectó caspasa-3 activa, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de procaspasa-3 debidas a la edad o al genotipo (Figura 61F).

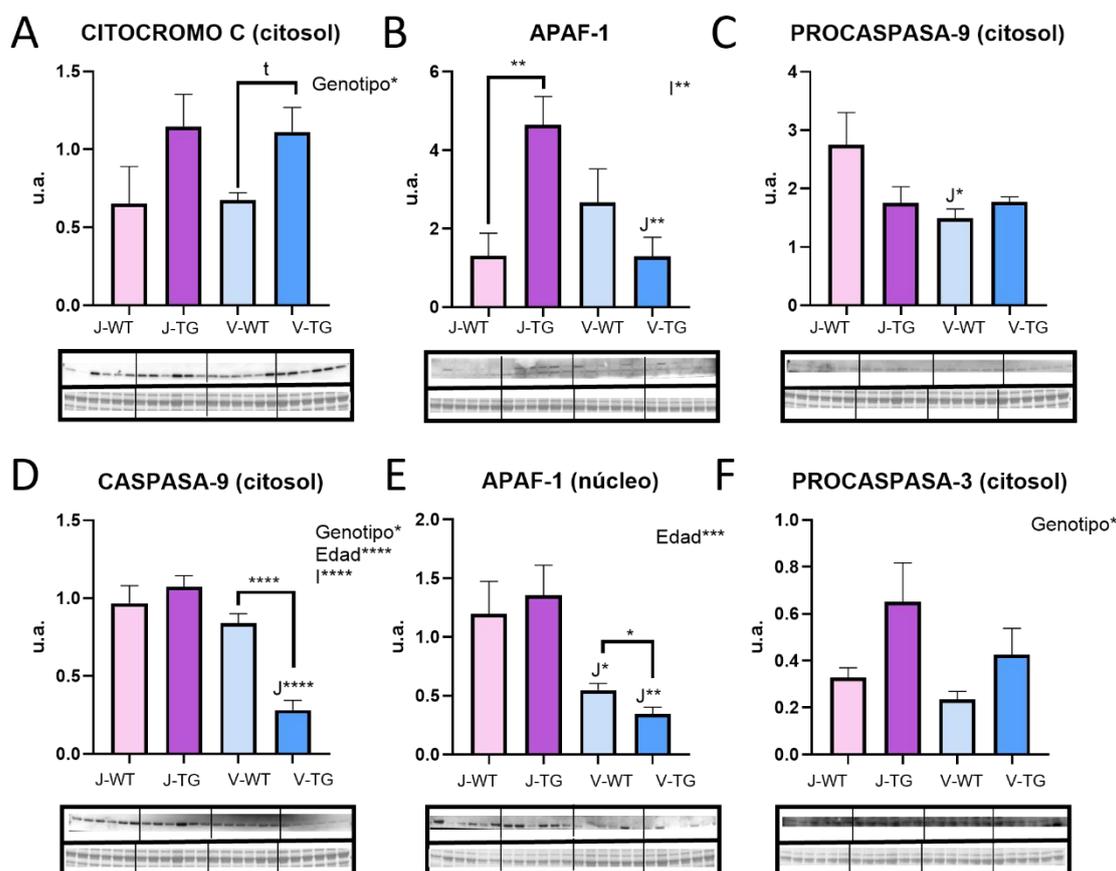


Figura 61. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la vía intrínseca de apoptosis en músculo esquelético de animales WT y TG, jóvenes y viejos. Citocromo c en fracciones citosólicas (A), APAF-1 (B), Procaspasa-9 en fracciones citosólicas (C), Caspasa-9 en fracciones citosólicas (D), APAF-1 en fracciones enriquecidas en núcleo (E), y Procaspasa-3 en fracciones citosólicas (F). Cada gráfica tiene debajo las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y con Ponceau S. Los datos se muestran como media \pm SEM de 6 réplicas. (u.a. = unidades arbitrarias).

Tras iniciarse la vía intrínseca también se liberan proteínas que van a desencadenar la apoptosis independiente de caspasas. Como marcadores de la ruta independiente de caspasas se midieron los niveles de AIF y ENDOG. AIF se encuentra en mitocondria, donde se observó un aumento con la edad en los animales con genotipo WT (J-WT vs. V-WT) (Figura 62A). Ya que esta proteína se libera a citosol cuando se produce la permeabilización de las membranas mitocondriales, procedimos también a cuantificar la presencia de AIF en compartimentos extramitocondriales. En citosol, los niveles de AIF se vieron afectados por la edad sólo en animales de genotipo TG (J-TG vs. V-TG), en los

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

que evidenciamos un descenso significativo. Los niveles de AIF en citosol fueron también significativamente menores en los ratones viejos TG en comparación con los WT de la misma edad (V-WT vs. V-TG) (Figura 62B). Una vez que AIF es liberado desde la mitocondria al citosol, se transloca al núcleo para llevar a cabo su acción proapoptótica promoviendo la degradación de la cromatina, por lo que también se midieron sus niveles en extractos nucleares. Mientras que la sobreexpresión de CYB5R3 tendió a aumentar los niveles de AIF nuclear en los ratones jóvenes (J-WT vs. J-TG), produjo una disminución en el grupo de viejos (V-WT vs. V-TG) (Figura 62C). El envejecimiento, por su parte, también disminuyó los niveles de AIF nuclear en los animales TG (J-TG vs. V-TG) (Figura 62C). En lo que respecta a los niveles de ENDOG (determinada en extractos nucleares), nuestros resultados mostraron una subida considerable como consecuencia de la edad en los ratones de genotipo WT (J-WT vs. V-WT), un efecto que se vio paliado con la sobreexpresión de CYB5R3 (Figura 62D).

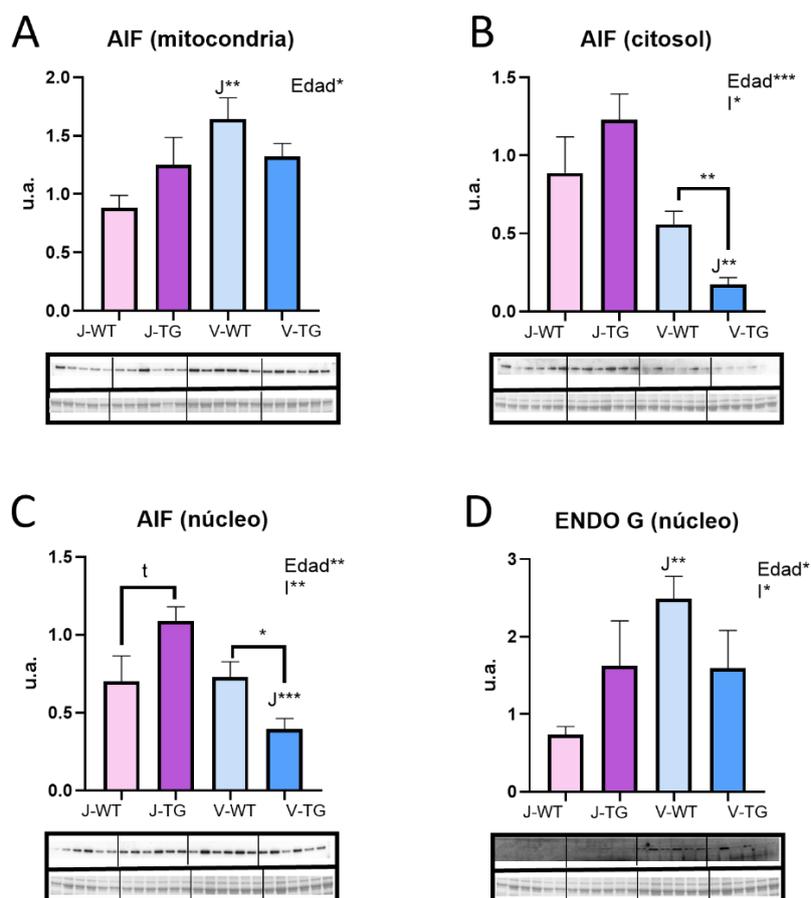


Figura 62. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis independiente de caspasas en músculo esquelético de animales WT y TG, jóvenes y viejos. AIF en fracciones enriquecidas en mitocondria (A), AIF en fracciones citosólicas (B), AIF en fracciones enriquecidas en núcleo (C) y ENDOG en fracciones enriquecidas en núcleo (D). Cada gráfica tiene debajo las transferencias de Western teñidas con anticuerpo y con Ponceau S. Los datos se muestran como media \pm SEM de 6 réplicas. (u.a. = unidades arbitrarias).

6.9 Discusión

Durante los últimos años se ha reconocido un papel clave de la CYB5R3 en la regulación del metabolismo respiratorio y el envejecimiento. Utilizando un modelo de levadura, el grupo donde se ha desarrollado esta Tesis Doctoral mostró que la sobreexpresión de NQR1, ortólogo de CYB5R3 de mamífero, induce un cambio desde un metabolismo fermentativo a uno respiratoria, y extiende la longevidad tanto cronológica como replicativa [254]. En mamíferos, se ha comprobado que la expresión y actividad de CYB5R3 pueden ser inducidas por la RC, lo que contribuye a prevenir la acumulación de daño por estrés oxidativo con el envejecimiento [53, 54, 218]. La regulación al alza de la expresión del gen CYB5R3 en respuesta a factores de estrés ambiental y al ayuno está mediada por la acción coordinada de los factores de transcripción Nrf2 y FOXO3a [207]. Por el contrario, la disminución en la abundancia de la proteína CYB5R3 que se ha observado en fibroblastos embrionarios murinos *Nrf2*^{-/-} se ha asociado con unas tasas de proliferación más bajas y un fenotipo senescente muy marcado [255].

Para obtener nuevos conocimientos sobre el papel fisiológico de CYB5R en el contexto del metabolismo y el envejecimiento, generamos una línea transgénica de ratones que sobreexpresa el gen CYB5R3 de rata (TG). Los ratones TG no solo exhiben algunos de los efectos saludables observados con la RC, asociados a la modulación del metabolismo de los lípidos, sino que también muestran una mayor longevidad que los WT, lo que también se ha observado en ratones transgénicos dobles que sobreexpresan CYB5R3 y NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1 (NQO1) [55, 256]. Un ensayo de microarrays de ARN derivado de hígado de ratones WT y de ratones que sobreexpresan CYB5R3 ha evidenciado la existencia de diferencias significativas en conjuntos de genes relacionados con la función mitocondrial, más aún, un estudio mediante Ingenuity Pathway Analysis (IPA) demostró la existencia de una expresión inducible por CYB5R3 de transcritos asociados con rutas relacionadas con la respiración aeróbica (p. ej., biosíntesis del coenzima Q y fosforilación oxidativa) [55]. Sin embargo, como hemos mostrado en el capítulo anterior y en nuestra publicación previa, algunas de las adaptaciones metabólicas de la RC se ven obstaculizadas por la sobreexpresión de CYB5R3 [216]. En este sentido, mientras que los ratones WT alimentados bajo condiciones de RC mostraron aumentos significativos en la masa mitocondrial y en marcadores de fusión (MFN-1) y biogénesis (NRF-1) mitocondrial en el músculo esquelético de las extremidades traseras, los ratones TG sometidos también a RC no mostraron un aumento en la masa mitocondrial,

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

independientemente de un claro aumento de la expresión de TFAM y de los complejos mitocondriales [216].

Nos resultaba particularmente interesante dilucidar cómo la sobreexpresión de CYB5R3 se dirige a marcadores clave relacionados con la fisiología mitocondrial, la señalización autofágica y la apoptosis en el músculo esquelético de ratones viejos, dado el papel central que juegan estas vías en la determinación de la tasa de envejecimiento [208], y la importancia fisiológica que tiene el músculo esquelético como el tejido postmitótico con una mayor contribución al gasto energético global del ratón [257].

Nuestros resultados obtenidos tras el análisis de tejidos procedentes de animales viejos de genotipos WT o TG han indicado que CYB5R3 resulta altamente sobreexpresada en homogeneizados de músculo esquelético de los ratones TG viejos, lo que concuerda con lo observado en el capítulo anterior para animales jóvenes [55, 216]. Además, mostramos aquí por primera vez que el envejecimiento no modifica el patrón de sobreexpresión de CYB5R3 y el polipéptido sobreexpresado se dirige eficazmente a mitocondrias y membranas ligeras en el músculo esquelético de los ratones TG. Por tanto, este tejido se constituye un modelo adecuado para estudiar los efectos directos de la sobreexpresión de CYB5R3 tanto en ratones jóvenes como en ratones viejos. CYB5R3 endógeno se incrementó significativamente por el envejecimiento, lo que concuerda con los resultados informados por Ubaida-Mohien *et al.* para el músculo esquelético humano [151], aunque los niveles endógenos del polipéptido que se alcanzaron en los ratones viejos WT fueron extremadamente bajos en comparación con los ratones TG.

La disfunción mitocondrial es uno de los sellos distintivos del envejecimiento [1], y la optimización de la función mitocondrial está relacionada con una disminución del estrés oxidativo y una mayor longevidad [258]. Así, en el presente estudio nos propusimos estudiar cómo el envejecimiento y/o la sobreexpresión de CYB5R3 afectaban a varios marcadores proteicos relacionados con el metabolismo, la dinámica y la biogénesis mitocondrial, así como con el reciclaje autofágico y la apoptosis.

Los complejos mitocondriales I, III, IV y V disminuyeron con el envejecimiento en el músculo esquelético de los ratones WT. La disminución del complejo I relacionada con el envejecimiento concuerda con nuestra investigación anterior [70] y está en línea con publicaciones anteriores [250, 259]. El hecho de que nuestro estudio anterior no destacara disminuciones de los complejos III, IV y V con el envejecimiento podría deberse a diferencias en el diseño del estudio en términos de edad (21 vs. 24 meses), dieta (AIN93G vs. AIN93M) y patrón de alimentación (restricción calórica del 5% frente a ingesta *ad*

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

libitum). También se ha descrito una disminución del complejo IV para el músculo esquelético de las personas mayores [260].

La sobreexpresión de CYB5R3 afectó profundamente la abundancia de complejos ETC, y el aumento del complejo II en ratones TG adultos jóvenes concuerda con nuestra publicación anterior [216]. Sin embargo, los efectos más llamativos de la sobreexpresión de CYB5R3 en los complejos ETC se observaron en ratones TG viejos, que exhibieron aumentos significativos de los complejos I, II y IV. Además, la sobreexpresión de CYB5R3 abolió las disminuciones relacionadas con el envejecimiento de los complejos I, III, IV y V, lo que indica un efecto protector contra la disfunción mitocondrial relacionada con el envejecimiento [55]. Es de destacar que la sobreexpresión en músculo esquelético y corazón de lncRNA (LINC00116), que codifica la microproteína altamente conservada Mitoregulina (MtlN), promueve un cambio de la glucólisis a la respiración, mejora la eficiencia respiratoria y optimiza el metabolismo mitocondrial a través de un mecanismo que se basa en su interacción con CYB5R3, que se requiere para proporcionar un entorno lipídico favorable que preserve la interacción del complejo respiratorio I en supercomplejos [261, 262]. Por otra parte, se ha descrito que la RC también aumenta los niveles de complejo I en el hígado, sin aumentar la producción de ROS [66].

Como indicamos en el capítulo anterior, la mayor abundancia de complejos ETC podría deberse a alteraciones en la composición de las membranas mitocondriales, pero también a cambios en la abundancia mitocondrial. Para distinguir entre estas dos posibilidades, medimos los niveles de VDAC, una proteína mayoritaria de la membrana mitocondrial externa que se emplea como un marcador bioquímico bien establecido de abundancia mitocondrial [173]. A pesar de que se ha documentado que la masa mitocondrial disminuye durante el envejecimiento [263], no encontramos cambios en los niveles de VDAC que pudieran atribuirse a la edad o al genotipo. No obstante, también se ha documentado un mantenimiento de los niveles de VDAC con el envejecimiento en el músculo esquelético de los monos Rhesus [264]. Por lo tanto, los aumentos de los marcadores de la ETC que observamos en ratones viejos TG no parecen deberse a cambios en la abundancia mitocondrial, sino más probablemente a alteraciones intrínsecas en la composición de las membranas mitocondriales. Asimismo, se ha comprobado también que la sobreexpresión de MtlN mejora la eficiencia respiratoria al reforzar el ensamblaje de proteínas en complejos y/o su estabilidad, independientemente de las alteraciones en la masa mitocondrial [261].

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

Dado que los procesos de fusión y fisión mitocondrial son necesarios para mantener un estado saludable de las mitocondrias en el músculo esquelético, y ya que la morfología mitocondrial cambia con el envejecimiento [265, 266], también nos interesó dilucidar el efecto del envejecimiento y/o sobreexpresión de CYB5R3 sobre marcadores clave de la dinámica de fusión y fisión mitocondrial. Este análisis se combinó además con el estudio de la morfología mitocondrial por microscopía electrónica. En ratones WT, el envejecimiento produjo una disminución sustancial en los niveles de MFN-2 que fue acompañada de un aumento generalizado de marcadores de fisión. Llama la atención que la sobreexpresión de CYB5R3 produjera en los ratones TG jóvenes cambios similares a los causados por el envejecimiento en el grupo de genotipo WT, aunque no se produjeron más alteraciones con el envejecimiento en el grupo TG. Nuestros resultados están totalmente de acuerdo con las demostraciones anteriores de que los niveles de MFN-2 disminuyen con el envejecimiento en el músculo esquelético del ratón, lo que conduce a una disfunción mitocondrial y la acumulación de mitocondrias dañadas. Además, la ablación de MFN-2 genera una marca genética relacionada con el envejecimiento, caracterizada por la inhibición de la mitofagia y el deterioro de la calidad mitocondrial, lo que contribuye a exacerbar la disfunción mitocondrial relacionada con la edad [267]. La falta de una disminución en los niveles de MFN-2 con el envejecimiento en los ratones TG refuerza la importancia de la expresión de CYB5R3 para prevenir la disfunción mitocondrial asociada al envejecimiento en el músculo esquelético. Más aún, también hemos publicado recientemente en nuestro grupo de investigación que los niveles de MFN-2 están aumentados en el músculo esquelético de las extremidades traseras de ratones sometidos a RC [70], lo cual es consistente con la idea de que algunos de los beneficios asociados a esta intervención nutricional podrían estar relacionados con el aumento de MFN-2. Sin embargo, las investigaciones previas encaminadas a dilucidar los posibles cambios de MFN-2 con el envejecimiento en el músculo esquelético humano han arrojado resultados contradictorios. En este sentido, mientras que existen estudios que han informado una disminución de MFN-2 con el envejecimiento en el músculo esquelético humano [260, 268], y la restauración de sus niveles con el ejercicio [268], otros han informado niveles de MFN-2 similares [269-271] o incluso superiores en músculos esqueléticos humanos envejecidos [272], señalando la existencia de mecanismos específicos de especie que determinan cómo los niveles de MFN-2 se alteran con el envejecimiento.

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

En lo referente al marcador de fisión analizado, encontramos que DRP-1 unido a mitocondrias también se incrementó significativamente en los ratones TG, efecto que es similar al que habíamos demostrado previamente para los ratones alimentados a largo plazo bajo condiciones de RC [70], y que podría indicar un efecto mimético de la sobreexpresión de CYB5R3 con la RC.

Investigaciones llevadas a cabo en otro grupo de investigación han demostrado que el envejecimiento afecta al tamaño de las mitocondrias de manera diferencial según el tipo de músculo: mientras que el sóleo (un músculo oxidativo rojo) mostró una mayor fragmentación de las SSM y las IMFM con el envejecimiento, y este cambio fue atenuado por la RC, el gastrocnemio blanco (un músculo glucolítico) presentó SSM agrandadas e IMFM más complejas / ramificadas con el envejecimiento, teniendo la RC solo un efecto marginal sobre estas alteraciones [251].

Es importante señalar que, aunque tanto el envejecimiento como la sobreexpresión de CYB5R3 aumentaron los niveles de marcadores de fisión en el músculo esquelético de las extremidades traseras, estos dos factores tuvieron resultados diferentes en la morfología y abundancia mitocondrial. En cortes transversales de FB del gastrocnemio rojo, encontramos que el aumento de los marcadores de fisión asociados con el envejecimiento se acompañó de una disminución del tamaño de las mitocondrias y un aumento del número de mitocondrias en los ratones WT. En FR, el envejecimiento también condujo a una disminución del tamaño de las SSM y las IMFM, lo que indica una prevalencia de la fragmentación mitocondrial con una edad avanzada, lo cual concuerda con los cambios observados en el sóleo [251]. Por el contrario, se ha reportado que el contenido mitocondrial en el gastrocnemio blanco no se modifica con el envejecimiento [250, 251].

Según nuestros datos, la sobreexpresión de CYB5R3 también aumentó la abundancia de marcadores de fisión y disminuyó el tamaño mitocondrial en FB de ratones TG jóvenes. Sin embargo, a diferencia de lo que se encontró con el envejecimiento, la abundancia mitocondrial (estimada a partir de los valores de Na y Vv) disminuyó significativamente en músculo esquelético de los ratones TG, lo que sugiere que la fisión está acompañada en este caso por una mayor eliminación autofágica de orgánulos. Con el avance de la edad, encontramos que el número de mitocondrias (Na) no cambió en los ratones TG, pero su tamaño aumentó significativamente, lo que también condujo a valores más altos de Vv. En FR, también se observó un mayor tamaño de SSM e IMFM en animales TG viejos en comparación con los WT de la misma edad, lo que también resultó en un

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

incremento del parámetro Vv. Nuestro grupo había encontrado previamente una disminución de la masa mitocondrial acompañada de un mayor tamaño del orgánulo en el gastrocnemio rojo de ratones alimentados con RC [70], lo que indica que estas alteraciones podrían representar características comunes de los músculos oxidativos en ratones sometidos a estas intervenciones anti-envejecimiento.

Por otro lado, es de destacar que los cambios ultraestructurales asociados con la edad y/o la sobreexpresión de CYB5R3 se encontraron generalmente más atenuados en las secciones longitudinales, en comparación con los cambios observados en las transversales, lo que sugiere que el envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3 podrían producir alteraciones de la morfología mitocondrial.

El mayor tamaño mitocondrial observado en secciones de gastrocnemio de los ratones TG viejos no puede explicarse por un predominio de fusión frente a fisión, debido a que en estas condiciones también encontramos una disminución del marcador de fusión MFN-2, a la vez que aumentos coordinados de todos los marcadores de fisión analizados (DRP-1, FIS1 y MFF). No obstante, estas observaciones que parecerían discrepantes pueden explicarse si consideramos que la fisión mitocondrial facilita la degradación de las mitocondrias dañadas por autofagia [240]. El mantenimiento de unos niveles correctos de autofagia es crucial para eliminar los orgánulos dañados, y distintos resultados muestran una autofagia alterada durante el envejecimiento en el músculo esquelético [259, 273, 274]. También se han encontrado niveles elevados de P62 (que se asocia con un bloqueo de la actividad autofágica) en el músculo esquelético de animales envejecidos, lo que sugiere una disminución del flujo autofágico durante el envejecimiento [259, 275]. Se ha informado que la relación entre LC3 I y II, un marcador de flujo autofágico, no cambia con el envejecimiento [70, 98, 136], lo que concuerda con nuestros resultados. Sin embargo, en nuestro caso evidenciamos un aumento dramático de los niveles de LC3AB I y II en ratones WT viejos, lo que podría representar su acumulación debido a un deterioro de la autofagia causado por el envejecimiento [276]. Este descenso de la autofagia con la edad en músculo esquelético se ha tratado de explicar por la acumulación lisosomal del pigmento no degradable lipofusina lo cual, su vez, constituye un círculo vicioso ya que la acumulación de ROS promueve la formación de lipofusina, que compromete la degradación mitocondrial y por tanto aumenta la disfunción mitocondrial y la formación de ROS [277, 278].

Es de destacar que, a pesar de no encontrar modificaciones en la relación entre LC3 I y II, los niveles de LC3AB I y II disminuyeron drásticamente en ratones viejos que

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

sobreexpresan CYB5R3, los cuales mostraron también unos niveles significativamente disminuidos de P62 y PARKIN. Dado que una elevación de P62 se ha relacionado con la disminución del flujo autofágico en el músculo esquelético durante el envejecimiento [70], los cambios observados en nuestro modelo de sobreexpresión de CYB5R3 son compatibles con un aumento del consumo de estas proteínas. De acuerdo con esta idea, en nuestra investigación previa hemos demostrado la existencia de unos niveles reducidos de P62 en ratones alimentados bajo condiciones de RC durante 18 meses, lo que sugiere un posible desbloqueo del flujo de autofagia [70], de manera similar al que hemos constatado en nuestro estudio centrado sobre ratones viejos que sobreexpresan CYB5R3. Unas tasas de autofagia más altas en estos animales, resultando en la eliminación predominante de las mitocondrias más pequeñas, podría conducir a la preservación de las mitocondrias con un área más alta, lo que explicaría la existencia de un aumento en el tamaño medio de los perfiles mitocondriales sin aumento de su número bajo condiciones de predominancia de los marcadores de fisión.

Está ampliamente aceptado que la biogénesis mitocondrial disminuye con el envejecimiento, y estudios previos han demostrado que los niveles de proteínas TFAM y NRF-1 disminuyen con el envejecimiento en el hígado de rata [224]. El descenso en los marcadores de biogénesis mitocondrial en músculo ha llevado a relacionar la inflamación asociada con la edad con disfunción mitocondrial y sarcopenia [279, 280]. En este sentido, se ha encontrado que células mioblásticas C2C12 con altos niveles de la citoquina proinflamatoria TNF- α muestran un descenso en los niveles de ARNm de PGC1 α , TFAM y NRF-1 [281]. Nuestros resultados han demostrado que lo mismo es válido para el músculo esquelético en el envejecimiento, aunque, en este caso, la disminución de los marcadores de biogénesis mitocondrial asociada a la edad avanzada no fue prevenida por la sobreexpresión de CYB5R3. En lo que respecta a los niveles de SIRT3, sirtuína mitocondrial que también se relaciona con los procesos de biogénesis en este orgánulo a través de PGC1 α [227], nuestros resultados parecen estar en contraste con publicaciones previas. Moreno-Ulloa *et al.* [282] mostraron una bajada en los niveles de proteína SIRT3 con la edad al comparar los niveles en cuádriceps de ratones de 6 meses frente a ratones de 26 meses alimentados con una dieta estándar. En humanos, Lanza *et al.* demostraron también en cuádriceps (concretamente en el vasto lateral) una bajada de SIRT3 con la edad, y dicha bajada resultó anulada con el ejercicio físico [283]. Sin embargo, en nuestro caso observamos una subida significativa en los niveles de SIRT3 con la edad, lo cual podría justificarse por el músculo empleado en el estudio, así como por la dieta, de

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

acuerdo con Palacios *et al.*, quienes demostraron que los niveles de SIRT3 varían de forma considerable en función del músculo que se emplee para el estudio, así como en función de la cantidad de grasa de la dieta [227]. Nuestro estudio se realizó a partir de un homogeneizado total de todo el músculo de la pata trasera, lo que puede motivar que no se aprecie la bajada en los niveles de SIRT3 con la edad en algún músculo concreto. Por su lado, la sobreexpresión de CYB5R3 tiende a incrementar los niveles de SIRT3 en los ratones alimentados *ad libitum*, como sería de esperar por el incremento que produce CYB5R3 en la ratio $NAD^+/NADH$ [230].

Si bien algunos estudios han indicado que el coenzima Q disminuye en la mayoría de los órganos durante el envejecimiento, los cambios observados en el coenzima Q del músculo esquelético con el avance de la edad no han sido uniformes. En un estudio anterior no se encontraron cambios en los niveles de coenzima Q en homogeneizados completos de gastrocnemio de ratones viejos en comparación con los jóvenes, aunque una intervención de RC basada en el procedimiento de alimentación cada dos días y el ejercicio físico sí resultó en un incremento en los niveles de coenzima Q del músculo esquelético en los ratones viejos [284]. Sin embargo, en un análisis centrado en mitocondrias aisladas de corazón, músculo esquelético, riñón y cerebro de ratón, se encontró que el contenido de coenzima Q disminuyó con la edad específicamente en el caso del músculo esquelético, mientras que la RC aumentó el coenzima Q₉ en las mitocondrias de este tejido [249]. En nuestro modelo, encontramos que el envejecimiento produjo una disminución en los niveles de coenzima Q del músculo esquelético que no se vio afectada por la sobreexpresión de CYB5R3. Como enzima implicada en la síntesis de coenzima Q se midieron los niveles de COQ7, un componente clave de la maquinaria de su biosíntesis al que se ha asignado un papel muy relevante en su regulación [118]. Nuestros resultados mostraron un aumento en los niveles de COQ7 con el envejecimiento que fue independiente de la sobreexpresión de CYB5R3. Aunque mutaciones de COQ7 generan deficiencias primarias de coenzima Q [285, 286], bajos niveles de esta proteína se han relacionado con un aumento de la longevidad [287, 288]. Nuestros resultados indicarían que el aumento de la longevidad observado en animales que sobreexpresan CYB5R3 [55] no se debe a modificaciones en la ruta de biosíntesis de coenzima Q, al menos en lo que respecta a COQ7 ni en adultos jóvenes ni en viejos. El incremento observado en los niveles de COQ7 podría deberse a un mecanismo compensatorio encaminado a paliar la reducción en los niveles de coenzima Q asociados a la edad, aunque finalmente no se consigue dicho efecto. En este sentido es importante tener en cuenta que los cambios en

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

los niveles de COQ7 pueden no estar vinculados necesariamente a alteraciones de la actividad en el mismo sentido, ya que la activación de COQ7 requiere que la proteína sea desfosforilada por la fosfatasa mitocondrial PPTc7 [233], por lo que sería interesante extender futuros estudios al análisis del estado de fosforilación de COQ7 con la edad y bajo distintas condiciones experimentales.

El coenzima Q tiene efecto antiapoptótico ya que previene la apertura del poro mitocondrial [114, 115], por lo que la disminución en sus niveles observada con el envejecimiento se podría relacionar con el aumento de apoptosis observado con la edad. Por otro lado, además de la disfunción mitocondrial asociada al envejecimiento, el exceso de apoptosis también se relaciona con la sarcopenia [289], lo que hace interesante profundizar en el estudio de esta molécula en nuestro modelo experimental.

Como se ha indicado anteriormente, con la edad aumenta la circulación de mediadores proinflamatorios como TNF- α [279, 280], que es capaz de desencadenar apoptosis por vía extrínseca [290]. Como marcador de esta vía se determinaron los niveles de procaspasa-8, que fueron especialmente incrementados tanto por la sobreexpresión de CYB5R3 en ratones jóvenes como por el envejecimiento, siendo en este caso más acusado el incremento en los ratones WT. Estos mayores niveles de procaspasa-8 podrían traducirse en mayores niveles de caspasa-8, que activarían a la caspasa-3 o a BID, que conecta la vía extrínseca con la intrínseca. BID truncado contribuye a la permeabilización de la mitocondria para desencadenar apoptosis por vía intrínseca. Marzetti *et al.* mostraron un incremento en los niveles de BID mitocondrial con la edad en gastrocnemio de ratas Ficher344 X Brown Norway, pero este incremento solo se observó a los 37 meses de edad, y no en los grupos de 18 y 29 meses, más próximos a la edad de los ratones utilizados en nuestro estudio [141]. De acuerdo con esto, existe la posibilidad de que el incremento en los niveles de la proteína proapoptótica BID se observe a edades muy avanzadas también en nuestro modelo experimental.

El desencadenamiento de la apoptosis va a depender del balance entre proteínas proapoptóticas, como BAX, y antiapoptóticas, como BCL-2, por lo que, como hemos indicado anteriormente, la ratio entre estas dos proteínas se aplica como marcador de la señalización apoptótica [252, 253]. Nuestros resultados muestran un incremento muy acusado en los niveles de BAX en el grupo de animales viejos TG, y el descenso de la ratio BCL-2/BAX indica una mayor apoptosis en los animales viejos independientemente del genotipo. Los mayores niveles de BAX en la mitocondria de los animales viejos TG podrían traer como consecuencia una mayor formación de poros en este orgánulo, con la

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

consiguiente liberación del citocromo *c*, cuyos niveles en citosol muestran una tendencia a incrementar en este grupo, tal como hemos observado. El citocromo *c* debe unirse a APAF-1 para formar el apoptosoma y activar a la caspasa-9 [176]. Nuestros resultados muestran una disminución en los niveles de APAF-1 con la edad en los animales TG. Por tanto, aunque estos animales hayan experimentado una mayor liberación de citocromo *c*, podríamos postular eso no se va a traducir necesariamente en una mayor formación de apoptosomas, lo que concuerda con el descenso significativo de los niveles de caspasa-9 activa en ese grupo respecto a los animales WT de la misma edad y a los TG jóvenes. Por tanto, el incremento en los niveles de BAX en los animales TG viejos parece no relacionarse con un incremento de la apoptosis. Por otra parte, diversos estudios muestran que la autofagia se relaciona negativamente con la apoptosis [291-293]. En el caso del modelo celular de mioblastos C2C12 se ha encontrado que una función autofágica correcta redundante en una mayor protección frente a factores proapoptóticos [294]; en gastrocnemio de ratas envejecidas también se ha comprobado que el ejercicio físico aumenta la autofagia y reduce la señalización apoptótica [295]. Nuestros resultados estarían en concordancia con estos estudios, ya que los animales viejos que sobreexpresan CYB5R3, parecen tener una mayor actividad autofágica, como hemos discutido anteriormente, y una menor actividad apoptótica. Sin embargo, en el grupo de animales WT viejos, en el que hemos obtenido resultados compatibles con la existencia de un bloqueo de autofagia (resultando en la acumulación de LC3), sí podría existir una mayor tasa de apoptosis, como indica el balance entre proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas. Leeuwenburgh *et al.* han mostrado una mayor traslocación de ENDOG al núcleo en el músculo de ratas envejecidas [296], lo que concuerda con nuestros resultados. Resulta muy interesante que este aumento dependiente de la edad se ve paliado en los animales que sobreexpresan CYB5R3. En concordancia con esto, existen datos apuntando que la apoptosis independiente de caspasas juega un papel más importante en la pérdida de músculo asociada con la edad que la apoptosis dependiente de caspasas [136].

También resulta interesante destacar, que muchas de estas proteínas conocidas por participar en la señalización apoptótica, tienen otras funciones no relacionadas con la apoptosis, como es el caso de APAF-1. Como ya hemos indicado en capítulos anteriores, APAF-1 participa en un punto de control de daños en el DNA en el ciclo celular [143], para lo cual se transloca al núcleo en condiciones en que existen este tipo de daños [247]. Por tanto, quisimos medir los niveles de esta proteína no sólo en citosol, sino también en núcleo. Nuestros resultados muestran una bajada en los niveles de APAF-1 en extractos

Capítulo 3. Efecto del envejecimiento y la sobreexpresión de CYB5R3

nucleares con la edad, independientemente del genotipo, lo que podría estar relacionado con la existencia de un punto de control de daños en el DNA defectuoso y, en consecuencia, inestabilidad genómica [143].

Otra de las proteínas de señalización apoptótica con funciones adicionales es BAX. Nuestros resultados parecen indicar que el incremento en los niveles de BAX en los animales TG viejos no se relaciona con un aumento de la apoptosis. De acuerdo con esto, Zhang *et al.* demostraron que BAX juega un papel clave en la maquinaria de importación de proteínas a la mitocondria (PIM) en músculo esquelético [297], que se ve afectada por el envejecimiento [298]. Este defecto en PIM con el envejecimiento lleva a la acumulación de proteínas desplegadas en el citosol, lo que genera citotoxicidad [299]. Por lo tanto, un aumento en los niveles de BAX que no viene acompañado de una estimulación de la apoptosis mitocondrial podría indicar una mejora en PIM, paliando así algunos efectos deletéreos envejecimiento, como también se ha encontrado que se produce en músculo a través de intervenciones como el ejercicio físico [300-302]. Dado que nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de CYB5R3 podría influir en esta ruta de importación de proteínas, sería interesante profundizar más en el futuro en el estudio de los mecanismos implicados.

En resumen, los datos de nuestro estudio muestran que la sobreexpresión de CYB5R3 no se ve afectada por el envejecimiento en el músculo esquelético de ratones transgénicos. Mientras que la sobreexpresión de CYB5R3 no previene la disminución de los marcadores de biogénesis mitocondrial o del CoQ asociada al envejecimiento, sí puede contrarrestar la disfunción mitocondrial y la disminución de la actividad autofágica causada por el envejecimiento, así como el exceso de apoptosis.

Conclusiones

7 Conclusiones.

1. La sobreexpresión significativa de CYB5R3 en el músculo esquelético de ratones transgénicos, y el envío eficiente del polipéptido sobreexpresado a las mitocondrias hacen a este tejido un modelo idóneo para estudiar los efectos directos de la sobreexpresión de esta enzima en la fisiología celular.
2. El componente graso de la dieta, el envejecimiento y la restricción calórica son factores clave que determinan los niveles de CYB5R3 endógeno en distintas fracciones subcelulares y/o en los homogeneizados totales.
3. El aumento de la fisión mitocondrial y de la autofagia que tiene lugar en músculo esquelético de ratones alimentados con una dieta basada en aceite de pescado pueden estar relacionados con la eliminación de las mitocondrias más pequeñas y el aumento de la biogénesis mitocondrial, con un efecto protector frente a la muerte celular programada, pero sin beneficios adicionales por la sobreexpresión de CYB5R3.
4. La dieta de aceite de soja maximiza los efectos de la sobreexpresión de CYB5R3 sobre los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en animales jóvenes/adultos.
5. La sobreexpresión de CYB5R3 palia el bloqueo de la autofagia y la inducción de la apoptosis en músculo esquelético de animales jóvenes/adultos alimentados con una dieta basada en manteca de cerdo, rica en ácidos grasos saturados.
6. Las alteraciones provocadas por la restricción calórica en la abundancia y la dinámica mitocondrial pueden verse obstaculizadas por la sobreexpresión de CYB5R3, pero estos efectos se compensan con una mayor abundancia de complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en ratones transgénicos sometidos a esta intervención dietética.
7. La restricción calórica ejerce un efecto estimulador sobre la ruta autofágica, que de nuevo se ve abolido por la combinación de esta intervención con la sobreexpresión de CYB5R3 en músculo esquelético de ratones jóvenes/adultos.
8. La sobreexpresión de CYB5R3 previene la disfunción mitocondrial y la disminución de los marcadores de autofagia asociadas con el envejecimiento, mientras que parece no tener efecto frente a la disminución de la biogénesis mitocondrial y de los niveles de coenzima Q asociada a la edad.

Bibliografía

8 Bibliografía

1. Lopez-Otin, C., et al., *The hallmarks of aging*. Cell, 2013. **153**(6): p. 1194-217.
2. Strehler, B.L., *Time, cells, and aging*. 2d ed. 1977, New York: Academic Press. xiv, 456 p.
3. Barja, G., *The mitochondrial free radical theory of aging*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2014. **127**: p. 1-27.
4. Hayflick, L., *Theories of biological aging*. Exp Gerontol, 1985. **20**(3-4): p. 145-59.
5. Vina, J., C. Borras, and J. Miquel, *Theories of ageing*. IUBMB Life, 2007. **59**(4-5): p. 249-54.
6. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J Gerontol, 1956. **11**(3): p. 298-300.
7. Miquel, J., et al., *Mitochondrial role in cell aging*. Exp Gerontol, 1980. **15**(6): p. 575-91.
8. Vina, J., et al., *The free radical theory of aging revisited: the cell signaling disruption theory of aging*. Antioxid Redox Signal, 2013. **19**(8): p. 779-87.
9. Barja, G., *Updating the mitochondrial free radical theory of aging: an integrated view, key aspects, and confounding concepts*. Antioxid Redox Signal, 2013. **19**(12): p. 1420-45.
10. Pamplona, R., et al., *Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals*. J Lipid Res, 1998. **39**(10): p. 1989-94.
11. Pamplona, R., G. Barja, and M. Portero-Otin, *Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation?* Ann N Y Acad Sci, 2002. **959**: p. 475-90.
12. Hulbert, A.J., et al., *Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals*. Physiol Rev, 2007. **87**(4): p. 1175-213.
13. Hulbert, A.J., *The links between membrane composition, metabolic rate and lifespan*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2008. **150**(2): p. 196-203.
14. Pamplona, R., et al., *Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: the pigeon and human case*. Mech Ageing Dev, 1996. **86**(1): p. 53-66.
15. Kim Sh, S.H., P. Kaminker, and J. Campisi, *Telomeres, aging and cancer: in search of a happy ending*. Oncogene, 2002. **21**(4): p. 503-11.
16. Blasco, M.A., *Telomere length, stem cells and aging*. Nat Chem Biol, 2007. **3**(10): p. 640-9.
17. Lopez-Otin, C., et al., *Metabolic Control of Longevity*. Cell, 2016. **166**(4): p. 802-821.
18. McCay, C.M., M.F. Crowell, and L.A. Maynard, *The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size*. 1935. Nutrition, 1989. **5**(3): p. 155-71; discussion 172.
19. Colman, R.J., et al., *Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys*. Science, 2009. **325**(5937): p. 201-4.
20. Colman, R.J., et al., *Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3557.
21. Mattison, J.A., et al., *Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 318-21.
22. Mattison, J.A., et al., *Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14063.

Bibliografia

23. Heilbronn, L.K., et al., *Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial*. JAMA, 2006. **295**(13): p. 1539-48.
24. Racette, S.B., et al., *One year of caloric restriction in humans: feasibility and effects on body composition and abdominal adipose tissue*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2006. **61**(9): p. 943-50.
25. Das, S.K., et al., *Low or moderate dietary energy restriction for long-term weight loss: what works best?* Obesity (Silver Spring), 2009. **17**(11): p. 2019-24.
26. Das, S.K., et al., *Long-term effects of 2 energy-restricted diets differing in glycemic load on dietary adherence, body composition, and metabolism in CALERIE: a 1-y randomized controlled trial*. Am J Clin Nutr, 2007. **85**(4): p. 1023-30.
27. Ravussin, E., et al., *A 2-Year Randomized Controlled Trial of Human Caloric Restriction: Feasibility and Effects on Predictors of Health Span and Longevity*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2015. **70**(9): p. 1097-104.
28. Dorling, J.L., et al., *Effects of caloric restriction on human physiological, psychological, and behavioral outcomes: highlights from CALERIE phase 2*. Nutr Rev, 2021. **79**(1): p. 98-113.
29. Dorling, J.L., et al., *Effect of 2 years of calorie restriction on liver biomarkers: results from the CALERIE phase 2 randomized controlled trial*. Eur J Nutr, 2021. **60**(3): p. 1633-1643.
30. Ntsapi, C. and B. Loos, *Caloric restriction and the precision-control of autophagy: A strategy for delaying neurodegenerative disease progression*. Exp Gerontol, 2016. **83**: p. 97-111.
31. Hofer, S.J., et al., *The ups and downs of caloric restriction and fasting: from molecular effects to clinical application*. EMBO Mol Med, 2022. **14**(1): p. e14418.
32. Kapahi, P., et al., *With TOR, less is more: a key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging*. Cell Metab, 2010. **11**(6): p. 453-65.
33. Hwangbo, D.S., et al., *Mechanisms of Lifespan Regulation by Calorie Restriction and Intermittent Fasting in Model Organisms*. Nutrients, 2020. **12**(4).
34. Garza-Lombo, C., et al., *mTOR/AMPK signaling in the brain: Cell metabolism, proteostasis and survival*. Curr Opin Toxicol, 2018. **8**: p. 102-110.
35. Hardie, D.G., *AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(10): p. 774-85.
36. Lopez-Lluch, G. and P. Navas, *Calorie restriction as an intervention in ageing*. J Physiol, 2016. **594**(8): p. 2043-60.
37. Haigis, M.C. and D.A. Sinclair, *Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 253-95.
38. Watroba, M. and D. Szukiewicz, *Sirtuins at the Service of Healthy Longevity*. Front Physiol, 2021. **12**: p. 724506.
39. Gillespie, Z.E., J. Pickering, and C.H. Eskiw, *Better Living through Chemistry: Caloric Restriction (CR) and CR Mimetics Alter Genome Function to Promote Increased Health and Lifespan*. Front Genet, 2016. **7**: p. 142.
40. Rattan, S.I., *Hormesis in aging*. Ageing Res Rev, 2008. **7**(1): p. 63-78.
41. Gonzalez-Freire, M., et al., *The road ahead for health and lifespan interventions*. Ageing Res Rev, 2020. **59**: p. 101037.
42. de Cabo, R., et al., *CYB5R3: a key player in aerobic metabolism and aging?* Aging (Albany NY), 2009. **2**(1): p. 63-8.

Bibliografía

43. Nikiforova, A.B., N.E. Saris, and A.G. Kruglov, *External mitochondrial NADH-dependent reductase of redox cyclers: VDAC1 or Cyb5R3?* Free Radic Biol Med, 2014. **74**: p. 74-84.
44. Elahian, F., et al., *Human cytochrome b5 reductase: structure, function, and potential applications.* Crit Rev Biotechnol, 2014. **34**(2): p. 134-43.
45. Oshino, N., Y. Imai, and R. Sato, *A function of cytochrome b5 in fatty acid desaturation by rat liver microsomes.* J Biochem, 1971. **69**(1): p. 155-67.
46. Reddy, V.V., D. Kupfer, and E. Caspi, *Mechanism of C-5 double bond introduction in the biosynthesis of cholesterol by rat liver microsomes.* J Biol Chem, 1977. **252**(9): p. 2797-801.
47. Sacco, J.C. and L.A. Trepanier, *Cytochrome b5 and NADH cytochrome b5 reductase: genotype-phenotype correlations for hydroxylamine reduction.* Pharmacogenet Genomics, 2010. **20**(1): p. 26-37.
48. Navarro, F., et al., *Vitamin E and selenium deficiency induces expression of the ubiquinone-dependent antioxidant system at the plasma membrane.* FASEB J, 1998. **12**(15): p. 1665-73.
49. Shirabe, K., et al., *A novel point mutation in a 3' splice site of the NADH-cytochrome b5 reductase gene results in immunologically undetectable enzyme and impaired NADH-dependent ascorbate regeneration in cultured fibroblasts of a patient with type II hereditary methemoglobinemia.* Am J Hum Genet, 1995. **57**(2): p. 302-10.
50. Houtkooper, R.H., E. Pirinen, and J. Auwerx, *Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(4): p. 225-238.
51. Finkel, T., C.X. Deng, and R. Mostoslavsky, *Recent progress in the biology and physiology of sirtuins.* Nature, 2009. **460**(7255): p. 587-91.
52. Lin, S.J., et al., *Calorie restriction extends Saccharomyces cerevisiae lifespan by increasing respiration.* Nature, 2002. **418**(6895): p. 344-8.
53. Navas, P., J.M. Villalba, and R. de Cabo, *The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress responses.* Mitochondrion, 2007. **7 Suppl**: p. S34-40.
54. De Cabo, R., et al., *Calorie restriction attenuates age-related alterations in the plasma membrane antioxidant system in rat liver.* Exp Gerontol, 2004. **39**(3): p. 297-304.
55. Martin-Montalvo, A., et al., *Cytochrome b5 reductase and the control of lipid metabolism and healthspan.* NPJ Aging Mech Dis, 2016. **2**: p. 16006.
56. Custers, et al., *Dietary lipids from body to brain.* Prog Lipid Res, 2022. **85**: p. 101144.
57. Mansuri, M.L., et al., *Increased oxidative stress and mitochondrial impairments associated with increased expression of TNF-alpha and caspase-3 in palmitic acid-induced lipotoxicity in myoblasts.* J Biochem Mol Toxicol, 2021. **35**(5): p. e22744.
58. Henique, C., et al., *Increased mitochondrial fatty acid oxidation is sufficient to protect skeletal muscle cells from palmitate-induced apoptosis.* J Biol Chem, 2010. **285**(47): p. 36818-27.
59. Aranceta, J. and C. Perez-Rodrigo, *Recommended dietary reference intakes, nutritional goals and dietary guidelines for fat and fatty acids: a systematic review.* Br J Nutr, 2012. **107 Suppl 2**: p. S8-22.
60. Purdel, C., A. Ungurianu, and D. Margina, *Metabolic and Metabolomic Insights Regarding the Omega-3 PUFAs Intake in Type 1 Diabetes Mellitus.* Front Mol Biosci, 2021. **8**: p. 783065.
61. Calder, P.C., *N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic.* Lipids, 2003. **38**(4): p. 343-52.

Bibliografía

62. Calder, P.C., *Immunomodulation by omega-3 fatty acids*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2007. **77**(5-6): p. 327-35.
63. Calder, P.C., *Mechanisms of action of (n-3) fatty acids*. J Nutr, 2012. **142**(3): p. 592S-599S.
64. Lands, W.E., A. Morris, and B. Libelt, *Quantitative effects of dietary polyunsaturated fats on the composition of fatty acids in rat tissues*. Lipids, 1990. **25**(9): p. 505-16.
65. Lopez-Dominguez, J.A., et al., *The Influence of Dietary Fat Source on Life Span in Calorie Restricted Mice*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2015. **70**(10): p. 1181-8.
66. Chen, Y., et al., *The influence of dietary lipid composition on liver mitochondria from mice following 1 month of calorie restriction*. Biosci Rep, 2012. **33**(1): p. 83-95.
67. Chen, Y., et al., *The influence of dietary lipid composition on skeletal muscle mitochondria from mice following 1 month of calorie restriction*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2012. **67**(11): p. 1121-31.
68. Chen, Y., et al., *The influence of dietary lipid composition on skeletal muscle mitochondria from mice following eight months of calorie restriction*. Physiol Res, 2014. **63**(1): p. 57-71.
69. Lopez-Dominguez, J.A., et al., *Dietary fat modifies mitochondrial and plasma membrane apoptotic signaling in skeletal muscle of calorie-restricted mice*. Age (Dordr), 2013. **35**(6): p. 2027-44.
70. Gutierrez-Casado, E., et al., *The Impact of Aging, Calorie Restriction and Dietary Fat on Autophagy Markers and Mitochondrial Ultrastructure and Dynamics in Mouse Skeletal Muscle*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2019. **74**(6): p. 760-769.
71. Lopez-Dominguez, J.A., et al., *Dietary fat and aging modulate apoptotic signaling in liver of calorie-restricted mice*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2015. **70**(4): p. 399-409.
72. Khraiwesh, H., et al., *Mitochondrial ultrastructure and markers of dynamics in hepatocytes from aged, calorie restricted mice fed with different dietary fats*. Exp Gerontol, 2014. **56**: p. 77-88.
73. Son, J.M. and C. Lee, *Mitochondria: multifaceted regulators of aging*. BMB Rep, 2019. **52**(1): p. 13-23.
74. Taanman, J.W., *The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1410**(2): p. 103-23.
75. Filograna, R., et al., *Mitochondrial DNA copy number in human disease: the more the better?* FEBS Lett, 2021. **595**(8): p. 976-1002.
76. Casuso, R.A. and J.R. Huertas, *The emerging role of skeletal muscle mitochondrial dynamics in exercise and ageing*. Ageing Res Rev, 2020. **58**: p. 101025.
77. Glancy, B., et al., *The Functional Impact of Mitochondrial Structure Across Subcellular Scales*. Front Physiol, 2020. **11**: p. 541040.
78. Yin, M. and L.A.J. O'Neill, *The role of the electron transport chain in immunity*. FASEB J, 2021. **35**(12): p. e21974.
79. Monteiro, B.S., et al., *Mitochondrial Uncoupling Proteins (UCPs) as Key Modulators of ROS Homeostasis: A Crosstalk between Diabetes and Male Infertility?* Antioxidants (Basel), 2021. **10**(11).
80. Lenaz, G. and M.L. Genova, *Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(4): p. C1221-39.
81. Nesci, S., et al., *Molecular and Supramolecular Structure of the Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System: Implications for Pathology*. Life (Basel), 2021. **11**(3).

Bibliografía

82. Acin-Perez, R., et al., *Respiratory active mitochondrial supercomplexes*. Mol Cell, 2008. **32**(4): p. 529-39.
83. Kuhlbrandt, W., *Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes*. BMC Biol, 2015. **13**: p. 89.
84. Payne, B.A. and P.F. Chinnery, *Mitochondrial dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1847**(11): p. 1347-53.
85. Nisoli, E., et al., *Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS*. Science, 2005. **310**(5746): p. 314-7.
86. Cerqueira, F.M., F.R. Laurindo, and A.J. Kowaltowski, *Mild mitochondrial uncoupling and calorie restriction increase fasting eNOS, akt and mitochondrial biogenesis*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e18433.
87. Protasoni, M. and M. Zeviani, *Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(2).
88. Dorn, G.W., 2nd, *Evolving Concepts of Mitochondrial Dynamics*. Annu Rev Physiol, 2019. **81**: p. 1-17.
89. Zuchner, S., et al., *Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A*. Nat Genet, 2004. **36**(5): p. 449-51.
90. Elachouri, G., et al., *OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution*. Genome Res, 2011. **21**(1): p. 12-20.
91. Cogliati, S., et al., *Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency*. Cell, 2013. **155**(1): p. 160-71.
92. Frezza, C., et al., *OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion*. Cell, 2006. **126**(1): p. 177-89.
93. Navaratnarajah, T., et al., *The relevance of mitochondrial morphology for human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2021. **134**: p. 105951.
94. Kraus, F. and M.T. Ryan, *The constriction and scission machineries involved in mitochondrial fission*. J Cell Sci, 2017. **130**(18): p. 2953-2960.
95. Friedman, J.R., et al., *ER tubules mark sites of mitochondrial division*. Science, 2011. **334**(6054): p. 358-62.
96. Ihenacho, U.K., et al., *Mitochondrial Fission Protein 1: Emerging Roles in Organellar Form and Function in Health and Disease*. Front Endocrinol (Lausanne), 2021. **12**: p. 660095.
97. Chen, H., et al., *Titration of mitochondrial fusion rescues Mff-deficient cardiomyopathy*. J Cell Biol, 2015. **211**(4): p. 795-805.
98. Joseph, A.M., et al., *Dysregulation of mitochondrial quality control processes contribute to sarcopenia in a mouse model of premature aging*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e69327.
99. Marzetti, E., et al., *Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: from signaling pathways to clinical trials*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(10): p. 2288-301.
100. Li, P.A., X. Hou, and S. Hao, *Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration*. J Neurosci Res, 2017. **95**(10): p. 2025-2029.
101. Vina, J., et al., *Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(14): p. 1369-74.
102. Chodari, L., et al., *Targeting Mitochondrial Biogenesis with Polyphenol Compounds*. Oxid Med Cell Longev, 2021. **2021**: p. 4946711.
103. Aquilano, K., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha (PGC-1alpha) and sirtuin 1 (SIRT1) reside in mitochondria: possible direct function in mitochondrial biogenesis*. J Biol Chem, 2010. **285**(28): p. 21590-9.

Bibliografía

104. Devarshi, P.P., S.M. McNabney, and T.M. Henagan, *Skeletal Muscle Nucleo-Mitochondrial Crosstalk in Obesity and Type 2 Diabetes*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(4).
105. Benton, C.R., et al., *Increased levels of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha (PGC-1alpha) improve lipid utilisation, insulin signalling and glucose transport in skeletal muscle of lean and insulin-resistant obese Zucker rats*. Diabetologia, 2010. **53**(9): p. 2008-19.
106. Kang, C. and L. Li Ji, *Role of PGC-1alpha signaling in skeletal muscle health and disease*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1271**: p. 110-7.
107. Virbasius, C.A., J.V. Virbasius, and R.C. Scarpulla, *NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators*. Genes Dev, 1993. **7**(12A): p. 2431-45.
108. Virbasius, J.V., C.A. Virbasius, and R.C. Scarpulla, *Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters*. Genes Dev, 1993. **7**(3): p. 380-92.
109. Huo, L. and R.C. Scarpulla, *Mitochondrial DNA instability and peri-implantation lethality associated with targeted disruption of nuclear respiratory factor 1 in mice*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(2): p. 644-54.
110. Canto, C., et al., *AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity*. Nature, 2009. **458**(7241): p. 1056-60.
111. Russell, A.P., et al., *Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle*. Diabetes, 2003. **52**(12): p. 2874-81.
112. Civitarese, A.E., et al., *Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans*. PLoS Med, 2007. **4**(3): p. e76.
113. Puigserver, P., et al., *A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis*. Cell, 1998. **92**(6): p. 829-39.
114. Diaz-Casado, M.E., et al., *The Paradox of Coenzyme Q10 in Aging*. Nutrients, 2019. **11**(9).
115. Bentinger, M., M. Tekle, and G. Dallner, *Coenzyme Q--biosynthesis and functions*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(1): p. 74-9.
116. Echtay, K.S., et al., *Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H(+) transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1416-21.
117. Papucci, L., et al., *Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property*. J Biol Chem, 2003. **278**(30): p. 28220-8.
118. Villalba, J.M. and P. Navas, *Regulation of coenzyme Q biosynthesis pathway in eukaryotes*. Free Radic Biol Med, 2021. **165**: p. 312-323.
119. Parrado-Fernandez, C., et al., *Calorie restriction modifies ubiquinone and COQ transcript levels in mouse tissues*. Free Radic Biol Med, 2011. **50**(12): p. 1728-36.
120. Turunen, M., et al., *Regulatory aspects of coenzyme Q metabolism*. Free Radic Res, 2002. **36**(4): p. 437-43.
121. Kamzalov, S. and R.S. Sohal, *Effect of age and caloric restriction on coenzyme Q and alpha-tocopherol levels in the rat*. Exp Gerontol, 2004. **39**(8): p. 1199-205.
122. Fernandez-Del-Rio, L., et al., *Regulation of hepatic coenzyme Q biosynthesis by dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids*. Redox Biol, 2021. **46**: p. 102061.

Bibliografía

123. Parzych, K.R. and D.J. Klionsky, *An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. **20**(3): p. 460-73.
124. Bagherniya, M., et al., *The effect of fasting or calorie restriction on autophagy induction: A review of the literature*. *Ageing Res Rev*, 2018. **47**: p. 183-197.
125. Escobar, K.A., et al., *Autophagy and aging: Maintaining the proteome through exercise and caloric restriction*. *Aging Cell*, 2019. **18**(1): p. e12876.
126. Bento, C.F., et al., *Mammalian Autophagy: How Does It Work?* *Annu Rev Biochem*, 2016. **85**: p. 685-713.
127. Zhao, Y.G., P. Codogno, and H. Zhang, *Machinery, regulation and pathophysiological implications of autophagosome maturation*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021. **22**(11): p. 733-750.
128. Galluzzi, L., et al., *Metabolic control of autophagy*. *Cell*, 2014. **159**(6): p. 1263-76.
129. Hu, D., Z. Liu, and X. Qi, *Mitochondrial Quality Control Strategies: Potential Therapeutic Targets for Neurodegenerative Diseases?* *Front Neurosci*, 2021. **15**: p. 746873.
130. Li, S., et al., *The Role of Mitophagy in Regulating Cell Death*. *Oxid Med Cell Longev*, 2021. **2021**: p. 6617256.
131. Zheng, Y., X. Zhang, and Z. Chen, *[Research progress on mechanism of Nix-mediated mitophagy]*. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2017. **46**(1): p. 92-96.
132. Zhang, W., *The mitophagy receptor FUN14 domain-containing 1 (FUNDC1): A promising biomarker and potential therapeutic target of human diseases*. *Genes Dis*, 2021. **8**(5): p. 640-654.
133. Kerr, J.F., *History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept*. *Toxicology*, 2002. **181-182**: p. 471-4.
134. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br J Cancer*, 1972. **26**(4): p. 239-57.
135. Xu, X., Y. Lai, and Z.C. Hua, *Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials*. *Biosci Rep*, 2019. **39**(1).
136. Wohlgemuth, S.E., et al., *Skeletal muscle autophagy and apoptosis during aging: effects of calorie restriction and life-long exercise*. *Exp Gerontol*, 2010. **45**(2): p. 138-48.
137. Tachtsis, B., et al., *Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Mitigate Palmitate-Induced Impairments in Skeletal Muscle Cell Viability and Differentiation*. *Front Physiol*, 2020. **11**: p. 563.
138. Kaczanowski, S., *Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging*. *Phys Biol*, 2016. **13**(3): p. 031001.
139. Schwartz, L.M., *Skeletal Muscles Do Not Undergo Apoptosis During Either Atrophy or Programmed Cell Death-Revisiting the Myonuclear Domain Hypothesis*. *Front Physiol*, 2018. **9**: p. 1887.
140. Lawen, A., *Apoptosis-an introduction*. *Bioessays*, 2003. **25**(9): p. 888-96.
141. Marzetti, E., et al., *Age-related activation of mitochondrial caspase-independent apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle*. *Mech Ageing Dev*, 2008. **129**(9): p. 542-9.
142. van Loo, G., et al., *The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet*. *Cell Death Differ*, 2002. **9**(10): p. 1031-42.
143. Zermati, Y., et al., *Nonapoptotic role for Apaf-1 in the DNA damage checkpoint*. *Mol Cell*, 2007. **28**(4): p. 624-37.
144. Galluzzi, L., et al., *Non-apoptotic functions of apoptosis-regulatory proteins*. *EMBO Rep*, 2012. **13**(4): p. 322-30.

Bibliografía

145. Kim, J.S., et al., *A Novel Non-Apoptotic Role of Procaspase-3 in the Regulation of Mitochondrial Biogenesis Activators*. J Cell Biochem, 2018. **119**(1): p. 347-357.
146. Murray, T.V., et al., *A non-apoptotic role for caspase-9 in muscle differentiation*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 22): p. 3786-93.
147. Orning, P. and E. Lien, *Multiple roles of caspase-8 in cell death, inflammation, and innate immunity*. J Leukoc Biol, 2021. **109**(1): p. 121-141.
148. Maelfait, J. and R. Beyaert, *Non-apoptotic functions of caspase-8*. Biochem Pharmacol, 2008. **76**(11): p. 1365-73.
149. Gheller, B.J., et al., *Understanding Age-Related Changes in Skeletal Muscle Metabolism: Differences Between Females and Males*. Annu Rev Nutr, 2016. **36**: p. 129-56.
150. Conley, K.E., S.A. Jubrias, and P.C. Esselman, *Oxidative capacity and ageing in human muscle*. J Physiol, 2000. **526 Pt 1**: p. 203-10.
151. Ubaida-Mohien, C., et al., *Discovery proteomics in aging human skeletal muscle finds change in spliceosome, immunity, proteostasis and mitochondria*. Elife, 2019. **8**.
152. Pearen, M.A., et al., *The nuclear receptor, Nor-1, markedly increases type II oxidative muscle fibers and resistance to fatigue*. Mol Endocrinol, 2012. **26**(3): p. 372-84.
153. Lexell, J., *Human aging, muscle mass, and fiber type composition*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 1995. **50 Spec No**: p. 11-6.
154. Bleck, C.K.E., et al., *Subcellular connectomic analyses of energy networks in striated muscle*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 5111.
155. Willingham, T.B., P.T. Ajayi, and B. Glancy, *Subcellular Specialization of Mitochondrial Form and Function in Skeletal Muscle Cells*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 757305.
156. Vincent, A.E., et al., *Quantitative 3D Mapping of the Human Skeletal Muscle Mitochondrial Network*. Cell Rep, 2019. **27**(1): p. 321.
157. Nelson, D.L., M.M. Cox, and A.L. Lehninger, *Lehninger principles of biochemistry*. Seventh edition. ed. 2017, New York, NY Houndmills, Basingstoke: W.H. Freeman and Company; Macmillan Higher Education. xxxiv, 1172, AS34, G20, I45 pages.
158. Finley, L.W., et al., *Skeletal muscle transcriptional coactivator PGC-1alpha mediates mitochondrial, but not metabolic, changes during calorie restriction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(8): p. 2931-6.
159. Boengler, K., et al., *Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue*. Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle, 2017. **8**(3): p. 349-369.
160. Rosenberg, I.H., *Sarcopenia: Origins and clinical relevance*. Journal of Nutrition, 1997. **127**: p. S990-S991.
161. Shi, Y., et al., *Sarcopenia and perioperative management of elderly surgical patients*. Front Biosci (Landmark Ed), 2021. **26**(10): p. 882-894.
162. Cruz-Jentoft, A.J., et al., *Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People*. Age Ageing, 2010. **39**(4): p. 412-23.
163. Cruz-Jentoft, A.J., et al., *Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis*. Age Ageing, 2019. **48**(1): p. 16-31.
164. Hepple, R.T., *Mitochondrial involvement and impact in aging skeletal muscle*. Front Aging Neurosci, 2014. **6**: p. 211.
165. Petersen, K.F., et al., *Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance*. Science, 2003. **300**(5622): p. 1140-2.

Bibliografía

166. Short, K.R., et al., *Age and aerobic exercise training effects on whole body and muscle protein metabolism*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **286**(1): p. E92-101.
167. Belcourt, M.F., et al., *The intracellular location of NADH:cytochrome b5 reductase modulates the cytotoxicity of the mitomycins to Chinese hamster ovary cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(15): p. 8875-81.
168. Rodríguez-López, S., *Mechanisms of longevity extension and healthy aging by over-expression of cytochrome b5 reductase 3*. Doctoral Thesis. University of Cordoba, 2021.
169. Wadman, I.A., et al., *The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins*. EMBO J, 1997. **16**(11): p. 3145-57.
170. Stoscheck, C.M., *Quantitation of protein*. Methods Enzymol, 1990. **182**: p. 50-68.
171. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
172. Weibel, E.R., *Stereological methods*. 1979, London ; New York: Academic Press.
173. Grünewald, A., et al., *Quantitative quadruple-label immunofluorescence of mitochondrial and cytoplasmic proteins in single neurons from human midbrain tissue*. J Neurosci Methods, 2014. **232**(100): p. 143-9.
174. Li, H., et al., *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. Cell, 1998. **94**(4): p. 491-501.
175. Marzetti, E., et al., *Multiple pathways to the same end: mechanisms of myonuclear apoptosis in sarcopenia of aging*. ScientificWorldJournal, 2010. **10**: p. 340-9.
176. Selman, C., et al., *Short-term caloric restriction and regulatory proteins of apoptosis in heart, skeletal muscle and kidney of Fischer 344 rats*. Biogerontology, 2003. **4**(3): p. 141-7.
177. Joza, N., et al., *AIF: not just an apoptosis-inducing factor*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1171**: p. 2-11.
178. Akbari, M., T.B.L. Kirkwood, and V.A. Bohr, *Mitochondria in the signaling pathways that control longevity and health span*. Ageing Res Rev, 2019. **54**: p. 100940.
179. Giacomello, E. and L. Toniolo, *The Potential of Calorie Restriction and Calorie Restriction Mimetics in Delaying Aging: Focus on Experimental Models*. Nutrients, 2021. **13**(7).
180. Sohal, R.S. and R. Weindruch, *Oxidative stress, caloric restriction, and aging*. Science, 1996. **273**(5271): p. 59-63.
181. Lopez-Lluch, G., et al., *Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(6): p. 1768-73.
182. Yu, B.P., *Membrane alteration as a basis of aging and the protective effects of calorie restriction*. Mech Ageing Dev, 2005. **126**(9): p. 1003-10.
183. Forbes, S.C., J.P. Little, and D.G. Candow, *Exercise and nutritional interventions for improving aging muscle health*. Endocrine, 2012. **42**(1): p. 29-38.
184. Villalba, J.M., et al., *The influence of dietary fat source on liver and skeletal muscle mitochondrial modifications and lifespan changes in calorie-restricted mice*. Biogerontology, 2015. **16**(5): p. 655-70.
185. Lass, A., et al., *Caloric restriction prevents age-associated accrual of oxidative damage to mouse skeletal muscle mitochondria*. Free Radic Biol Med, 1998. **25**(9): p. 1089-97.
186. Calvo-Rubio Barrera, M., *Hallmarks of aging in kidney from mice submitted to genetic and nutritional intervention*. Doctoral Thesis. University of Cordoba., 2019.

Bibliografía

187. Lee, J.H., J.H. Jeon, and M.J. Lee, *Docosahexaenoic Acid, a Potential Treatment for Sarcopenia, Modulates the Ubiquitin-Proteasome and the Autophagy-Lysosome Systems*. *Nutrients*, 2020. **12**(9).
188. Flachs, P., et al., *Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat*. *Diabetologia*, 2005. **48**(11): p. 2365-75.
189. Rossignoli, C.P., et al., *Effects of intermittent dietary supplementation with conjugated linoleic acid and fish oil (EPA/DHA) on body metabolism and mitochondrial energetics in mice*. *J Nutr Biochem*, 2018. **60**: p. 16-23.
190. Aoun, M., et al., *Rat liver mitochondrial membrane characteristics and mitochondrial functions are more profoundly altered by dietary lipid quantity than by dietary lipid quality: effect of different nutritional lipid patterns*. *Br J Nutr*, 2012. **107**(5): p. 647-59.
191. Kucharska, J., et al., *Treatment with coenzyme Q10, omega-3-polyunsaturated fatty acids and their combination improved bioenergetics and levels of coenzyme Q9 and Q10 in skeletal muscle mitochondria in experimental model of arthritis*. *Physiol Res*, 2021. **70**(5): p. 723-733.
192. Lalia, A.Z., et al., *Influence of omega-3 fatty acids on skeletal muscle protein metabolism and mitochondrial bioenergetics in older adults*. *Aging (Albany NY)*, 2017. **9**(4): p. 1096-1129.
193. Vors, C., et al., *Inflammatory gene expression in whole blood cells after EPA vs. DHA supplementation: Results from the ComparED study*. *Atherosclerosis*, 2017. **257**: p. 116-122.
194. Yang, B., et al., *Lowering effects of fish oil supplementation on proinflammatory markers in hypertension: results from a randomized controlled trial*. *Food Funct*, 2020. **11**(2): p. 1779-1789.
195. Liao, J., et al., *The Effects of Fish Oil on Cardiovascular Diseases: Systematical Evaluation and Recent Advance*. *Front Cardiovasc Med*, 2021. **8**: p. 802306.
196. Morales, P.E., et al., *Skeletal muscle type-specific mitochondrial adaptation to high-fat diet relies on differential autophagy modulation*. *FASEB J*, 2021. **35**(10): p. e21933.
197. Sadeghi, A., et al., *Interplay between oxidative stress and autophagy function and its role in inflammatory cytokine expression induced by palmitate in skeletal muscle cells*. *Cytokine*, 2020. **125**: p. 154835.
198. Mir, S.U., et al., *Inhibition of autophagic turnover in beta-cells by fatty acids and glucose leads to apoptotic cell death*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(10): p. 6071-85.
199. RostamiRad, A., et al., *Palmitate-induced impairment of autophagy turnover leads to increased apoptosis and inflammation in peripheral blood mononuclear cells*. *Immunobiology*, 2018. **223**(3): p. 269-278.
200. Yang, B., et al., *omega-6 Polyunsaturated fatty acids (linoleic acid) activate both autophagy and antioxidation in a synergistic feedback loop via TOR-dependent and TOR-independent signaling pathways*. *Cell Death Dis*, 2020. **11**(7): p. 607.
201. Shimabukuro, M., et al., *Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(5): p. 2498-502.
202. Hickson-Bick, D.L., L.M. Buja, and J.B. McMillin, *Palmitate-mediated alterations in the fatty acid metabolism of rat neonatal cardiac myocytes*. *J Mol Cell Cardiol*, 2000. **32**(3): p. 511-9.
203. Wei, Y., et al., *Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006. **291**(2): p. E275-81.

Bibliografía

204. Turpin, S.M., et al., *Apoptosis in skeletal muscle myotubes is induced by ceramides and is positively related to insulin resistance*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **291**(6): p. E1341-50.
205. Saini, A., et al., *Omega-3 fatty acid EPA improves regenerative capacity of mouse skeletal muscle cells exposed to saturated fat and inflammation*. Biogerontology, 2017. **18**(1): p. 109-129.
206. Maiuri, M.C., et al., *Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 741-52.
207. Siendones, E., et al., *Membrane-bound CYB5R3 is a common effector of nutritional and oxidative stress response through FOXO3a and Nrf2*. Antioxid Redox Signal, 2014. **21**(12): p. 1708-25.
208. Lopez-Lluch, G., et al., *Mouse liver plasma membrane redox system activity is altered by aging and modulated by calorie restriction*. Age (Dordr), 2005. **27**(2): p. 153-60.
209. Guarente, L., *Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins?* Cell, 2008. **132**(2): p. 171-6.
210. Martin-Montalvo, A., et al., *Metformin improves healthspan and lifespan in mice*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2192.
211. Kunau, W.H., V. Dommes, and H. Schulz, *beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress*. Prog Lipid Res, 1995. **34**(4): p. 267-342.
212. Jove, M., et al., *Caloric restriction reveals a metabolomic and lipidomic signature in liver of male mice*. Aging Cell, 2014. **13**(5): p. 828-37.
213. Laganier, S. and B.P. Yu, *Effect of chronic food restriction in aging rats. II. Liver cytosolic antioxidants and related enzymes*. Mech Ageing Dev, 1989. **48**(3): p. 221-30.
214. Laganier, S. and B.P. Yu, *Modulation of membrane phospholipid fatty acid composition by age and food restriction*. Gerontology, 1993. **39**(1): p. 7-18.
215. Hagopian, K., et al., *Complex I-associated hydrogen peroxide production is decreased and electron transport chain enzyme activities are altered in n-3 enriched fat-1 mice*. PLoS One, 2010. **5**(9): p. e12696.
216. Rodriguez-Lopez, S., et al., *Mitochondrial adaptations in liver and skeletal muscle to pro-longevity nutritional and genetic interventions: the crosstalk between calorie restriction and CYB5R3 overexpression in transgenic mice*. Geroscience, 2020. **42**(3): p. 977-994.
217. Jakobs, H.H., et al., *The N-reductive system composed of mitochondrial amidoxime reducing component (mARC), cytochrome b5 (CYB5B) and cytochrome b5 reductase (CYB5R) is regulated by fasting and high fat diet in mice*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e105371.
218. Hyun, D.H., et al., *Calorie restriction up-regulates the plasma membrane redox system in brain cells and suppresses oxidative stress during aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(52): p. 19908-12.
219. Chen, C.N., et al., *Age-dependent effects of caloric restriction on mTOR and ubiquitin-proteasome pathways in skeletal muscles*. Geroscience, 2019. **41**(6): p. 871-880.
220. Mitchell, S.J., et al., *Effects of Sex, Strain, and Energy Intake on Hallmarks of Aging in Mice*. Cell Metab, 2016. **23**(6): p. 1093-1112.
221. Tilokani, L., et al., *Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms*. Essays Biochem, 2018. **62**(3): p. 341-360.

Bibliografía

222. Khraiwesh, H., et al., *Alterations of ultrastructural and fission/fusion markers in hepatocyte mitochondria from mice following calorie restriction with different dietary fats*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2013. **68**(9): p. 1023-34.
223. Cartee, G.D., et al., *Exercise Promotes Healthy Aging of Skeletal Muscle*. Cell Metab, 2016. **23**(6): p. 1034-1047.
224. Picca, A., et al., *Aging and calorie restriction oppositely affect mitochondrial biogenesis through TFAM binding at both origins of mitochondrial DNA replication in rat liver*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e74644.
225. Kong, X., et al., *Sirtuin 3, a new target of PGC-1alpha, plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11707.
226. Imai, S. and L. Guarente, *Ten years of NAD-dependent SIR2 family deacetylases: implications for metabolic diseases*. Trends Pharmacol Sci, 2010. **31**(5): p. 212-20.
227. Palacios, O.M., et al., *Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1alpha in skeletal muscle*. Aging (Albany NY), 2009. **1**(9): p. 771-83.
228. Qiu, X., et al., *Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation*. Cell Metab, 2010. **12**(6): p. 662-7.
229. Chen, Y., et al., *Tumour suppressor SIRT3 deacetylates and activates manganese superoxide dismutase to scavenge ROS*. EMBO Rep, 2011. **12**(6): p. 534-41.
230. van de Ven, R.A.H., D. Santos, and M.C. Haigis, *Mitochondrial Sirtuins and Molecular Mechanisms of Aging*. Trends Mol Med, 2017. **23**(4): p. 320-331.
231. Yun, J. and T. Finkel, *Mitohormesis*. Cell Metab, 2014. **19**(5): p. 757-66.
232. Bentinger, M., K. Brismar, and G. Dallner, *The antioxidant role of coenzyme Q*. Mitochondrion, 2007. **7 Suppl**: p. S41-50.
233. Gonzalez-Mariscal, I., et al., *The mitochondrial phosphatase PPTC7 orchestrates mitochondrial metabolism regulating coenzyme Q10 biosynthesis*. Biochim Biophys Acta Bioenerg, 2018. **1859**(11): p. 1235-1248.
234. Masiero, E., et al., *Autophagy is required to maintain muscle mass*. Cell Metab, 2009. **10**(6): p. 507-15.
235. Jiao, J. and F. Demontis, *Skeletal muscle autophagy and its role in sarcopenia and organismal aging*. Curr Opin Pharmacol, 2017. **34**: p. 1-6.
236. Rubinsztein, D.C., G. Marino, and G. Kroemer, *Autophagy and aging*. Cell, 2011. **146**(5): p. 682-95.
237. Yang, L., et al., *Long-Term Calorie Restriction Enhances Cellular Quality-Control Processes in Human Skeletal Muscle*. Cell Rep, 2016. **14**(3): p. 422-428.
238. Mercken, E.M., et al., *Calorie restriction in humans inhibits the PI3K/AKT pathway and induces a younger transcription profile*. Aging Cell, 2013. **12**(4): p. 645-51.
239. Drake, J.C., R.J. Wilson, and Z. Yan, *Molecular mechanisms for mitochondrial adaptation to exercise training in skeletal muscle*. FASEB J, 2016. **30**(1): p. 13-22.
240. Twig, G., B. Hyde, and O.S. Shirihai, *Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1777**(9): p. 1092-7.
241. Zhang, Y., E. Chong, and B. Herman, *Age-associated increases in the activity of multiple caspases in Fisher 344 rat organs*. Exp Gerontol, 2002. **37**(6): p. 777-89.
242. Phillips, T. and C. Leeuwenburgh, *Muscle fiber specific apoptosis and TNF-alpha signaling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction*. FASEB J, 2005. **19**(6): p. 668-70.

Bibliografía

243. Marzetti, E., et al., *Modulation of age-induced apoptotic signaling and cellular remodeling by exercise and calorie restriction in skeletal muscle*. Free Radic Biol Med, 2008. **44**(2): p. 160-8.
244. Jeong, S.Y. and D.W. Seol, *The role of mitochondria in apoptosis*. BMB Rep, 2008. **41**(1): p. 11-22.
245. Daugas, E., et al., *Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis*. FEBS Lett, 2000. **476**(3): p. 118-23.
246. Rice, K.M. and E.R. Blough, *Sarcopenia-related apoptosis is regulated differently in fast- and slow-twitch muscles of the aging F344/N x BN rat model*. Mech Ageing Dev, 2006. **127**(8): p. 670-9.
247. Besse, B., et al., *Nuclear localization of apoptosis protease activating factor-1 predicts survival after tumor resection in early-stage non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(17): p. 5665-9.
248. Wai, T. and T. Langer, *Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation*. Trends Endocrinol Metab, 2016. **27**(2): p. 105-117.
249. Lass, A., L. Kwong, and R.S. Sohal, *Mitochondrial coenzyme Q content and aging*. BioFactors, 1999. **9**(2-4): p. 199-205.
250. Leduc-Gaudet, J.P., et al., *Mitochondrial morphology is altered in atrophied skeletal muscle of aged mice*. Oncotarget, 2015. **6**(20): p. 17923-17937.
251. Faitg, J., et al., *Effects of Aging and Caloric Restriction on Fiber Type Composition, Mitochondrial Morphology and Dynamics in Rat Oxidative and Glycolytic Muscles*. Frontiers in physiology, 2019. **10**: p. 420-420.
252. Oltvai, Z.N., C.L. Milliman, and S.J. Korsmeyer, *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death*. Cell, 1993. **74**(4): p. 609-19.
253. Motyl, T., *Regulation of apoptosis: involvement of Bcl-2-related proteins*. Reprod Nutr Dev, 1999. **39**(1): p. 49-59.
254. Jiménez-Hidalgo, M., et al., *NQR1 controls lifespan by regulating the promotion of respiratory metabolism in yeast*. Aging Cell, 2009. **8**(2): p. 140-51.
255. Ungvari, Z., et al., *Age-associated vascular oxidative stress, Nrf2 dysfunction, and NF- κ B activation in the nonhuman primate Macaca mulatta*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2011. **66**(8): p. 866-75.
256. Diaz-Ruiz, A., et al., *Overexpression of CYB5R3 and NQO1, two NAD(+) -producing enzymes, mimics aspects of caloric restriction*. Aging Cell, 2018. **17**(4): p. e12767.
257. Ramsey, J.J., M.E. Harper, and R. Weindruch, *Restriction of energy intake, energy expenditure, and aging*. Free Radical Biology and Medicine, 2000. **29**(10): p. 946-968.
258. Martin-Montalvo, A. and R. de Cabo, *Mitochondrial metabolic reprogramming induced by calorie restriction*. Antioxid Redox Signal, 2013. **19**(3): p. 310-20.
259. Mercken, E.M., et al., *Conserved and species-specific molecular denominators in mammalian skeletal muscle aging*. NPJ Aging Mech Dis, 2017. **3**: p. 8.
260. Crane, J.D., et al., *The effect of aging on human skeletal muscle mitochondrial and intramyocellular lipid ultrastructure*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2010. **65**(2): p. 119-28.
261. Stein, C.S., et al., *Mitoregulin: A lncRNA-Encoded Microprotein that Supports Mitochondrial Supercomplexes and Respiratory Efficiency*. Cell Reports, 2018. **23**(13): p. 3710-3720.e8.
262. Chugunova, A., et al., *LINC00116 codes for a mitochondrial peptide linking respiration and lipid metabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(11): p. 4940-4945.

Bibliografía

263. Picca, A., et al., *Mitochondrial Dysfunction and Aging: Insights from the Analysis of Extracellular Vesicles*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(4).
264. Pugh, T.D., et al., *A shift in energy metabolism anticipates the onset of sarcopenia in rhesus monkeys*. Aging Cell, 2013. **12**(4): p. 672-81.
265. Hood, D.A., et al., *Maintenance of Skeletal Muscle Mitochondria in Health, Exercise, and Aging*. Annu Rev Physiol, 2019. **81**: p. 19-41.
266. Barbieri, E., et al., *The pleiotropic effect of physical exercise on mitochondrial dynamics in aging skeletal muscle*. Oxid Med Cell Longev, 2015. **2015**: p. 917085.
267. Sebastian, D., et al., *Mfn2 deficiency links age-related sarcopenia and impaired autophagy to activation of an adaptive mitophagy pathway*. EMBO J, 2016. **35**(15): p. 1677-93.
268. Tezze, C., et al., *Age-Associated Loss of OPA1 in Muscle Impacts Muscle Mass, Metabolic Homeostasis, Systemic Inflammation, and Epithelial Senescence*. Cell Metab, 2017. **25**(6): p. 1374-1389.e6.
269. Distefano, G., et al., *Chronological Age Does not Influence Ex-vivo Mitochondrial Respiration and Quality Control in Skeletal Muscle*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2017. **72**(4): p. 535-542.
270. Joseph, A.M., et al., *The impact of aging on mitochondrial function and biogenesis pathways in skeletal muscle of sedentary high- and low-functioning elderly individuals*. Aging Cell, 2012. **11**(5): p. 801-9.
271. Konopka, A.R., et al., *Markers of human skeletal muscle mitochondrial biogenesis and quality control: effects of age and aerobic exercise training*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2014. **69**(4): p. 371-8.
272. Wyckelsma, V.L., et al., *Preservation of skeletal muscle mitochondrial content in older adults: relationship between mitochondria, fibre type and high-intensity exercise training*. J Physiol, 2017. **595**(11): p. 3345-3359.
273. Peterson, C.M., D.L. Johannsen, and E. Ravussin, *Skeletal Muscle Mitochondria and Aging: A Review*. Journal of Aging Research, 2012. **2012**: p. 194821.
274. Picard, M., et al., *Alterations in intrinsic mitochondrial function with aging are fiber type-specific and do not explain differential atrophy between muscles*. Aging Cell, 2011. **10**(6): p. 1047-55.
275. Glancy, B., et al., *Mitochondrial reticulum for cellular energy distribution in muscle*. Nature, 2015. **523**(7562): p. 617-20.
276. Klionsky, D.J., et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)(1)*. Autophagy, 2021. **17**(1): p. 1-382.
277. Terman, A. and U.T. Brunk, *Myocyte aging and mitochondrial turnover*. Exp Gerontol, 2004. **39**(5): p. 701-5.
278. Terman, A., et al., *Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging*. Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(4): p. 503-35.
279. Combaret, L., et al., *Skeletal muscle proteolysis in aging*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2009. **12**(1): p. 37-41.
280. Salvioli, S., et al., *Inflamm-aging, cytokines and aging: state of the art, new hypotheses on the role of mitochondria and new perspectives from systems biology*. Curr Pharm Des, 2006. **12**(24): p. 3161-71.
281. Remels, A.H., et al., *TNF-alpha impairs regulation of muscle oxidative phenotype: implications for cachexia?* FASEB J, 2010. **24**(12): p. 5052-62.

Bibliografía

282. Moreno-Ulloa, A., et al., *Recovery of Indicators of Mitochondrial Biogenesis, Oxidative Stress, and Aging With (-)-Epicatechin in Senile Mice*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2015. **70**(11): p. 1370-8.
283. Lanza, I.R., et al., *Endurance exercise as a countermeasure for aging*. Diabetes, 2008. **57**(11): p. 2933-42.
284. Rodríguez-Bies, E., P. Navas, and G. López-Lluch, *Age-dependent effect of every-other-day feeding and aerobic exercise in ubiquinone levels and related antioxidant activities in mice muscle*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2015. **70**(1): p. 33-43.
285. Sakamuri, S., et al., *Measurement of respiratory function in isolated cardiac mitochondria using Seahorse XFe24 Analyzer: applications for aging research*. Geroscience, 2018. **40**(3): p. 347-356.
286. Wang, Y., et al., *Pathogenicity of two COQ7 mutations and responses to 2,4-dihydroxybenzoate bypass treatment*. J Cell Mol Med, 2017. **21**(10): p. 2329-2343.
287. Lakowski, B. and S. Hekimi, *Determination of life-span in Caenorhabditis elegans by four clock genes*. Science, 1996. **272**(5264): p. 1010-3.
288. Lapointe, J. and S. Hekimi, *Early mitochondrial dysfunction in long-lived Mclk1 +/- mice*. J Biol Chem, 2008. **283**(38): p. 26217-27.
289. Buonocore, D., et al., *Oxidative system in aged skeletal muscle*. Muscles Ligaments Tendons J, 2011. **1**(3): p. 85-90.
290. Lavrik, I., A. Golks, and P.H. Krammer, *Death receptor signaling*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 2): p. 265-7.
291. Ghavami, S., et al., *Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders*. Prog Neurobiol, 2014. **112**: p. 24-49.
292. Hroudova, J., N. Singh, and Z. Fisar, *Mitochondrial dysfunctions in neurodegenerative diseases: relevance to Alzheimer's disease*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 175062.
293. Nixon, R.A. and D.S. Yang, *Autophagy and neuronal cell death in neurological disorders*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(10).
294. Salucci, S., et al., *The peculiar apoptotic behavior of skeletal muscle cells*. Histol Histopathol, 2013. **28**(8): p. 1073-87.
295. Luo, L., et al., *Chronic resistance training activates autophagy and reduces apoptosis of muscle cells by modulating IGF-1 and its receptors, Akt/mTOR and Akt/FOXO3a signaling in aged rats*. Exp Gerontol, 2013. **48**(4): p. 427-36.
296. Leeuwenburgh, C., et al., *Age-related differences in apoptosis with disuse atrophy in soleus muscle*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **288**(5): p. R1288-96.
297. Zhang, Y., et al., *Altered mitochondrial morphology and defective protein import reveal novel roles for Bax and/or Bak in skeletal muscle*. Am J Physiol Cell Physiol, 2013. **305**(5): p. C502-11.
298. MacKenzie, J.A. and R.M. Payne, *Mitochondrial protein import and human health and disease*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(5): p. 509-23.
299. Eldeeb, M.A., M.A. Ragheb, and M. Esmaili, *How does protein degradation regulate TOM machinery-dependent mitochondrial import?* Curr Genet, 2020. **66**(3): p. 501-505.
300. Ornatsky, O.I., M.K. Connor, and D.A. Hood, *Expression of stress proteins and mitochondrial chaperonins in chronically stimulated skeletal muscle*. Biochem J, 1995. **311** (Pt 1): p. 119-23.
301. Takahashi, M., et al., *Contractile activity-induced adaptations in the mitochondrial protein import system*. Am J Physiol, 1998. **274**(5): p. C1380-7.
302. Mattson, J.P., et al., *Induction of mitochondrial stress proteins following treadmill running*. Med Sci Sports Exerc, 2000. **32**(2): p. 365-9.

Anexo: Artículo publicado



Mitochondrial adaptations in liver and skeletal muscle to pro-longevity nutritional and genetic interventions: the crosstalk between calorie restriction and CYB5R3 overexpression in transgenic mice

Sandra Rodríguez-López · Sara López-Bellón · José A. González-Reyes · M. Isabel Burón · Rafael de Cabo · José M. Villalba

Received: 10 March 2020 / Accepted: 1 April 2020
© American Aging Association 2020

Abstract Calorie restriction without malnutrition (CR) is considered as the most effective nongenetic nor pharmacological intervention that promotes healthy aging phenotypes and can extend lifespan in most model organisms. Lifelong CR leads to an increase of cytochrome *b*₅ reductase-3 (CYB5R3) expression and activity. Overexpression of CYB5R3 confers some of the salutary effects of CR, although the mechanisms involved might be independent because key aspects of energy metabolism and lipid profiles of tissues go in opposite ways. It is thus important to study if some of the metabolic adaptations induced by CR are affected by CYB5R3 overexpression. CYB5R3 overexpression greatly preserved body and liver weight in mice under CR conditions. In liver, CR did not modify mitochondrial abundance, but lead to increased expression of mitofusin Mfn2 and TFAM, a transcription factor

involved in mitochondrial biogenesis. These changes were prevented by CYB5R3 overexpression but resulted in a decreased expression of a different mitochondrial biogenesis-related transcription factor, Nrf1. In skeletal muscle, CR strongly increased mitochondrial mass, mitofusin Mfn1, and Nrf1. However, CYB5R3 mice on CR did not show increase in muscle mitochondrial mass, regardless of a clear increase in expression of TFAM and mitochondrial complexes in this tissue. Our results support that CYB5R3 overexpression significantly modifies the metabolic adaptations of mice to CR.

Keywords Calorie restriction · Cytochrome *b*₅ reductase · Liver · Mitochondria · Skeletal muscle

Sandra Rodríguez-López and Sara López-Bellón contributed equally to this work.

S. Rodríguez-López · S. López-Bellón · J. A. González-Reyes · M. I. Burón · J. M. Villalba (✉)
Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología,
Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario, ceiA3,
Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Severo
Ochoa, 3ª planta, 14014 Córdoba, Spain

e-mail: jmvillalba@uco.es

R. de Cabo
Translational Gerontology Branch, National Institute on Aging,
National Institutes of Health, Baltimore, MD, USA

Introduction

Aging can be defined as the time-dependent progressive functional decline with decreased fertility and increased susceptibility of the organism to endogenous and external threats. Aging is the greater risk factor for all chronic diseases including metabolic, degenerative and neoplastic disorders (Harman 1956). The free radical theory of aging, despite some drawbacks and criticisms (Liochev 2015), is still one of the most accepted theories enunciated to explain the causes of aging (Barja 2013; Barja 2014). This theory is based on the overproduction of several oxidant species—mainly of mitochondrial origin—with advancing age as the main causative factor of aging, which may be also concomitant with a decrease of antioxidant protective mechanisms (Harman 1956). Indeed, mitochondrial dysfunction has been increasingly identified as a causative factor in many aging-related diseases (Sure et al. 2018). Since the preservation of mitochondrial function is a viable strategy to counteract some of the deleterious manifestations of aging (Csiszar et al. 2019), understanding the alterations of mitochondrial metabolism with aging is of utmost importance (Sakamuri et al. 2018).

Several interventions have been reported to delay aging and to provide protection against aging-related diseases. Among them, calorie restriction without malnutrition (CR) has revealed as the most effective nongenetic intervention that preserves health and extends lifespan in many model organisms (Sohal and Weindruch 1996). There is a strong interest in elucidating how CR produces its antiaging effects, not only to get basic knowledge about the molecular mechanisms involved, but also because this research could give us novel clues on the identification of targets susceptible of intervention. As a general agreement, it has been established that optimization of mitochondrial function plays a key mechanistic role in the prolongevity action of CR (Lopez-Lluch et al. 2006). In accordance, our recent comparative study aimed to elucidate the role of sex, strain and energy intake on hallmarks of aging in mice has shown that the maintenance of mitochondrial function is indeed one of the major predictors of longevity extension in mice fed a CR diet age. Interestingly, the two other main predictors of longevity extension highlighted in our previous study were the maintenance of NAD⁺ levels and the preservation of an optimal amount of fat mass with age (Mitchell et al. 2016).

NADH-cytochrome *b*₅ reductases (EC 1.6.2.2) constitute a family of flavoproteins encoded by 4 different genes in mammals, designed as CYB5R1–4, which catalyse one electron transfer from NADH (which is thus oxidized to NAD⁺) not only to cytochrome *b*₅ but also to a variety of alternative acceptors including coenzyme Q and other redox cyclers (de Cabo et al. 2009). Recently, a great interest has been paid to CYB5R3 in the fields of metabolism and aging research (de Cabo et al. 2009; Diaz-Ruiz et al. 2018; Martin-Montalvo et al. 2016). Two CYB5R3 isoforms can be generated by alternative splicing. A soluble cytosolic isoform, known as methaemoglobin reductase, is expressed exclusively in the erythroid lineage, whereas a membrane-bound isoform expressed in many cell types is attached to the cytosolic side of the mitochondrial outer membrane, the endoplasmic reticulum and the plasma membrane and participates in many physiological processes including elongation and desaturation of fatty acids (Oshino et al. 1971), cholesterol biosynthesis (Reddy et al. 1977) and drug metabolism (Jansson and Schenkman 1973; Sacco and Trepanier 2010). A transplasma membrane redox system which relies on membrane-bound CYB5R3 and coenzyme Q protects cells against oxidants (Navas et al. 2007) and is upregulated by CR, thus potentiating resilience of cells against oxidative damage (De Cabo et al. 2004; Lopez-Lluch et al. 2005; Navas et al. 2007).

To gain new insights into the physiological role this enzyme plays in metabolism and aging, we generated transgenic *Drosophila melanogaster* flies overexpressing CYB5R and transgenic mice overexpressing CYB5R3 (Tg mice) and, interestingly, both experimental models were found to live longer than their wild-type (WT) counterparts (Martin-Montalvo et al. 2016). Tg mice exhibited increased insulin sensitivity and improved regulation of glucose homeostasis both when fed standard and high-fat diets. Conversely, mice with a β -cell-specific deletion of CYB5R3 had impaired insulin secretion, resulting in glucose intolerance and diet-induced hyperglycaemia. Moreover, respiratory response to glucose was blunted in CYB5R3-deficient cells, which also displayed impaired NAD⁺ homeostasis and extensive mitochondrial abnormalities (Fan et al. 2020). On the other hand, Tg mice overexpressing CYB5R3 showed less inflammation and decreased oxidative damage, and were protected against induced cancer, which resembled the healthy effect of CR. However, Tg mice were fatter but not heavier than WT

controls when fed a standard diet ad libitum and preferentially used carbohydrate to meet their energy needs, which differs from other anti-aging interventions as CR or metformin supplementation, where increased longevity required the use of fat as a source of fuel (Guarente 2008; Martin-Montalvo et al. 2013). Thus, CYB5R3 overexpression could contribute to extend lifespan in mice by mechanisms that may be distinct from those described for CR. Further studies aimed at gain knowledge on mitochondrial modifications in tissues from mice overexpressing CYB5R3 are lacked. Furthermore, the existence of a putative crosstalk between CR and CYB5R3 overexpression has not been explored.

The aim of this research was to study the impact of CR on key markers related to mitochondrial function in Tg mice in comparison with their WT littermates. We extended our studies to both liver and skeletal muscle because these tissues are major contributors to whole animal energy expenditure, and they represent mitotic (liver) (Spindler and Dhahbi 2007) and postmitotic (skeletal muscle) tissue models (Ramsey et al. 2000). Our results support that metabolic adaptations of mice fed under CR can be altered by CYB5R3 overexpression.

Materials and methods

Animals and diets

Tg mice were generated as previously reported (Martin-Montalvo et al. 2016). Briefly, the rat CYB5R3 gene was cloned into the pRC/CMV-rDTD plasmid (Belcourt et al. 1998). The transgene insert was cleaved from the DNA cloning vector by digestion with SmaI and NruI restriction enzymes and the purified transgene (under the control of the human cytomegalovirus immediate-early promoter and the SV40 poly-adenylation sequences) was then microinjected into fertilized C57BL/6J eggs at the University of Michigan Transgenic Animal Model Core Facility (<http://www.med.umich.edu/tamc/>). Surviving eggs were transferred to pseudopregnant B6D2F1 female mice. Stable incorporation of the construct into the genome was validated as described in our previous report (Martin-Montalvo et al. 2016). Tg males were crossed with WT females of the C57BL/6J background obtained from Charles River (Barcelona, Spain) to establish a colony that was

maintained under barrier conditions at the Service of Experimentation Animals (SAEX) of the University of Córdoba. Tg and WT mice were distinguished by PCR genotyping with DNA obtained from tail tissue using the primers CACCAAAATCAACGGGACTT (forward) and AGACCGGGGAGAGTACCACT (reverse) to reveal the presence of the transgene. As internal control, we used amplification of the IL2 gene with the primers CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT (forward) and GTAGGTGGAAATTC TAGCATCATCC (reverse).

Experimental groups were established with males of the two genotypes (WT and Tg in C57BL/6J background). The animals were maintained from weaning on 12-h light/dark cycle at 22 °C with a free access to water and a standard chow until they reached an age of 3 months. Then, they were switched to a purified AIN93M diet and separated into the two dietary groups: ad libitum (AL) and calorie restriction (CR) with a 40% reduction of the ad libitum intake. Mice were fed with experimental diets for 4 months and then sacrificed by cervical dislocation. Muscle from hind limb and liver were rapidly excised and frozen by immersion in liquid nitrogen in a buffered medium containing 10% DMSO as cryoprotectant and then stored at −80 °C. Procedures with experimentation animals were approved by the bioethics committee of the University of Córdoba and authorized by the *Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Junta de Andalucía* (authorization code: 20/04/2016/053).

Preparation of tissue extracts

Muscle and liver tissues were trimmed and homogenized in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer, which contains 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1 mM DTT, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 10 µg/mL each of chymostatin, leupeptin, antipain, and pepstatin A (CLAP) and phosphatase inhibitor cocktails 2 and 3 (Sigma-Aldrich) diluted at 1:100. Tissues were homogenized using a mechanical tissue disrupter (Ultra-Turrax T25, IKA, Staufen, Germany) for 30 s. Homogenates were centrifuged at 10,000g for 15 min at 4 °C to separate supernatants containing the protein extracts, which were transferred to new tubes and stored frozen at −80 °C until use. Total amount of protein in the extracts was estimated by using the Stoscheck modification

(Stoscheck 1990) of the dye-binding method of Bradford (Bradford 1976).

Electrophoresis and Western blot immunodetection

Polyacrylamide gel electrophoresis was performed as described by Lopez-Dominguez et al. (2013). Membranes were incubated with primary antibodies (obtained from Santa Cruz Biotech unless otherwise stated) raised against the following mitochondrial components: CYB5R3 (Proteintech, 10894-1-AP), VDAC1/2/3 (sc-98708), TOTAL OxPhos Complex Kit (Life technologies, 458099), NRF1 (sc-33771), TFAM (sc-2358), Mfn1 (sc-50330), Mfn2 (sc-50331) and Fis1 (sc-98900). Antibody against CYB5R3 was used at 1:10,000 dilution, antibodies against Mfn2 and Fis 1 were used at 1:500 dilution, antibodies against TFAM and VDAC were used at 1:1000 dilution, antibody against NRF1 was used at 1:2000 dilution and TOTAL OxPhos Complex antibody Kit was used at 1:4000 dilution. Appropriate species-specific secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase were used to reveal binding sites by enhanced chemiluminescence (ECL-Plus, GE Healthcare Life Sciences). The signal was recorded using a ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad) and staining intensity of positive bands was quantified with Image Lab™ Software (Bio-Rad). To correct for possible differences in protein load between samples, data obtained from the quantification of the immunostained bands (in arbitrary units) were normalized to density data of the corresponding lanes stained with Ponceau S.

Statistics

Data values were analysed using the GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). All the data shown in this paper are means \pm SEM. Normality of data was verified using the Kolmogorov-Smirnov normality test. The means were compared using the two-way ANOVA. We assessed overall differences due to “diet” (independently of genotype), “genotype” (independently of diet) and the interaction “diet \times genotype”, as well as individual differences between experimental groups. Significant differences were expressed as follows: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) and **** ($p < 0.0001$).

Results

Body and liver weight

We first determined body and liver weight in WT and Tg mice that had been fed an AIN93M diet for 4 months, either ad libitum or under conditions of 40% restriction. No differences in body weight between genotypes were observed when mice were fed ad libitum and, as expected, CR produced a significant decrease of body weight in both genotypes ($p < 0.0001$). However, weight loss due to CR intervention was significantly more pronounced in WT than in Tg mice. As a result, Tg mice weighed significantly more than WT littermates when fed under CR conditions ($p < 0.0001$) (Fig. 1a).

Liver weight was also reduced in WT mice fed under CR conditions in comparison with mice of the same genotype fed ad libitum (Fig. 1b) although no difference between the two dietary conditions was observed when liver weight was normalized to body weight (Fig. 1c). No differences in liver weight or in liver weight normalized to body weight were found when comparing mice of the two genotypes when fed ad libitum. Of note, in contrast to what was found for WT mice, CR did not result in a significant decrease of liver weight in Tg mice (Fig. 1b). Moreover, liver weight normalized to body weight was significantly increased in Tg mice fed under CR in comparison with mice of the same genotype fed ad libitum (Fig. 1c).

CYB5R3 polypeptide in liver and skeletal muscle from WT and Tg mice

Next, we studied the levels of CYB5R3 polypeptide in tissue extracts obtained from liver and hind limb skeletal muscle from WT and Tg mice fed the two experimental diets. As shown in Fig. 1a, b, the effect of CR and CYB5R3 overexpression on this parameter was strongly tissue-dependent. Overexpression of the CYB5R3 gene led to a modest albeit significant increase of the CYB5R3 polypeptide in liver from Tg mice fed ad libitum, but this increase was blunted by CR in such a way that no differences between genotypes were noted in mice submitted to this dietary intervention. Interestingly, levels of hepatic CYB5R3 polypeptide were significantly decreased by CR in mice of both genotypes, with this effect being much more striking in Tg mice (Fig. 2a). In skeletal muscle, overexpression of the CYB5R3 gene led to a dramatic increase in the levels

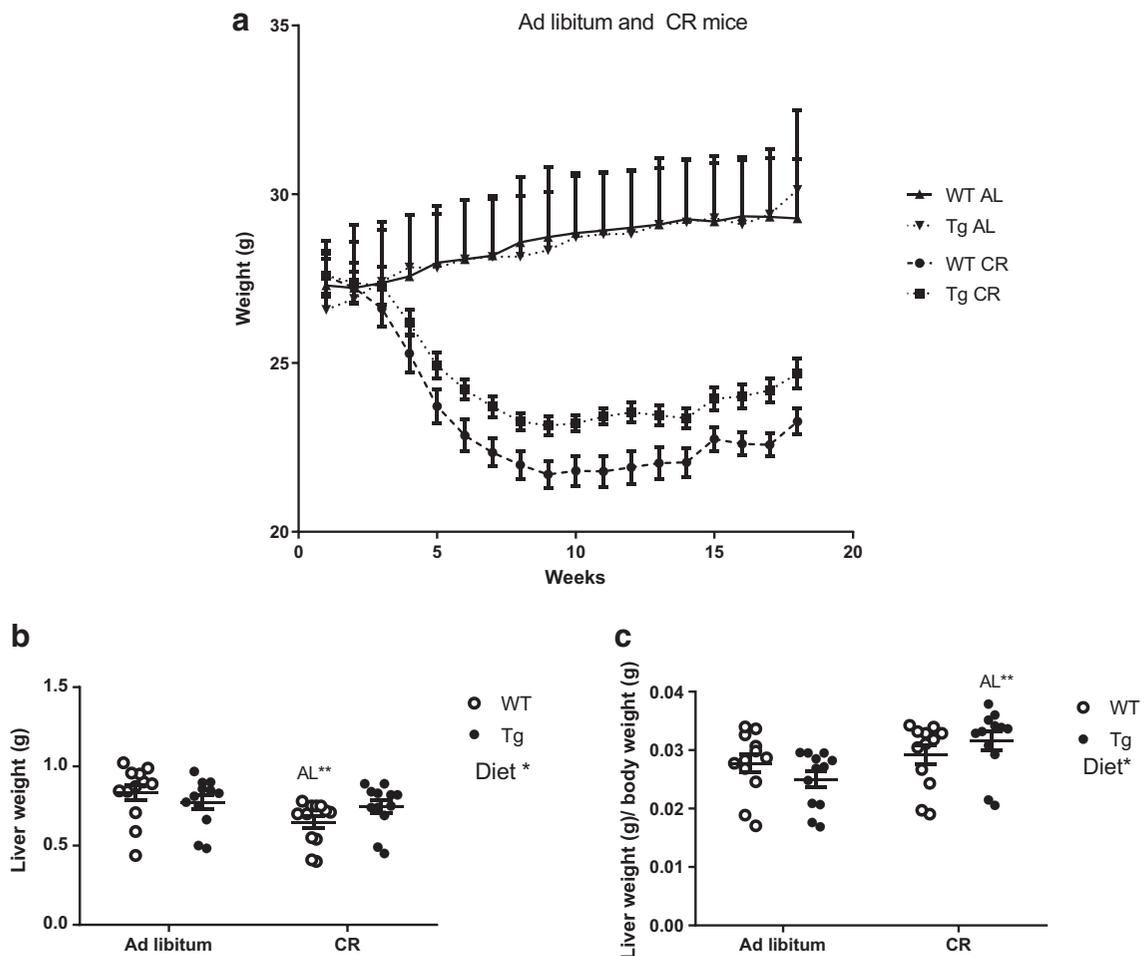


Fig. 1 Changes in body (a) and liver (b) weight in WT and Tg mice overexpressing CYB5R3, fed ad libitum or under CR. The body weight (a) was monitored weekly during 19 weeks of intervention. **b** displays liver weights after 19 weeks of intervention

and **c** shows the relative liver-to-body weight at the end of the intervention. Data are represented as mean \pm SEM of at least 12 mice

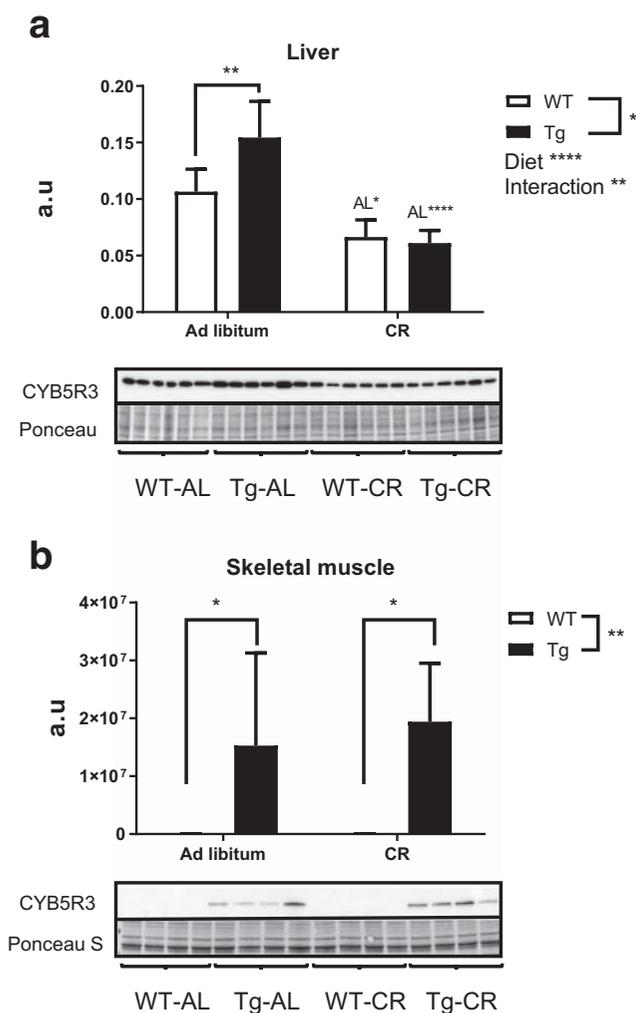
of the CYB5R3 polypeptide regardless the intake of calories. In contrast with the results obtained in liver, the levels of CYB5R3 polypeptide in skeletal muscle was not affected by CR regardless of genotype (Fig. 2b).

Mitochondrial dynamics and biogenesis markers

We next investigated the impact that CR and/or overexpression of CYB5R3 gene imposes on mitochondrial dynamics by studying the levels of key marker proteins related to mitochondrial fusion and fission phenomena. As depicted in Fig. 3a, no significant differences were detected for the levels of hepatic Mfn1 in both ad libitum and CR-fed mice, but Mfn2 was significantly increased in WT mice fed under CR in comparison with WT mice fed

ad libitum. Interestingly, the extent of this increase by CR was attenuated in Tg mice in such a way that no significant differences were observed when comparing Tg mice fed ad libitum or under CR (Fig. 3b). The fission marker Fis1 was not altered by CR in WT mice, but it was significantly increased in Tg mice fed ad libitum in comparison with WT mice fed the same diet. As observed for CYB5R3 polypeptide, this effect was also vanished in mice fed under CR conditions. Consequently, Fis1 levels were significantly lower in Tg mice fed under CR in comparison with animals of the same genotype fed ad libitum (Fig. 3c). We also measured the levels of TFAM and NRF1, two key transcription factors regulating mitochondrial biogenesis. TFAM polypeptide exhibited a dramatic increase by CR both in WT and in Tg mice

Fig. 2 Expression levels of CYB5R3 measured by Western blots in protein extracts obtained from liver (a) and hind limb skeletal muscle (b) of wild-type and Tg mice. Depicted data are mean \pm SEM of 4 replicates. In all graphs, asterisks without a letter refer to statistically significant differences between genotypes, whereas “AL” followed by asterisks indicates statistically significant differences between ad libitum and CR for a given genotype. Significant interactions between diet and genotype are also indicated when appropriated. In Figs. 2, 3, 4, 5, 6, and 7, representative Western blots and Ponceau S-stained lanes as loading control are included below each graph. a.u. arbitrary units



although, as found for another markers, a decrease was also observed in Tg mice fed under CR in comparison with WT mice fed the same diet (Fig. 3d). NRF1 levels also tended to increase with CR in WT mice in comparison with their ad libitum controls, although in this case the differences did not reach statistical significance ($p = 0.1$). Interestingly, a significant decrease of this mitochondrial biogenesis marker was again observed in Tg mice fed under CR in comparison with WT mice fed the same diet (Fig. 3e). Figure 3f depicts Western blots used for quantification of protein levels in liver with their corresponding Ponceau S-stained lanes used for normalization of protein loading.

Changes elicited by CR and/or CYB5R3 overexpression in skeletal muscle were different to those observed in liver. In skeletal muscle, CR produced a significant increase in the levels of Mfn1 in mice of both genotypes

without any change attributable to CYB5R3 overexpression (Fig. 4a), while the levels of Mfn2 (Fig. 4b) and Fis1 (Fig. 4c) were unaffected by either CR or CYB5R3 overexpression. We found an increase of TFAM levels by CYB5R3 overexpression regardless of the diet (Fig. 4d), while NRF1 was substantially increased by CR in WT mice but no significant change was observed in Tg mice (Fig. 4e). Figure 4f depicts Western blots used for quantification of protein levels in skeletal muscle with their corresponding Ponceau S-stained lanes used for protein loading normalization.

Mitochondrial mass and electron transport chain complexes

To further study the impact CR and/or CYB5R3 overexpression exert on mitochondria, we measured the

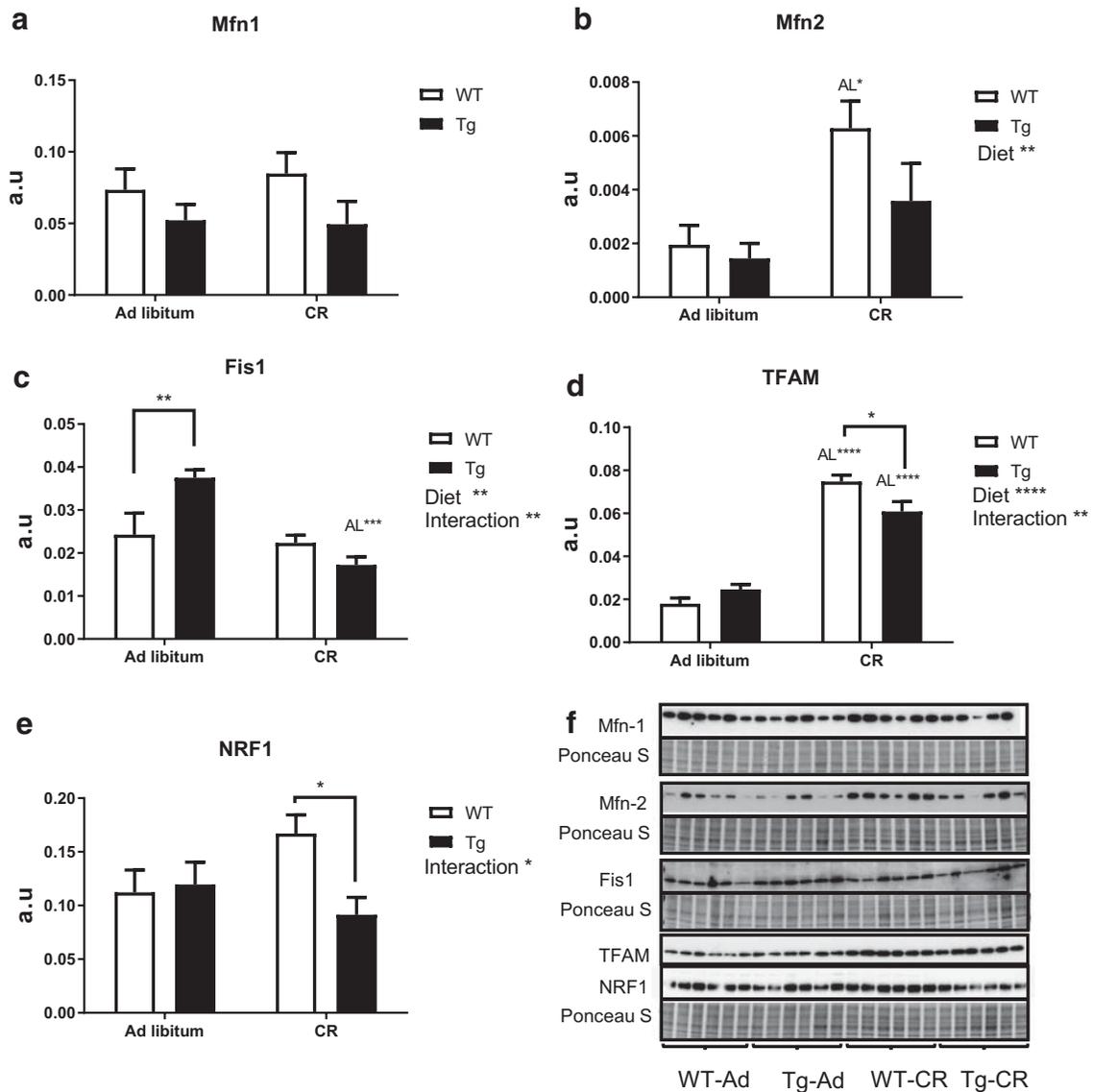


Fig. 3 Expression levels of proteins related to mitochondrial fusion: Mfn-1 (a) and Mfn-2 (b); fission: Fis1 (c); and biogenesis: TFAM (d) and NRF1 (e) in liver of wild-type and Tg mice fed ad libitum or under CR. When detected, general effects of diets and interaction between genotype and diet are represented on the

corresponding panels. Data are represented as mean \pm SEM of 6 replicates. Western blots used for quantification of protein levels with their corresponding Ponceau S-stained lanes used for normalization of protein loading (f)

levels of VDAC (porin), an outer membrane protein which is considered as a biochemical marker of mitochondrial abundance (Grünewald et al. 2014), and several marker subunits of the electron transport chain (ETC) complexes in the inner membrane. Neither CR nor CYB5R3 overexpression altered VDAC levels in liver (Fig. 5a), but CR strongly increased VDAC in skeletal muscle from WT mice. It is noteworthy that the effect of CR was again abated in mice

overexpressing CYB5R3, so that VDAC levels in Tg mice fed under CR were not only much lower than those of WT mice fed the same diet, but even lower than those of Tg mice fed ad libitum (Fig. 5b).

Regarding the abundance of marker subunits of the electron transport chain complexes, we found no changes attributable to diet or genotype in hepatic levels of complexes I and II (Fig. 6a, b), but CR produced substantial increases of hepatic complex III (with statistical

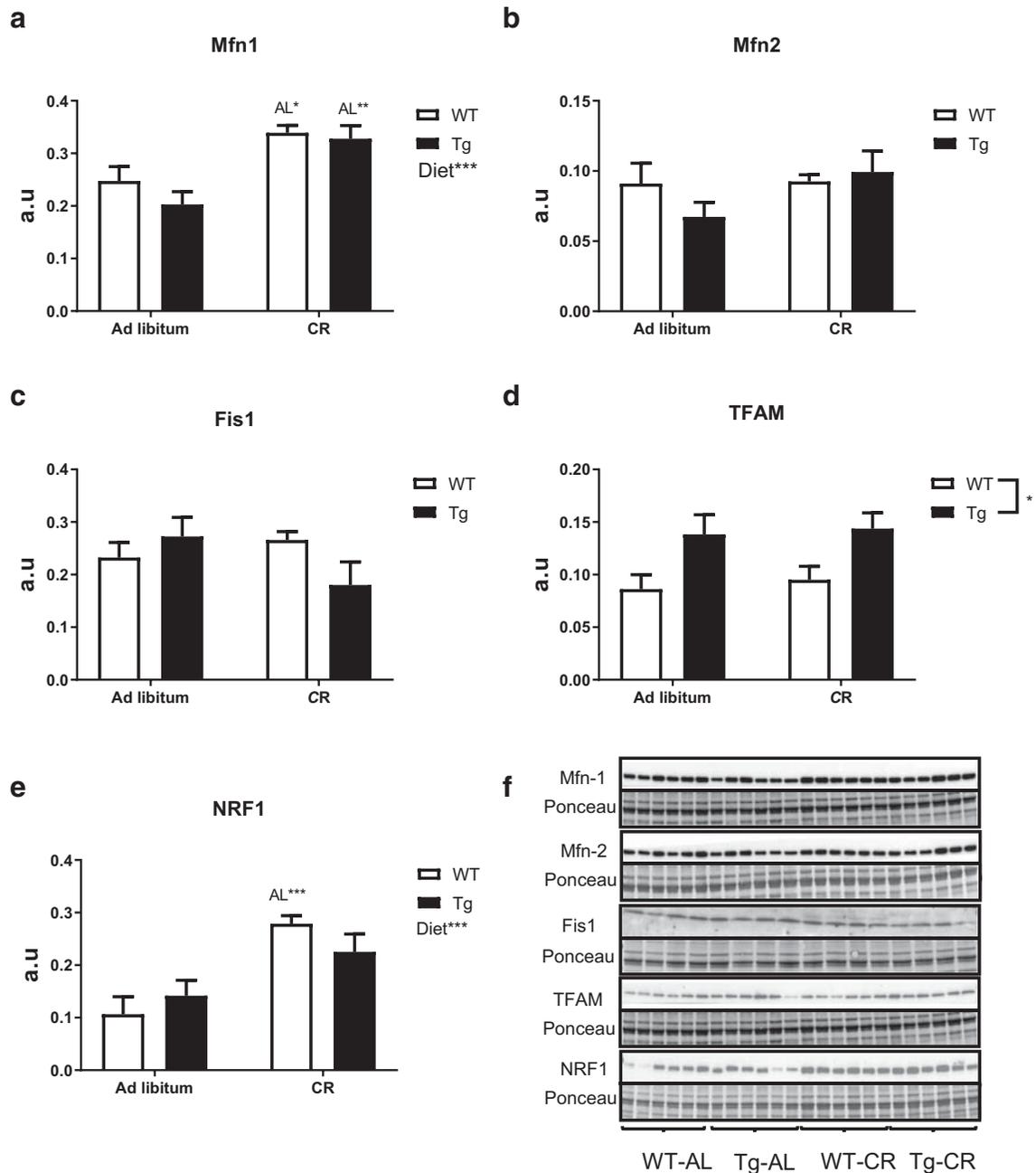


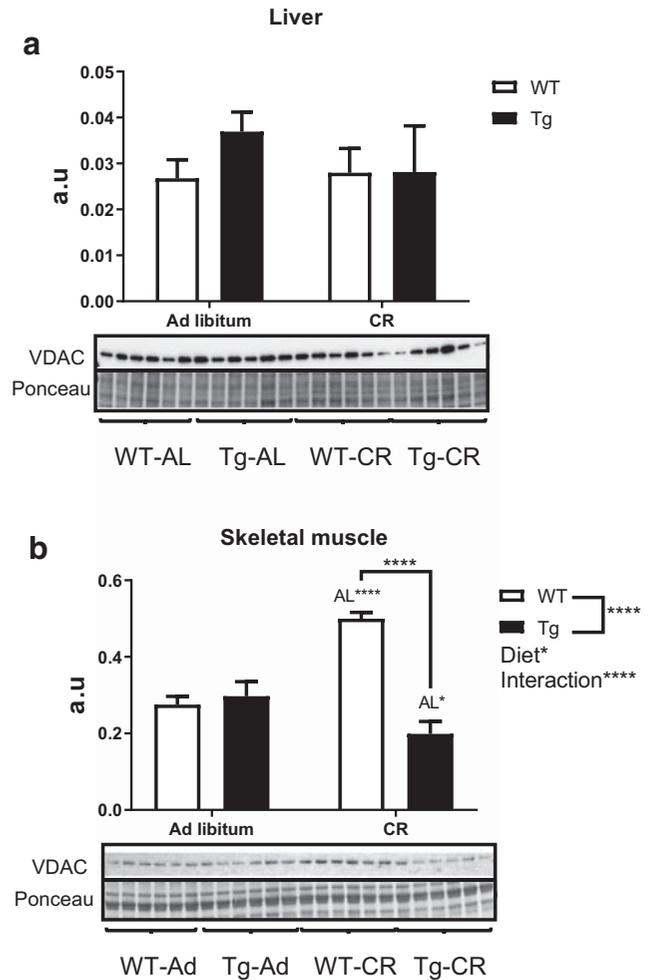
Fig. 4 Expression levels of protein related to mitochondrial fusion Mfn-1 (a) and Mfn-2 (b), fission Fis1 (c) and biogenesis TFAM (d) and NRF1 (e) in skeletal muscle of wild-type and transgenic animals fed ad libitum or under CR. General effects of diet and interaction between genotype and

diet are represented, when detected, on the corresponding panel. Data are shown as mean \pm SEM of 6 replicates except in c (Fis1) with 4 replicates. Western blots used for quantification of protein levels with their corresponding Ponceau S-stained lanes used for normalization of protein loading (f)

significance in both genotypes, see Fig. 6c), complex IV (with statistical significance in Tg mice, see Fig. 6d) and complex V (where statistical significance for the effect of

diet was obtained when mice of both genotypes were combined, see Fig. 6e). Figure 6f depicts the Western blots used for quantification of protein levels, with their

Fig. 5 Expression levels of VDAC as mitochondrial mass marker in protein extracts obtained from liver (a) and hind limb skeletal muscle (b) of WT and Tg mice. Data are depicted as mean \pm SEM of 6 replicates



corresponding Ponceau S-stained lanes used for protein loading normalization.

In the case of skeletal muscle, we evidenced a global and genotype-independent effect of CR to increase the abundance of marker subunits of complexes I (where statistical significance was obtained when mice of both genotypes were combined, see Fig. 7a) and IV (with statistical significance in mice of both genotypes, see Fig. 7d). On the other hand, complexes II and III shared another pattern of changes as a function of diet and/or genotype, i.e. the abundance of these complexes was increased in WT mice fed a CR diet and in Tg mice fed ad libitum, in comparison with their WT controls fed ad libitum. No differences were however found when comparing the two dietary groups of Tg mice, and CR did not affect significantly the levels of complexes II and III in these mice (see Fig. 7b, c). Finally, the pattern of

complex V changes with diet and/or genotype was similar to that exhibited by VDAC (see above), i.e. CR produced a significant increase in WT mice, but this increase was abated by CYB5R3 overexpression. Complex V abundance was thus significantly lower in Tg mice fed under CR in comparison with WT mice fed the same diet, and no change as a function of genotype was observed in mice fed ad libitum (Fig. 7e). Figure 7f depicts Western blots used for quantification of protein levels, and their corresponding Ponceau S-stained lanes used for protein loading normalization.

The alterations in the levels of several mitochondrial complexes with diet and/or genotype we document here could be accounted by changes in mitochondrial abundance and/or by modifications in the intrinsic composition of mitochondrial membranes. To distinguish between these two possibilities, we

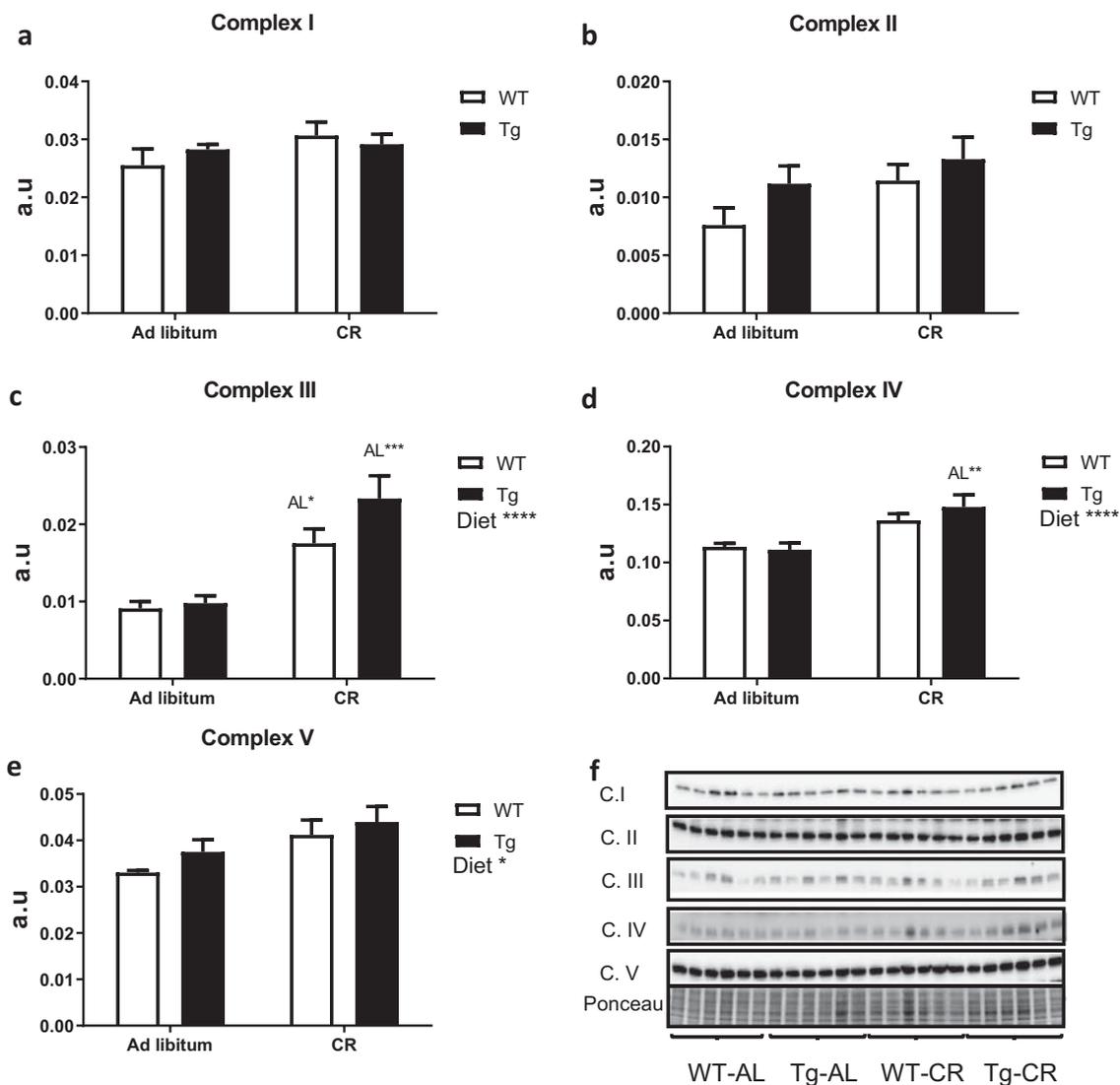


Fig. 6 Expression levels of mitochondrial electron transport chain complexes in liver from WT and Tg mice fed ad libitum or under CR. **a** to **e** represent the levels of mitochondrial complexes I to V, respectively. Statistically significant differences between groups

are indicated where detected. Data are mean \pm SEM of 6 replicates. Western blots used for quantification of protein levels with their corresponding Ponceau S-stained lanes used for normalization of protein loading (**f**)

calculated the levels of mitochondrial complexes relative to VDAC, as previously published (Grünwald et al. 2014), and the results are depicted in Figs. 8 (for liver) and 9 (for skeletal muscle). Interestingly, a consistent pattern of changes was highlighted for both tissues when the abundance of each mitochondrial complex was referred to the corresponding value of VDAC. In liver, CYB5R3 overexpression did not alter the abundance of ETC complexes relative to VDAC in mice fed ad libitum, but a general trend towards the increase of all complexes was found in Tg mice fed

under CR (see Fig. 8a–e), with statistically significant differences being obtained for complex IV:VDAC in comparison with Tg mice fed ad libitum (Fig. 8d).

In skeletal muscle, it was highlighted again that abundance of most complexes relative to VDAC was not altered by CYB5R3 overexpression in mice fed ad libitum (see Fig. 9a, c–e), resembling the results obtained in liver, with the sole exception of complex II which was increased significantly in Tg compared with WT mice (Fig. 9b). Of note, the abundance of all complexes relative to VDAC was consistently

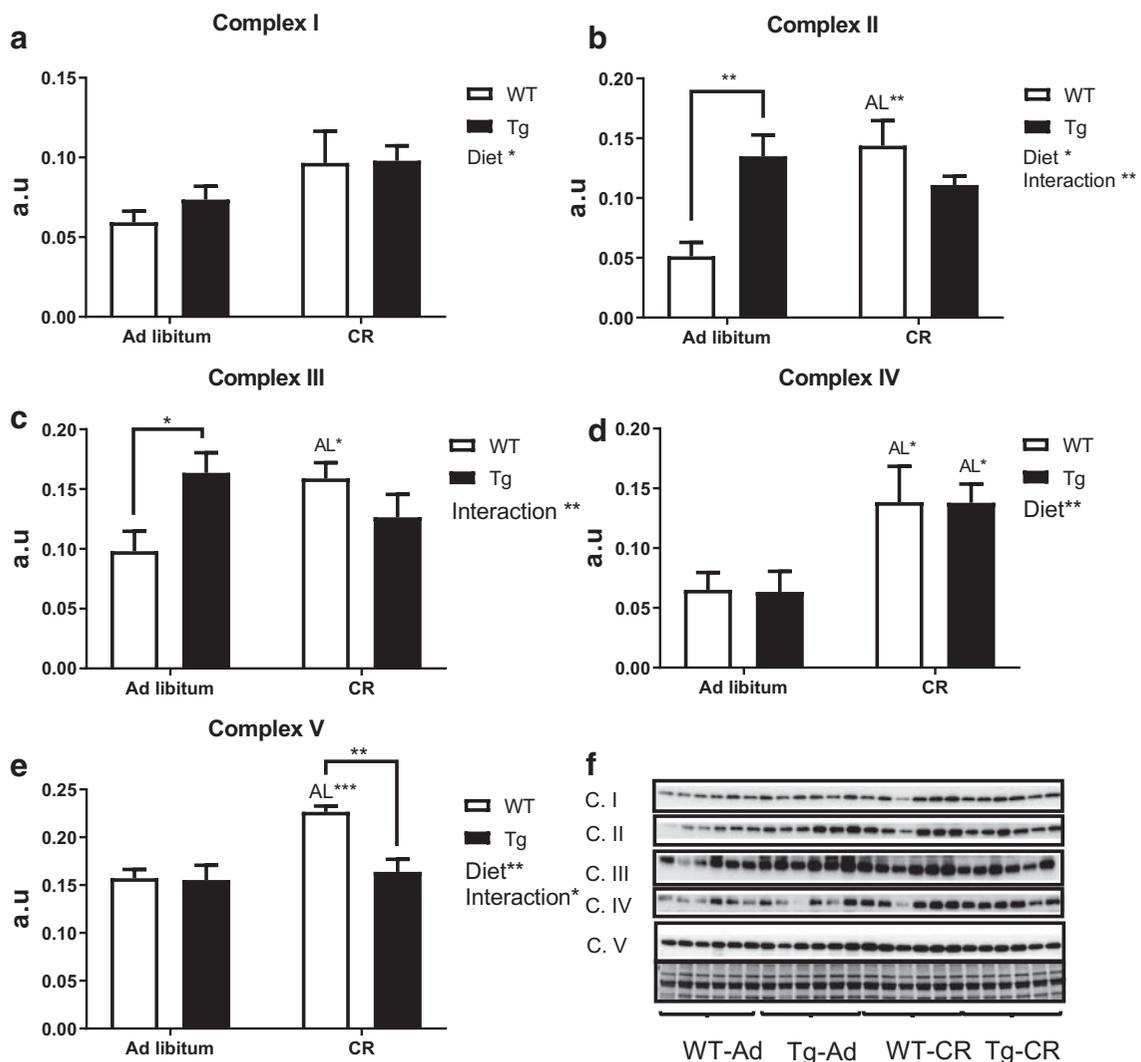


Fig. 7 Expression levels of mitochondrial electron transport chain complexes quantified in skeletal muscle of WT and Tg mice fed either ad libitum or under CR. **a** to **e** represent complexes I to V, respectively. Statistical differences between groups as well as general effect of diet and

interactions genotype-diet are indicated on the corresponding panel. Data were represented as mean \pm SEM of 6 replicates. Western blots used for quantification of protein levels with their corresponding Ponceau S-stained lanes used for normalization of protein loading (f)

increased in Tg mice fed under CR in comparison with their WT littermates fed the same diet (see Fig. 9a–e). Moreover, statistically significant increases with respect to Tg mice fed ad libitum were also observed for complexes I, IV, and V (see Fig. 9a, d, e).

Discussion

The NADH dehydrogenase CYB5R3 has direct implications in cell protection against oxidative stress and in

the regulation of NAD⁺ levels, and thus, a fundamental role for CYB5R3 in metabolism and aging has been proposed (de Cabo et al. 2009; Siendones et al. 2014). Moreover, it has been considered that some of the beneficial effects CR exerts on health could be related, at least in part, to CYB5R3 induction (De Cabo et al. 2004; Lopez-Lluch et al. 2005; Navas et al. 2007). However, whereas some of the salutary effects of CR are indeed mimicked in transgenic mice overexpressing CYB5R3 (Tg mice) (Martin-Montalvo et al. 2016), the mechanisms involved in metabolic adaptation of Tg mice

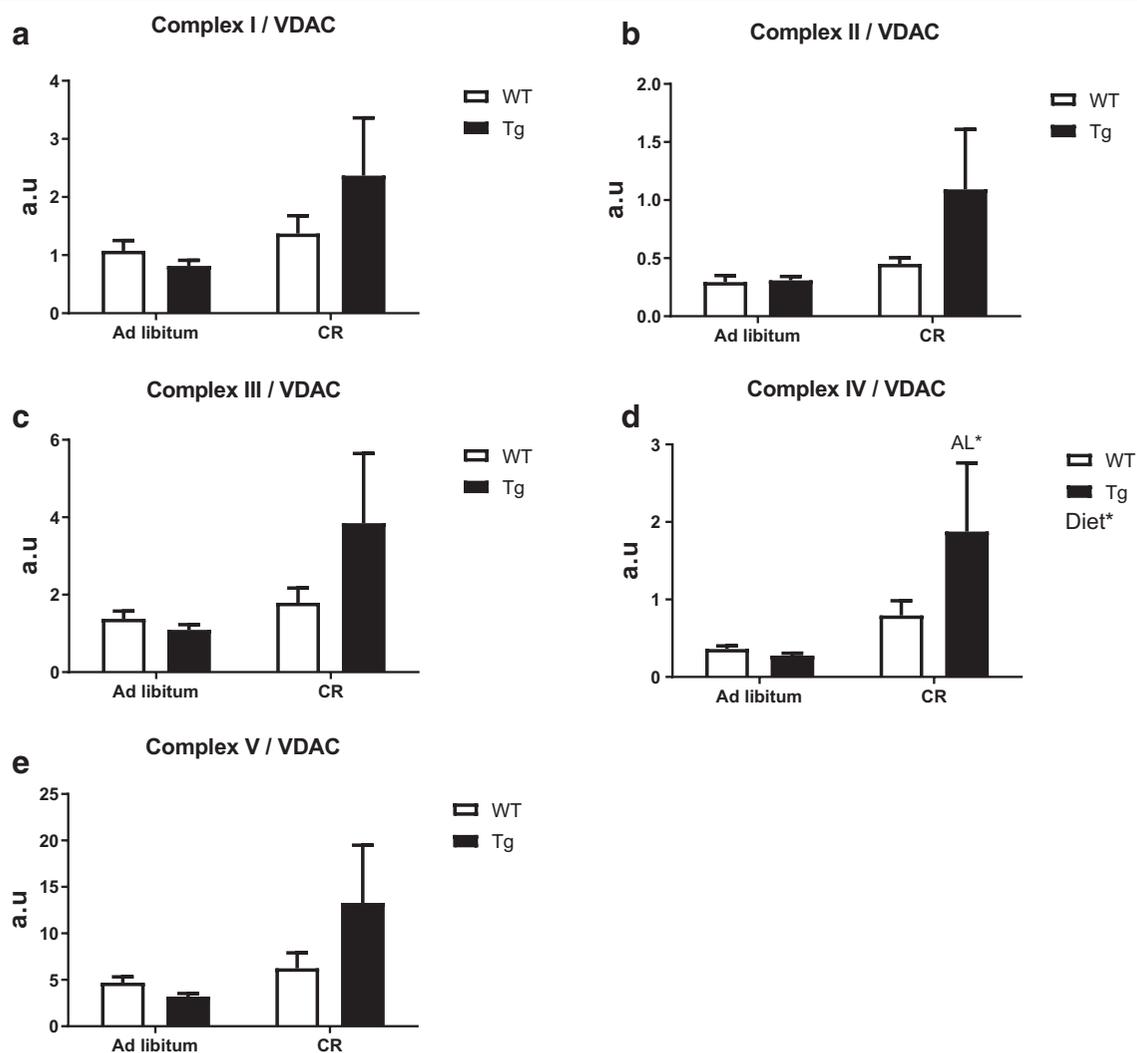


Fig. 8 Levels of mitochondrial complexes relative to VDAC in liver. **a** to **e** as in Fig. 5. Statistical differences were found only for complex IV/VDAC (**d**)

might be independent of those described for CR. In this sense, Tg mice fed a standard diet ad libitum were fatter but not heavier than the corresponding WT controls, and preferentially used carbohydrate to meet their energy needs. These two traits clearly depart from a typical CR phenotype, which is characterized by the decrease of body weight, adiposity and the use of fat as a fuel source (Guarente 2008; Martin-Montalvo et al. 2013). Since saturated fatty acids are required to allow mitochondrial β -oxidation to proceed (Kunau et al. 1995), metabolic adaptations elicited by CYB5R3 overexpression might be related to the action of this enzyme in enhancing elongation and desaturation of fatty acids, which may lead to the inhibition of fatty acid β -

oxidation and, thus, to the preferential use of carbohydrate metabolism (Martin-Montalvo et al. 2016). Lipid composition of membranes is also modified by CR, but the changes again differ from those produced by CYB5R3 overexpression. In this sense, CR decreases the levels of long-chain PUFA and increases monounsaturated fatty acids without any change in saturated fatty acids, as result of a metabolic reprogramming leading to lower levels of oxidative damage which could contribute to the extension of lifespan (Jove et al. 2014; Laganieri and Yu 1989; Laganieri and Yu 1993).

Because CR and CYB5R3 overexpression modify key aspects of energy metabolism and the lipid profile of tissues in opposite ways, it is important to study if

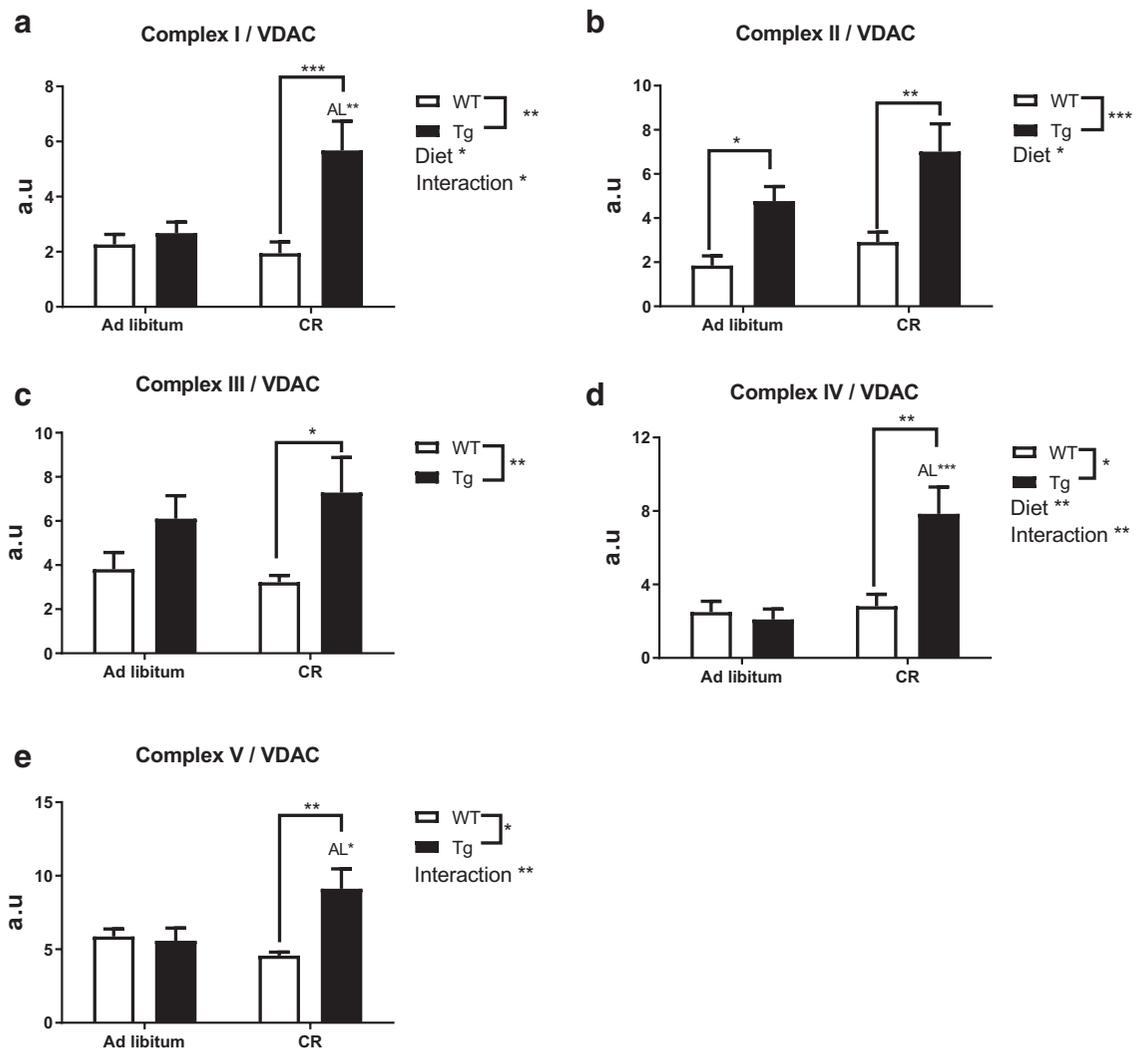


Fig. 9 Levels of mitochondrial complexes relative to VDAC in hind limb skeletal muscle. **a** to **e**, as in Fig. 6. Significant differences between groups or diets and genotype-diet interaction were found where noted

some of the metabolic adaptations induced by CYB5R3 overexpression are affected by CR. In accordance with this idea, our previous research has shown that increasing n-3 PUFA in tissues can be beneficial to mice fed ad libitum (Hagopian et al. 2010), while shortening lifespan in mice fed a CR diet (Lopez-Dominguez et al. 2015).

After being fed a standard diet for 4 months ad libitum, CYB5R3 mice showed no significant differences in body weight with respect to their WT controls, which is in agreement with our previous research in these mice fed closely related standard or high-fat diets (Martin-Montalvo et al. 2016). However, although CR produced a significant decrease of body weight in both

genotypes, CYB5R3 overexpression led to a greater preservation of body weight—and to a greater extent of liver weight. Thus, CYB5R3 emerges for the first time as a key determinant in the control of organ and body weight in mice under CR.

Quantification of CYB5R3 polypeptide levels in liver and skeletal muscle homogenates from mice fed ad libitum also confirmed our previous observations, with a modest although statistically significant increase of CYB5R3 polypeptide in liver and a dramatic augmentation in skeletal muscle from Tg in comparison with WT mice (Martin-Montalvo et al. 2016). Skeletal muscle is thus a suitable model to study the direct effects of CYB5R3 overexpression in the cellular physiology.

While CR did not affect CYB5R3 levels in skeletal muscle, this intervention produced a decrease in liver, particularly in Tg mice. The decrease of hepatic CYB5R3 in young mice submitted to CR is in accordance with our previous research carried out in Fischer-344 rats (De Cabo et al. 2004) and C57BL/6J mice (Lopez-Lluch et al. 2005), which allowed us to document that CR has a dual effect on CYB5R3 levels in liver plasma membrane. Of note, while a decrease in a CYB5R3-dependent activity was observed in young animals fed a CR diet, a remarkable increase was observed in old animals fed the CR diet lifelong. Furthermore, hepatic expression and polypeptide levels of CYB5R were also decreased in C57BL/6J mice after 18-h fasting, which was confirmed in HepG2 and Hepa1.6 cell lines cultured under glucose deprivation (Jakobs et al. 2014). In brain, CYB5R3 levels were unchanged by CR in young, but markedly increased in old Fischer-344 rats fed a CR diet. A substantial increase of CYB5R3 levels was also observed in SH-SY5Y neuroblast cells cultured with serum obtained from rats that had been fed under CR, in comparison with cells cultured with serum obtained from rats fed ad libitum (Hyun et al. 2006). Taken together, these observations demonstrate the existence of age and tissue-specific mechanisms regulating CYB5R3 levels by CR.

Of note, whereas the expression of ectopic CYB5R3 in Tg mice is controlled by a viral promoter (CMV), expression of the endogenous CYB5R3 gene is controlled by SP1 transcription factor (Toyoda et al. 1995), which can be further upregulated through FOXO3a and Nrf2 under conditions of nutritional and oxidative stress (Siendones et al. 2014). Since the levels of CYB5R3 polypeptide were similarly affected by CR in both WT and Tg mice, it is very likely that this regulation is post-transcriptional.

Previous research has firmly established that CR results in increased mitochondrial number and mass, and it may reduce ROS production without decreasing cellular respiration (Civitarese et al. 2007; Lopez-Lluch et al. 2006). However, how CR targets mitochondrial metabolism in mice overexpressing CYB5R3 is completely unknown. To elucidate the putative crosstalk between CR and CYB5R3 overexpression in the regulation of mitochondrial mass and function, we used here a battery of antisera raised against key mitochondrial proteins, including VDAC, different subunits of mitochondrial complexes, the mitofusins Mfn1 and Mfn2,

the fission factor Fis1 and two transcription factors involved in mitochondrial biogenesis: Nrf1 and TFAM.

VDAC is an abundant protein of the outer mitochondrial membrane whose levels serve as a biochemical estimate of mitochondrial mass (Grünewald et al. 2014). No significant differences among experimental groups were found for hepatic VDAC, but a substantial increase was observed in skeletal muscle from WT mice on CR in comparison with their ad libitum controls, supporting a higher mitochondrial abundance in this tissue under CR conditions. In accordance with previous investigations (Villalba et al. 2015), our results support that mitochondrial metabolism is rapidly adapted to CR in skeletal muscle compared with other tissues as liver, although another pathways which also affects the rate of aging, as mTOR signalling and the ubiquitin-proteasome pathway, were not affected by CR in skeletal muscle from young rats but a substantial inhibition was achieved in middle-age animals (Chen et al. 2019). The observations reported here are however in contrast with our previous studies based on a quantitative approach using electron microscopy, which allowed us to document that a 6-month CR intervention based on AIN93G diet was sufficient to increase mitochondrial abundance in mouse liver (Khraiwesh et al. 2014; Khraiwesh et al. 2013) whereas these changes were not detected in skeletal muscle (Gutierrez-Casado et al. 2019). Since the amount of fat constitutes the main difference between AIN93G (7% fat) and AIN93M (4% fat) diets, the possibility exists that this factor plays a key role in determining the rate of mitochondrial adaptations of different tissues to CR. However, controversial results regarding changes of mitochondrial mass with CR and aging may also arise from the heterogeneity in the methods used to assess mitochondrial content (Cartee et al. 2016), as discussed in our previous publication (Gutierrez-Casado et al. 2019).

Interestingly, CYB5R3 overexpression abated the increase of VDAC levels in skeletal muscle from mice fed under CR, an effect that might be related to the inhibition of mitochondrial β -oxidation and the preferential use of carbohydrate metabolism in Tg mice (Martin-Montalvo et al. 2016). Mfn2 (but not Mfn1) and TFAM were dramatically increased and NRF1 tended to increase by CR in liver of WT mice, which is partially in accordance with a previous research that documented the upregulation of hepatic Mfn2 and TFAM mRNA in mice fed under CR for 3 or 12 months starting at 2 months of age (Nisoli et al. 2005). However,

this research also evidenced an increase of Mfn1 mRNA that we have not confirmed here at the level of polypeptide. In accordance with our results, NRF1 mRNA levels increase in HeLa cells cultured with CR serum and this effect is inhibited by insulin (Lopez-Lluch et al. 2006), and TFAM and NRF1 protein levels decrease with aging in rat liver, and this decrease can be prevented by CR (Picca et al. 2013). According to our results, CR not only prevents the aging-related decrease of hepatic TFAM in old animals, but it even increases the level of this factor in young mice. The lack of Fis1 changes in WT mice fed under CR is in contrast with the increase reported for this fission factor in mice fed an AIN-93G diet for 6 months under CR conditions (Khraiwesh et al. 2013). This highlights again the importance of dietary fat content (AIN-93G vs. AIN-93M) and/or duration of intervention (6 months vs. 4 months) in determining the outcome of CR on mitochondrial dynamics.

Of note, CYB5R3 overexpression abated (for Mfn-2 and Fis1) or at least attenuated (for TFAM) the effect of CR in liver. CYB5R3 overexpression led to an increase of hepatic Fis1 in mice fed ad libitum, but this effect was abated by CR. Moreover, CYB5R3 overexpression also led to decreased hepatic NRF1, indicating a global effect on mitochondrial metabolism, dynamics and biogenesis in mice fed under CR. Mfn2 is a key protein of facilitating of contacts between endoplasmic reticulum and mitochondria which might result in an improvement in the processing of fat deposits (de Brito and Scorrano 2008; Rieusset 2018). The absence of CR effect of hepatic levels of Mfn2 in Tg mice and the decrease of TFAM and NRF1 in Tg mice fed under CR in comparison with WT mice fed the same diet might be related to the enhancement of carbohydrate metabolism in mice overexpressing CYB5R3 (Martin-Montalvo et al. 2016).

Changes elicited by CR and/or CYB5R3 overexpression in skeletal muscle were different to those observed in liver, indicating the existence of tissue specificity for mitochondrial adaptations to the interventions. In skeletal muscle, we evidenced an increase in the level of Mfn1 protein by CR in both genotypes, although Mfn2 was unaffected. It has been demonstrated elsewhere that CR increases the protein levels of Mfn2 in skeletal muscle of female swiss mice fed for 6 months with the same diet used here (AIN93M) starting at 1 month of age (Cerqueira et al. 2011). This discrepancy may be caused by differences in sex and strain (Mitchell et al. 2016). Previous results of our own group have also

demonstrated an increase of Mfn2 levels in skeletal muscle of C57BL/6 mice fed the AIN93G diet under CR conditions for 6 months starting at 3 months of age (Gutierrez-Casado et al. 2019). This fact reveals again the importance of the amount of fat in the diet. The increase of Mfn1 in skeletal muscle of mice of both genotypes fed under CR could indicate an increase in mitochondrial fusion needed to protect against autophagic degradation of these organelles (Tilokani et al. 2018). Additional studies will be necessary to elucidate putative changes in autophagy by CYB5R3 overexpression in mice fed under CR.

Unlike the results obtained in liver, levels of TFAM were not affected by CR but, interestingly, we evidenced a general effect of CYB5R3 overexpression increasing this factor independently of diet. While Civitarese et al. (2007) have demonstrated that TFAM mRNA is increased in muscle of healthy humans under CR, the intervention was not evaluated for TFAM at the levels of polypeptide. The dramatic increase of NRF1 polypeptide in skeletal muscle from WT mice fed under CR is in accordance with the similar increase observed for the mitochondrial abundance marker VDAC (see above). Of note, as also found for VDAC, the increase of NRF1 levels by CR was not observed in Tg mice, reinforcing the interference of both interventions.

While we found no major changes in the marker of hepatic mitochondrial abundance (VDAC) in liver tissue, an increase of fatty acid β -oxidation in response to CR could influence the activity and abundance of mitochondrial complex subunits (Chen et al. 2012a). Levels of complex III were increased by CR in both WT and Tg mice, which could facilitate electron flow through the mitochondrial chain. In skeletal muscle, CYB5R3 overexpression by itself increased the levels of complexes II and III in mice fed ad libitum, and CR apparently produced a generalized increase in the levels of mitochondrial complexes, although this effect seemed to be blunted when the dietary intervention was combined with CYB5R3 overexpression. Nevertheless, when the levels of mitochondrial complexes were normalized to those of VDAC to analyse those intrinsic changes taking place in the mitochondrial membranes independently of changes accounted by alterations in mitochondrial abundance, we were able to evidence a consistent effect of CYB5R3 overexpression to increase the levels of ETC complexes in both tissues, being the effect particularly striking in skeletal muscle. It has been shown that the increase in the levels of complex I by CR does not

produce an increase in the levels of ROS in skeletal muscle (Chen et al. 2012b). The increase of ETC complexes could indicate a higher production of ATP without higher ROS production in Tg mice, as we have already demonstrated in liver (Martin-Montalvo et al. 2016).

In summary, our data support that many alterations elicited by CR in mitochondrial abundance and dynamics can be hindered by CYB5R3 overexpression, but these effects are compensated by a greater abundance of mitochondrial ETC complexes in Tg mice submitted to this dietary intervention.

Authors' contributions JMVM and RdC conceived and designed the project; SRL was responsible of raising and maintaining the colony of mice; SRL and SLB performed the experimental determinations and conducted the data analysis; JAGR and MIB provided valuable advice; SRL, SLB and JMVM wrote the manuscript with approval from all authors.

Funding information This study was supported by Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) grant BFU2015-64630-R, cofinanced with EU FEDER funds, and Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MICIU) grant RTI2018-100695-B-I00, Spanish Junta de Andalucía (BIO-276) and Universidad de Córdoba (to JMVM). SRL held a FPI predoctoral contract funded by MINECO. SLB held a FPU predoctoral contract awarded by the Spanish Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (MECD). RdC is supported by the Intramural Research Program of the National Institute on Aging.

Compliance with ethical standards All animals were cared for in accordance with the University of Córdoba policy for animal welfare, which complies current European, Spanish and Andalusian regulations and is in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health. This study was approved by the bioethics committee of the University of Córdoba and authorized by the Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Junta de Andalucía (authorization code: 20/04/2016/053).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Barja G. Updating the mitochondrial free radical theory of aging: an integrated view, key aspects, and confounding concepts. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19:1420–45. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5148>.
- Barja G. The mitochondrial free radical theory of aging. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014;127:1–27. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394625-6.00001-5>.
- Belcourt MF, Hodnick WF, Rockwell S, Sartorelli AC. The intracellular location of NADH:cytochrome b5 reductase modulates the cytotoxicity of the mitomycins to Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1998;273:8875–81. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.15.8875>.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- Cartee GD, Hepple RT, Bamman MM, Zierath JR. Exercise promotes healthy aging of skeletal muscle. *Cell Metab.* 2016;23:1034–47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.007>.
- Cerqueira FM, Laurindo FR, Kowaltowski AJ. Mild mitochondrial uncoupling and calorie restriction increase fasting eNOS, akt and mitochondrial biogenesis. *PLoS One.* 2011;6:e18433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018433>.
- Civitaresse AE, Carling S, Heilbronn LK, Hulver MH, Ukropcova B, Deutsch WA, et al. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Med.* 2007;4:e76. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040076>.
- Csiszar A, Yabluchanskiy A, Ungvari A, Ungvari Z, Tarantini S. Overexpression of catalase targeted to mitochondria improves neurovascular coupling responses in aged mice. *Geroscience.* 2019;41:609–17. <https://doi.org/10.1007/s11357-019-00111-0>.
- Chen CN, Liao YH, Tsai SC, Thompson LV. Age-dependent effects of caloric restriction on mTOR and ubiquitin-proteasome pathways in skeletal muscles. *Geroscience.* 2019;41:871–80. <https://doi.org/10.1007/s11357-019-00109-8>.
- Chen Y, et al. The influence of dietary lipid composition on liver mitochondria from mice following 1 month of calorie restriction. *Biosci Rep.* 2012a;33:83–95. <https://doi.org/10.1042/BSR20120060>.
- Chen Y, et al. The influence of dietary lipid composition on skeletal muscle mitochondria from mice following 1 month of calorie restriction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2012b;67:1121–31. <https://doi.org/10.1093/gerona/gls113>.
- de Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature.* 2008;456:605–10. <https://doi.org/10.1038/nature07534>.
- De Cabo R, Cabello R, Rios M, Lopez-Lluch G, Ingram DK, Lane MA, et al. Calorie restriction attenuates age-related alterations in the plasma membrane antioxidant system in rat liver. *Exp Gerontol.* 2004;39:297–304. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2003.12.003>.
- de Cabo R, Siendones E, Minor R, Navas P. CYB5R3: a key player in aerobic metabolism and aging? *Aging (Albany NY).* 2009;2:63–8. <https://doi.org/10.18632/aging.100112>.
- Diaz-Ruiz A, et al. Overexpression of CYB5R3 and NQO1, two NAD(+)-producing enzymes, mimics aspects of caloric restriction. *Aging Cell.* 2018;17:e12767. <https://doi.org/10.1111/acer.12767>.
- Fan J, et al. Cyb5r3 links FoxO1-dependent mitochondrial dysfunction with β -cell failure. *Mol Metab.* 2020;34:97–111. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.12.008>.
- Grünewald A, Lax NZ, Rocha MC, Reeve AK, Hepplewhite PD, Rygiel KA, et al. Quantitative quadruple-label

- immunofluorescence of mitochondrial and cytoplasmic proteins in single neurons from human midbrain tissue. *J Neurosci Methods*. 2014;232:143–9. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.05.026>.
- Guarente L. Mitochondria—a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell*. 2008;132:171–6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.007>.
- Gutierrez-Casado E, et al. The impact of aging, calorie restriction and dietary fat on autophagy markers and mitochondrial ultrastructure and dynamics in mouse skeletal muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2019;74:760–9. <https://doi.org/10.1093/gerona/gly161>.
- Hagopian K, et al. Complex I-associated hydrogen peroxide production is decreased and electron transport chain enzyme activities are altered in n-3 enriched fat-1 mice. *PLoS One*. 2010;5:e12696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012696>.
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956;11:298–300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>.
- Hyun DH, Emerson SS, Jo DG, Mattson MP, de Cabo R. Calorie restriction up-regulates the plasma membrane redox system in brain cells and suppresses oxidative stress during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:19908–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608008103>.
- Jakobs HH, et al. The N-reductive system composed of mitochondrial amidoxime reducing component (mARC), cytochrome b5 (CYB5B) and cytochrome b5 reductase (CYB5R) is regulated by fasting and high fat diet in mice. *PLoS One*. 2014;9:e105371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105371>.
- Jansson I, Schenkman JB. Evidence against participation of cytochrome b5 in the hepatic microsomal mixed-function oxidase reaction. *Mol Pharmacol*. 1973;9:840–5.
- Jove M, Naudi A, Ramirez-Nunez O, Portero-Otin M, Selman C, Withers DJ, et al. Caloric restriction reveals a metabolomic and lipidomic signature in liver of male mice. *Aging Cell*. 2014;13:828–37. <https://doi.org/10.1111/acel.12241>.
- Khraiweh H, et al. Mitochondrial ultrastructure and markers of dynamics in hepatocytes from aged, calorie restricted mice fed with different dietary fats. *Exp Gerontol*. 2014;56:77–88. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.03.023>.
- Khraiweh H, et al. Alterations of ultrastructural and fission/fusion markers in hepatocyte mitochondria from mice following calorie restriction with different dietary fats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2013;68:1023–34. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt006>.
- Kunau WH, Dommies V, Schulz H. Beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res*. 1995;34:267–342. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(95\)00011-9](https://doi.org/10.1016/0163-7827(95)00011-9).
- Laganier S, Yu BP. Effect of chronic food restriction in aging rats. II. Liver cytosolic antioxidants and related enzymes. *Mech Ageing Dev*. 1989;48:221–30. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(89\)90084-5](https://doi.org/10.1016/0047-6374(89)90084-5).
- Laganier S, Yu BP. Modulation of membrane phospholipid fatty acid composition by age and food restriction. *Gerontology*. 1993;39:7–18. <https://doi.org/10.1159/000213509>.
- Liochev SI. Reflections on the theories of aging, of oxidative stress, and of science in general. Is it time to abandon the free radical (oxidative stress) theory of aging? *Antioxid Redox Signal*. 2015;23:187–207. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5928>.
- Lopez-Dominguez JA, et al. Dietary fat modifies mitochondrial and plasma membrane apoptotic signaling in skeletal muscle of calorie-restricted mice. *Age (Dordr)*. 2013;35:2027–44. <https://doi.org/10.1007/s11357-012-9492-9>.
- Lopez-Dominguez JA, et al. The influence of dietary fat source on life span in calorie restricted mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015;70:1181–8. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu177>.
- Lopez-Lluch G, et al. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:1768–73. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510452103>.
- Lopez-Lluch G, Rios M, Lane MA, Navas P, de Cabo R. Mouse liver plasma membrane redox system activity is altered by aging and modulated by calorie restriction. *Age (Dordr)*. 2005;27:153–60. <https://doi.org/10.1007/s11357-005-2726-3>.
- Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, Palacios HH, Mote PL, Scheibye-Knudsen M, et al. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun*. 2013;4:2192. <https://doi.org/10.1038/ncomms3192>.
- Martin-Montalvo A, et al. Cytochrome b5 reductase and the control of lipid metabolism and healthspan. *NPJ Aging Mech Dis*. 2016;2:16006. <https://doi.org/10.1038/npjamd.2016.6>.
- Mitchell SJ, Madrigal-Matute J, Scheibye-Knudsen M, Fang E, Aon M, González-Reyes JA, et al. Effects of sex, strain, and energy intake on hallmarks of aging in mice. *Cell Metab*. 2016;23:1093–112. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.027>.
- Navas P, Villalba JM, de Cabo R. The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress responses. *Mitochondrion*. 2007;7(Suppl):S34–40. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2007.02.010>.
- Nisoli E, et al. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science*. 2005;310:314–7. <https://doi.org/10.1126/science.1117728>.
- Oshino N, Imai Y, Sato R. A function of cytochrome b5 in fatty acid desaturation by rat liver microsomes. *J Biochem*. 1971;69:155–67. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a129444>.
- Picca A, Pesce V, Fracasso F, Joseph AM, Leeuwenburgh C, Lezza AM. Aging and calorie restriction oppositely affect mitochondrial biogenesis through TFAM binding at both origins of mitochondrial DNA replication in rat liver. *PLoS One*. 2013;8:e74644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074644>.
- Ramsey JJ, Harper ME, Weindruch R. Restriction of energy intake, energy expenditure, and aging. *Free Radical Bio Med*. 2000;29:946–68. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00417-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00417-2).
- Reddy VV, Kupfer D, Caspi E. Mechanism of C-5 double bond introduction in the biosynthesis of cholesterol by rat liver microsomes. *J Biol Chem*. 1977;252:2797–801.
- Rieusset J. The role of endoplasmic reticulum-mitochondria contact sites in the control of glucose homeostasis: an update. *Cell Death Dis*. 2018;9:388. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0416-1>.
- Sacco JC, Trepanier LA. Cytochrome b5 and NADH cytochrome b5 reductase: genotype-phenotype correlations for

- hydroxylamine reduction. *Pharmacogenet Genomics*. 2010;20:26–37. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3283343296>.
- Sakamuri S, et al. Measurement of respiratory function in isolated cardiac mitochondria using Seahorse XFe24 Analyzer: applications for aging research. *Geroscience*. 2018;40:347–56. <https://doi.org/10.1007/s11357-018-0021-3>.
- Siendones E, et al. Membrane-bound CYB5R3 is a common effector of nutritional and oxidative stress response through FOXO3a and Nrf2. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21:1708–25. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5479>.
- Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*. 1996;273:59–63. <https://doi.org/10.1126/science.273.5271.59>.
- Spindler SR, Dhahbi JM. Conserved and tissue-specific genic and physiologic responses to caloric restriction and altered IGF1 signaling in mitotic and postmitotic tissues. *Annu Rev Nutr*. 2007;27:193–217. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093743>.
- Stoscheck CM. Quantitation of protein. *Methods Enzymol*. 1990;182:50–68.
- Sure VN, et al. A novel high-throughput assay for respiration in isolated brain microvessels reveals impaired mitochondrial function in the aged mice. *Geroscience*. 2018;40:365–75. <https://doi.org/10.1007/s11357-018-0037-8>.
- Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem*. 2018;62:341–60. <https://doi.org/10.1042/EBC20170104>.
- Toyoda A, Fukumaki Y, Hattori M, Sakaki Y. Mode of activation of the GC box/Sp1-dependent promoter of the human NADH-cytochrome b5 reductase-encoding gene. *Gene*. 1995;164:351–5. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00443-a](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00443-a).
- Villalba JM, et al. The influence of dietary fat source on liver and skeletal muscle mitochondrial modifications and lifespan changes in calorie-restricted mice. *Biogerontology*. 2015;16:655–70. <https://doi.org/10.1007/s10522-015-9572-1>.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.