

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**

Programa de Doctorado en Biomedicina



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**Regulación fisiológica mitocondrial y de señalización
autofágica a través de intervenciones nutricionales con
diferentes fuentes lipídicas y antioxidantes**

Mitochondrial physiology and autophagic signaling regulation through
nutritional interventions with different lipid sources and antioxidants

Elena Gutiérrez Casado

Córdoba, julio 2018

TITULO: *REGULACIÓN FISIOLÓGICA MITOCONDRIAL Y DE SEÑALIZACIÓN
AUTOFÁGICA A TRAVÉS DE INTERVENCIONES NUTRICIONALES
CON DIFERENTES FUENTES LIPÍDICAS Y ANTIOXIDANTES*

AUTOR: *Elena Gutiérrez Casado*

© Edita: UCOPress. 2018
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/
ucopress@uco.es](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

**Regulación fisiológica mitocondrial y de señalización
autofágica a través de intervenciones nutricionales con
diferentes fuentes lipídicas y antioxidantes**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Elena Gutiérrez Casado**, Licenciada
en Biología, para optar al grado de **Doctora en Ciencias**

Los Directores,

José Manuel Villalba Montoro
Catedrático de Biología Celular
Universidad de Córdoba

José Antonio González Reyes
Catedrático de Biología Celular
Universidad de Córdoba

En Córdoba, a 27 de julio de 2017



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Dº José Manuel Villalba Montoro y Dº José Antonio González Reyes,
Doctores en Ciencias y Catedráticos de la Universidad del Área de Biología
Celular del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de
la Universidad de Córdoba,

INFORMAN

Que D^a Elena Gutiérrez Casado, Licenciada en Biología, ha realizado bajo
su dirección el trabajo titulado “**Regulación de la adaptación metabólica
mitocondrial y de señalización autofágica a través de intervenciones
nutricionales con diferentes fuentes lipídicas y antioxidantes**”, y que a su
juicio reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctora en
Ciencias

Y para que conste, firmo la presente en Córdoba, a 27 de julio de 2018.

Fdo.: José Manuel Villalba
Montoro

Fdo.: José Antonio González
Reyes



TÍTULO DE LA TESIS: Regulación fisiológica mitocondrial y de señalización autofágica a través de intervenciones nutricionales con diferentes fuentes lipídicas y antioxidantes

Mitochondrial physiology and autophagic signaling regulation through nutritional interventions with different lipid sources and antioxidants

DOCTORANDO/Elena Gutiérrez Casado

INFORME RAZONADO DEL/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).

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, llevada a cabo entre los años 2014 y 2018, la doctoranda Elena Gutiérrez Casado ha superado con creces los objetivos, tanto formativos como de investigación, planteados al comienzo de la misma. El trabajo realizado por la doctoranda se ha centrado en la regulación de la autofagia, proceso celular de gran importancia a la hora de determinar la pauta de envejecimiento, a través de diversas intervenciones como son el tratamiento con agentes moduladores positivos y negativos de la síntesis del antioxidante endógeno coenzima Q y los suplementos lipídicos del medio de cultivo aplicados a modelos celulares *in vitro* (células murinas Tkpts y Hepa1.6), y la restricción calórica con dietas que contienen distintas fuentes grasas en modelos animales (ratones). La investigación llevada a cabo por la doctoranda nos ha permitido constatar que los efectores de la biosíntesis de coenzima Q ejercen algunos efectos de manera independiente a esta función en células Tkpts, como son la dinámica mitocondrial, el consumo de oxígeno y la ratio de acidificación del medio extracelular. La abundancia complejos mitocondriales, especialmente el complejo III, la generación de especies reactivas y, de manera importante, la señalización autofágica sí resultan regulados por el coenzima Q. Respecto a la autofagia, el mecanismo molecular implica una activación en el procesamiento de LC3 a LC3I, proceso que está mediado por Trx1. Estos resultados son de gran importancia, pues nos ofrecen nuevas pistas de cara a entender los mecanismos moleculares por los cuales el coenzima Q ejerce sus efectos beneficiosos sobre las células. En células Hepa1.6 hemos podido comprobar asimismo cómo los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 son inductores de la autofagia a través de mecanismos en los que también interviene el aumento de los niveles de coenzima Q, favoreciendo así mismo el procesamiento de LC3.

En lo que se refiere a los modelos de tejidos animales (músculo esquelético e hígado de ratón), la doctoranda ha examinado en profundidad el efecto que diferentes fuentes de grasa en la dieta pueden causar en fenómenos de autofagia en condiciones de restricción calórica y su relación con el envejecimiento. Así, en el caso de músculo esquelético (tomado como ejemplo de tejido post-mitótico), se ha observado una potenciación de este fenómeno que depende del tiempo de duración del periodo de restricción calórica y de la fuente lipídica incluida en la dieta. Un estudio comparativo exhaustivo llevado a cabo a través del análisis de la expresión de los marcadores esenciales de este proceso y mediante microscopía electrónica de transmisión, indica que la manteca (rica en ácido oleico y ácidos grasos saturados), como fuente de grasa, ejerce un efecto óptimo en el proceso de auto- y mitofagia cuando se compara con animales no sometidos a restricción calórica. Dicho efecto parece más pronunciado tras intervenciones dietéticas a largo plazo (18 meses). Hay que destacar que estos resultados han sido recientemente aceptados para su publicación en la revista "*The Journal of Gerontology: Series A*" (doi: 10.1093/gerona/gly161) que, con un factor de impacto de 4,902, se enmarca en el primer cuartil en el campo "*Geriatrics and Gerontology*" (JCR de 2017). En este artículo, la doctoranda es primera autora. En hígado (tomado como modelo de tejido mitótico), la grasa de la dieta en condiciones de restricción calórica en intervenciones de 18 meses no indujo la aparición de cambios tan notables, ni en la expresión de los marcadores señalados, ni en la ultraestructura celular referida a figuras de autofagia, como lo hizo en el músculo esquelético. Sin embargo, en animales sometidos a restricción calórica durante 6 meses, sí que se observaron cambios en función de la abundancia de dobles enlaces en la grasa de la dieta, lo que presupone la existencia de diversas rutas adaptativas en la fisiología hepática a las condiciones impuestas por la restricción calórica.

Finalmente, queremos destacar la presentación de muchos de los resultados aquí resumidos en Congresos de ámbito nacional e internacional. Por otra parte, la estancia realizada por la solicitante en el laboratorio del Prof. Jon J Ramsey (Department of Molecular Biosciences, School of Veterinary Medicine, Universidad de California, Davis, USA) entre el 2 de febrero y el 1 de mayo de 2015, permite que la doctoranda pueda acceder al título de Doctor con Mención Internacional.

Por todo lo expuesto, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 26 de julio de 2018

Firma de los directores



Fdo: José Manuel Villalba Montoro



Fdo: José Antonio González Reyes

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 José Antonio González Reyes. El trabajo ha sido financiado por los proyectos de investigación BFU2015-64630-R, BFU2011-23578 (ambos del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad) y 1R01AG028125-01A1 (NIH, Estados Unidos), así como por el programa de Proyectos Internacionales (Junta de Andalucía) y por el grupo de investigación BIO-276 (“Biomembranas, Antioxidantes y Estrés oxidativo”, Junta de Andalucía y Universidad de Córdoba). La doctoranda recibió una ayuda del programa nacional de Formación del Profesorado Universitario (FPU 13/0418, Ministerio de Educación, Cultura y Deporte) y también disfrutó de un contrato asociado a proyecto P09-CVI-4887.

Índices

Abreviaturas	i
Abstract	ix
Resumen	xxxi
1. Introducción	1
1.1. Ruta de autofagia.....	3
1.1.1. ¿Qué es la autofagia?.....	3
1.1.2. Mecanismos moleculares de la ruta de autofagia	4
1.1.3. Factores que regulan la ruta de autofagia	10
1.1.4. Papel de la proteína SQTSM1/p62 en la autofagia selectiva.....	13
1.1.5. Autofagia selectiva: mitofagia.....	16
1.2. Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	19
1.2.1. Qué son y cómo se producen	19
1.2.2. Interacciones entre las ROS y las biomoléculas celulares	20
1.2.3. La mitocondria como fuente de ROS	21
1.3. Compuestos fenólicos.....	24
1.3.1. ¿Qué son los compuestos fenólicos?	24
1.3.2. El flavonoide Kaempferol. Papel terapéutico	25
1.3.3. Kaempferol y su papel como modulador de la autofagia	27
1.4. Sirtuinas. ¿Qué son y cómo se regulan?. Papel de la nicotinamida.....	28
1.5. El coenzima Q	29
1.5.1. ¿Qué es y cómo podemos encontrarlo en la célula?	29
1.5.2. Funciones biológicas del Q.....	30
1.5.3. Biosíntesis del Q.....	31
1.6. Ácidos grasos.	32
1.6.1. ¿Qué son los ácidos grasos y cómo se clasifican?	32
1.6.2. Ácidos grasos esenciales.....	34
1.6.3. Alteraciones del patrón lipídico celular inducidas por la dieta.....	36
1.6.4. Modulación de la autofagia a través los ácidos grasos	36
1.7. El envejecimiento y sus teorías	38
1.7.1. La restricción calórica como intervención anti-envejecimiento	40
1.7.1.1. Restricción calórica y producción de especies reactivas de oxígeno	41
1.7.1.2. Restricción calórica y grado de insaturación de los ácidos grasos en las membranas	42

1.7.2. Autofagia y envejecimiento. Papel de la restricción calórica en su modulación	42
1.7.2.1. Enfermedades asociadas a disfunciones en la ruta de autofagia	45
1.8. Dinámica mitocondrial	49
1.8.1. Fusión mitocondrial	49
1.8.2. Fisión mitocondrial	51
2. Objetivos	53
3. Material y Métodos	57
3.1. Modelo celular	59
3.1.1. Líneas celulares	59
3.1.2. Determinación de la viabilidad celular	59
3.1.2.1. Tinción con azul tripán	59
3.1.2.2. Ensayo MTT	60
3.1.3. Tratamientos	60
3.1.3.1. Emulsiones lipídicas	61
3.1.3.2. Compuestos fenólicos precursores de la síntesis de Q	62
3.1.3.3. Suplemento con Coenzima Q ₁₀	62
3.1.3.4. Inhibidores	62
3.1.3.4.1. Ácido <i>p</i> -aminobenzoico (PABA)	62
3.1.3.4.2. Nicotinamida (NAM)	63
3.1.3.5. Inhibidores de la ruta de autofagia	63
3.1.3.5.1. Tioconazol, inhibidor de la proteína ATG4	63
3.1.3.5.2. Cloroquina	63
3.1.4. Obtención de extractos celulares	64
3.1.4.1. Electroforesis y western blot	64
3.1.4.2. Extracciones lipídicas	64
3.1.5. Aislamiento de mitocondrias a partir de cultivos celulares	65
3.1.6. Aislamiento de ARN a partir de cultivos celulares	66
3.2. Modelo animal	66
3.2.1. Animales y dietas	66
3.2.2. Obtención de homogenados totales de tejido	69
3.3. Determinación de la cantidad de proteína en las muestras	69
3.4. Separación electroforética de las proteínas y western blot	70
3.4.1. Preparación de las muestras	70
3.4.2. Electroforesis	70
3.4.3. Transferencia y control de carga	70

3.4.4. Bloqueo, inmunotinción y revelado.....	71
3.5. Medida de los niveles de coenzima Q ₉ y Q ₁₀ mediante HPLC.....	73
3.6. Ensayos enzimáticos de la cadena de transporte electrónico	73
3.6.1. Actividad citrato sintasa	74
3.6.2. Actividad simple de los complejos	74
3.6.2.1. Complejo I	74
3.6.2.2. Complejo II	75
3.6.2.3. Complejo III.....	75
3.6.2.4. Complejo IV.....	75
3.6.3. Actividad combinada de los complejos	75
3.7. Tinción de lípidos mediante Oil-red O.....	76
3.8. Medidas de daño oxidativo.....	77
3.8.1. Determinación del grado de peroxidación de los lípidos.....	77
3.8.2. Determinación del grado de oxidación de las proteínas	77
3.8.3. Análisis mediante citometría de flujo	78
3.8.3.1. Determinación de los niveles de superóxido intracelular	78
3.8.3.2. Determinación de los niveles de hidróperóxido intracelular.....	79
3.8.3.3. Determinación de los niveles de superóxido mitocondrial	79
3.8.3.4. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$).....	79
3.8.3.5. Determinación de la masa mitocondrial.....	80
3.8.3.6. Determinación del flujo autofágico.....	80
3.9. Medidas de metabolismo celular	81
3.10. Análisis de expresión génica mediante RT-PCR a tiempo real.....	82
3.10.1. Validación de la eficiencia de los cebadores	82
3.10.1.1. Síntesis de ADN copia	82
3.10.1.2. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	83
3.10.1.3. RT-PCR cuantitativa a tiempo real	83
3.11. Análisis de figuras de autofagia mediante microscopía electrónica.....	84
3.11.1. Preparación de muestras de hígado y músculo esquelético para microscopía electrónica	84
3.11.2. Análisis ultraestructural cuantitativo de figuras de autofagia y mitofagia.....	85
3.12. Análisis estadístico.....	85
4. Resultados	87

4.1. Regulación de la fisiología mitocondrial y de la ruta autofágica mediada por coenzima Q en la línea celular Tkpts.....	89
4.1.1. Alteraciones en la cadena de transporte electrónico en respuesta al tratamiento con kaemperol, pHB y suplemento exógeno de Q ₁₀	90
4.1.2. Modificaciones en el consumo de O ₂ y la capacidad respiratoria y glucolítica celular	96
4.1.3. Alteraciones de la fisiología mitocondrial y daño oxidativo en respuesta al tratamiento con kaempferol y pHB	99
4.1.4. Posible papel de la sirtuina mitocondrial 3 (Sirt3) en los efectos mediados por kaempferol	102
4.1.5. Posible papel de Sirt3 en el efecto del kaempferol sobre la generación de especies reactivas de oxígeno.....	103
4.1.6. Implicación de Sirt3 en las alteraciones de la masa mitocondrial en respuesta al tratamiento con kaempferol.....	105
4.1.7. Niveles de Q y dinámica mitocondrial	107
4.1.8. Niveles de Q y señalización autofágica	111
4.1.9. Niveles de ARNm de marcadores de la ruta de autofagia	121
4.1.10. Posible papel de la tiorredoxina 1 en la regulación del flujo autofágico mediada por Q	122
4.1.11. Alteraciones en el flujo autofágico mediadas por la inhibición de ATG4.....	125
4.2. Papel de los ácidos grasos en la fisiología mitocondrial y la ruta de autofagia en la línea celular Hepa 1.6. Posible implicación del coenzima Q.....	129
4.2.1. Efecto del tratamiento con emulsiones sobre la formación de gotas lipídicas	130
4.2.2. Alteraciones en la actividad de los complejos de la CTE en respuesta a las distintas fuentes grasas	132
4.2.3. Alteraciones en la masa mitocondrial en respuesta al tratamiento con distintas fuentes grasas	135
4.2.4. Generación de especies reactivas de oxígeno y alteraciones en el potencial mitocondrial en respuesta a suplementos lipídicos	140
4.2.5. Determinación de daño oxidativo en proteínas y lípidos en respuesta a las distintas fuentes grasas	142
4.2.6. Efecto de las emulsiones lipídicas sobre la ruta de autofagia.....	143
4.2.7. Posible implicación de los niveles de Q sobre la ruta de autofagia en células Hepa 1.6	150

4.3. Autofagia, estrés oxidativo y mitocondria. Efectos del envejecimiento, la restricción calórica y el componente graso de la dieta en músculo esquelético como modelo de tejido post-mitótico	157
4.3.1. Efecto de las intervenciones dietéticas y el envejecimiento sobre la autofagia en músculo esquelético. Análisis cuantitativo ultraestructural	157
4.3.2. Análisis de efectores de la ruta de autofagia y posible efecto de las intervenciones nutricionales y el envejecimiento.....	167
4.3.3. Niveles de daño oxidativo en proteínas, envejecimiento y restricción calórica ...	175
4.3.4. Cambios en la cadena de transporte electrónico en respuesta al envejecimiento y a la dieta	176
4.4. Autofagia, estrés oxidativo y mitocondria. Efectos del envejecimiento, la restricción calórica y el componente graso de la dieta en hígado como modelo de tejido mitótico	180
4.4.1. Envejecimiento, intervenciones dietéticas y autofagia: estudio morfológico y cuantitativo	180
4.4.2. Análisis de efectores de la ruta de autofagia y posible efecto de las intervenciones nutricionales y el envejecimiento.....	185
4.4.3. Daño oxidativo en proteínas, envejecimiento y restricción calórica	193
4.4.4. Cambios en la cadena de transporte electrónico en respuesta al envejecimiento y a la dieta	194
5. Discusión	199
5.1. El coenzima Q como regulador de la fisiología mitocondrial y la ruta de autofagia en la línea celular Tkpts.....	201
5.1.1. Efecto de los sustratos biosintéticos y el aporte exógeno de coenzima Q sobre los niveles de complejos de la cadena de transporte electrónico	201
5.1.2. Modificaciones en el consumo de oxígeno y la capacidad glucolítica en respuesta a las modificaciones en los niveles de Q.....	203
5.1.3. Efecto de los precursores biosintéticos del Q sobre la producción de ROS y daño oxidativo en células Tkpts.....	205
5.1.4. Alteraciones en la masa mitocondrial mediadas por kaempferol	207
5.1.5. Alteraciones en la dinámica mitocondrial por precursores biosintéticos del coenzima Q	208
5.1.6. Alteraciones en la ruta de autofagia y su posible regulación a través de modificaciones en los niveles de Q.....	210
5.1.7. Papel de la tiorredoxina 1 (Trx 1) y de la proteasa ATG4 en el control de la autofagia mediado por Q.....	215

5.2. Ácidos grasos como moduladores de la función mitocondrial y ruta autofágica en la línea celular Hepa 1.6.....	219
5.2.1. Efecto de las emulsiones lipídicas sobre la acumulación de depósitos grasos. Relación entre las gotas lipídicas y otros orgánulos celulares	219
5.2.2. Alteraciones de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y efecto del suplemento graso.....	222
5.2.3. Cambios en la masa mitocondrial en respuesta a los tratamientos con emulsiones lipídicas	224
5.2.4. Alteraciones en la generación de ROS y daño oxidativo de componentes celulares en respuesta al tratamiento con emulsiones lipídicas.....	226
5.2.5. Alteraciones en la ruta de autofagia en respuesta a la naturaleza del componente graso	229
5.2.6. Papel del coenzima Q en la regulación de la autofagia por emulsiones lipídicas.	231
5.3. Alteraciones morfológicas y funcionales en la ruta autofágica, daño oxidativo y marcadores de masa mitocondrial mediadas por intervenciones nutricionales en músculo esquelético.....	234
5.3.1. Autofagia, mitofagia, envejecimiento y restricción calórica en músculo esquelético	234
5.3.2. Efectos de las distintas intervenciones dietéticas sobre parámetros morfológicos y cuantitativos de las figuras de autofagia	236
5.3.3. Envejecimiento, restricción calórica y grasa de la dieta como moduladores de la ruta de autofagia.....	238
5.3.4. Efectos de la restricción calórica, grasa de la dieta y envejecimiento en el daño oxidativo a proteínas	242
5.3.5. Expresión de los complejos de la cadena de transporte electrónico en respuesta a las intervenciones nutricionales, envejecimiento y aporte graso de la dieta	243
5.4. Alteraciones morfológicas y funcionales en la ruta autofágica, daño oxidativo y marcadores de masa mitocondrial mediadas por intervenciones nutricionales en hígado	246
5.4.1. Efectos de las distintas intervenciones dietéticas sobre parámetros morfológicos y cuantitativos de las figuras de autofagia	246
5.4.2. Envejecimiento, restricción calórica y grasa de la dieta como moduladores de la ruta de autofagia.....	248
5.4.3. Alteraciones en el daño oxidativo a proteínas en respuesta al envejecimiento y a las diferentes intervenciones nutricionales	252
5.4.4. Expresión de los complejos de la cadena de transporte electrónico en respuesta a las intervenciones nutricionales y al envejecimiento	254

6. Conclusiones Generales	259
7. General Conclusions	263
8. Bibliografía	267
Anexo I Controles de carga para western blot.....	I
Las siguientes imágenes se corresponden con los controles de carga (membranas teñidas con la tinción de rojo Ponceau S) para los western blot realizados en muestras de extractos totales de células Tkpts recogidos en el capítulo 4.1 de resultados.	III
Las siguientes imágenes se corresponden con los controles de carga (membranas teñidas con la tinción de rojo Ponceau S) para los western blot realizados en muestras de extractos totales de células Hepa 1.6 recogidos en el capítulo 4.2 de resultados.....	VIII
Las siguientes imágenes se corresponden con los controles de carga (membranas teñidas con la tinción de rojo Ponceau S) para los western blot realizados en muestras de homogenado total de músculo esquelético recogidos en el capítulo 4.3 de resultados.....	X
Las siguientes imágenes se corresponden con los controles de carga (membranas teñidas con la tinción de rojo Ponceau S) para los western blot realizados en muestras de homogenado total de hígado recogidos en el capítulo 4.4 de resultados.	XII
Anexo II Artículo publicado	XV

Índice de figuras

Introducción

Figura In-1. Tipos de autofagia en células de mamíferos	4
Figura In-2. Sistemas de lipidación implicados en el proceso de autofagia	7
Figura In-3. Ruta de autofagia. Etapas del proceso y complejos y proteínas implicadas en ellas	9
Figura In-4. Regulación de la ruta de autofagia.....	12
Figura In-5. Estructura de la proteína SQTSM1/p62, estímulos que controlan su función y mecanismo de actuación como proteína “receptora” en el proceso de autofagia selectiva.....	15
Figura In-6. Mecanismos de mitofagia.....	18
Figura In-7. Principales especies reactivas de oxígeno	20
Figura In-8. Esquema que muestra, de forma resumida, la cadena de transporte electrónico y generación de especies reactivas de oxígeno por parte de los complejos mitocondriales.....	23
Figura In-9. Estructura química del kaempferol (3, 5,7,4-tetrahidroxiflavona).	25
Figura In-10. Estructura del coenzima Q y sus estados rédox	30
Figura In-11. Clasificación de los ácidos grasos atendiendo al número de dobles enlaces.....	34
Figura In-12. Principales representantes de cada uno de los grupos de ácidos grasos	34

Resultados

Figura Tk-1. Niveles Q ₉ , Q ₁₀ , ratio Q ₉ /Q ₁₀ y Q total en células Tkpts. Efecto del tratamiento con suplemento de Q ₁₀ 2 y 10 μM	90
Figura Tk-2. Niveles de subunidades marcadoras de complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol y ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico (pHB) e inhibidor, ácido <i>p</i> -aminobenzoico (PABA), de la síntesis endógena de Q	92
Figura Tk-3. Niveles de subunidades marcadoras de complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en extractos totales de células Tkpts. Efecto del suplemento con Q ₁₀ exógeno a 2 μM y del tratamiento combinado con el inhibidor de su síntesis PABA	94

Figura Tk-4. Niveles de subunidades marcadoras de complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en extractos totales de células Tkpts. Efecto del suplemento con Q ₁₀ exógeno a 10 μM y del tratamiento combinado con el inhibidor de su síntesis endógena PABA	95
Figura Tk-5. Niveles de OCR y ECAR en células Tkpts. Efecto del tratamiento con Q ₁₀ exógeno y PABA.....	97
Figura Tk-6. Niveles de OCR y ECAR en células Tkpts. Efecto del tratamiento con pHB y PABA	98
Figura Tk-7. Niveles de OCR y ECAR en células Tkpts. Efecto del tratamiento con kaempferol y PABA	99
Figura Tk-8. Niveles de superóxido mitocondrial y potencial de membrana ($\Delta\Psi$) en células Tkpts. Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol y pHB e inhibidor, PABA, de la síntesis endógena de Q	100
Figura Tk-9. Grado de oxidación de proteínas en extractos totales de células Tkpts.Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol y pHB e inhibidor, PABA, de la síntesis endógena de Q	101
Figura Tk-10. Grado de oxidación de proteínas en extractos mitocondriales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con precursores de la síntesis endógena de Q, kaempferol y pHB	102
Figura Tk-11. Patrón de acetilación de proteínas en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento simple con kaempferol y combinado con kaempferol y nicotinamida.....	103
Figura Tk-12. Niveles de peróxido y superóxido intracelulares en células Tkpts. Efecto del tratamiento simple conkaempferol y combinado con kaempferol y nicotinamida.....	104
Figura Tk-13. Niveles de superóxido mitocondrial en células Tkpts. Efecto del tratamiento simple con kaempferol y combinado con kaempferol y nicotinamida.....	105
Figura Tk-14. Niveles de VDAC y Complejo V en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento simple con kaempferol y combinado con kaempferol y nicotinamida.....	106
Figura Tk-15. Niveles de masa mitocondrial. Efecto del tratamiento simple con kaempferol y combinado con kaempferol y nicotinamida	106
Figura Tk-16. Niveles de Drp 1 en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol y pHB e inhibidor, PABA, de la síntesis endógena de Q	107
Figura Tk-17. Niveles de Fis 1 en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol y pHB e inhibidor, PABA, de la síntesis endógena de Q.....	108

Figura Tk-18. Niveles de Mfn1 en extractos totales de células Tkpts.Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol y pHB e inhibidor, PABA, de la síntesis endógena de Q.....	109
Figura Tk-19. Niveles de Mfn2 en extractos totales de células Tkpts.Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol y pHB e inhibidor, PABA, de la síntesis endógena de Q.....	110
Figura Tk-20. Niveles de OPA1 en extractos totales de células Tkpts.Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol y pHB e inhibidor, PABA, de la síntesis endógena de Q	111
Figura Tk-21. Niveles de mTOR, fosfo mTOR y ratio fosfo mTOR/mTOR en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol y pHB e inhibidor, PABA, de la síntesis endógena de Qy del tratamiento con Q ₁₀ exógeno	113
Figura Tk-22. Niveles de Beclina 1 en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol y pHB e inhibidor, PABA, de la síntesis endógena de Q	115
Figura Tk-23. Niveles de Beclina 1 en extractos totales de células Tkpts. Efecto del suplemento con Q ₁₀ exógeno y del tratamiento con el inhibidor de su síntesis endógena PABA.....	115
Figura Tk-24. Niveles de p62 y sus formas ubiquitiniladas en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol y pHB e inhibidor, PABA, de la síntesis endógena de Qy del tratamiento con Q ₁₀ exógeno	117
Figura Tk-25. Niveles de LC3 en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con precursores, kampferol y pHB, e inhibidores, PABA, de la síntesis endógena de Q.....	119
Figura Tk-26. Niveles de LC3 en extractos totales de células Tkpts. Efecto del suplemento con Q ₁₀ exógeno y del tratamiento con el inhibidor de su síntesis endógena PABA.....	120
Figura Tk-27. Determinación del flujo autofágico mediante citometría de flujo en células Tkpts. Efectos sobre el flujo autofágico de tratamientos que incrementan los niveles de Q (kaempferol, pHB, Q ₁₀) y que los disminuyen (PABA).....	121
Figura Tk-28. Niveles de expresión de ARNm de los genes Sqtsm1 (p62), Map13ca y Map13cb. Efecto de tratamientos que incrementan los niveles de Q, (kaempferol y Q ₁₀) o que lo disminuyen (PABA).....	122
Figura Tk-29. Niveles de Trx 1 en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol y pHB e inhibidor, PABA, de la síntesis endógena de Q.....	123
Figura Tk-30. Niveles de Trx 1 en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con Q ₁₀ exógeno y PABA	124
Figura Tk-31. Niveles de expresión de ARNm del gen Txn 1 en células Tkpts. Efecto de tratamientos que incrementan los niveles de Q, (kaempferol y Q ₁₀) o que lo disminuyen (PABA)	124

Figura Tk-32. Curva de toxicidad del tratamiento con tioconazol en células Tkpts	125
Figura Tk-33. Efecto del tratamiento con tioconazol sobre los niveles de LC3 en extractos totales de células Tkpts	126
Figura Tk-34. Efecto del tratamiento con tioconazol sobre los niveles de Trx 1 en extractos totales de células Tkpts.	127
Figura Tk-35. Efecto del tratamiento combinado con Q ₁₀ y tioconazol sobre los niveles de LC3 en extractos totales de células Tkpts	128
Figura Tk-36. Efecto del tratamiento combinado con Q ₁₀ y tioconazol sobre los niveles de Trx 1 en extractos totales de células Tkpts.	129
Figura He-1. Acumulación de gotas lipídicas en células Hepa 1.6 tratadas con las emulsiones lipídicas Lipoplus y ClinOleic.....	131
Figura He-2. Cuantificación del grado de acumulación de gotas lipídicas en células Hepa 1.6 tratadas con las emulsiones lipídicas Lipoplus y ClinOleic	131
Figura He-3. Niveles de Mfn2 en extractos totales de células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con las emulsiones lipídicas Lipoplus y ClinOleic	132
Figura He-4. Actividades de la cadena de transporte electrónico en mitocondrias aisladas a partir de células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con las emulsiones lipídicas Lipoplus y Lipofundina.....	134
Figura He-5. Niveles de OCR y ECAR en células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con las emulsiones lipídicas Lipoplus y ClinOleic.....	135
Figura He-6. Niveles de masa mitocondrial en células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con las emulsiones lipídicas Lipoplus y ClinOleic.....	136
Figura He-7. Niveles de PINK1 y Parkin en extractos totales de células Hepa 1.6.Efecto del tratamiento con las emulsiones lipídicas Lipoplus y ClinOleic	137
Figura He-8. Niveles de subunidades marcadoras de complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en extractos totales de células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con las emulsiones lipídicas Lipoplus y ClinOleic.....	139
Figura He-9. Generación de especies reactivas de oxígeno en células Hepa 1.6.Efecto del tratamiento con las emulsiones lipídicas Lipoplus y ClinOleic	141
Figura He-10. Determinaciones de potencial mitocondrial ($\Delta\Psi$) en células Hepa 1.6.Efecto del tratamiento con las emulsiones lipídicas Lipoplus y ClinOleic	141
Figura He-11. Determinación del grado de oxidación de proteínas en extractos totales de células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con las emulsiones lipídicas Lipoplus y ClinOleic...	142

Figura He-12. Niveles de hidroperóxidos en extractos totales de células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con las emulsiones lipídicas Lipoplus, Lipofundina y ClinOleic.....	143
Figura He-13. Niveles de mTOR, fosfo mTOR y ratio fosfo mTOR/mTOR en extractos totales de células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con las emulsiones lipídicas Lipoplus y ClinOleic	144
Figura He-14. Niveles de Beclina 1 en extractos totales de células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con las emulsiones lipídicas Lipoplus y ClinOleic	145
Figura He-15. Emulsiones lipídicas (Lipoplus y ClinOleic) y niveles de p62 y sus formas ubiquitiniladas en extractos totales de células Hepa 1.6	146
Figura He-16. Emulsiones lipídicas (Lipoplus y ClinOleic) y niveles de LC3 en extractos totales de células Hepa 1.6	148
Figura He-17. Dinámica de LC3. Efecto del tratamiento con las emulsiones lipídicas Lipoplus y ClinOleic	149
Figura He-18. Efecto de las emulsiones lipídicas (Lipoplus y ClinOleic) sobre el flujo autofágico determinado mediante citometría de flujo en células Hepa 1.6.....	149
Figura He-19. Inhibición de la biosíntesis de Q con PABA y niveles de p62 en extractos totales de células Hepa 1.6	151
Figura He-20. Inhibición de la biosíntesis de Q con PABA y niveles de LC3 en extractos totales de células Hepa 1.6	152
Figura He-21. Efecto de la inhibición de la biosíntesis de Q sobre la dinámica de LC3.....	154
Figura He-22. Efecto del suplemento con Q ₁₀ exógeno sobre los niveles de p62 y la dinámica de la proteína en extractos totales de células Hepa 1.6	155
Figura He-23. Efecto del suplemento con Q ₁₀ exógeno sobre los niveles de LC3 en extractos totales de células Hepa 1.6	156
Figura He-24. Efecto del suplemento con Q ₁₀ exógeno sobre la dinámica de LC3.....	157
Figura Mu-1. Área de las figuras de autofagia en zonas intermiofibrilares y subsarcolémicas de fibras rojas de músculo esquelético.....	159
Figura Mu-2. Perímetro de las figuras de autofagia en zonas intermiofibrilares y subsarcolémicas de fibras rojas de músculo esquelético.....	161
Figura Mu-3. Densidad numérica de las figuras de autofagia en zonas intermiofibrilares y subsarcolémicas de fibras rojas de músculo esquelético.....	163
Figura Mu-4. Densidad de volumen de las figuras de autofagia en zonas intermiofibrilares y subsarcolémicas de fibras rojas de músculo esquelético.....	164

Figura Mu-5. Fibras rojas cortadas transversalmente procedentes del músculo gastrocnemio de ratones sometidos a las distintas intervenciones nutricionales observadas mediante microscopía electrónica	166
Figura Mu-6. Figuras de autofagia y mitocondrias alteradas en fibras de músculo esquelético	167
Figura Mu-7. Niveles de Beclina 1 en homogenado total de músculo esquelético. Efecto de la restricción calórica y del origen de la grasa de la dieta.....	168
Figura Mu-8. Niveles p62 en homogenado total de músculo esquelético. Efecto de la restricción calórica y del origen de la grasa de la dieta.....	169
Figura Mu-9. Niveles de LC3I, LC3II y ratio LC3 en homogenado total de músculo esquelético. Efecto de la restricción calórica y del origen de la grasa de la dieta.....	171
Figura Mu-10. Ratio de LC3. Efecto de la restricción calórica y del origen de la grasa de la dieta.....	172
Figura Mu-11. Niveles de PINK1 en homogenado total de músculo esquelético. Efecto de la restricción calórica y del origen de la grasa de la dieta.....	173
Figura Mu-12. Niveles de Parkin en homogenado total de músculo esquelético. Efecto de la restricción calórica y del origen de la grasa de la dieta.....	174
Figura Mu-13. Daño oxidativo en proteínas en homogenado total de músculo esquelético de los diferentes grupos dietéticos. Efecto de la restricción calórica y del origen de la grasa de la dieta	176
Figura Mu-14. Niveles de subunidades marcadoras de los complejos de la cadena de transporte electrónico en homogenado total de músculo esquelético de los diferentes grupos dietéticos. Efecto de la restricción calórica	178
Figura Mu-15. Niveles de subunidades marcadoras de los complejos de la cadena de transporte electrónico en homogenado total de músculo esquelético de los diferentes grupos dietéticos. Efecto del origen de la grasa de la dieta.....	179
Figura Hi-1. Área y perímetro de las figuras de autofagia en hepatocitos. Efecto de la restricción calórica y del origen de la grasa de la dieta.....	181
Figura Hi-2. Densidad numérica y densidad de volumen de las figuras de autofagia en hepatocitos. Efecto de la restricción calórica y del origen de la grasa de la dieta.....	183
Figura Hi-3. Porciones de hepatocitos de ratones sometidos a las diferentes intervenciones nutricionales durante 6 meses observadas al microscopio electrónico	184

Figura Hi-4. Porciones de hepatocitos de ratones sometidos a las diferentes intervenciones nutricionales durante 18 meses observadas al microscopio electrónico	185
Figura Hi-5. Niveles de Beclina 1 en homogenado total de hígado de los distintos grupos dietéticos. Efecto de la restricción calórica y del origen de la grasa de la dieta.....	186
Figura Hi-6. Niveles de p62 en homogenado total de hígado de los diferentes grupos dietéticos. Efecto de la restricción calórica y del origen de la grasa de la dieta.....	187
Figura Hi-7. Niveles de LC3I y LC3II en homogenado total de hígado de los diferentes grupos dietéticos. Efecto de la restricción calórica y del origen de la grasa de la dieta	189
Figura Hi-8. Ratio de LC3 en homogenado total de hígado de los diferentes grupos dietéticos. Efecto de la restricción calórica y del origen de la grasa de la dieta.....	191
Figura Hi-9. Niveles de PINK1 en homogenado total de hígado de los diferentes grupos dietéticos. Efecto de la restricción calórica y del origen de la grasa de la dieta	192
Figura Hi-10. Daño oxidativo en proteínas en homogenado total de hígado de los diferentes grupos dietéticos. Efecto de la restricción calórica y del origen de la grasa de la dieta.....	194
Figura Hi-11. Niveles de subunidades marcadoras de la cadena de transporte electrónico en homogenado total de hígado de los diferentes grupos dietéticos. Efecto de la restricción calórica	196
Figura Hi-12. Niveles de subunidades marcadoras de los complejos de la cadena de transporte electrónico en homogenado total de hígado de los diferentes grupos dietéticos. Efecto del origen de la grasa de la dieta	198

Índice de tablas

Material y métodos

Tabla M1. Composición de las dietas utilizadas para cada grupo de estudio	68
Tabla M2. Abundancia de los distintos ácidos grasos en cada una de las grasas utilizadas en la elaboración de las dietas.....	68
Tabla M3. Anticuerpos utilizados en la determinación de proteínas envueltas en la ruta de autofagia, mitofagia y patrón de acetilación proteico	72
Tabla M4. Anticuerpos utilizados en la determinación de subunidades de los complejos de la CTE, de tiorredoxina 1, y en la detección de los grupos DNP de proteínas carboniladas	72

Tabla M5. Anticuerpos utilizados en la determinación proteínas de fusión y fisión mitocondrial
..... 73

Tabla M6. Cebadores utilizados para la amplificación de los genes de interés y sus secuencias
..... 82

Abreviaturas

AA	Ácido araquidónico
AD	Enfermedad de Alzheimer
ADP	Adenosín difosfato
ALA	Ácido α -linolénico
AMBRA1	Molécula activada en la autofagia regulada por Beclina 1
AMP	Adenosín monofosfato
AMPK	Quinasa dependiente de adenosin monofosfato
APS	Síndrome antifosfolipídico
Atg	Genes relacionados con autofagia
ATP	Adenosín trifosfato
BAT	Tejido adiposo pardo
Bax	Proteína X asociada a Bcl-2
Bcl-2	<i>B cell CLL/lymphoma 2</i>
BHT	Butilhidroxitolueno
BNIP3L/NIX	Proteína tipo 3 de interacción con Bcl-2
CAMKK2/CaMKK β	Proteína quinasa quinasa 2 y β dependientes de calcio/calmodulina
CHO	Células de ovario de hámster chino
CLAP	Quimostatina, leupeptina, antipaína y pepstatina
CMA	Autofagia mediada por chaperonas
CMT2A	Enfermedad Charcot-Marie Tooth tipo 2A
Cq	Cloroquina
CTE	Cadena de transporte electrónico
DBH ₂	Deciubiquinol
DBI	Índice de dobles enlaces
DCDHF	Diclorodihidrofluoresceína
DCDHF-DA	Diclorodihidrofluoresceína diacetato
DCF	Diclorofluoresceina
DCPIP	2,6-dicloroindofenol
DHA	Ácido docosaheptaenoico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNP	Dinitrofenilhidrazona
DNPH	Dinitrofenilhidrazina

DRP 1	Proteína 1 relacionada con Dinamina
DTT	Ditiotreitol
DY	Potencial de membrana mitocondrial
ECAR	Ratio de acidificación extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFA	Ácidos grasos esenciales
EIR	Región de interacción con enzimas E2-ubiquitin ligasas
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FADH ₂	Forma reducida del dinucleótido de flavina y adenina
FCCP	Carbonilcianuro- <i>p</i> -trifluorometoxifenilhidrazona
FIP200	Proteína de interacción de 200 KD
Fis 1	Proteína 1 de fisión mitocondrial
FoxO	<i>Transcription Factor of forkhead box</i>
FYCO1	<i>FYVE and coiled-coil domain containing 1</i>
GABARAP	Proteína asociada al receptor gamma-aminobutírico
GBM	Glioblastoma multiforme
GTP	Guanosín trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HEK 293	Células humanas embrionarias de riñón 293
HeLa	Células humanas de cáncer de cérvix uterino
Hepa 1.6	Células de hepatocarcinoma de ratón 1.6
HEt	Hidroetidina
HFD	Dieta alta en grasa
4-HNE	4-hidroxinonenal
HL-60	Células leucemia promielocítica humana
HO ₂ [·]	Radical hidroperoxilo
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HT-22	Células neuronales de hipocampo de ratón
HUVEC	Células primarias de la vena del cordón umbilical humanas
IGF1R	Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1
IMM	Membrana mitocondrial interna
IRS1, 2	Sustrato 1 y 2 del receptor de insulina
IUPAC	Unión internacional de química pura y aplicada

JC-1	5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-yoduro de tetraetil-benzimidazol-carbocianina
K	Kaempferol
KIF 1B-b	Miembro de la familia de las kinesinas 1B-b
KIF 2A	Miembro de la familia de las kinesinas 2A
KIF5B	Miembro de la familia de las kinesinas 5B
LA	Ácido linoleico
LAMP-1	Proteína 1 asociada a membrana del lisosoma
LAMP-2A	Proteína 2A asociada a membrana del lisosoma
LC3	Proteína 1 asociada a microtúbulos de cadena ligera 3
LIR	Región de interacción con LC3
L-OPA1	Forma larga de OPA1
MAMs	Membranas de asociación a mitocondrias
MC3T3-E1	Células osteoblásticas
MEFs	Fibroblastos embrionarios de ratón
Mfn1	Mitofusina 1
Mfn2	Mitofusina 2
MnSOD	Superóxido dismutasa mitocondrial
mTOR	Diana de rapamicina en mamíferos
mTORC1/C2	Complejo 1 y complejo 2 de la diana de rapamicina en mamíferos
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
MuRF1	<i>Muscle RING-finger Protein-1</i>
NAD ⁺	Forma oxidada del dinucleótido de adenina y nicotinamida
NADH	Forma reducida del dinucleótido de adenina y nicotinamida
NADP ⁺	Forma oxidada del dinucleótido fosfato de adenina y nicotinamida
NADPH	Forma reducida del dinucleótido de adenina y nicotinamida
NAM	Nicotinamida
Nampt	Nicotinamida fosforibosiltransferasa
Na	Densidad numérica
O ₂ ⁻	Radical superóxido

OA	Ácido oleico
OCR	Ratio de consumo de oxígeno
OH·	Radical hidroxilo
OMM	Membrana mitocondrial externa
OPA1	Proteína de atrofia óptica 1
p62/SQTSM1	Sequestosoma 1
PA	Ácido palmítico
PABA	Ácido <i>para</i> -aminobenzoico
Parkin	Proteína 2 asociada a la enfermedad de Parkinson juvenil
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Enfermedad de Parkinson
PDSS1 y PDSS2	Subunidad 1 y 2 de la poliprenil difosfato sintasa
PE	Fofatidil etanolamina
PGC1- α	Coactivador 1-alfa del Receptor gamma Activado por Proliferadores de Peroxisomas
pHB	Ácido <i>para</i> -hidroxibenzoico
PI (3) P	Fosfatidil inositol 3-fosfato
PIK3	Fosfoinositol 3-quinasa
PINK1	Quinasa putativa 1 inducida por PTEN
PLIN1	Perilipina 1
PMRS	Sistema rédox de la membrana plasmática
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PTPm	Poros de transición de permeabilidad mitocondrial
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
Q	Coenzima Q
Q ⁻	Ubisemiquinona
QH ₂	Coenzima Q reducido o ubiquinol
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
RAB	Proteína relacionada con Ras en el cerebro
RAP	Rapamicina
RC	Restricción calórica

RE	Retículo endoplásmico
RILP	Proteínas lisosomales de interacción con RAB
RIPA	Ensayo de radio-inmunoprecipitación
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SA	Ácido esteárico
SDS	Dodecil sulfato sódico
SEM	Error estándar de la media
SFA	Ácidos grasos saturados
SH-SY5Y	Células de neuroblastoma
Sirt1-7	Sirtuinas 1-7
SK-HEP-1	Células de hepatocarcinoma humano
SNARE	Receptor de la proteína de unión soluble a factor sensible a NSF
SOD	Superóxido dismutasa
S-OPA1	Forma corta de OPA1
TBARS	Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
Tc	Tioconazol
TG	Triglicéridos
Tkpts	Células epiteliales de túbulo contorneado proximal de riñón de ratón
TSC1/TSC2	Proteínas mutadas en la esclerosis tuberosa
UBA	Dominio de unión a ubiquitina
UCPs	Proteínas desacoplantes
ULK1	Proteína quinasa 1 similar a Unc-51
VDAC	Canal de aniones dependiente de voltaje
V _v	Densidad de volumen
WIPI	<i>WD-repeat protein</i>

Abstract

Introduction

Autophagy is an intracellular process through which portions of the cytoplasm, organelles such as mitochondria and peroxisomes, protein aggregates and infectious agents are degraded by the action of lysosomes. Three types of autophagy have been defined: macroautophagy (referred to as autophagy hereafter), microautophagy and chaperone-mediated autophagy (CMA).

Autophagy begins with the isolation of a membrane section, known as phagophore, that can be originated from lipid bilayers derived from the endoplasmic reticulum (ER), and / or from the Golgi trans network, as well as from endosomes. This process is regulated by the action of several multiproteic complexes that act in coordination to form autophagic vesicles that contain the material to be degraded, called autophagosomes. The first regulatory complex, that promotes the isolation of the membrane, is the “pre-initiation” complex formed by ULK1 kinase protein, ATG13, ATG10 and FIP200. This tetrameric complex acts on the initiation complex, composed by VPS34, VPS15, Beclin 1 and ATG14, which allows the assembly of the elongation machinery of the phagophore. Subsequently, two ubiquitin-like conjugation systems participate in the phagophore elongation and in the autophagosome maturation process. The first conjugation reaction will lead ATG12/ATG5/ATG16L1 complex, which participates in the conjugation of ATG8 family proteins, specifically LC3, with the lipid phosphatidylethanolamine (PE). These processes will determine the phagophore elongation, the hemifusion of its edges giving rise to the autophagosomes and its subsequent maturation. Afterwards, these vesicles fuse with lysosomes for the degradation of their content, a process that is facilitated by the cytoskeleton and by proteins such as RAB7. The regulation of this process is mediated by “metabolic sensors”, being crucial the role of AMPK which acts as a positive regulator of this pathway, and mTORC1 complex which acts as an inhibitor. Both regulate directly or indirectly ULK1. Posttranslational modifications of Beclin 1 and its partners in the “initiation complex” are key regulators of this process. Autophagy can proceed as a bulk process under nutrient-deprived conditions, or can be also very highly selective in the degradation of selected organelles. When this process involves the selective degradation of mitochondria, a phenomenon known as mitophagy, it can be regulated by two pathways: The first one is mediated by the protein BNIP1/NIX, which acts in the maturation processes of some cell lines, whereas the second one is mediated by the

PINK1/Parkin system, which enables the turnover of non-functional mitochondrial. The p62 polypeptide plays an important role in this type of mitophagy.

Another important point to be addressed in the present work is focused on reactive oxygen species (ROS), a term used to refer to various reactive oxygen derivatives, whether or not being free radicals. The main ROS that can be found at the cellular level are the hydroxyl radicals (OH \cdot), the superoxide radicals (O $_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H $_2$ O $_2$). These species interact with the main cellular biomolecules, causing damage to DNA, proteins and lipids, thus leading to a variety of deleterious processes.

The mitochondria plays a fundamental role in cellular metabolism because it is responsible for generating ATP through the action of the electron transport chain (ETC), composed of a group of multiprotein complexes located in the inner mitochondrial membrane (IMM). In addition, the mitochondria has been characterized as one of the main ROS sources at cellular level. Specifically, the formation of O $_2^{\cdot-}$ within the ETC takes place mainly at two points: the complex I (NADH-dehydrogenase), highlighting the role of flavin mononucleotide and iron-sulfur centers in the release of O $_2^{\cdot-}$ towards the mitochondrial matrix; and the complex III (Ubiquinol: cytochrome *c* oxidoreductase), which produces this reactive species from the coenzyme Q cycle to the cytosolic side of the IMM. ROS production by the ETC seems to be due to the blockage of the electrons in the complexes, a condition that is produced when the input rate of electrons exceeds their passage through the components of the chain.

In the present thesis, the role of different phenolic compounds in processes such as autophagy and mitochondrial function is also analyzed. Phenolics are secondary metabolites in plants, which contain a common aromatic ring bearing one or more hydroxyl groups. They are classified according to their origin, biological function, and chemical structure. With regards to their abundance, they can be classified into two groups: flavonoids and non-flavonoid compounds. The first ones are the most numerous, comprising 15 carbons with two aromatic rings connected by a three-carbon bridge.

Several studies have strongly supported the antioxidant capacity of flavonoids, so its consumption is associated with a lower risk of cancer or cardiovascular diseases. Furthermore, these compounds can alleviate oxidative DNA damage and can prevent

lipid peroxidation in a wide range of cell lines. However, at high doses they can act as pro-oxidants inducing processes such as apoptosis. Within these compounds, kaempferol (3,5,7,4-tetrahydroxyflavone) is a flavonol present in a large amount of vegetables and fruits, exerting several biological functions, among which its anti-inflammatory capacity is remarkable.

Many studies carried out with different cell types have determined the effect of kaempferol decreasing ROS production. However, a treatment with this compound at high concentrations for long periods increases the production of reactive species in another study models. This compound can modulate the autophagy pathway acting on many targets, thus enhancing processes which include cellular protection against different types of stresses and cell differentiation.

Coenzyme Q (Q) is another important molecule on which we have focused our research, a lipid whose structure comprises a benzoquinone ring connected to a polyisoprenoid side chain. This molecule plays many roles in the cell that can be divided between those performed locally in the mitochondria, and those carried out in other cellular compartments. Whithin the mitochondria, Q acts as an electron carrier of the ETC. It also acts as cofactor of uncoupling proteins (UCPs), prevents the opening of the permeability transition pore (mPTP), and can act as a terminal electron acceptor in the pyrimidines synthesis pathway. Among their extra-mitochondrial functions, this molecule is part of the plasma membrane redox system (PMRS) and belongs to the non-enzymatic antioxidant machinery together with additional small molecules such as flavonoids or glutathione.

Fatty acids are biomolecules composed by a carboxyl group linked to a long hydrocarbon chain, that are normally found taking part of complex lipid molecules as fundamental components of biological membranes. Attending to the presence of double bonds (unsaturations) between the carbons of the carbon chain, fatty acids can be classified as: saturated fatty acids (SFA), with no double bonds, and unsaturated ones which contain a variable number of unsaturations. To this sense, according to the number of double bonds, two groups can be established: monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA). Given the inability of cells to synthesize some types of fatty acids that are necessary for several biological functions, these must be obtained from the diet. These fatty acids, known as "essential fatty acids"

(EFA), are classified mainly into two families: the n-3 and the n-6 series. Some studies have determined the ability of cell membranes to adapt their lipid composition depending on the predominant fat that is incorporated in the diet, leading to biochemical alterations in cells, and especially in mitochondrial membranes. In this way, fats rich in PUFA, such as soybean and fish oils, give rise to membranes that are more susceptible to oxidative damage because the carbons that are part of the unsaturations are more prone to suffer oxidative attack than fats rich in SFA and MUFA, such as animal fat or olive oil respectively. This may be one of the reasons by which alterations in lipidome can be related with processes such as aging.

Several studies have suggested that fatty acids can regulate the autophagic process. For instance, palmitic acid (PA) enhances autophagy in rat INS-1 pancreatic β cells protecting them from apoptosis. However, other researchers have determined that it is oleic acid (OA), and not PA, the one increasing the formation of autophagic vesicles, with also increasing the expression of proteins related to this mechanism in HepG2 cells and primary mouse hepatocytes. Autophagy induced by n-3 series PUFA contributes to a more efficient recovery from renal damage induced by ischemia / reperfusion in Fat-1 mice. Moreover, the increase in the efficiency of this pathway promoted by these fatty acids favors cytotoxicity in tumor cells and promotes apoptosis. Finally, n-6 series fatty acids enhance autophagy flux increasing the longevity in *C. elegans*.

Another essential point of the present work is the study of different nutritional interventions on aging, and more specifically the relationship of these interventions with the autophagy pathway. Aging can be defined as the time-dependent progressive loss of function in the different tissues of an organism due to the degradation of their components at a molecular level, thus leading to lower fertility and increased susceptibility to suffer a variety of age-related diseases. Although not without controversy, the so-called "Free Radicals Theory of Aging" provides a solid foundation to explain this process. It is postulated that the production of ROS, especially at the mitochondrial level, progressively damages different cellular biomolecules. The inability of the cellular antioxidant response to counteract this chronic oxidative damage results in the progressive accumulation of lesions and, ultimately, in the loss of functionality of these components. Closely related to this theory, it has been also postulated that the features of lipids that make up the cell membranes affect the intensity of the oxidative damage to which they are exposed, therefore affecting aging and

longevity. Several comparative studies have determined that double bonds index (DBI) of membrane lipids is higher in animals with a shorter maximum longevity.

Caloric restriction (CR), considered as a decrease in calorie intake without malnutrition, is the best defined non-genetic or pharmacological intervention that consistently increases longevity and promotes healthy aging in many species. This intervention can act *via* the decrease of ROS production, the enhancement of an antioxidant response that is responsible for their elimination, and also the promotion of repair systems that amend the damages induced by them. Since the mitochondria are the main source of ROS generation, part of the beneficial effects of CR on longevity most likely derives from an improvement in mitochondrial function. In addition, this intervention can redistribute the type of predominant unsaturation of fatty acids in certain tissues, making the membranes less susceptible to oxidative damage. It has been widely established that during aging there is a decrease in the cell proteolytic capacity, which has been considered responsible, at least in part, for the accumulation of damaged components in the tissues of old animals. In various tissues, such as heart, brain, liver, muscle and kidney, certain morphological characteristics have been observed (such as the expansion of the lysosomal compartments, accumulation of vacuoles and deposition of undigested material enriched in lipofuscin) that point to a loss of autophagy efficiency in old animals. Other investigations carried out through genetic approaches in different study models, have determined that the lack of functionality of certain autophagy-related genes promotes phenotypes associated with aging, and even cause a decrease in the lifespan of these organisms in some cases. Defects in the autophagy pathway have also been associated with diseases showing a high prevalence in the aged population: neurological disorders, cancer, different immunosenescence processes, as well as myopathies. There are indications that CR induces improvements in the autophagic process, since individuals submitted to this intervention have a lower amount of damaged cellular components and biomolecules than those fed *ad libitum*. At the cellular level, it has also been reported that CR induces alterations in the autophagic pathway by the activation of two "energy sensors": AMPK and sirtuin 1, which establish a positive feedback loop for mutual activation. In addition, this intervention promotes autophagy by inhibiting the signaling pathway mediated by insulin-like growth factors, which ultimately results in the inhibition of mTOR. The replacement of mitochondria by mitophagy is also favored by this nutritional intervention, since it

increases the expression of proteins related to this process (PINK1, Parkin and BNIP3L) in the kidney of old rats compared to animals fed a high calorie diet. Although it seems evident that a better functioning of the autophagy route prevents the appearance of events associated with aging, the persistent activation of this process does not seem to be an ideal anti-aging intervention, since investigations carried out in progeric mice showed that the increase in this pathway contributed to the systemic degeneration suffered by these animals.

Finally, we must emphasize the importance of mitochondrial dynamics processes, which allow cells to adapt to the requirements of energy demand, lipid biogenesis and fatty acid synthesis, among other processes, depending on the conditions of the environment. For this, the mitochondria are subjected to modulation of their dynamic properties, being able to merge, divide, move or tether to other organelles such as the ER. In this process, a family of GTPase proteins belonging to DRP subfamily is a key component. Within this family, Drp1 and Fis1 proteins participate in mitochondrial fission, while mitofusins 1 and 2 (Mfn1 and Mfn2) and the OPA1 proteins play a fundamental role in mitochondrial fusion. Alterations in the machinery of mitochondrial dynamics have been associated with numerous pathologies.

Objectives

One of the main objective of this PhD dissertation is to analyze the role played by coenzyme Q in relation with the mitochondrial physiology and the autophagy route in several *in vitro* systems through pharmacologic and nutritional interventions.

To accomplish this objective, the following specific objectives are pursued:

1. To study the alterations of mitochondrial physiology, at the level of abundance of marker subunits of the electron transport chain complexes and generation of reactive oxygen species, in response to treatments that increase coenzyme Q levels in the kidney cell line Tkpts. Such an increment will be accomplished both endogenously (by providing to the cultures several recognized biosynthetic precursors, as kaempferol and *para*-hydroxibenzoic acid), and exogenously (through direct supplementation with coenzyme Q₁₀). In addition, it is our aim to

elucidate the role played by the mitochondrial sirtuin (Sirt3) mediating the effects elicited by the polyphenol kaempferol.

2. To determine in the kidney cell line Tkpts possible alterations in the mitochondrial dynamics processes and the role played by coenzyme Q this modulation.
3. To study the modification in the autophagy route that are influenced by coenzyme Q levels in the kidney cell line Tkpts.
4. To determine the alterations in the mitochondrial physiology that are mediated by the nature of several lipid supplements in the murine hepatocarcinoma cell line Hepa 1.6.
5. To study in the cell line Hepa 1.6 those alterations in the autophagic route in response to different lipid supplements and the putative involvement of coenzyme Q levels in this response.

The other main objective of this PhD dissertation is to analyze how caloric restriction and fat content of the diet influence the autophagic route in an *in vivo* model, by analyzing the response of a post-mitotic (skeletal muscle) and a mitotic tissue (liver) in mice subjected to caloric restriction with diets that contain each of three different lipid sources that differ in the unsaturation degree of fatty acids: lard, soybean oil and fish oil.

To accomplish this objective, the following specific objectives are pursued.

1. To determine following a structural approach the alterations in the autophagy route in both tissues in response to caloric restriction and dietary fat content.
2. To analyze the alterations in the autophagy route by determining several protein effectors that participate in the pathway, as a function of caloric restriction and and the nature of dietary fat.

Material and methods

Two cell lines from different origin have been used to perform the present study: Tkpts (derived from mouse kidney proximal convoluted tubule epithelium) and Hepa 1.6 (derived from murine hepatocellular carcinoma). To study the implication of Q in different cellular processes, Tkpts cells were treated with precursors of the endogenous synthesis of this molecule, namely kaempferol (K, at 10 μ M) and *p*-hydroxybenzoic acid (pHB, at 1 μ M), and with an inhibitor of Q endogenous synthesis, *p*-aminobenzoic acid (PABA, at 1 mM), as well as supplementation of culture medium with exogenous Q₁₀. In addition, to determine the influence of fatty acids and the possible involvement of Q in such cellular processes, Hepa 1.6 cells were treated with three lipid emulsions: Lipofundin MCT/LCT (source of n-6 PUFA), Lipoplus (source of n-3 PUFA) and ClinOleic (source of n-9 MUFA).

C57BL/6 strain mice were used as an animal model to analyze the effect of aging, CR and the predominant fat source of the diet on the autophagy route, the expression of marker subunits of the ETC complexes and the oxidative damage in proteins in different tissues. For this, four experimental groups were established: one control group fed with 95% of a previously calculated *ad libitum* intake, to avoid developments of obesity of individuals, and three groups that were submitted to 40% of CR which were fed diets that varied in the source of fat. In the control group (Ctrl.Soy group) and in one of the CR groups (CR.Soy group) the fat source was soybean oil (rich in PUFA n-6), while in the remaining CR groups the fat source was fish oil (rich in n-3 PUFA, CR.Fish group) or lard (rich in SFA and MUFA n-9, CR.Lard group).

For determinations of effectors of the autophagy pathway, mitochondrial dynamics and markers subunits of the ETC complexes, total extracts were obtained from the corresponding cell cultures by using RIPA buffer. To obtain the total tissue homogenates, the organs were cut and then homogenized with a Potter Elvehjem homogenizer (Teflon-glass) and subsequently dispersed with a mechanic tissue disrupter (Ultra-Turrax). For each tissue, a homogenization buffer was used with optimized composition depending on the particular requirements. In all cases, both for cells and tissues buffers were supplemented with protease and phosphatase inhibitors to maintain the integrity of the proteins. The subsequent quantification of protein in the extracts and homogenates was carried out using the Bradford method. The determination of the levels of the different proteins of interest was carried out by

western blot and subsequent immunostaining with the appropriate primary and secondary antibodies. In the Hepa 1.6 cell line, measurements of lipid accumulations were performed using the Oil-Red O dye and subsequent absorbance determination by spectrophotometry.

Quantifications of ROS generation in the different cell lines were made by flow cytometry using different probes according to the species to be analyzed: dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCDHF-DA) for peroxides, hydroetidine (HEt) for intracellular superoxide, and MitoSOX for mitochondrial superoxide. Measurements of mitochondrial potential ($\Delta\Psi$) were carried out using the JC-1 probe. For autophagy flux assays, the flow cytometry CYTO-ID kit was used with cells that had been treated both in the presence and absence of chloroquine (Cq), an inhibitor of the fusion between autophagosomes and lysosomes.

The determinations of the mitochondrial function were carried out with a Seahorse XFe24 analyzer using the Phenotype test kit, to measure the oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) in the different cell lines and culture conditions, as required. Furthermore, the enzymatic activity of the ETC complexes was determined by the corresponding spectrophotometric assays using isolated mitochondria.

The oxidative damage in proteins was determined using the Oxyblot kit, and carbonyl groups were detected subsequently by immunodetection. Determinations of lipid peroxidation were carried out by using the FOX reagent.

Finally, planimetric and stereological measurements of autophagy figures were carried out using micrographs taken by transmission electron microscopy from liver and skeletal muscle tissues obtained from mice that had been subjected to the different nutritional interventions. Micrographs were subsequently analyzed with ImageJ software (N.I.H., USA).

Results and discussion

In Tkpts cell line, the ETC subunits were differentially regulated depending on the endogenous or exogenous origin of Q, being complex III the most affected by the levels

of this molecule. Thus, a substantial increase in complex III was observed in cells that had been cultured in the presence of any of the two precursors of Q biosynthesis, K and pHB, which was prevented when the treatments were combined with PABA, a competitive inhibitor of Q biosynthesis. In addition, the single treatment with PABA decreased by itself the levels of this complex with respect to untreated control cells. These results are in accordance with previous studies carried out in yeast, that confirmed the importance of Q levels in the maintenance of complex III function and stability. In the case of complex I, an increase was observed in cells treated with K, pHB and PABA, which supports that regulation of this complex by these compounds could be related to the existence of structural homology in these molecules (structurally, PABA differs from pHB in a single substituent of the benzoic ring). In the case of complexes II and IV, our results indicated that PABA could act as an inhibitor of the expression of both complexes, but only in the presence of their structural analogues K and pHB. No changes were observed for complex V. Although alterations of different marker subunits were also observed in the presence of the exogenous supplement of Q₁₀, this effect was observed when Q₁₀ was used at a concentration of 10 μM, while no effect was obtained at 2 μM. This result may indicate that the incorporation of exogenous Q₁₀ into the cellular compartments where it performs its metabolic or signaling function is rather inefficient, leaving most of the exogenous Q₁₀ sequestered in a compartment not relevant for these functions, such as the lysosomal compartment. Furthermore, our results support that PABA can exert effects on the regulation of the expression of the mitochondrial complexes independently of its action as an inhibitor of Q biosynthesis, since even in cells treated with high concentrations of Q₁₀, the effects were reverted by simultaneous treatment with PABA.

Mitochondrial function, as determined by the analysis of OCR and ECAR, was also affected by Q levels. Specifically, treatment with PABA decreased OCR, a result that is consistent with the fact that Q is the only electron carrier capable of donating electrons from complexes I and II to III and, therefore, alterations in the levels of this molecule induce changes in mitochondrial function. The recovery of this parameter in the presence of an exogenous supplement with Q₁₀ seems to indicate that, at 10 μM, the amount of Q that reaches the mitochondria favors the recovery of the O₂ consumption rate. On the other hand, treatment with K produced changes both in the OCR and in the ECAR, diminishing them independently of the effect this substance has on the Q levels.

This effect of K has been found in other cell lines. The generation of mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ decreased in cells treated with K but not in cells treated with pHB, while it considerably increased with the addition of PABA in both single and combined treatments. These results indicate that the action of phenolic compounds decreasing the production of mitochondrial ROS is related to their capacity as biosynthetic precursors of Q. However, in the case of treatment with pHB, its function as a precursor of Q synthesis does not appear to be sufficient to produce such effects, suggesting that additional actions may be necessary, that are carried out by K but not by pHB. However, despite producing alterations in the generation of mitochondrial $O_2^{\cdot-}$, none of the treatments induced alterations in the "oxy-proteome" of these cells.

In terms of mitochondrial dynamics, our results indicate that the regulation of fission and fusion proteins does not seem to clearly deal with Q levels. However, treatment with K could favor fission process rather than fusion in this cell line, since it significantly increased Drp1 levels and decreased Mfn1 and Mfn2 levels. These results are in accordance with those observed in the cell line SH-SY5Y, where treatment with 30 μ M of K produced changes in the mitochondrial network, favoring the loss of junctions with the ER, thus producing a rounded shape of mitochondria known as "donut", an event which is predictive of fission processes.

In Tkpts cell line, several autophagy pathway markers gave differential responses to alterations in Q levels. However, the mTOR and phospho mTOR proteins did not seem to be affected by these alterations. This could be possibly due to the great variety of factors acting on this master regulator of the route. Beclin 1, on the other hand, increased its levels only in the presence of an exogenous supplementation of Q_{10} . This could indicate that this protein regulation is independent of the increase of endogenous Q levels, but it is affected when the Q_{10} accumulates in a different compartment, probably the lysosome. Furthermore, when analyzing the effects of PABA we observed that in all cases this treatment resulted a decrease in Beclin 1, indicating that this direct effect of the treatment is not related to its action as a competitive inhibitor of COQ2 protein. These results are in contrast with those reported by other authors who determined that in Q-deficient fibroblasts, the messenger levels of this protein were increased with respect to the controls. The levels of the p62 "native" form were not altered by the treatments; however, its ubiquitinated forms significantly increased in the presence of the exogenous Q_{10} supplementation. This result could indicate an

increase in the efficiency of incorporation of ubiquitinated proteins to the phagophore, or even a slight blockade of the autophagy flux that prevents the ubiquitinated proteins degradation. Finally, both LC3 forms (LC3I and LC3II) increased their levels in the presence of K and pHB, an increase that was reverted when the treatments were combined with PABA. The same response was observed with the Q₁₀ supplementation, with no further changes being observed by combined treatment with Q₁₀ plus PABA. These results are in contrast with those obtained by Rodríguez-Hernández *et al.*, where Q deficiency in fibroblasts produced an increase in LCII form, with no alteration in LC3I levels. Autophagy flux, calculated from determinations carried out both in absence and in the presence of Cq, indicated that the treatments with pHB and Q₁₀ significantly decreased the autophagy flux while PABA significantly increased it with respect to the control. One hypothesis that may explain these results is that the increase in Q levels favors the processing of the LC3 precursor form (pro-LC3) to LC3I and from LC3I to its lipidated form (LC3II) but, simultaneously, it could cause a partial blockade in the next steps that lead to the formation of autophagosomes. This idea is compatible with the results obtained by Rodríguez-Hernández *et al.*, who proposed that autophagy is activated as a survival response that is elicited under Q deficiency conditions. To study the possible improvement in the pro-LC3 to LC3I processing, we focused our study towards Atg4 enzyme, which plays a crucial role in this processing. Recent studies carried out in yeasts (*S. cerevisie*) have determined that thioredoxin modulates the activity of the Atg4 protein. In Tkpts cell line, the levels of thioredoxin 1 (Trx 1) increased by treatment with K and pHB, while decreased when the treatments were combined with PABA. The exogenous supplementation of Q₁₀ also tended to increase these levels, with no changes observed when PABA was present. These data seem to indicate that the regulation of Trx 1 is mediated, at least in part, by an increase in the Q levels.

Once determined the effect our treatments have on Trx 1 levels, we deepened in the study of ATG4, a protein that is regulated by Trx1, using thioconazole (Tc) an inhibitor of its activity. Both LC3 forms were increased, once again, in the presence of Q₁₀, whereas a significant decrease in these forms was observed in cells treated with 5µM Tc treatment with respect to the control, an effect that was more striking in the case of LC3I. The combined treatment with Q+Tc did not re-establish the levels of these proteins, which indicates the impossibility of Q to perform this function in the presence

of the ATG4 inhibitor. However, the determination of Trx 1 levels in the presence of Tc, and also in cells submitted to the combined treatment with Q+Tc, revealed that Trx1 significantly decreased with respect to the control conditions, making impossible to differentiate the direct regulator that responds to alterations in Q levels: Trx 1 or ATG4. Nevertheless, our results are compatible with the hypothesis that the alteration of Trx 1 levels in response to increased Q could act on ATG4 to carry out a more efficient processing of pro-LC3 to LC3I.

With regards to the role of fatty acids as modulators of mitochondrial function and the autophagy pathway in Hepa 1.6 cells, we observed that the addition of Lipoplus and ClinOleic emulsions greatly increased the accumulation of lipid droplets compared with control conditions, being this effect more pronounced in the case of ClinOleic. The fact that this emulsion produced a greater accumulation of lipid droplets can be an adaptive response to lipotoxicity, a phenomenon of cellular dysfunction caused by hyperlipidemia in non-adipose tissues that can cause cell death, which is mainly associated with SFA, due to the inability of these fatty acids to be transformed efficiently into triglycerides. Co-supplementation with unsaturated fatty acids can prevent this phenomenon. Therefore, given that ClinOleic contains 62% oleic acid (OA, MUFA) and 12% palmitic acid (PA; SFA) while Lipoplus only contains 6% PA, the possibility exists that cells treated with ClinOleic increase the formation of fat accumulations, enabled by the OA, to reduce PA toxicity. In addition to this hypothesis, it has been described that n-3 PUFAs prevent the formation of fat storage. Subsequently, we analyzed the levels of Mfn2, a mitochondrial protein that mediates the interactions between mitochondria and the ER, and between mitochondria and lipid droplets through perilipin 1, that could favor lipid metabolism. Our results revealed a significant increase of Mfn2 in response to treatment with both emulsions, especially with Lipoplus, which could result in an improved processing of fat accumulations. Regarding the study of mitochondrial function in response to the different emulsions, no significant changes were observed in the enzymatic activities of the ETC complexes nor any changes in the OCR and the ECAR.

Since our research group had previously shown that treatment with lipid emulsions increased Q levels in the cell line under study and this increase was more significant in the case of PUFAs, we carried out determinations of mitochondrial mass, given the existing relationship between Q and the mitochondria. This analysis showed that,

among the different treatment with lipid emulsions, only Lipoplus increased significantly mitochondrial mass with respect to the control. Determinations of mitophagy-related protein levels were also performed to check possible correlations between this process and mitochondria accumulation. In this sense, the levels of PINK1 decreased in the presence of Lipoplus with respect to the control conditions, with Parkin showing a trend towards a slight increase, which indicates that this treatment could decrease the mitochondrial turnover balance. On the other hand, treatment with ClinOleic increased significantly Parkin levels. Regarding the analysis of ETC complexes subunits markers of the, the most striking results indicated that Lipoplus induced a significant increase in the levels of complex I and a trend towards increased complex III with respect to the control conditions. This effect may be related to the fact that PUFAs (to a greater extent than SFAs or MUFAs) exert a partial inhibition of complexes I and III, which are the main producers of mitochondrial $O_2^{\cdot-}$, and it is possible that cells rise the expression of these complexes as an adaptive response. This would also explain the significant increase in the production of mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ in the presence of Lipoplus emulsion, whereas a milder response was obtained in the presence of ClinOleic.

Regarding to ROS, the most significant changes were observed for the level of peroxides, where ClinOleic treatment increased its levels dramatically with respect to the rest of the experimental conditions. This could be explained on the basis of the lipotoxicity induced by SFA contained in this emulsion although these results could be also explained on the basis of a higher efficiency of the mitochondrial superoxide dismutase (SOD2, which catalyzes the dissociation reaction of $O_2^{\cdot-}$ to H_2O_2), and hence $O_2^{\cdot-}$ levels in cells treated with Clinoleic were substantially lower than those found in cells cultured in the presence of Lipoplus.

Oxidative damage in proteins was not altered in the presence of any of the emulsions; however, the degree of lipid peroxidation decreased in cells treated with Lipoplus, with a similar trend being observed for Lipofundin, while ClinOleic increased lipid peroxidation with respect to the other emulsions. These results could be explained if we take into account that PUFA-rich emulsions increase the levels of Q in this cell line and thus, also increase antioxidant defense. Regarding the autophagic pathway, treatment with ClinOleic increased the levels of mTOR and phospho mTOR, Beclin 1, both LC3 forms (in the presence of Cq) and tended to increase the levels of p62 and its

ubiquitinated forms. However, these changes did not imply changes in the autophagy flux, as determined by cytometry assays. These results may indicate that the SFA present in the emulsion would cause an arrest on the autophagic route, possibly due to the action of Sirt3 and the signaling cascade mediated by this sirtuin, which would favor the action of the mTORC1 complex to block process. The treatment with n-3 PUFA-rich emulsion acted mainly in the last steps of the autophagy pathway increasing both LC3 forms, but more strikingly LC3II, which was sufficient to increase the autophagy flux. Q levels seem to be related to this response, since combined treatments with Lipoplus+PABA (both in the presence and in the absence of Cq) led to a decrease of p62 levels as well as LC3I form, and decreased the dynamics of both proteins in comparison with the results obtained with the single treatment with Lipoplus. This could indicate that the increase in the endogenous synthesis of Q elicited by Lipoplus plays an important role in the processing of pro-LC3 to LC3I, since it is at this point that we observe a more significant fall when treatment is combined with PABA. When analyzing the levels of these proteins in cells cultured in the presence of an exogenous Q₁₀ supplementation (+/- Cq), the results revealed that p62 levels did not change, LC3I was increased with the supplement (both in the absence and in the presence of Cq) and LC3II was increased only in cells subjected to the single treatment. Supplementation with exogenous Q₁₀ partially recapitulated the effects of Lipoplus on LC3I levels, which could indicate either that a lipid supplement enriched in n-3 fatty acids acts at the level of LC3II in a way that is partially independently on a Q increase, or that the endogenously synthesized Q could regulate more efficiently the conversion of LC3I to LC3II.

In relation to the ultrastructural alterations associated to the autophagy pathway in skeletal muscle in response to aging, caloric restriction and dietary fat, the results showed differential responses depending on the area of analyzed muscle fiber, intermyofibrillar (IMZ) or subsarcolemmal (SSZ), presenting the first one a greater number of autophagosomes, and the second one especially altered mitochondria. While in IMZ the size of these figures tended to decrease in practically all interventions at 18 months, the volume occupied by them varied according to the specific intervention, highlighting a marked decrease in this parameter in animals fed with the diet CR.Lard and somewhat more discreet in those fed with CR.Soy. However, animals fed with CR.Fish diet presented the same response as the control group: an increase in the

volume of these figures associated with age. On the other hand, the size of these figures in the SSZ grew significantly after 6 months of intervention in the animals submitted to RC without long term modifications. However, in the control group and in the diet with the CR.Fish, there was growth in these figures over long periods of intervention (18 months). Regarding the determined effectors of the autophagy pathway, a significant increase in Beclin 1 levels was observed in response to aging in control animals, while CR did not induce changes in this parameter, results that agree with those found by others authors. The p62 levels increased drastically with aging in control animals, which could reveal a blockage in the autophagic pathway associated with age, a fact that agrees with observations carried out in muscle of advanced age rats. In CR conditions, an increase in this protein was observed after 6 months of intervention while in longer interventions, these levels remained unchanged, being lower than those observed in the control group homologous in age. These results indicate that CR can unblock the autophagic flow associated with aging. The type of fat added did not induce significant changes on this parameter. The lack of changes in the ratio of the LC3 protein in response to age in the control group indicates that these last stages of the route are not affected by aging, a result that is consistent with other studies carried out in rodents. Under RC conditions, a decrease in the LC3 ratio was observed at 6 months of intervention with respect to the control homologous group in age, levels that increased in longer interventions until reaching values similar to those obtained in the control mice. Thus, it does not seem that the reduction in caloric intake is favoring a significant increase in the autophagy flux, at least at the level of the last stages of the route. Regarding the dietary fat, the most remarkable fact is the increase in the ratio of LC3 in animals fed with the CR.Fish at 18 months of intervention with respect to the rest of the groups subjected to CR. These results are in line with studies carried out on Fat-1 mice, where an increase in the amount of n-3 fatty acids induced an increase in the autophagy pathway, increasing the expression of proteins such as LC3. The mitophagy markers PINK1 and Parkin were not altered in response to aging, a result that is in agreement with several studies carried out in other animal models. In CR conditions, the most remarkable results were those obtained with the CR.Lard diet after 6 months of intervention, where the levels of PINK1 were the highest and those of Parkin the lowest with respect to the rest of the CR groups. After 18 months of intervention, animals fed with this diet maintained high levels of PINK1 and restored Parkin levels, so a balance

between both proteins can determine the role of PINK1 as a regulator of the autophagic process or as a preservative of the mitochondrial function.

Concerning the oxidative damage in proteins, a trend to decrease with aging in control animals was observed. It is possible that this response is due to the fact that the animals do not present a very advanced age, or that the protein fraction analyzed (total homogenates) does not present alterations, without discarding, therefore, the possibility of damage in others. However, CR significantly decreased this parameter after 18 months of intervention. Regarding the fat component, in long interventions all the diets decreased the oxidative damage with respect to the 6 months of intervention, being CR.Soy, a diet rich in PUFA of n-6 series, which presented a greater protein oxidation. Finally, analyzing the ETC subunits markers, the most relevant data regarding the impact of CR was the reduction in the levels of complex I at 6 months of intervention and the decrease of complex III at 18. These results suggest an adaptive response of the animals submitted to this intervention by which they diminish the expression of the two complexes of the ETC that produce the larger amount of ROS at the mitochondrial level. The fatty component of the diet under CR conditions altered the expression of some complexes in young animals (II, III and IV). However, this response was attenuated by aging.

Finally, regarding the ultrastructural alterations of the autophagy pathway in the liver in response to aging, CR and dietary fat, a significant increase in the size of the autophagy figures was observed in response to age in all experimental groups, either submitted or not to RC. However, in the groups where caloric intake was reduced, an attenuation of this response was observed since at 18 months of intervention the autophagy figures presented a smaller area, being the group CR.Soy 18 the one showing the smallest autophagy figures compared with the rest of age-matched groups. We could then consider the possibility that CR prevents the increase in size of the autophagy figures that occurs as a result of age. On the other hand, the volume of hepatocyte occupied by these figures increased significantly with aging both in the control group and in the group of mice fed with the CR.Fish diet, whereas an attenuation of this response was observed in the rest of the groups subjected to a long-term intervention (18 months). Overall, the changes in the analyzed parameters might be indicative of an improved autophagy flux in long-term interventions (18 months). Although all fats seem to act in a similar way under RC, the n-3 PUFA-rich diet seems to be less efficient

in modulating these parameters at the end point of the study, while still presented some improvements in shorter intervention periods. Attending to the protein effectors of the autophagic pathway, an aging-associated increase of Beclin 1 was observed in control animals, while in those subjected to CR this increase occurred at 6 months, with no subsequent alterations being observed. Dietary fat differentially affected this last parameter. To this sense, levels of this protein were increased with age in the CR.Lard and CR.Fish groups, whereas this response was attenuated in CR.Soy. The levels of p62 remained unchanged in the control group independently of the age, while in the group undergoing CR it decreased significantly after 18 months of intervention, with no changes being observed in shorter interventions. These findings are in accordance with those reported by other authors showing that short periods of CR did not induce changes in p62. Dietary fat did not affect significantly this protein, although higher levels were found in the animals fed the CR.Fish diet in both intervention periods. In these animals, the volume of the autophagy figures was greater at 18 months, which could be indicative of a less efficient elimination by the lysosomal machinery in this group. In regard to LC3, there were no alterations in the ratio of both forms in response to age in control animals, a fact that has been already noted by other researchers. Under RC conditions, both forms of LC3 were increased, but their ratio was unaltered, which could be indicative both of an increase in the autophagy flux and a blockage of the same magnitude. Dietary fat acted differentially at the level of this protein, showing a significant increase in the LC3II form and a trends towards an increase of this ratio in animals fed CR.Lard, which may imply an improvement in autophagy. In the case of animals fed the CR.Fish diet, the increase in both forms of this protein after 18 months of intervention is compatible with a blockage in the last stages of the pathway. This may be related to the increased and volume of the autophagy figures that is also observed under CR.Fish intervention. On the other hand, the levels of PINK1 did not vary in response to aging in the control group nor in animals subjected to CR. However, at 18 months, the group fed the CR.Lard diet presented the highest levels of this protein, a result that is compatible with an increase in mitochondrial turnover.

Regarding the oxidative damage of proteins, no alterations associated with age were found, a fact that is in accordance with previous observations carried out by our research group in which the level of hydroperoxides was not altered with aging in these same animals. On the other hand, the fat component of the diet did alter these levels,

increasing them in the groups fed with PUFA-rich diets compared to those enriched in SFA and MUFA, being CR.Fish the one that resulted in the highest levels, which is in accordance with the above-mentioned study focused on hydroperoxides. However, longer periods of CR were able to reverse this damage.

Finally, concerning the levels of the ETC markers subunits, the most relevant results indicated an increase in the levels of complex I and a tendency to decrease in the levels of complex III. Under CR conditions, there was a significant decrease in the expression levels of complex III after 6 months of intervention. This could represent an adaptation promoted by CR to decrease the expression of one of the complexes that produces the highest amount of ROS in the mitochondria, which would contribute to a decrease in ROS production. This effect, however, would not apply to complex I, since its expression increases significantly under the same experimental conditions. On the other hand, CR produced a generalized increase in the expression of the analyzed subunits after 18 months of intervention. Dietary fat seems to exert very subtle changes at this level. The most important one was that observed in animals fed the CR.Lard diet, where a significant decrease of complex III was observed in response to age in comparison with the rest of the groups subjected to CR. As discussed previously, this could represent an adaptation in this group to diminish the expression of one of the complexes that produces more ROS.

Resumen

Introducción

La autofagia es un proceso intracelular por el cual se degradan partes de citoplasma, orgánulos como mitocondrias y peroxisomas, agregados proteicos y agentes infecciosos, por acción de los lisosomas. Se han definido tres tipos de autofagia: macroautofagia (designada de aquí en adelante como autofagia), microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (CMA). La autofagia comienza con el aislamiento de una sección de membrana conocido como fagóforo, que puede originarse a partir de bicapas lipídicas procedentes de retículo endoplásmico (RE), y/o de la red trans del complejo de Golgi, así como de endosomas. Este proceso viene regulado por la acción de diversos complejos multiproteicos que actúan colaborando en la formación de las vesículas autofágicas que contendrán el material a degradar, denominadas autofagosomas. El primer complejo que facilitará el aislamiento de membrana es el complejo de “pre-iniciación” compuesto por la quinasa ULK1 y las proteínas ATG13, ATG101 y FIP200. Éste a su vez actuará sobre el complejo de iniciación formado por VPS34, VPS15, Beclina 1 y ATG14, que permitirá el ensamblado de la maquinaria de elongación del fagóforo. Posteriormente, dos sistemas de conjugación similares a los de ubiquitinación trabajarán en la elongación del fagóforo y la posterior maduración del autofagosoma. La primera reacción de conjugación dará lugar al complejo ATG12/ATG5/ATG16L1, y éste a su vez participará en la conjugación de las proteínas de la familia ATG8, y concretamente de LC3, con el lípido fosfatidiletanolamina (PE), procesos que determinarán la elongación del fagóforo, la hemifusión de sus extremos dando lugar a los autofagosomas y la posterior maduración del mismo. Una vez maduras, estas vesículas se unen con los lisosomas para la degradación de su contenido, proceso que está facilitado por la acción del citoesqueleto y de proteínas como RAB7. La regulación de este proceso está mediada por sensores metabólicos celulares entre los que destacan la quinasa AMPK, que actúa como regulador positivo de dicha ruta, y el complejo mTORC1 que la regula negativamente. Ambas actúan de forma directa o indirecta sobre la proteína ULK1. También se producen modificaciones post-traduccionales sobre el complejo de iniciación, concretamente sobre la proteína Beclina 1, que pueden regular el proceso.

El proceso autofágico puede ser no específico en condiciones de privación de nutrientes o, por el contrario, puede estar dirigido a orgánulos celulares concretos. Cuando se dirige de forma específica a la mitocondria se conoce como mitofagia, que

puede producirse por dos vías fundamentalmente: la mediada por la proteína BNIPL/NIX, que actúa en los procesos madurativos de algunas líneas celulares, y la mediada por las proteínas PINK1/Parkin, que se encarga del recambio de mitocondrias no funcionales, dónde también participa de manera activa la proteína p62.

Otro punto importante a tratar en el presente trabajo son las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*), término que se utiliza para referirse a diversos derivados reactivos del oxígeno, sean o no radicales libres. Las principales ROS que podemos encontrar a nivel celular son el radical hidroxilo (OH^\cdot), el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Éstas interactúan con las principales biomoléculas celulares, causando daño en el ADN, proteínas y lípidos, dando lugar a numerosos procesos deletéreos.

La mitocondria juega un papel fundamental en el metabolismo celular pues es la encargada de generar ATP mediante la acción de la cadena de transporte electrónico (CTE), compuesta por un conjunto de complejos multiproteicos localizados en la membrana mitocondrial interna (IMM). Además, la mitocondria ha sido identificada como una de las principales fuentes de ROS a nivel celular. Concretamente, la formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ dentro de la CTE se concentra principalmente en dos puntos: el complejo I (NADH-deshidrogenasa) destacándose los mononucleótidos de flavina y centros ferrosulfurados como los responsables de liberar $\text{O}_2^{\cdot-}$ hacia la matriz mitocondrial, y el complejo III (Ubiquinol:citocromo *c* óxido-reductasa), que produce esta especie reactiva a partir del ciclo del coenzima Q hacia el lado citosólico de la IMM. La producción de ROS parece deberse al estancamiento de los electrones en los complejos producido cuando la ratio de entrada de los mismos excede el ritmo de paso de los electrones por los componentes de la cadena.

En la presente tesis se analiza también el papel de diferentes compuestos fenólicos en procesos como autofagia y función mitocondrial. Los compuestos fenólicos, metabolitos secundarios de las plantas, presentan en su estructura un anillo aromático acompañado de uno o más grupos hidroxilo, y se clasifican atendiendo a distintos criterios tales como su origen, función biológica y estructura química. En función de su abundancia pueden clasificarse en dos grupos: los flavonoides y los no flavonoides. Los primeros son los más abundantes y se caracterizan por poseer 15 carbonos y dos anillos aromáticos conectados entre ellos por 3 puentes de carbono. Diversos estudios han demostrado la gran capacidad antioxidante de los flavonoides, por lo que su consumo

está asociado con un menor riesgo de sufrir cáncer o enfermedades cardiovasculares. Además, también tienen capacidad de mitigar el daño oxidativo en el ADN y de prevenir la peroxidación lipídica en una gran cantidad de tipos celulares. No obstante, a concentraciones elevadas pueden actuar como pro-oxidantes induciendo procesos como la apoptosis. Dentro de estos compuestos, el kaempferol (3,5,7,4-tetrahidroxiflavona) es un flavonol presente en gran cantidad de vegetales y frutas, que muestra una gran cantidad de funciones biológicas entre las que destaca, por ejemplo, su capacidad antiinflamatoria. Numerosos estudios realizados en distintas líneas celulares han determinado el efecto de sustancia mitigando la producción de ROS. No obstante, el tratamiento con ella a altas concentraciones y durante periodos largos incrementa la producción de dichas especies en otros modelos de estudio. Este compuesto puede actuar además como modulador de la ruta de autofagia actuando sobre diferentes dianas, favoreciendo con ello procesos tan diversos como la protección celular frente a distintos tipo de estrés o la diferenciación celular.

Otra molécula importante sobre la que hemos centrado nuestras investigaciones, es el coenzima Q (Q), lípido cuya estructura comprende un anillo benzoquinónico conectado a una cola lateral de isoprenos. Esta molécula desempeña numerosas funciones que pueden dividirse entre las que realiza a nivel local en la mitocondria, y las que lleva a cabo en otros compartimentos celulares. En la mitocondria, podemos encontrarla formando parte de la CTE actuando como transportador electrónico. Además, actúa como cofactor de proteínas desacoplantes (UCPs), previene la apertura del poro de transición de permeabilidad (PTPm) y puede actuar como aceptor final de electrones en la síntesis de pirimidinas. En cuanto a sus funciones extra-mitocondriales, forma parte del sistema rédox de la membrana plasmática (PMRS) y constituye parte de la defensa antioxidante no enzimática junto a otras moléculas como los flavonoides o el glutatión.

Los ácidos grasos son biomoléculas compuestas por un grupo carboxilo unido a una cadena hidrocarbonada, que suelen encontrarse formando parte de moléculas lipídicas más complejas, siendo componentes fundamentales de las membranas biológicas. Pueden clasificarse en dos tipos atendiendo a la presencia de dobles enlaces (insaturaciones) en su cadena hidrocarbonada: ácidos grasos saturados (SFA), que carecen de dobles enlaces, e insaturados, que sí los poseen. Dentro de estos últimos se pueden distinguir dos subgrupos en función de si presentan un único doble enlace,

denominándose ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), o varios, denominándose ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Ante la imposibilidad de las células de sintetizar ciertos tipos de ácidos grasos necesarios para las funciones biológicas, éstos son captados a partir de la dieta. A estos ácidos grasos se les conoce como “ácidos grasos esenciales” (EFA) y se clasifican principalmente en dos familias: la serie n-3 y la serie n-6. Algunos estudios han determinado la capacidad de las membranas celulares para adaptar su composición lipídica en función de la grasa predominante presente en la dieta, lo que puede conllevar una serie de alteraciones bioquímicas en las células y en especial en las membranas mitocondriales. De esta forma, las grasas ricas en PUFA, como el aceite de soja y pescado dan lugar a membranas que son más susceptibles de sufrir daño oxidativo, pues los carbonos que forman parte de las insaturaciones son más propensos a ello, que las grasas ricas en SFA y MUFA, como la grasa animal o el aceite de oliva respectivamente. Es por ello que estas alteraciones en el lipidoma pueden relacionarse con procesos como el envejecimiento.

Numerosos estudios han sugerido que los ácidos grasos pueden regular el proceso autofágico. Por ejemplo, el ácido palmítico (PA) incrementa este proceso en células β pancreáticas INS-1 de rata protegiéndolas de la apoptosis. No obstante, otros investigadores han determinado que es el ácido oleico (OA), y no el PA, es el que favorece la formación de vesículas autofágicas incrementando también la expresión de proteínas relacionadas con este mecanismo en células HepG2 y hepatocitos primarios de ratón. La autofagia inducida por los PUFA de la serie n-3 contribuye a una recuperación más eficiente del daño renal inducido por isquemia/reperfusión en ratones Fat-1. Además, el aumento en la eficiencia de esta ruta promovido por estos ácidos grasos, favorece la citotoxicidad en células tumorales favoreciendo la apoptosis. Por último, los ácidos grasos de la serie n-6 favorecen el flujo autofágico, lo que permite incrementar la longevidad en *C. elegans*.

Otro punto fundamental del presente trabajo es el estudio de diferentes intervenciones nutricionales sobre el envejecimiento, y más concretamente sobre la relación de éste con la ruta de autofagia. El envejecimiento puede definirse como la pérdida progresiva de función en los distintos tejidos de un organismo debido a la degradación de sus componentes a nivel molecular dependiente del tiempo, lo que implica una menor fertilidad y un aumento en la susceptibilidad de sufrir gran número de enfermedades de diversa índole. Aunque no exenta de controversia, la denominada

“Teoría de los Radicales Libres” sobre el envejecimiento proporciona unas bases sólidas para explicar dicho proceso. En ella se postula que la producción de ROS, sobre todo a nivel mitocondrial, daña progresivamente distintas biomoléculas celulares. La imposibilidad de la célula de contrarrestar este daño oxidativo mediante la respuesta antioxidante resulta en la acumulación de lesiones y, en última instancia, en la pérdida de funcionalidad de estos componentes. En estrecha relación con esta teoría se encuentra la hipótesis que propone que las características de los lípidos que conforman las membranas celulares condicionan la intensidad del daño oxidativo al que se ven expuestas afectando, por tanto, al envejecimiento y la longevidad. Diversos estudios comparativos han determinado que en animales con una menor longevidad máxima aparece un mayor índice de dobles enlaces (DBI) en los lípidos de membrana.

La restricción calórica (RC), es decir, una disminución en la ingesta de calorías sin malnutrición, es la intervención no genética ni farmacológica que de forma más fehaciente es capaz de incrementar la longevidad y favorecer un envejecimiento saludable en diversas especies. Esta intervención puede actuar disminuyendo la producción de ROS, potenciando la respuesta antioxidante encargada de la eliminación de las mismas y promoviendo también la corrección de los daños inducidos por ellas. Puesto que la mitocondria es una de las principales fuentes de generación de ROS, parte de los efectos beneficiosos de la RC sobre la longevidad provienen, muy probablemente, de una mejora en la función mitocondrial. Además, esta intervención puede redistribuir el tipo de insaturación de los ácidos grasos predominante en ciertos tejidos, haciendo que las membranas sean menos susceptibles al daño oxidativo.

Ha sido ampliamente establecido que durante el envejecimiento se produce una disminución en la capacidad proteolítica celular considerada responsable, al menos en parte, de la acumulación de componentes celulares dañados en los tejidos de animales viejos. En diversos tejidos, como corazón, cerebro, hígado, músculo y riñón, se han observado determinadas características morfológicas (como la expansión de los compartimentos lisosomales, acumulación de vacuolas y deposición de material no digerido rico en lipofucsina) que apuntan a una pérdida de eficiencia en la ruta de autofagia en animales viejos. Otras investigaciones llevadas a cabo mediante abordajes genéticos en distintos modelos de estudio, han determinado que la falta de funcionalidad de ciertos genes relacionados con la autofagia da lugar a fenotipos asociados al envejecimiento, provocando en algunos casos una disminución en la longevidad

máxima en dichos organismos. Defectos en la ruta de autofagia han sido asociados también a enfermedades que presentan una alta prevalencia en la población envejecida: desórdenes neurológicos, cáncer, distintos procesos de inmunosenescencia, así como miopatías. Existen indicios de que la RC introduce mejoras en el proceso autofágico, ya que individuos sometidos a esta intervención presentan una menor cantidad de componentes celulares y biomoléculas dañadas que los que son alimentados *ad libitum*. Se ha descrito, además, que la RC induce alteraciones en la ruta autofágica por la activación de dos “sensores energéticos a nivel celular”: AMPK y sirtuina 1, los cuales establecen un bucle de retroalimentación positiva para su activación mutua. Además, esta intervención promueve procesos autofágicos inhibiendo la ruta de señalización mediada por factores de crecimiento similares a insulina, lo que resulta finalmente en la inhibición de mTOR. El recambio de mitocondrias mediante el proceso de mitofagia se ve favorecido también por esta intervención nutricional, pues incrementa la expresión de proteínas relacionadas con este proceso (PINK1, Parkin y BNIP3L) en riñón de ratas viejas frente a otras alimentadas con una dieta altamente calórica. Aunque parece evidente que un mejor funcionamiento de la ruta de autofagia previene la aparición de eventos asociados al envejecimiento, la activación persistente de esta ruta no parece ser una intervención anti-envejecimiento ideal, ya que investigaciones llevadas a cabo en ratones con progeria mostraron que el incremento en esta ruta contribuyó a la degeneración sistémica sufrida por estos animales.

Por último, hay que recalcar la importancia de los procesos de dinámica mitocondrial, que permiten a las células adaptarse a los requerimientos de demanda energética, biogénesis de lípidos y síntesis de ácidos grasos, etc. en función de las condiciones del medio. Para ello, las mitocondrias están sujetas a modulación de sus propiedades dinámicas, pudiendo fusionarse, dividirse, moverse o anclarse a otros orgánulos como el RE. En este proceso participa una familia de GTPasas incluida en la subfamilia DRPs. Dentro de éstas, en la fisión mitocondrial participan proteínas como Drp1 y Fis1, mientras que en la fusión juegan un papel fundamental las mitofusinas 1 y 2 (Mfn1 y Mfn2) y la proteína OPA1. Alteraciones en la maquinaria de dinámica mitocondrial han sido asociadas con numerosas patologías.

Material y métodos

Se han utilizado dos líneas celulares de diferente origen para la realización del presente estudio: Tkpts (derivada de túbulo contorneado proximal de riñón) y Hepa 1.6 (derivadas de hepatocarcinoma murino). Para estudiar la implicación del Q en distintos procesos celulares, las células Tkpts fueron tratadas con precursores de la síntesis endógena de esta molécula, kaempferol (K, 10 μ M) y ácido *p*-hidroxibenzoico (pHB, 1 μ M), y con un inhibidor de la misma, el ácido *p*-aminobenzoico (PABA, 1mM), así como con un suplemento de Q₁₀ exógeno. Además, para determinar la influencia de los ácidos grasos y la posible implicación del Q en dichos procesos celulares, se trataron las células Hepa 1.6 con tres emulsiones lipídicas: Lipofundina MCT/LCT (fuente de PUFA n-6), Lipoplus (fuente de PUFA n-3) y ClinOleic (fuente de MUFA n-9).

Para analizar el efecto del envejecimiento, la RC y el componente graso de la dieta sobre la ruta de autofagia, la expresión de subunidades marcadoras de los complejos de la CTE y el daño oxidativo en proteínas en diferentes tejidos, se utilizaron ratones de la estirpe C57BL/6 como modelo animal. Para ello, se establecieron 4 grupos experimentales: uno control alimentado con el 95% de la ingesta *ad libitum*, previamente calculada para evitar la obesidad de los individuos, y tres sometidos a 40 % de RC cuya fuente grasa fue distinta: en el grupo control (grupo Ctrl.Soy) y uno de los grupos de RC (grupo CR.Soy) fue aceite de soja (rico en PUFA n-6), mientras que en los grupos de RC restantes la grasa fue aceite de pescado (rico en PUFA n-3, grupo CR.Fish) o manteca de cerdo (rica en SFA y MUFA n-9, grupo CR.Lard).

Para las determinaciones de efectores de la ruta de autofagia, dinámica mitocondrial y subunidades marcadoras de los complejos de la CTE, se realizaron extractos totales a partir de los correspondientes cultivos celulares mediante la utilización de tampón RIPA. Para la obtención de los homogenados totales de tejido, se trocearon los órganos y se homogeneizaron con un homogeneizador Potter Elvehjem (teflón-vidrio) dispersándose posteriormente con un dispersor de cabezal metálico. Para cada tejido se utilizó un tampón de homogeneización con una composición adaptada a sus requerimientos. En todos los casos, tanto para células como para tejidos, los tampones contenían inhibidores de proteasas y fosfatasa para mantener la integridad de las proteínas. La posterior cuantificación de proteína presente en los extractos y homogenados, se llevó a cabo mediante el método de Bradford. La determinación de los

niveles de las distintas proteínas de interés se llevó a cabo mediante western blot y posterior inmunotinción con los anticuerpos primarios y secundarios adecuados. En la línea celular Hepa 1.6 se realizaron medidas de los acúmulos lipídicos mediante utilización del colorante Oil-Red O y posterior determinación de la absorbancia mediante espectrofotometría.

Se llevaron a cabo determinaciones de la generación de ROS en las distintas líneas celulares mediante citometría de flujo utilizando diferentes sondas según la especie a analizar: diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCDHF-DA) para la peróxidos, hidroetidina (HET) para superóxido intracelular y MitoSOX para superóxido mitocondrial. Las medidas de potencial mitocondrial ($\Delta\Psi$) se llevaron a cabo utilizando la sonda JC-1. Para las medidas de flujo autofágico se utilizó el kit CYTO-ID en presencia y ausencia de cloroquina (Cq), un inhibidor de la fusión entre autofagosomas y lisosomas, realizándose las determinaciones también mediante citometría de flujo.

Las determinaciones de la función mitocondrial se llevaron a cabo con un analizador Seahorse XFe24 utilizando el kit Phenotype test, obteniendo así las ratios de consumo de oxígeno (OCR) y de acidificación del medio extracelular (ECAR) en las distintas líneas celulares de interés. También se determinó la actividad enzimática de los complejos de la CTE mediante ensayos espectrofotométricos a partir de mitocondrias aisladas.

El daño oxidativo en proteínas se determinó utilizando el kit Oxyblot, detectándose posteriormente los grupos carbonilo por inmunodetección. Las determinaciones de peroxidación lipídica se llevaron a cabo mediante la utilización del reactivo de FOX.

Por último, se obtuvieron medidas planimétricas y estereológicas de las figuras de autofagia utilizando micrografías, tomadas mediante microscopía electrónica de transmisión, en hígado y músculo esquelético de ratones sometidos a las distintas intervenciones nutricionales siendo analizadas con el software ImageJ (N.I.H., USA).

Resultados y discusión

En la línea celular Tkpts, las subunidades de la CTE se regulan de manera diferencial en función de la procedencia endógena o exógena del Q, siendo el complejo III el que más se afecta por los niveles de esta molécula. Así, se observó un fuerte

incremento en los niveles de este complejo en presencia de K y pHB, ambos precursores de la biosíntesis de Q, que fue prevenido cuando los tratamientos fueron combinados con PABA, inhibidor de la misma. Además, el tratamiento simple con PABA disminuyó por sí mismo los niveles de este complejo con respecto a los observados en células control. Estos resultados están en sintonía con estudios previos en levaduras que constataron la importancia de los niveles de Q en el mantenimiento de la función y estabilidad del complejo III. En el caso del complejo I, se observó un incremento en sus niveles en presencia de los tratamientos con K, pHB y PABA, por lo que la regulación de esta subunidad podría estar relacionada con la homología estructural existente entre estas moléculas (estructuralmente, PABA difiere de pHB en un único sustituyente del anillo benzoico). En el caso de los complejos II y IV, los resultados indican que el PABA podría estar actuando como inhibidor de la expresión de estos complejos pero sólo en presencia de sus análogos estructurales K y pHB, mientras que en el complejo V no se observaron cambios. Aunque también se observaron alteraciones de estas subunidades en presencia del aporte exógeno de Q₁₀, éste sólo tuvo efecto a una concentración de 10 µM, mientras que no presentó efecto alguno a 2 µM. Este resultado puede indicar que la incorporación de Q₁₀ exógeno hasta los compartimentos celulares donde lleva a cabo su función metabólica o señalizadora es poco eficiente, quedando la mayoría del Q₁₀ exógeno secuestrado en un compartimento no relevante para estas funciones, como podría ser el compartimento lisosomal. Además, nuestros resultados apoyan que el PABA ejerce efectos de regulación de la expresión de estas subunidades de forma independiente a su acción como inhibidor de la biosíntesis de Q, ya que incluso en células tratadas con concentraciones elevadas de Q₁₀, los efectos son revertidos en las células tratadas simultáneamente con PABA.

La función mitocondrial, determinada mediante el análisis del OCR y el ECAR, se ve afectada también por los niveles de Q. Concretamente, el tratamiento con PABA disminuye el OCR, resultado que concuerda con el hecho de que el Q es el único transportador electrónico capaz de donar electrones procedentes de los complejos I y II al III y, por ello, las alteraciones en los niveles de esta molécula, inducen modificaciones en la función mitocondrial. La recuperación de este parámetro en presencia de un suplemento exógeno con Q₁₀, parece indicar que a 10µM la cantidad de Q que alcanza la mitocondria favorece la recuperación de la ratio de consumo de O₂. Por su parte, el tratamiento con K produjo cambios tanto en el OCR como en el ECAR,

disminuyéndolos de manera independiente del efecto que esta sustancia tiene sobre los niveles de Q. Este efecto del K ha sido mostrado en otras líneas celulares. La generación de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial disminuyó en células tratadas con K pero no con pHB, mientras que aumentó de manera considerable con la adición de PABA tanto de forma simple como combinada. Estos resultados indican que la acción de los compuestos fenólicos disminuyendo la producción de ROS mitocondriales, está relacionada con su capacidad como precursores biosintéticos del Q. No obstante, en el caso del tratamiento con pHB, su capacidad como precursor de síntesis de Q no parece ser suficiente para producir dichos efectos, lo que sugiere que podrían ser necesarias acciones adicionales, llevadas a cabo por K pero no por pHB. No obstante, a pesar de producir alteraciones en la generación de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial, ninguno de los tratamientos supuso alteraciones en el “oxi-proteoma” de estas células.

En cuanto a dinámica mitocondrial, nuestros resultados indican que la regulación de las proteínas de fisión y fusión no parece implicar de forma clara a los niveles de Q. No obstante, el tratamiento con K podría favorecer el proceso de fisión en detrimento del de fusión en esta línea celular, ya que incrementa significativamente los niveles de Drp1 y disminuye los de Mfn1 y Mfn2. Estos resultados concuerdan con los observados en la línea celular SH-SY5Y, donde el tratamiento con 30 μ M de K produjo cambios en la red mitocondrial de estas células, favoreciendo la pérdida de uniones con el RE y mostrando una morfología redondeada conocida como “donut”, acontecimientos predictivos de procesos de fisión.

En la línea celular Tkpts, diversos marcadores de la ruta de autofagia presentaron respuestas diferenciales ante las alteraciones de los niveles de Q. Sin embargo, las proteínas mTOR y fosfo mTOR no parecen verse afectadas por estas alteraciones, posiblemente por la gran variedad de factores que actúan sobre este regulador maestro de la ruta. Beclina 1, por su parte, incrementó sus niveles sólo en presencia de un aporte exógeno de Q_{10} , lo podría indicar que la regulación de esta proteína es independiente del aumento de los niveles endógenos de Q pero se afecta cuando el Q_{10} se acumula en un compartimento distinto, posiblemente el lisosomal. Además, analizando los efectos del PABA, observamos que en todos los casos produce una disminución de Beclina 1 por lo que este efecto directo del tratamiento no está relacionado con su acción como inhibidor competitivo de la proteína COQ2. Estos resultados contrastan con los de otros autores que determinaron que en fibroblastos deficientes de Q, los niveles de mensajero de esta

proteína se encontraban incrementados con respecto a sus respectivos controles. Los niveles de la forma “nativa” de p62 no se alteraron por la adición de los tratamientos; no obstante, sus formas ubiquitiniladas se incrementaron en presencia del suplemento con Q₁₀ exógeno, lo que podría indicar un aumento en la eficiencia de incorporación de proteínas ubiquitiniladas al fagóforo, o un ligero bloqueo del flujo autofágico que impida la degradación de las mismas. Por último, ambas formas de LC3 (LC3I y LC3II) incrementaron sus niveles en presencia de K y pHB, incremento que fue revertido cuando los tratamientos fueron combinados con PABA. Se observó la misma respuesta con el suplemento de Q₁₀, no observándose cambios ulteriores por tratamiento combinado con Q₁₀ más PABA. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Rodríguez-Hernández *et al.*, donde la deficiencia de Q en fibroblastos produjo un incremento de la forma LCII no variando los niveles de LC3I. Determinaciones de flujo autofágico, medido a partir de determinaciones llevadas a cabo tanto en ausencia como en presencia de Cq, indicaron que los tratamientos con pHB y Q₁₀ disminuyeron significativamente el flujo autofágico mientras que el PABA lo acrecentó notablemente con respecto al control. Una hipótesis que puede explicar estos resultados es que el aumento en los niveles de Q favorece el procesamiento de la forma primitiva de LC3 (pro-LC3) a LC3I y de ésta a su forma lipídada (LC3II) pero, simultáneamente provocaría un bloqueo parcial en los pasos siguientes que dan lugar a la formación de autofagosomas. Estos resultados son compatibles con los ya mencionados de Rodríguez-Hernández *et al.*, que proponen que la autofagia se activa como un método de supervivencia ante el déficit de Q. Para estudiar esta posible mejora en el procesamiento de pro LC3 a LC3I, abordamos el estudio de la enzima ATG4, que juega un papel fundamental en dicho procesamiento. Estudios recientes llevados a cabo en levaduras (*S. cerevisie*) han determinado que la acción de la tiorredoxina modula la actividad de la proteína Atg4. De esta manera, en esta línea celular los niveles de tiorredoxina 1 (Trx 1) aumentaron en presencia del tratamiento con K y pHB, disminuyendo cuando los tratamientos eran combinados con PABA. El aporte exógeno de Q₁₀ también tendió a incrementar dichos niveles, no observándose cambios cuando el PABA estaba presente. Estos datos parecen indicar que la regulación de Trx 1 está mediada, al menos en parte, por un incremento en los niveles de Q. Una vez confirmado el efecto de nuestros tratamientos sobre Trx 1, profundizamos en el estudio de la proteína regulada por ésta, ATG4, utilizando un inhibidor de su actividad, el tioconazol (Tc). Ambas formas de LC3 se incrementaron nuevamente en presencia de Q₁₀,

observándose una disminución significativa con respecto al control en dichas formas con el tratamiento con Tc 5 μ M, siendo más llamativo en el caso de LC3I. El tratamiento combinado con Q+Tc no reestableció los niveles de estas proteínas, lo que indica la imposibilidad del Q para actuar en presencia del inhibidor de ATG4. No obstante, la determinación de los niveles de Trx 1 en presencia de Tc y el tratamiento combinado con Q+Tc, reveló que Trx1 se encontraba disminuida significativamente con respecto a las condiciones control, por lo que no podemos diferenciar cuál es el regulador directo que responde a las alteraciones en los niveles de Q, si Trx 1 o ATG4. No obstante, los resultados obtenidos son compatibles con la hipótesis de que la alteración de los niveles de Trx 1 en respuesta a niveles incrementados de Q, podría actuar sobre ATG4 llevando a cabo un procesamiento más eficiente de pro LC3 a LC3I.

En lo que respecta al papel de los ácidos grasos como moduladores de la función mitocondrial y la ruta de autofagia en células Hepa 1.6, observamos que la adición de las emulsiones Lipoplus y ClinOleic incrementó en gran medida la acumulación de gotas lipídicas con respecto a las condiciones control, siendo más llamativo en el caso de ClinOleic. El hecho de que esta emulsión produzca mayor acumulación de gotas lipídicas puede ser una respuesta adaptativa frente a la lipotoxicidad, fenómeno de disfunción celular causado por la hiperlipidemia en tejidos no adiposos que puede causar la muerte celular y que está asociada principalmente a los SFA, debido a la imposibilidad de éstos de convertirse eficientemente en triglicéridos. La co-suplementación con ácidos grasos insaturados puede prevenir este fenómeno. Por tanto, y dado que ClinOleic presenta un 62% de oleico (OA; MUFA) y un 12% de palmítico (PA; SFA) mientras que Lipoplus presenta sólo un 6% de PA, es posible que las células tratadas con ClinOleic incrementen la formación de acúmulos grasos para paliar la toxicidad del PA facilitado por el OA. Además de esta hipótesis, se ha descrito que los PUFA n-3 previenen la formación de reservas grasas. Posteriormente se analizaron los niveles de Mfn2, proteína mitocondrial que participa en las interacciones entre mitocondrias y el RE y entre mitocondrias y gotas lipídicas a través de la perilipina 1, que podrían favorecer el metabolismo lipídico. Nuestros resultados revelaron un incremento significativo en Mfn2 en respuesta al tratamiento con ambas emulsiones, especialmente con Lipoplus, lo que podría resultar en una mejora del procesamiento de los acúmulos grasos. En cuanto al estudio de la función mitocondrial en respuesta a las distintas emulsiones, no se observaron cambios significativos en las actividades

enzimáticas de los complejos de la CTE, ni tampoco modificaciones en el OCR y el ECAR.

Puesto que en nuestro grupo de investigación se había demostrado previamente que el tratamiento con las emulsiones lipídicas incrementó los niveles de Q en la línea celular de estudio, siendo este incremento más significativo en el caso de los PUFA, y dada la relación existente entre el Q y la mitocondria, se llevaron a cabo determinaciones de masa mitocondrial, que mostraron que sólo el tratamiento con Lipoplus la incrementaba significativamente con respecto al control. Se llevó a cabo, además, la determinación del nivel de proteínas relacionadas con la mitofagia para comprobar posibles correlaciones entre este proceso y la acumulación de mitocondrias. En este sentido, los niveles de PINK1 disminuyeron en presencia de Lipoplus con respecto a las condiciones control, tendiendo Parkin a incrementarse levemente, indicando que este tratamiento podría estar reduciendo el balance de recambio mitocondrial. Por otro lado, el tratamiento con ClinOleic incrementó significativamente los niveles de Parkin. En cuanto al análisis de subunidades de los complejos de la CTE, los resultados más llamativos indicaron que el tratamiento con Lipoplus produjo un incremento significativo en los niveles de complejo I y tendió a incrementar el complejo III con respecto a las condiciones control. Esto puede relacionarse con el hecho de que los PUFA, en mayor medida que los SFA o los MUFA, ejercen una inhibición parcial de los complejos I y III, que son los principales productores de $O_2^{\cdot -}$ mitocondrial, y es posible que las células incrementen la expresión de estos complejos como respuesta adaptativa a dicho evento. Ello explicaría también el aumento significativo en la producción de $O_2^{\cdot -}$ mitocondrial en presencia de esta emulsión, que fue más discreto en presencia de ClinOleic. En cuanto a las ROS, el incremento más significativo se produjo a nivel de peróxidos dónde el tratamiento con ClinOleic incrementó dramáticamente sus niveles con respecto al resto de condiciones experimentales. Esto puede ser explicado debido a la lipotoxicidad inducida por los SFA presentes en la composición de esta emulsión, aunque también sugiere una mayor eficiencia de la superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2) (que cataliza la reacción de dismutación del $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2), de ahí que los niveles de $O_2^{\cdot -}$ observados con este tratamiento fueran menores que los encontrados en presencia de Lipoplus. El daño oxidativo en proteínas no se alteró en presencia de ninguna de las emulsiones; no obstante, el grado de peroxidación lipídica disminuyó en células tratadas con Lipoplus, tendiendo a ocurrir lo mismo con

Lipofundina, mientras que ClinOleic incrementó estos niveles con respecto a las otras emulsiones. Estos resultados pueden explicarse teniendo en cuenta que las emulsiones ricas en PUFA incrementan en mayor medida los niveles de Q en esta línea celular, aumentando así la defensa antioxidante. En cuanto a la ruta de autofagia, el tratamiento con ClinOleic incrementó los niveles de mTOR y fosfo mTOR, Beclina 1, ambas formas de LC3 (en presencia de Cq) y tendió a aumentar los niveles de p62 y sus formas ubiquitiniladas. No obstante, estos cambios no supusieron modificaciones del flujo autofágico, tal y como se determinó mediante ensayos de citometría. Estos resultados pueden indicar que los SFA presentes en la emulsión provocarían una detención en la ruta autofágica, posiblemente por la acción de Sirt3 y la cascada de señalización que media, que favorecería la actuación del complejo mTORC1 bloqueando la ruta. El tratamiento con la emulsión rica en PUFA n-3 actuó principalmente en los últimos pasos de la ruta de autofagia incrementando ambas formas de LC3, aunque más llamativamente LC3II, lo que fue suficiente para incrementar el flujo autofágico. Los niveles de Q parecen estar relacionados con esta respuesta, ya que tratamientos combinados con Lipoplus+PABA en presencia y ausencia de Cq, disminuyeron los niveles de p62 así como los de la forma LC3I, disminuyendo también la dinámica de ambas proteínas en comparación con las alcanzadas con el tratamiento simple con Lipoplus. Esto puede indicar que el incremento en la síntesis endógena de Q producido por Lipoplus juega un papel importante a nivel del procesamiento de pro-LC3 a LC3I, ya que es en este punto donde observamos una caída más drástica en presencia del tratamiento combinado con PABA. Al analizar los niveles de estas proteínas en presencia de un suplemento de Q₁₀ exógeno (+/-Cq), los resultados revelaron que p62 no cambió, que LC3I se incrementó con el suplemento en ausencia y presencia de Cq y que LC3II sólo aumentó en presencia del tratamiento simple. Estos resultados muestran que la suplementación con Q₁₀ exógeno es capaz de recrear parte de los resultados obtenidos con Lipoplus a nivel de LC3I, lo que podría indicar o bien que el aporte de un suplemento rico en n-3 actúa a nivel de LC3II de forma parcialmente independiente al incremento en los niveles de Q produce, o bien que el Q sintetizado de forma endógena regulara de forma más eficiente el paso de LC3I a LC3II.

En cuanto a las alteraciones ultraestructurales relacionadas con la ruta de autofagia en músculo esquelético en respuesta al envejecimiento, la restricción calórica y la grasa de la dieta, los resultados mostraron respuestas diferenciales en función de la zona de la

fibra muscular analizada, intermiofibrilar (IMZ) o subsarcolémica (SSZ), encontrándose en la primera un mayor número de autofagosomas y en la segunda, sobre todo mitocondrias alteradas. Mientras que en la IMZ el tamaño de estas figuras tendió a decrecer en prácticamente todas las intervenciones a los 18 meses, el volumen ocupado por las mismas varió en función de la intervención concreta, destacándose una marcada disminución de este parámetro en animales alimentados con la dieta CR.Lard y algo más discreta en los alimentados con CR.Soy. Sin embargo, animales alimentados con la dieta CR.Fish experimentaron la misma respuesta que el grupo control: un incremento en el volumen de estas figuras asociado a la edad. Por su parte, el tamaño de estas figuras en la SSZ creció significativamente a los 6 meses de intervención en los animales sometidos a RC sin que se produjesen modificaciones a más largo plazo. No obstante, en el grupo control y en el alimentado con la dieta CR.Fish sí que se produjo un crecimiento en estas figuras en periodos largos de intervención (18 meses). En cuanto a los efectores de la ruta de autofagia determinados, se observó un aumento significativo de los niveles de Beclina 1 en respuesta al envejecimiento en animales control, mientras que la RC no indujo cambios en este parámetro, resultados que concuerdan con los hallados por otros autores. Los niveles de p62 aumentaron drásticamente con el envejecimiento en los animales del grupo control, lo que podría poner de manifiesto un bloqueo en la ruta autofágica asociado a la edad, hecho que coincide con observaciones llevadas a cabo en músculo de ratas de avanzada edad. En condiciones de RC se observó un incremento de p62 a los 6 meses de intervención, mientras que en intervenciones más largas estos niveles permanecieron invariables, siendo menores que los observados en el grupo control homólogo en edad. Estos resultados indican que la RC calórica puede desbloquear el flujo autofágico asociado al envejecimiento. El tipo de grasa aportada no indujo modificaciones significativas a nivel de este parámetro. La falta de cambios en la ratio de la proteína LC3 en respuesta a la edad en el grupo control indica que estas últimas etapas de la ruta no se ven afectadas por el envejecimiento, resultado que concuerda con otros estudios llevados a cabo en roedores. En condiciones de RC se observó una disminución de la ratio de LC3 a los 6 meses de intervención con respecto al grupo control homólogo en edad, niveles que se incrementaron en intervenciones más largas hasta alcanzar valores similares a los obtenidos en los animales control, por lo que no parece que la reducción en la ingesta esté favoreciendo un incremento significativo del flujo autofágico, al menos a nivel de las últimas etapas de la ruta. En cuanto a la grasa de la dieta suministrada, el dato más

destacable es el aumento de la ratio de LC3 en animales alimentados con la CR.Fish a los 18 meses de intervención con respecto al resto de grupos sometidos a RC. Estos resultados son compatibles con estudios llevados a cabo en ratones Fat-1, donde un incremento en la cantidad de ácidos grasos n-3 indujo un incremento en la ruta de autofagia, aumentando la expresión de proteínas tales como LC3. Los marcadores de mitofagia PINK1 y Parkin no se alteraron en respuesta al envejecimiento, resultado que está en concordancia con diversos estudios llevados a cabo en otros modelos animales. En condiciones de RC, los resultados más llamativos fueron los obtenidos con la dieta CR.Lard a los 6 meses de intervención, donde los niveles de PINK1 fueron los más elevados y los de Parkin los más bajos con respecto al resto de grupos de RC. A los 18 meses de intervención los animales alimentados con esta dieta mantuvieron unos niveles de PINK1 elevados y restablecieron los niveles de Parkin, por lo que un balance entre ambas proteínas puede determinar el papel de PINK1 como reguladora del proceso autofágico o como preservadora de la función mitocondrial.

En cuanto al daño oxidativo en proteínas, se observó una tendencia a la disminución con el envejecimiento en animales control. Es posible que esta respuesta se deba a que los animales no presentan una edad muy avanzada, o a que la fracción proteica analizada (homogenados totales) no presente alteraciones, sin descartarse, por tanto, la posibilidad de daño en otras. No obstante, la RC disminuyó significativamente este parámetro a los 18 meses de intervención. En lo referente al componente graso aportado, en intervenciones largas todas las dietas disminuyeron el daño oxidativo con respecto a los 6 meses de intervención, siendo CR.Soy, dieta rica en PUFA de la serie n-6, la que presentó una mayor oxidación proteica. Por último, analizando los niveles de subunidades marcadoras de la CTE, los datos más llamativos en cuanto al impacto de la RC fueron la reducción en los niveles de complejo I a los 6 meses de intervención y la disminución también del complejo III a los 18 meses. Estos resultados pueden suponer una respuesta adaptativa de los animales sometidos a esta intervención por la que disminuyen la expresión de los dos complejos de la CTE que producen la mayor cantidad de ROS a nivel mitocondrial. El componente graso de la dieta en condiciones de RC alteró la expresión de algunos complejos en animales jóvenes (II, III y IV). No obstante, esta respuesta quedó atenuada por el envejecimiento.

Finalmente, atendiendo a las alteraciones ultraestructurales de la ruta de autofagia en hígado en respuesta al envejecimiento, la RC y la grasa de la dieta, se observó un

aumento significativo en el tamaño de las figuras de autofagia en respuesta a la edad en todos los grupos experimentales, sometidos o no a RC. No obstante, en los grupos cuya ingesta calórica fue reducida, se observó una atenuación de esta respuesta, ya que a los 18 meses de intervención las figuras de autofagia presentaron un área menor, siendo el grupo CR.Soy 18 el que presentó las más pequeñas entre los homólogos de edad de las otras dietas. Podría entonces considerarse la posibilidad de que la RC prevenga el incremento de tamaño de las figuras de autofagia que se produce como consecuencia de la edad. Por su parte, el volumen de hepatocito ocupado por las mismas se incrementó significativamente con el envejecimiento en el grupo control y en el alimentado con la dieta CR.Fish, observándose una atenuación de esta respuesta en el resto de grupos sometidos a la intervención a largo plazo (18 meses). De forma global, los cambios en los parámetros analizados pueden indicar un flujo autofágico mejorado en intervenciones a largo plazo (18 meses). Aunque en RC todas las grasas parecen actuar de manera similar, la rica en PUFA de la serie n-3 parece ser menos eficiente en la modulación de estos parámetros a tiempo final del estudio, presentando no obstante algunas mejoras en periodos de intervención más cortos. Atendiendo a los efectores proteicos de la ruta autofágica, se observó un incremento de Beclina 1 asociado al envejecimiento en animales control, mientras que en los sometidos a RC este aumento ocurrió a los 6 meses, no observándose alteraciones posteriores. La grasa de la dieta afectó diferencialmente a este parámetro. En las dietas CR.Lard y CR.Fish esta proteína se incrementó en respuesta a la edad, mientras que en la CR.Soy esta respuesta se atenúa. Los niveles de p62 permanecieron invariables en el grupo control en función de la edad, mientras que en el grupo sometido a RC disminuyó significativamente a los 18 meses de intervención, no observándose cambios en intervenciones más cortas. Estos resultados concuerdan con los de otros autores donde periodos cortos de RC no indujeron cambios en esta proteína. La grasa de la dieta no afectó de manera notable este parámetro, no obstante los niveles más elevados de p62 se encontraron en los animales alimentados con la dieta CR.Fish en ambos periodos de intervención. En estos animales el volumen de las figuras de autofagia era mayor a los 18 meses, lo que podría indicar que en este grupo el mayor volumen y tamaño de las figuras de autofagia podría deberse a su eliminación menos eficiente por la maquinaria lisosomal. En referencia a LC3 no se produjeron alteraciones en la ratio de ambas formas en respuesta a la edad en animales control, hecho constatado por otros investigadores. En condiciones de RC se incrementaron ambas formas de LC3, pero no su ratio, lo que podría indicar tanto un

incremento del flujo autofágico como un bloqueo en el mismo. La grasa de la dieta actuó de manera diferencial a nivel de esta proteína, observándose un aumento significativo en la forma LC3II y una tendencia al aumento de la ratio en animales alimentados con CR.Lard, lo que puede suponer una mejora del flujo autofágico. En el caso de los animales alimentados con CR.Fish, el incremento en ambas formas de la proteína a los 18 meses de intervención es compatible con un bloqueo en las últimas etapas de la ruta que, a su vez, puede estar relacionado con el incremento de tamaño y volumen de las figuras de autofagia observadas bajo dicha intervención. Por su parte, los niveles de PINK1 no variaron en respuesta al envejecimiento en el grupo control ni tampoco en animales sometidos a RC. No obstante, a los 18 meses, el grupo alimentado con la dieta CR.Lard fue el que presentó los niveles más elevados de esta proteína, resultado compatible con un incremento en el proceso de recambio de mitocondrias.

En cuanto al daño oxidativo a proteínas, no se observaron alteraciones asociadas a la edad, hecho que está en la línea de observaciones previas llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación en las que el nivel de hidroperóxidos no se alteró con el envejecimiento en estos mismos animales. Por su parte, el componente graso de la dieta sí que alteró estos niveles incrementándolos en los grupos alimentados con dietas ricas en PUFA frente a las ricas en SFA y MUFA, siendo CR.Fish la que presentó los niveles más elevados, lo que vuelve a coincidir con el estudio del nivel de hidroperóxidos previamente citado. Sin embargo, periodos más largos de RC fueron capaces de revertir este daño. Por último, en referencia a los niveles de las subunidades marcadoras de la CTE, los resultados más llamativos mostraron un incremento de los niveles de complejo I y una tendencia a la disminución en el complejo III. En condiciones de RC, a los 6 meses de intervención se produjo un descenso significativo de los niveles de expresión del complejo III, lo que podría representar una adaptación promovida por la RC disminuyendo la expresión de uno de los complejos que produce mayor cantidad de ROS a nivel mitocondrial, lo que contribuiría a una disminución en la producción de las mismas. Este efecto, sin embargo, no se aplicaría al complejo I, cuya expresión aumenta de manera significativa en las mismas condiciones experimentales. Por su parte, a los 18 meses de intervención, la RC produjo un incremento generalizado en la expresión de las subunidades determinadas. La grasa de la dieta parece ejercer cambios muy sutiles a este nivel. El más destacable se produjo con la dieta CR.Lard, dónde se observó una disminución significativa del complejo III en respuesta a la edad con respecto al resto de

grupos sometidos a RC, lo que, como comentamos anteriormente, podría suponer una adaptación de este grupo a disminuir la expresión de uno de los complejos que más ROS produce.

1. Introducción

Ya que el presente trabajo se centra en el estudio de la regulación de la fisiología mitocondrial y de señalización autofágica a través de distintas intervenciones, bien dietéticas, como son la restricción calórica (RC) y/o el aporte de suplementos grasos de distinta naturaleza, o bien farmacológicas centradas principalmente en el control de los niveles de coenzima Q (Q) intracelulares, en la presente introducción se abordan conceptos claves para la comprensión de los distintos procesos estudiados como la autofagia y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la posible modulación de los mismos por distintas intervenciones experimentales y la relación de éstos con procesos biológicos claves como el envejecimiento.

1.1. Ruta de autofagia

1.1.1. ¿Qué es la autofagia?

La autofagia es un proceso intracelular muy conservado entre especies por el cual se degradan partes de citoplasma, orgánulos como mitocondrias y peroxisomas, agregados proteicos y agentes infecciosos, por acción de los lisosomas. Se han definido tres tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (ver figura In-1).

Con el término macroautofagia nos referimos a la degradación de contenido citoplasmático cuando éste se encuentra englobado en vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas, las cuales se fusionarán con los lisosomas dando lugar finalmente a los autofagolisosomas. De aquí en adelante nos referiremos a este proceso cuando nos refiramos de manera genérica a la autofagia.

La microautofagia hace referencia a la degradación de componentes citoplasmáticos mediante invaginación directa de la membrana de los lisosomas. En la autofagia mediada por chaperonas (CMA) ciertas proteínas marcadas para degradación se translocan a través de la membrana del lisosoma formando complejos con chaperonas (como es el caso de Hsc-70), que son reconocidos a través del receptor de la membrana lisosomal LAMP-2A degradándose finalmente [1].

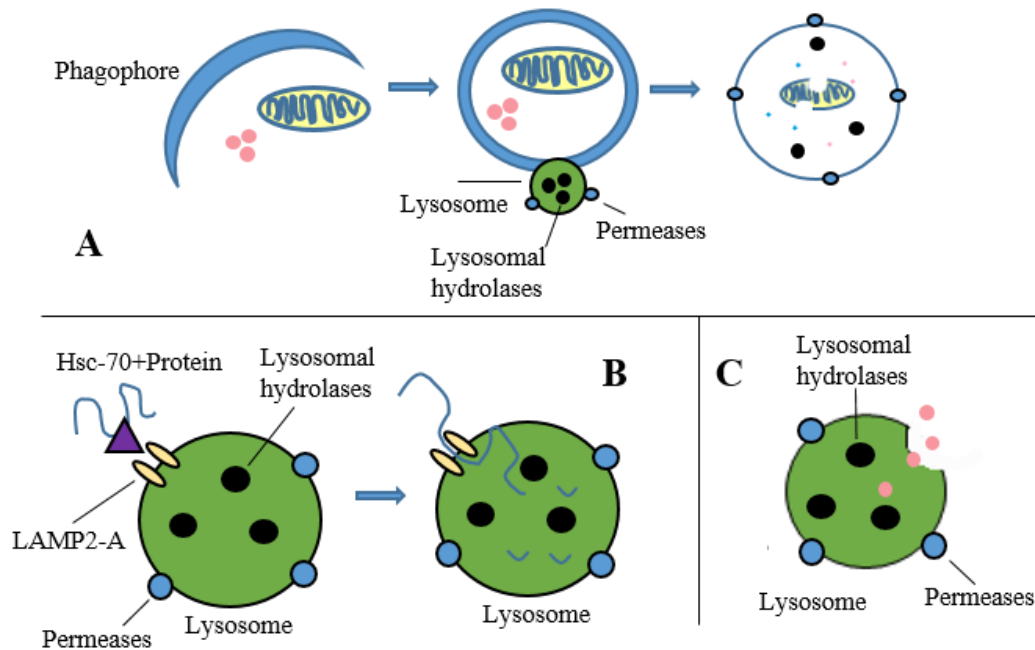


Figura In-1: Tipos de autofagia en células de mamíferos. Procesos de eliminación de componentes celulares mediados por lisosomas: Macroautofagia (autofagia) (A), autofagia mediada por chaperonas (CMA) (B) y microautofagia (C). Figura adaptada de Parzych y Klionsky, 2014 [2].

Aunque la importancia del proceso de autofagia se conoce ampliamente en mamíferos, gran parte de la mecánica del proceso se conoce gracias a estudios llevados a cabo en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* [3-7]. Mediante estudios de *screening* en levaduras se han identificado un total de 32 genes relacionados con el proceso de autofagia, los denominados genes Atg, de los cuales gran parte se encuentran conservados en hongos, plantas, gusanos, moscas y mamíferos. Éstos se traducirán dando lugar a una compleja red de proteínas Atg (ATG en mamíferos) que actuarán facilitando la ruta autofágica.

Una de las funciones primordiales de este proceso es ofrecer a la célula protección frente a falta de nutrientes y estreses relacionados. En condiciones de baja disponibilidad energética la autofagia permite que se degraden gran cantidad de macromoléculas, lo que permitirá a la célula afrontar sus demandas energéticas [8].

1.1.2. Mecanismos moleculares de la ruta de autofagia

El proceso de autofagia comienza con el aislamiento de una sección de membrana conocido como fagóforo, que puede provenir de bicapas lipídicas procedentes de

1. Introducción

retículo endoplásmico (RE), y/o de la red trans del complejo de Golgi, así como de endosomas [9, 10], siendo no obstante la procedencia de esta membrana un tema controvertido en el caso de mamíferos.

Se proponen tres modelos de biogénesis de los autofagosomas en función a la procedencia de la membrana. El primero de ellos postula que la membrana proviene primordialmente de otros orgánulos citoplasmáticos (“plataformas”) como sería por ejemplo el RE (modelo de maduración). Otro modelo baraja la posibilidad de que esta membrana puede proceder de diversas fuentes (modelo de ensamblado) y el último modelo combina los dos anteriores, y propone que los autofagosomas se forman a partir de una plataforma citoplasmática y durante la maduración del mismo se agregan más porciones de membrana procedentes de otros orgánulos. Por tanto, no está claramente establecido si el origen de esta membrana procede directamente del retículo, de un subdominio de éste o de compartimentos que no están relacionados con el mismo [8].

Este aislamiento de una fracción de membrana viene mediado por la actuación del denominado “complejo de pre-iniciación”. Éste es un complejo proteico tetramérico en el cual juega un papel fundamental la proteína quinasa 1 similar a Unc-51 (ULK1), análoga a la proteína Atg 1 encontrada en levaduras. Esta proteína quinasa es capaz de regularse de forma positiva o negativa por otras quinasas que actúan aguas arriba de ella como “sensores nutricionales”. Ejemplos de ello son el complejo 1 multiproteico de la diana de rapamicina en mamíferos (mTORC1) y la proteína quinasa dependiente de AMP, (AMPK). En condiciones de escasez de nutrientes el complejo de pre-iniciación compuesto por ULK1, ATG13, ATG101 y la proteína FIP200, es capaz de actuar sobre el complejo de iniciación (también conocido como complejo I o complejo PI3K clase III) en el que juega un papel fundamental la proteína VPS34. Ésta, junto con el resto de proteínas que forman el complejo (VPS15, Beclina 1 y ATG14) favorece la generación de fosfatidilinositol 3 fosfato (PI (3) P). Esta acumulación lipídica en forma de PIs, crea una plataforma estable sobre la cual se podrá ensamblar posteriormente la maquinaria proteica encargada de la elongación del fagóforo, proteínas que harán finalmente que las membranas del mismo se expandan y terminen por cerrarse formando una estructura de doble membrana que es el autofagosoma. Las proteínas que son reclutadas a estas zonas de acumulación de PIs pertenecen a la familia WIPI y son capaces de reconocer al PI(3)P uniéndose a él. Una vez reclutadas estas proteínas, la WIPI2 es capaz de reconocer a ATG16L1, que forma parte de un sistema de conjugación similar al de

1. Introducción

ubiquitina que será el encargado de llevar a cabo la elongación del fagóforo [8] (ver figura In-3).

Existen dos sistemas de conjugación similares a los de ubiquitinación que juegan un papel fundamental en la elongación del fagóforo y posteriormente en la maduración del autofagosoma. El que actúa en primer lugar es el complejo multiproteico conocido como sistema de conjugación ATG12. La proteína ATG12 es similar a la ubiquitina que, aunque presenta una composición aminoacídica diferente, es capaz de plegarse de forma similar a ella (ver figura In-2). Al igual que sucede con la ubiquitina, esta proteína posee una glicina en su extremo carboxilo terminal que es fundamental para la formación de enlaces tioéster con los residuos de cisteína de los sitios activos de las proteínas ATG7 y ATG10 y de enlaces amida con los residuos de lisina del sitio activo de ATG5 [11].

En primer lugar, la proteína ATG7 (proteína similar a E1) activa el extremo C-terminal de ATG 12, que es transferido a la proteína ATG10 (proteína similar a E2). Esta segunda activación potencia la unión covalente de ATG12 con ATG5. Este nuevo complejo (ATG12/ATG5) interaccionará con la proteína ATG16L1 formando un complejo supramolecular que ayudará a definir el lugar de formación del autofagosoma, favoreciendo además la segunda conjugación clave necesaria para la hemifusión de las membranas del fagóforo y el reconocimiento de componentes marcados para su degradación [8]. El complejo ATG12/ATG5/ATG16L1 actuará como una proteína similar a E3 catalizando la reacción de conjugación de las proteínas de la familia ATG8 con el lípido fosfatidiletanolamina (PE) [11].

Dentro de la familia de proteínas ATG8, en ratón y humanos encontramos LC3 (cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada a microtúbulos) GABARAP y GATE 16, siendo la primera de ellas la que se encuentra mejor caracterizada y la que juega un papel homólogo a la proteína Atg8 en levaduras. LC3 se sintetiza en el citoplasma celular en su forma larga (pro-LC3). Ésta, al igual que el resto de proteínas de la familia ATG8, presentan residuos de arginina en su extremo C-terminal los cuales en condiciones de inducción de autofagia son eliminados proteolíticamente por la acción de la cisteína proteasa ATG4, dando lugar a la forma LC3I [11]. Esta forma corta de la proteína, que se encuentra en el citoplasma, presenta un residuo de glicina expuesto en su extremo carboxilo terminal, que será reconocido y activado nuevamente por la

1. Introducción

proteína ATG7 (proteína similar a E1), pasará a la proteína ATG3 (proteína similar a E2) y finalmente en conjunción con el complejo ATG12/5/16L1, que actuará como una proteína similar a E3, conjugará a LC3I con PE dando lugar a la proteína LC3II que se unirá fuertemente a los autofagosomas tanto en su cara interna como externa. Esta segunda conjugación de LC3 con PE, que dará lugar a LC3II, marcará la maduración del autofagosoma. La lipídación del resto de proteínas de la familia ATG8 actuarán también favoreciendo la extensión de los extremos del fagóforo y su posterior cerrado [12] (ver figura In-2).

Por tanto, la membrana aislada en un primer momento comenzará a elongarse para atrapar a componentes citoplasmáticos que posteriormente serán degradados, gracias al complejo ATG12/5/16L1 que se localiza en el fagóforo. En los últimos pasos de elongación de esta estructura, este complejo se irá dissociando progresivamente a la vez que se va incrementando la lipídación de LC3I para dar lugar a LC3II y su anclaje a la estructura en formación. Finalmente, el fagóforo se cerrará dando lugar al autofagosoma el cual presenta LC3II tanto en su cara interna como en su cara externa (ver figura In-3).

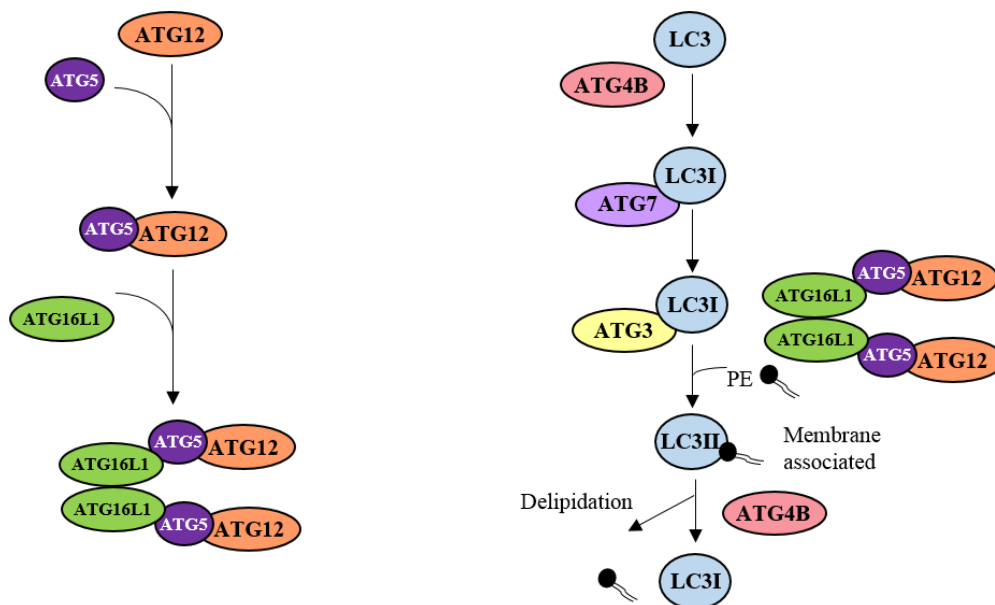


Figura In-2: Sistemas de lipídación implicados en el proceso de autofagia: Proteínas y enzimas implicadas en las conjugaciones de los sistemas ATG12-ATG5-ATG16L1 (A) y LC3 (B). Imagen adaptada de Parzych y Klionsky, 2014 [2].

Estos últimos pasos de la formación del autofagosoma parecen estar regulados también por las proteínas ATG2A y ATG2B, las cuales se asocian con las proteínas WIPI1. Aunque el papel de este complejo no está completamente claro, parece ser que

1. Introducción

puede participar en el cerrado de los autofagosomas actuando tras el proceso de lipidación de LC3II, pues su falta da lugar a la acumulación de autofagosomas abiertos [13].

Una vez formado, el autofagosoma ha de fusionarse con los lisosomas para que su contenido se degrade, y el momento en el que se produzca esta degradación es crucial ya que debe llevarse a cabo una vez que el autofagosoma se encuentre completamente cerrado. Una posible señal que indica que los autofagosomas están listos para fusionarse con los lisosomas son las proteínas ATG8. Trabajos en levaduras sugieren que la pérdida de la proteína Atg8 en la membrana externa del autofagosoma, propicia el estímulo de fusión con los lisosomas y el desensamblado de la maquinaria de iniciación [14, 15]. Una vez cerrado el autofagosoma, ATG4 volverá a actuar delipidando la forma de LC3II, permitiendo que se genere nuevo LC3I para dar lugar a nuevos autofagosomas[11] y al perderse de la cara externa del mismo se favorecerá su completa maduración y unión a los lisosomas [16]. No obstante, en mamíferos parece ser que la presencia de ciertas proteínas ATG8 en la superficie de esta estructura puede facilitar la unión de ésta con el lisosoma [8]. Sin embargo, el hecho de que en los autofagosomas no se encuentren complejos multiproteicos asociados con el fagóforo, como ATG16L1 o ULK1, puede implicar que la ausencia de estas proteínas presentes en las fases tempranas de formación sea la que desencadene la fusión con lisosomas [8].

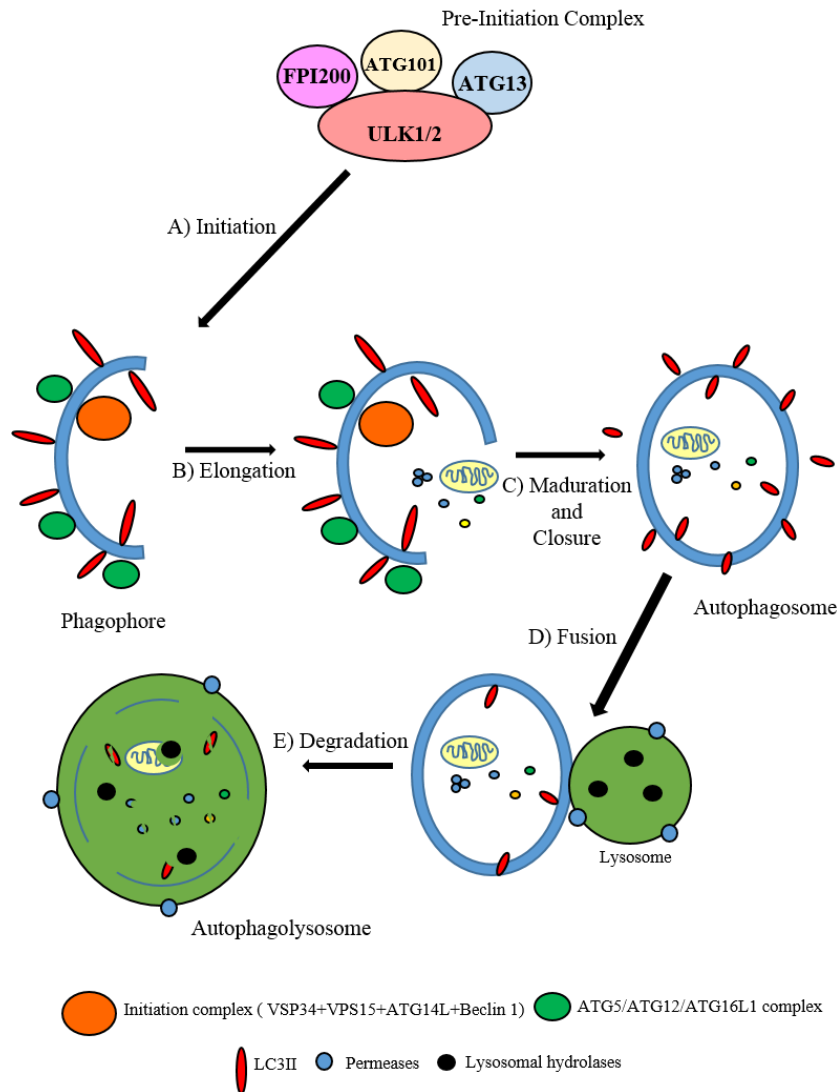


Figura In-3: Ruta de autofagia. Etapas de la ruta de autofagia y complejos y proteínas implicadas en ellas. El proceso puede dividirse en 5 etapas las cuales aparecen representadas con letras: Iniciación (A), elongación del fagóforo (B), maduración y cierre del autofagosoma (C), fusión del autofagosoma con el lisosoma (D) y degradación del contenido del autofagolisosoma (E) cuyos subproductos serán liberados al citoplasma por las permeasas lisosomales. Imagen adaptada de Yang y Klionsky, 2010 [17].

El citoesqueleto parece jugar un papel fundamental en el proceso de fusión del autofagosoma con el lisosoma [18]. El movimiento de proteínas y orgánulos celulares por la superficie de los microtúbulos está sujeto a la acción de dos “motores” moleculares como son las dineínas y las quinesinas [19]. En mamíferos, los endosomas tardíos así como los lisosomas se encuentran particularmente en zonas perinucleares. Diversos estudios han demostrado cómo los autofagosomas maduros se mueven a través de los microtúbulos hacia las zonas perinucleares ricas en lisosomas, incrementándose así la eficiencia de fusión con éstos [20, 21].

1. Introducción

Se ha demostrado el importante papel que juega la dineína en la facilitación del proceso de fusión entre autofagosomas y lisosomas, puesto que en estudios llevados a cabo *in vitro* en cultivos de *D. melanogaster* y células murinas, se observó que cuando la dineína no era funcional se producía la acumulación de autofagosomas y una reducción en la eliminación de agregados proteicos [22]. A la vista de este papel positivo de la dineína cabría pensar que la quinesina estaría actuando de manera opuesta a la primera, impidiendo la movilización de los fagosomas a las inmediaciones perinucleares. No obstante, parece que ambos motores moleculares operan de manera coordinada para que esta facilitación se haga posible [8]. En este sentido, la eliminación de la quinesina KIF5B produce un bloqueo de la autofagia y una acumulación de autofagosomas en las zonas perinucleares [23]. Por el contrario, otros estudios han determinado que la acumulación de lisosomas en la zona perinuclear, debida a la falta de actividad de quinesinas KIF1 B-b y KIF2Ada lugar, por el contrario, un incremento en la fusión entre fagosomas y lisosomas, situación que se puede revertir cuando estas proteínas se sobre-expresan y los lisosomas viajan a la periferia celular [24]. Estas evidencias parecen indicar que la localización de los lisosomas *per se* puede determinar el ratio de fusión entre éstos y los autofagosomas [8].

Otras proteínas que juegan un papel importante en la fusión de los autofagosomas con los lisosomas son la familia de proteínas RAB GTPasas. Dentro de esta familia parece ser que RAB7, que se encuentra en endosomas tardíos y lisosomas, facilita la movilidad de éstos y su posterior fusión, reclutando dineínas a los endosomas que interaccionan con las proteínas lisosomales de interacción con RAB (RILP) [25]. Además, RAB7 también es capaz de reclutar quinesinas a los autofagosomas mediante la unión directa de la proteína FYCO1 que posee un motivo de interacción con LC3. Esta combinación, junto con sus motivos de unión a RAB7 y a PI (3)P, hace que esta proteína se asocie de manera directa con los autofagosomas [8].

Por último, se ha sugerido también que los componentes de la maquinaria SNARE como VAM7 y VAM9 favorecen el proceso de unión de los autofagosomas con los lisosomas [2, 26].

1.1.3. Factores que regulan la ruta de autofagia

El proceso de autofagia ayuda a la célula a responder a una gran cantidad de factores de estrés intra y extracelular que incluyen la escasez de nutrientes, la presencia/ausencia

de insulina y otros factores de crecimiento, la hipoxia y el estrés de retículo, entre otros [27].

Por ello, no es raro que numerosos sensores metabólicos regulen la biogénesis de autofagosomas, actuando normalmente en etapas tempranas de su formación sobre los complejos de pre-iniciación e iniciación. Dentro de estos sensores juegan un papel fundamental en la regulación de la ruta de autofagia AMPK, como sensor del ratio AMP/ATP celular y mTOR como sensor de la cantidad de aminoácidos (ver figura In-4).

La serina/treonina quinasa mTOR (diana de rapamicina en mamíferos) es uno de los principales reguladores negativos de la ruta de autofagia conservado de levaduras a humanos. Esta quinasa puede encontrarse formando parte de dos complejos proteicos conocidos como: Complejo 1 mTOR (mTORC1) compuesto por las proteínas: mTOR, Raptor, mLST8 y ocasionalmente por las proteínas PRAS40 y DEPTOR que lo regulan negativamente, y complejo 2 mTOR (mTORC2) compuesto por mTOR, mLST8, rictor, SIN1 y Protor [28].

En condiciones normales el complejo de pre-iniciación y concretamente las proteínas ULK1 (y se piensa que también ULK2, presente en mamíferos, que desempeña una función similar a ULK1) y ATG13 se encuentran fosforiladas por la acción del complejo mTORC1. Esta fosforilación impide la interacción entre ULK1 y AMPK lo que da lugar a una inhibición en la ruta de autofagia [29]. Además, los factores de crecimiento también regulan la ruta de autofagia a nivel del complejo mTORC1. Concretamente cuando estos factores, como el factor de crecimiento insulínico (IGF-1) se unen a sus receptores (IGF1-R), provocan una serie de fosforilaciones (mediadas por tirosina quinasa) que actúan sobre los sustratos 1 y 2 del receptor de insulina (IRS1 y IRS2) los cuales terminan activando a AKT (también conocida como serina/treonina proteína quinasa B). Esta proteína quinasa, a su vez, inhibe la actividad del complejo TSC1/TSC2 (proteínas mutadas en la esclerosis tuberosa) reguladores negativos del complejo mTORC1, lo que provocará finalmente una inhibición de la ruta de autofagia en condiciones nutricionales óptimas [30] (ver figura In-4).

1. Introducción

Por su parte, el complejo mTORC1 también puede actuar de forma negativa sobre el flujo autofágico regulando la actividad del factor de transcripción EB (TFEB) el cual está implicado en la biogénesis lisosomal [31, 32]. De manera interesante, aunque el complejo mTORC1 es un regulador negativo de la ruta de autofagia, el complejo mTORC2 es requerido para la progresión de la misma, probablemente por la actuación de este a nivel del citoesqueleto de actina, que es clave en diversos estadios de la formación del autofagosoma [8]. Otro de los reguladores importantes de la ruta de autofagia es la proteína quinasa AMPK. Cuando ésta es activada por bajos niveles energéticos (mayor cantidad de AMP que de ATP) fosforila a los complejos TSC1/TSC2 activándolos, y éstos a su vez actúan inhibiendo mTORC1 permitiendo la inducción de la autofagia [33]. De manera alternativa AMPK puede actuar inhibiendo directamente mTORC1 [29, 34, 35] o actuando de manera directa sobre ULK1 [36, 37] activando las fases de pre-iniciación de la ruta (ver figura In-4).

Diversos estudios apuntan también a que ULK1 puede autofosforilarse o ser fosforilada por AKT en presencia de insulina [38].

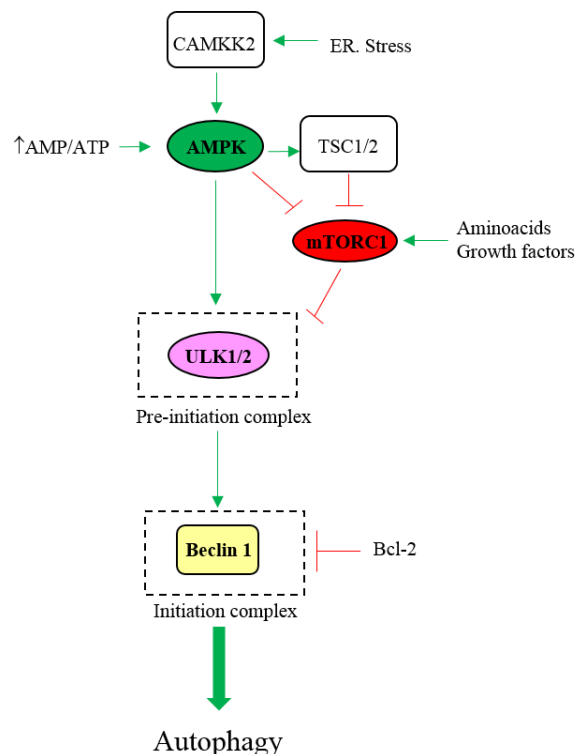


Figura In-4. Regulación de la ruta de autofagia. Principales estímulos y proteínas reguladoras del proceso autofágico. Las líneas marcadas en verde indican regulación positiva, mientras que las rojas indican regulación negativa. Los cuadros punteados hacen referencia al resto de proteínas formadoras de los complejos de pre-iniciación e iniciación de la ruta de las cuales se han destacado las más significativas. Figura adaptada de Parzych y Klionsky, 2014 [2].

1. Introducción

Atendiendo ahora a las posibles modificaciones post-traduccionales que pueden regular el complejo de iniciación, nos centraremos en las que afectan a la proteína Beclina 1. Esta proteína se regula positivamente mediante su interacción con ATG14L1[39] y AMBRA1 (molécula activada en la autofagia regulada por Beclina 1) [40] y de forma negativa con proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 (*B cell CLL/lymphoma 2*). En condiciones de estrés nutricional, la proteína Bcl-2 se fosforila, disociándose de Beclina 1 siendo ésta capaz entonces de formar parte del complejo de iniciación [41] (ver figura In-4).

Además, el propio complejo ULK1/ULK2, activado en condiciones de privación de nutrientes, es capaz de fosforilar tanto al agregado Beclina 1-ATG14L [42] como a la proteína AMBRA1 [43] favoreciendo que se continúe con la ruta.

Por último, se ha observado también que un incremento en las concentraciones de calcio intracelular, derivado de estrés del retículo endoplásmico, actúa a nivel de las proteínas CAMKK2/CaMKK β (proteína quinasa quinasa 2 y β dependientes de calcio/calmodulina) que activan a AMPK induciendo la autofagia [44] (ver figura In-4). La acumulación de proteínas mal plegadas en el RE causada por diversas “agresiones” puede inducir también la ruta autofágica tanto en levaduras como en mamíferos. No obstante, el papel de la autofagia a nivel de estrés de retículo es controvertido, pues existen evidencias que apoyan que en algunos casos promueven la supervivencia celular, mientras que otros favorece la muerte celular [2, 45].

1.1.4. Papel de la proteína SQTSM1/p62 en la autofagia selectiva

Mientras que la autofagia de componentes no específicos se induce en condiciones de estrés nutricional, ésta también puede ser un proceso altamente específico que medie el mantenimiento de la célula y su homeostasis. Entre estos componentes específicos se pueden encontrar peroxisomas, mitocondrias y proteínas ubiquitiniladas [2]. Una de las proteínas implicadas en el proceso de autofagia selectiva es la proteína p62 (también conocida como Sequestosoma 1 (SQTSM1)). Ya que distintos agregados proteicos y orgánulos celulares son marcados para su degradación, son necesarias proteínas que reconozcan dichas modificaciones e incorporen estos componentes a las vesículas autofágicas, siendo p62 una de estas proteínas “receptoras”. Concretamente ésta

1. Introducción

presenta una estructura compleja formada por varios dominios específicos: Un dominio C-terminal de unión a ubiquitina (UBA), una región intermedia de interacción con LC3 (LIR), responsable de la unión de proteínas ubiquitiniladas a las proteínas de la familia ATG8, en especial a LC3, que se encuentran conjugadas covalentemente a los autofagosomas, y una región de interacción con enzimas E2-ubiquitin ligasas (EIR) (ver figura In-5A).

Una vez unido el elemento al autofagosoma naciente (fagóforo), p62 estabiliza la membrana lipídica que lo compone permitiendo la expansión de ésta entorno a la “carga” seleccionada. Esta función como “andamio molecular” viene conferida por la presencia del dominio PB1 (Phox and Bem 1), que favorece también la formación de heterodímeros de p62 por los dominios N-terminales que cooperan en el reclutamiento de componentes marcados al autofagosoma [46]. Por su parte, los dominios UBA de p62 tienden a formar dímeros intermoleculares, suponiendo esta dimerización un impedimento espacial para el reconocimiento de componentes ubiquitinilados.

En un estudio muy reciente llevado a cabo por Peng y colaboradores [46], se ha determinado que el estrés de ubiquitina, es decir, el aumento de las concentraciones de esta proteína mediada por distintos estímulos (sobre-expresión de la misma, choque térmico o inhibición del proteasoma) promueve la actuación las enzimas E2 ubiquitín ligasas UBED2D2 y UBED2D3, las cuales mediante ubiquitinilación de los dominios EIR de p62 promueven la desestabilización de los dímeros de las regiones UBA, siendo entonces capaz p62 de reconocer las “cargas” unidas a ubiquitina y dirigirlas a los fagóforos para su posterior degradación lisosomal [46] (ver figura In-5B y 5C).

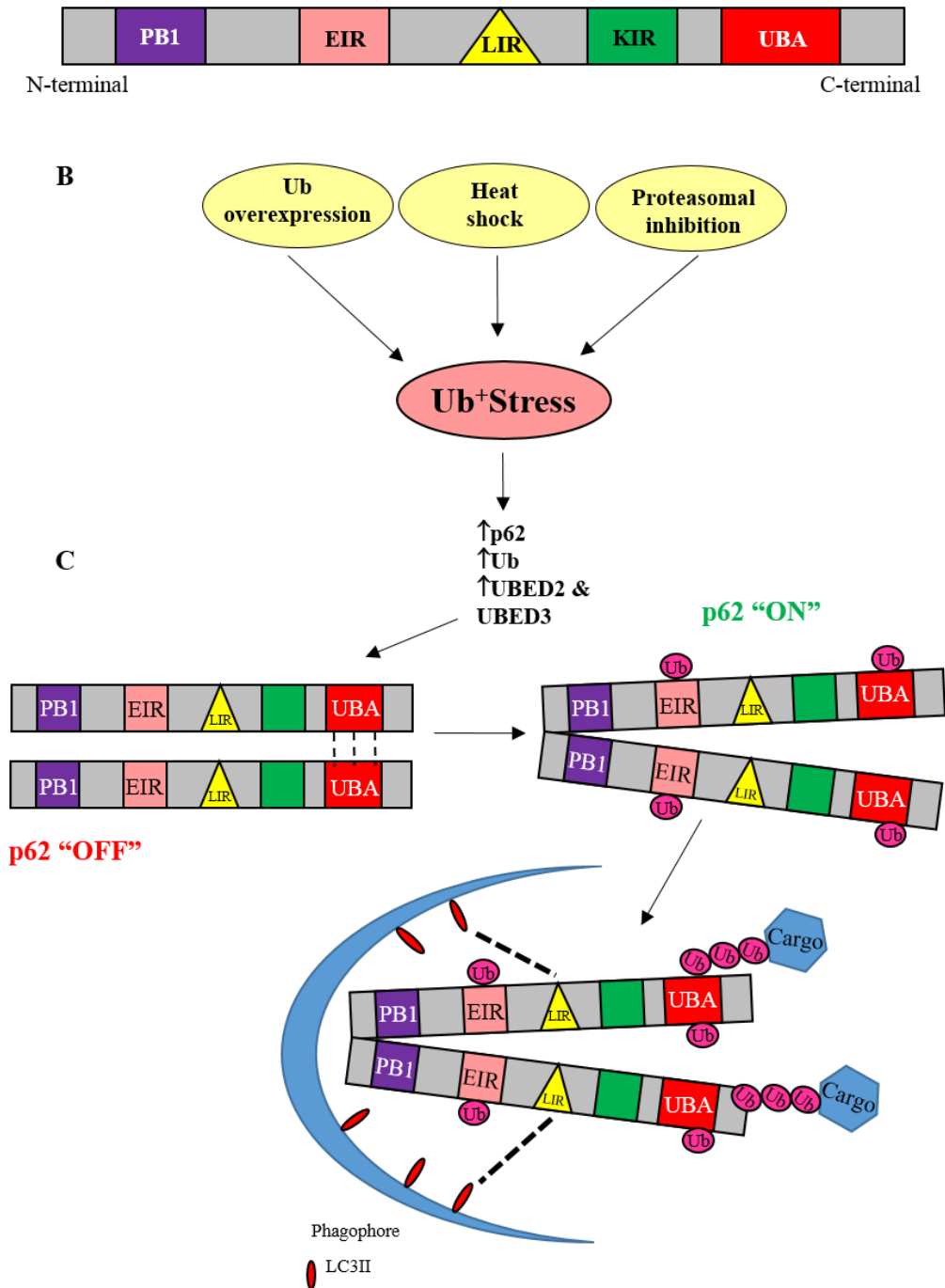


Figura In-5: Estructura de la proteína SQTSM1/p62 (A), estímulos que controlan su función (B) y mecanismo de actuación como proteína "receptora" en el proceso de autofagia selectiva (C). Figura adaptada de Peng et al. 2017 [46].

Por último, la proteína p62 también interviene en la degradación lisosomal de bacterias intracelulares, proceso conocido como "xenofagia"[47].

1.1.5. Autofagia selectiva: mitofagia

Como se comentó con anterioridad, el proceso autofágico puede ser no específico en condiciones de privación de nutrientes o por el contrario puede estar dirigido a orgánulos celulares concretos[2]. Cuando el orgánulo seleccionado para la degradación es la mitocondria, este proceso se conoce como mitofagia y en mamíferos juega un papel fundamental en la maduración de algunos tipos celulares y en la eliminación de estos orgánulos cuando dejan de ser funcionales para la célula [48, 49]. Dependiendo de si se trata de un proceso madurativo o un proceso de eliminación de mitocondrias dañadas, la señalización implicada es diferente [2].

El primero de ellos ha sido descrito durante la maduración de células sanguíneas en mamíferos. En las mitocondrias de estas células se expresa la proteína BNIP3L/NIX (proteína tipo 3 de interacción con Bcl-2) concretamente en la membrana mitocondrial externa (OMM). Esta proteína presenta un dominio de reconocimiento para las proteínas LC3 y GABARAP, que se localizan en el fagóforo en formación [50]. Al ser reconocidas estas proteínas por BNIP3L, las mitocondrias pasarían a englobarse en el interior de los autofagosomas, degradándose finalmente por la acción de las proteínas lisosomales (ver figura In-6A).

Cuando la eliminación de mitocondrias se centra en la degradación de orgánulos dañados, el proceso ocurre de manera algo diferente, aunque el fin del orgánulo continúa siendo la degradación. En este caso, la proteína citosólica Parkin (proteína 2 asociada a la enfermedad de Parkinson juvenil) (ubiquitin ligasa E3) es reclutada a la membrana mitocondrial externa por la proteína quinasa PINK1 (quinasa putativa 1 inducida por PTEN). En mitocondrias sanas esta proteína es importada a la membrana mitocondrial interna, donde se degrada por procesos proteolíticos mediado por las proteínas PMPCB y PARL [51].

Recientemente se ha descrito un nuevo papel de PINK1 en mitocondrias sanas, donde esta quinasa es capaz de fosforilar a una proteína de la membrana interna mitocondrial, MIC60, controlando entonces ambas el remodelado de las uniones entre crestas mitocondriales, la actividad del complejo I de la CTE y la supervivencia neuronal *in vivo* [52]. Por su parte, cuando las mitocondrias se encuentran dañadas, presentando un potencial de membrana ($\Delta\Psi$) bajo, PINK1 no es degradada, quedando

1. Introducción

anclada en la OMM a modo de señal de “daño mitocondrial”. Estudios recientes han propuesto que esta proteína es capaz de dimerizarse en la OMM autofosforilándose y siendo capaz también de fosforilar a ubiquitinas unidas a otras proteínas mitocondriales, así como al propio dominio de unión a ubiquitina que posee Parkin. Parkin, ahora activada, ubiquitinilará a distintos sustratos mitocondriales que serán a su vez fosforilados por la propia PINK1, actuando ambos por tanto en un ciclo de retroalimentación positiva [53].

Los sustratos ubiquitinilados serán entonces reconocidos por proteínas como p62, que posee dominios de asociación a ubiquitina (UBA), así como dominios de reconocimiento para la proteína LC3. Por tanto, aquellas mitocondrias que hayan sido reconocidas por p62 viajarán al autofagosoma, degradándose finalmente en él [2] (ver figura In-6B).

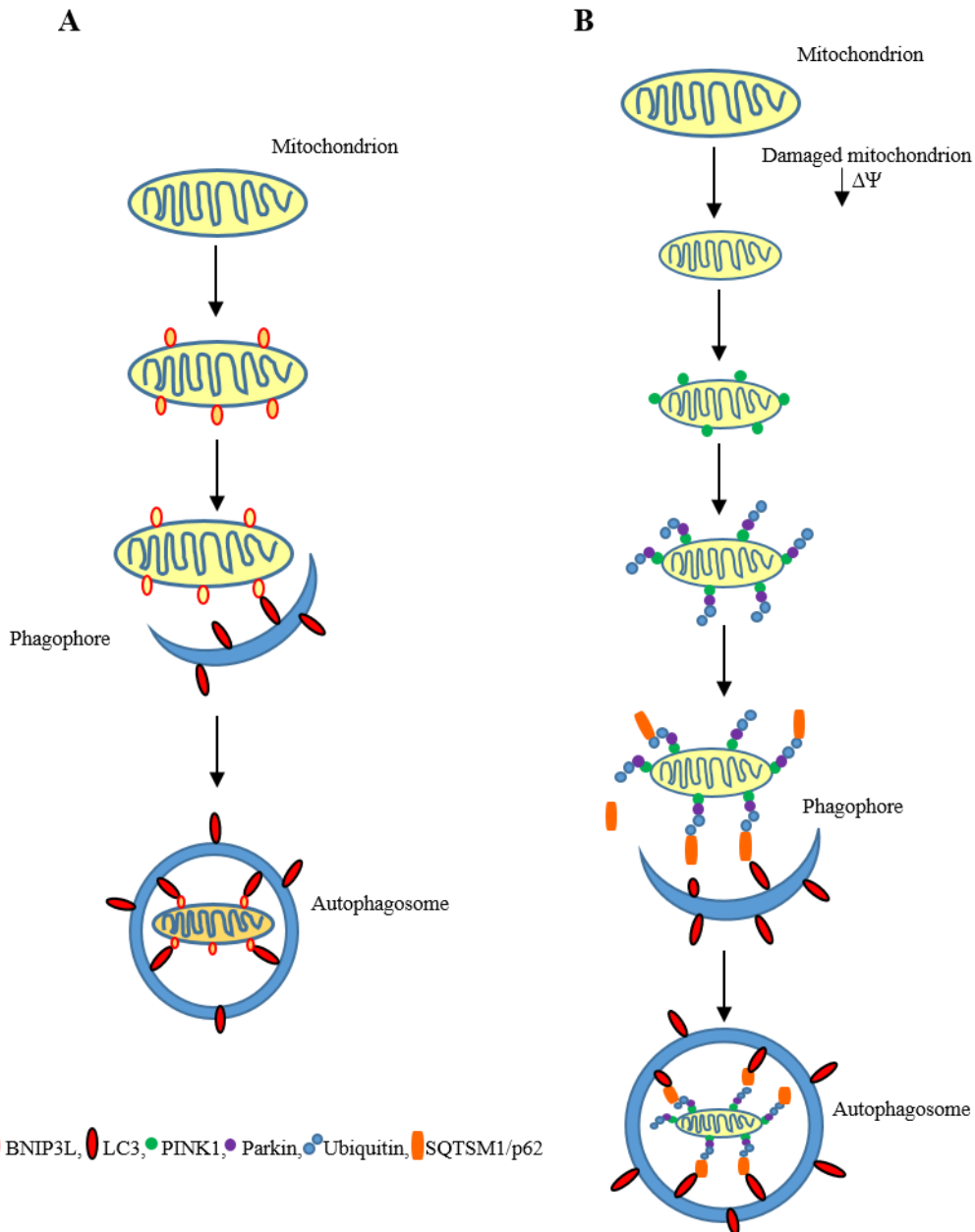


Figura In-6: Mecanismos de mitofagia. Mitofagia mediada por acción de la proteína BNIP3L y su posterior interacción con LC3, típica de procesos madurativos de los glóbulos rojos (A). Mitofagia mediada por el sistema proteico PINK1/Parkin dirigido a mitocondrias dañadas (B). Figura adaptada de Parzych y Klionsky, 2014 [2].

1.2. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

1.2.1. Qué son y cómo se producen

Según Halliwell y Gutteridge [54] un radical libre es cualquier especie química que contiene uno o más electrones desapareados, pudiendo formarse a partir de una especie no radical mediante la pérdida o ganancia de uno o más electrones. La presencia de electrones desapareados hace que estas sustancias sean altamente reactivas.

El término “especies reactivas de oxígeno” (en inglés *Reactive Oxygen Species*, o ROS), se utiliza para referirse a derivados del oxígeno sean radicales libres (superóxido, hidroxilo, peroxilo, alcoxilo o hidroperoxilo) o no (peróxido de hidrógeno, ozono u oxígeno singlete, entre otros) [54].

Las principales ROS que podemos encontrar a nivel celular son las siguientes (ver figura In-7):

- Radical hidroxilo (OH \cdot): en los sistemas biológicos puede originarse a partir de H₂O₂ mediante la reacción de Fenton o por fisión homolítica inducida por radiación UV, entre otros procesos. Está considerada como la especie más reactiva de todas las derivadas del oxígeno.
- Radical superóxido (O₂ \cdot^-): se produce cuando el oxígeno molecular capta un único electrón y se reduce, formándose así la forma aniónica conocida como superóxido. Puede producirse por la acción de algunas enzimas como es el caso de la xantina oxidasa, aunque este hecho no sucede con frecuencia en sistemas *in vivo*. Además, se ha descrito que la autooxidación de diversas moléculas tales como el gliceraldehído, la cisteína o el FADH₂ en presencia de oxígeno puede dar lugar a la producción de este radical, sugiriéndose además que es necesaria la presencia de iones metálicos como el hierro o el cobre para que esto se produzca. La forma protonada del radical O₂ \cdot^- , el hidroperoxilo (HO₂ \cdot), es incluso más reactiva que la primera pudiendo iniciar reacciones de peroxidación en los ácidos grasos.
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂): se trata de una especie reactiva de oxígeno no radical que es capaz de atravesar fácilmente las membranas celulares provocando daños directos como la inactivación de la enzima gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa. Esta molécula es capaz de reaccionar fácilmente con

1. Introducción

iones metálicos produciendo radical hidroxilo. Además, a altas concentraciones (10-100 μm) presenta un carácter citotóxico [55].

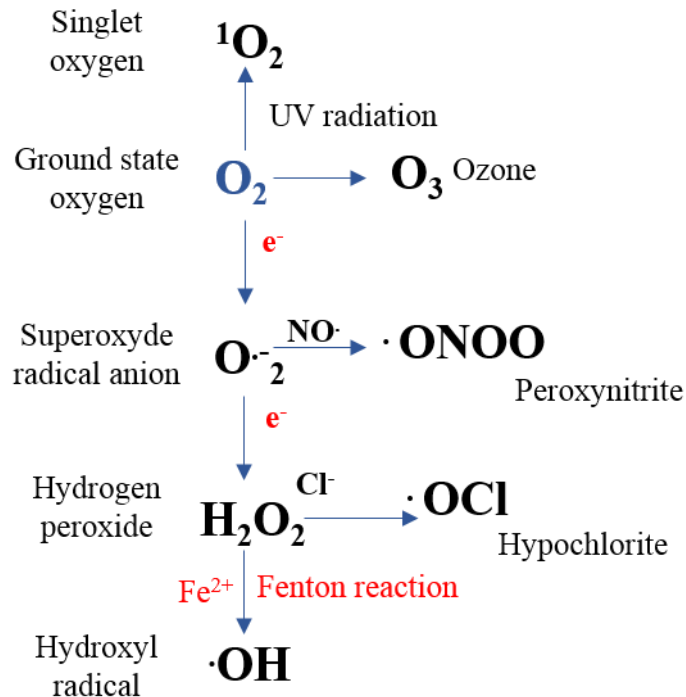


Figura In-7: Principales especies reactivas de oxígeno. Figura modificada de Bartosz, 2009 [56].

1.2.2. Interacciones entre las ROS y las biomoléculas celulares

Las ROS pueden interactuar con las principales biomoléculas celulares provocando numerosos procesos deletéreos, como los producidos durante el envejecimiento, o numerosas patologías como el cáncer, enfermedades neurológicas o cardiovasculares. Las principales biomoléculas con las que pueden reaccionar las ROS son:

ADN: el daño oxidativo a este nivel puede provocar mutaciones, pérdida de la expresión o de síntesis de proteínas, modificaciones oxidativas en las bases nitrogenadas, fragmentaciones, desmetilación de “islas CpG” (regiones del ADN que presentan una gran cantidad de pares de citosina y guanina unidos por enlaces fosfato) que pueden activar la expresión de determinados genes, entre otras acciones.

Proteínas: los aminoácidos que forman parte de la estructura de las proteínas, más concretamente tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y cisteína, son propensos a ser atacados por radicales libres, normalmente por $\text{OH}\cdot$ [57]. Estas

reacciones de oxidación producidas a nivel de los aminoácidos pueden provocar cambios conformacionales en la proteína que deriven en pérdida o modificación de las funciones biológicas de la misma. Además, pueden producirse entrecruzamientos entre cadenas peptídicas, fragmentación de la estructura proteica o formación de grupos carbonilos [58], lo cual es ampliamente utilizado como marcador del estrés oxidativo a nivel proteico.

Lípidos: normalmente el daño oxidativo producido en estas estructuras es producto de la peroxidación lipídica, que afecta primordialmente a estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) [59]. Estas modificaciones pueden conllevar cambios en la permeabilidad de la membrana celular interfiriendo con numerosas reacciones que tienen lugar a nivel de las membranas.

1.2.3. La mitocondria como fuente de ROS

La mitocondria es un orgánulo de vital importancia para el correcto funcionamiento de la célula, ya que desempeña la importantísima función, entre otras, de generar ATP, que actúa como moneda energética del organismo. Este proceso es llevado a cabo mediante la actuación de la cadena de transporte electrónico, que es un conjunto de complejos multiproteicos que se localizan embebidos en la membrana mitocondrial interna (IMM).

En condiciones fisiológicas normales, la glucosa es convertida en piruvato por una serie de procesos que forman la ruta metabólica de la glucólisis y que tiene lugar en el citosol. El piruvato se introduce en la mitocondria y es descarboxilado a acetil CoA, molécula que entra en el ciclo de Krebs y que dará lugar entre otros productos a NADH y FADH₂. Estas moléculas serán las que alimenten el proceso de fosforilación oxidativa a través de la cadena de transporte electrónico [60]. El NADH y FADH₂, serán oxidados en los complejos mitocondriales I y II, respectivamente. Los electrones que se liberan serán transportados al complejo III por la ubiquinona y posteriormente al complejo IV por el citocromo c, donde serán transferidos al oxígeno molecular para formar agua. La energía que se desprende del transporte electrónico es usada por los complejos I, III y IV, para generar un gradiente de protones entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana, lo que producirá un potencial mitocondrial ($\Delta\Psi$) negativo en la cara

1. Introducción

interna de la membrana mitocondrial y generará fuerza protón motriz. Ésta será usada por el complejo V para finalmente generar ATP [61].

La mitocondria ha sido identificada como una de las principales fuentes de ROS a nivel celular [62, 63]. Dichas especies intervienen en el desarrollo de gran cantidad de patologías y procesos deletéreos (como el envejecimiento) aunque también juegan un importante papel en la señalización rédox entre este orgánulo y el resto de la célula [64, 65].

El primer estudio que determinó que la cadena de transporte electrónico era capaz de generar ROS, se publicó en el año 1966 [66] y, posteriormente, Chance y colaboradores determinaron, de forma pionera, que mitocondrias aisladas eran capaces de producir H_2O_2 [67, 68]. Posteriormente, se demostró que este peróxido era producto de reacciones de dismutación producidas en la mitocondria con el fin de neutralizar la formación de anión superóxido. De forma paralela se descubrió que la reacción de dismutación era llevada a cabo por una superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD), lo que puso de manifiesto la importancia de la mitocondria como fuente productora de O_2^- [69].

Son pocos los donadores electrónicos de electrones mitocondriales que, *per se*, poseen un potencial termodinámico suficiente para reducir al oxígeno dando lugar a anión superóxido. Bajo la mayoría de las circunstancias, moléculas como el NADH, NADPH, QH_2 (coenzima Q reducido o ubiquinol) y el glutatión no reaccionan de forma directa con el oxígeno para generar anión superóxido, sino que la reacción se produce en sitios rédox activos dentro de grupos prostéticos, o cuando estos transportadores electrónicos, como el QH_2 , se unen a proteínas cuyos factores cinéticos favorecen o impiden que se produzca la reacción. Existen evidencias de que los complejos I, III y IV, pero nunca el complejo II, y los dos transportadores “móviles” de electrones Q y citocromo *c*, son capaces de organizarse dando lugar a distintas combinaciones de supercomplejos en la membrana mitocondrial interna [70]. Parece estar bastante establecido que la formación de una mayor o menor proporción de superóxido a nivel de la mitocondria, está relacionada de manera directa con varios factores: a) la cantidad de transportador electrónico presente dentro del supercomplejo mitocondrial y la proporción de éste que se encuentre en estado reducido (que será, por tanto, capaz de reaccionar con el oxígeno), b) la cantidad de oxígeno local presente en la mitocondria y c) la constante de reacción de segundo orden entre el transportador electrónico y el

1. Introducción

oxígeno para dar lugar a este radical libre [71]. Ya que para la formación de $O_2^{\cdot-}$ el electrón pasa directamente del transportador (donador) al oxígeno, la distancia existente entre ambos también determinará que se produzca con una mayor o menor eficiencia [72, 73]. Además, como expusimos anteriormente, un incremento o disminución en el ratio de consumo de oxígeno por parte de la mitocondria, puede determinar la producción de $O_2^{\cdot-}$ *in vivo* debido a las alteraciones en la concentración local de oxígeno [74].

La formación de superóxido dentro de la cadena de transporte electrónico se concentra principalmente en dos puntos concretos: el complejo I (NADH deshidrogenasa) y el complejo III (Ubiquinol citocromo c reductasa) [75, 76]. Más concretamente, se ha propuesto que dentro del complejo I son los mononucleótidos de flavina y los centros ferrosulfurados, ambos dirigidos hacia la matriz mitocondrial, los posibles responsables de la generación de $O_2^{\cdot-}$. Por su parte, la producción de superóxido a partir del ciclo del Q en el complejo III, se dirige fundamentalmente hacia el lado citosólico de la membrana interna, aunque algunos estudios también sugieren que parte de la generación de ROS pudiera tener lugar hacia la cara de la matriz [77] (ver figura In-8). La contribución de estos dos componentes en la producción de superóxido mitocondrial variará en función del órgano que se considere y también en función de si la mitocondria se encuentra en un estado 3 (sintetizando ATP a partir de ADP) o 4 (en ausencia de ADP) [77, 78]. En el caso de pulmón y corazón, el complejo más activo es el III, liberando superóxido a ambos lados de la membrana. No obstante, en el caso del cerebro el complejo más activo es el I que, como se ha indicado, parece liberarlo hacia la matriz [78-80].

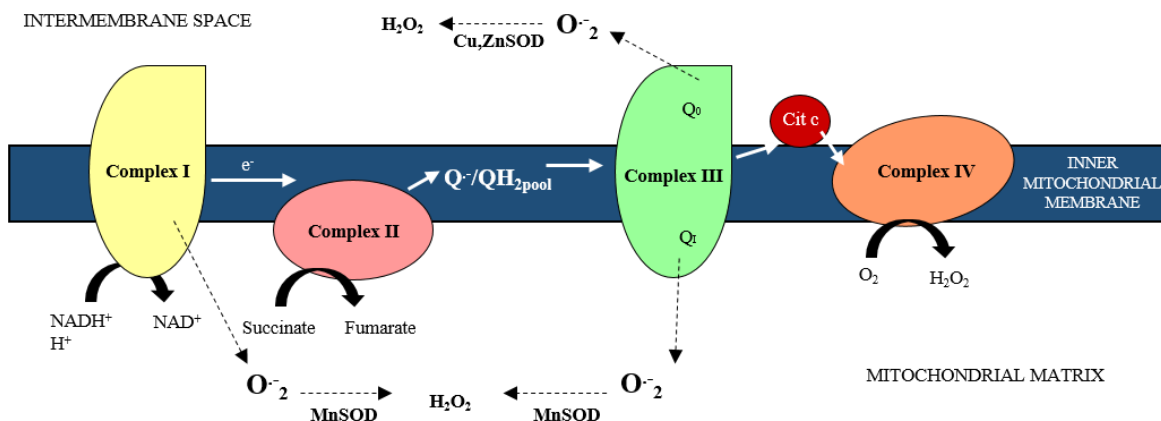


Figura In-8. Esquema que muestra, de forma resumida, la cadena de transporte electrónico y generación de ROS por parte de los complejos mitocondriales.

La producción de ROS parece deberse al estancamiento de los electrones en los complejos [81, 82]. Dicho estancamiento se produce cuando el ratio de entrada de los mismos en el complejo I excede el ritmo de paso de los electrones por el resto de componentes de la cadena [83]. Esta situación puede recrearse de manera experimental mediante la adición de ciertas sustancias que inhiben la cadena en alguno de sus complejos. Esto nos permite estudiar los lugares de generación de anión superóxido ya que, en condiciones fisiológicas normales, el proceso de transporte está optimizado de manera que se disminuya la probabilidad de que esto ocurra.

La inhibición de estos dos complejos, el I y el III, favorece la disminución de los niveles de oxidación de los intermediarios de la cadena, lo que aumenta la probabilidad de que estos electrones puedan ser traspasados al oxígeno molecular [78].

1.3. Compuestos fenólicos

1.3.1. ¿Qué son los compuestos fenólicos?

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de plantas que presentan en su estructura un anillo aromático acompañado de uno o más grupos hidroxilo. Se han descrito más de 8000 compuestos hasta la fecha [84], los cuales se clasifican atendiendo a distintos parámetros como su origen, función biológica y estructura química. Atendiendo a esta última, los compuestos fenólicos pueden ser simples, poseyendo un grupo carboxilo unido a un anillo de benceno con uno o más grupos hidroxilo o metoxilo, o compuestos denominándose “polifenoles” cuando poseen más de un anillo. De manera más concreta, estas moléculas se clasifican en cinco familias: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, ligninas y curcuminoides [85] pudiendo clasificarse también en dos grandes grupos en función de su abundancia: flavonoides y no flavonoides.

Los flavonoides son los compuestos fenólicos más abundantes y su estructura se caracteriza por poseer 15 carbonos y dos anillos aromáticos conectados entre ellos por 3 puentes de carbono. Esta estructura básica puede presentar numerosas modificaciones dando lugar a las distintas subfamilias de flavonoides que son: flavonas, flavonoles, flavan-3-oles, isoflavonas, flavononas y antocianidinas.

1. Introducción

Son numerosos los estudios que demuestran la gran capacidad antioxidante [86, 87] que desempeñan los flavonoides, por lo que su consumo está asociado con un menor riesgo de sufrir cáncer o enfermedades cardiovasculares [88]. Concretamente, estos compuestos son capaces de reaccionar con el anión superóxido, y radicales hidroxilo, peroxilo o alcoxilo [89-91] pudiendo también interactuar en diferente medida con quelantes de hierro/cobre alterando, por tanto, la propensión a la generación de radical hidroxilo por la reacción de Fenton [90]. Además, los flavonoides también tienen la capacidad de mitigar el daño oxidativo en el ADN y de prevenir la peroxidación lipídica en una gran cantidad de tipos celulares [89, 90]. Parece ser que la estructura que presentan los flavonoides es la que permite que desempeñen funciones como antioxidantes; concretamente, la presencia de insaturaciones en carbonos del anillo benceno, la posición del grupo hidroxilo en el carbono 3 y su hidrofobicidad [84].

A pesar de todo lo indicado, se ha descrito que a concentraciones elevadas los flavonoides pueden actuar como sustancias pro-oxidantes induciendo procesos como la apoptosis [87, 92, 93].

1.3.2. El flavonoide Kaempferol. Papel terapéutico

El kaempferol (3,5,7,4-tetrahidroxiflavona) (ver figura In-9) es un flavonol presente en gran cantidad de vegetales y frutas como tomates, uvas, fresas, y lúpulo entre otros, que se ha utilizado ampliamente en medicina tradicional por presentar gran cantidad de funciones biológicas entre las que se encuentra, por ejemplo, su capacidad antiinflamatoria [94].

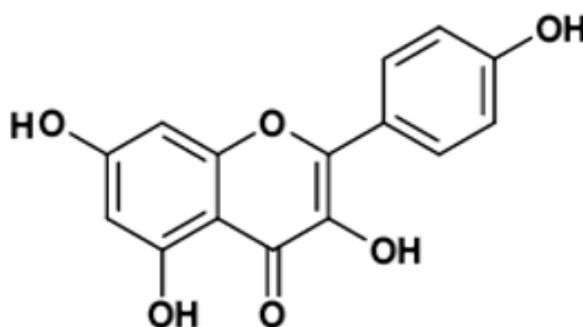


Figura In-9. Estructura química del kaempferol (3, 5,7,4-tetrahidroxiflavona)

Numerosos estudios han analizado el efecto que posee esta sustancia sobre la generación de especies reactivas de oxígeno. Por ejemplo, el tratamiento con este flavonol es capaz de disminuir la formación de ROS en células de leucemia

1. Introducción

promielocítica humana (HL-60) sin modificar el potencial de membrana mitocondrial, provocando al mismo tiempo daño oxidativo en el ADN de estas células [95]. Otros estudios describen cómo el tratamiento con este polifenol es capaz de disminuir la producción de ROS actuando a nivel de la ruta de señalización de osteopontina (una citoquina proinflamatoria) y su receptor, la integrina $\alpha\beta_3$, en células primarias de la vena del cordón umbilical humanas (HUVEC) [96]. De la misma manera, el kaempferol es capaz de disminuir el daño oxidativo en linfocitos humanos aislados, así como disminuir la generación de ROS e incrementar la supervivencia de células neuronales de hipocampo de ratón HT-22 expuestas a estrés oxidativo [97]. Apoyando estos efectos beneficiosos del kaempferol, estudios llevados a cabo en hígado de rata dañado tras el tratamiento con propacetamol, determinaron cómo el pre-tratamiento con kaempferol fue capaz de proporcionar protección ante el daño inducido mediante su acción antioxidante (disminuyendo la acumulación de TBARS e incrementando la expresión de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) y disminuyendo los niveles de interleuquinas inflamatorias) y antiapoptótica (disminuyendo el ratio Bax/Bcl-2 y la expresión de la caspasa 3) [98]. Estudios llevados a cabo en individuos alimentados con una dieta baja en kaempferol, revelaron un incremento en el daño oxidativo a ADN de linfocitos, así como una disminución en la actividad de la SOD en eritrocitos, frente a individuos que consumieron una dieta rica en este compuesto [99]. Este hecho contrasta con los resultados de Young y colaboradores [100], que observaron un menor estrés oxidativo en personas alimentadas con una dieta de frutas y vegetales pobre en flavonoles.

Existen otras evidencias experimentales que apoyan que el tratamiento con este polifenol puede favorecer la generación de ROS. De esta manera, estudios realizados en células humanas de cáncer de cérvix uterino, HeLa, determinaron que el tratamiento con kaempferol a altas dosis (200 μM) provoca un incremento en la producción de ROS al mismo tiempo que induce la expresión de marcadores apoptóticos [101]. Siguiendo esta misma línea, experiencias llevadas a cabo en distintas líneas celulares de glioblastoma multiforme (GBM) mostraron que el tratamiento con kaempferol en exposiciones largas (a partir de 72 horas) es capaz de producir un incremento en la generación de ROS y una disminución en el potencial de membrana mitocondrial, provocando además una disminución en la expresión de proteínas implicadas en el sistema de defensa antioxidante celular (SOD-1 y tiorredoxina 1 (Trx 1)) [102].

Todos estos estudios ponen de manifiesto el papel dual que puede jugar el kaempferol en cuanto a estrés oxidativo se refiere, dejando ver también las múltiples dianas sobre las que puede actuar. Por tanto, podemos decir que la concentración y la duración del tratamiento serán las que determinen que esta sustancia actúe en un sentido o en el contrario.

1.3.3. Kaempferol y su papel como modulador de la autofagia

Aparte de su papel como modulador en la generación de especies reactivas de oxígeno y en procesos apoptóticos e inflamatorios, este compuesto puede actuar como un modulador de la autofagia, afectando a este proceso de formas diversas y actuando sobre diferentes dianas. Estudios llevados a cabo en células HeLa determinaron que el tratamiento con kaempferol induce una serie de modificaciones en la bioenergética mitocondrial (disminución en el consumo de oxígeno y en la síntesis de ATP) que hace que la autofagia se active como una respuesta ante el estrés energético celular [101]. Otro trabajo postula que el tratamiento con kaempferol en células de hepatocarcinoma humano, SK-HEP-1, es capaz de inducir autofagia mediante un aumento de la regulación positiva de la ruta, incrementando AMPK, y una disminución de los estímulos negativos de la misma, disminuyendo los niveles de Akt y mTOR, lo que favorecería la inducción del proceso. Además, este tratamiento favorecerá una parada del ciclo celular en la fase G2/M [94]. Este mismo hecho se constató en otros estudios llevados a cabo en distintas líneas celulares de carcinoma hepatocelular humano, donde el tratamiento con kaempferol fue capaz de inhibir la supervivencia y la proliferación celular, favoreciendo además la activación de la ruta de autofagia, actuando nuevamente a nivel de AMPK, y viéndose por tanto incrementada la expresión de genes como Beclina 1 y Atg5 y de proteínas como LC3II [103].

El tratamiento con este polifenol también induce la autofagia como respuesta a daños inducidos a la célula, tal y como se observó en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y, donde el tratamiento con kaempferol induce la autofagia para proteger a las células frente a la apoptosis inducida por el tratamiento con rotenona [104].

Por último, el tratamiento con kaempferol es capaz de modular la ruta de autofagia favoreciendo con ello la diferenciación celular. Ejemplo de ello es la autofagia inducida

por kaempferol en células osteoblásticas MC3T3-E1, proceso necesario para la diferenciación de estas células a osteoclastos [105].

Todos estos resultados ponen de manifiesto que el kaempferol es capaz de actuar como modulador de la ruta de autofagia, favoreciendo con ello procesos tan diversos como la protección celular frente a daños o la diferenciación celular.

1.4. Sirtuinas. ¿Qué son y cómo se regulan?. Papel de la nicotinamida

Las sirtuínas constituyen una familia de proteínas desacetilasas dependientes de NAD^+ que catalizan la eliminación de grupos acetilo de las cadenas laterales de lisina modificadas. Ya que su actividad es dependiente del NAD^+ disponible, estas proteínas actuarán dependiendo del estado metabólico celular. En mamíferos se han descrito 7 genes que codifican estas 7 proteínas (Sirt1-Sirt7) cuya localización puede ser nuclear (como Sirt1, Sirt6 y Sirt7), citoplasmática (como Sirt2, aunque puede desplazarse al núcleo) y mitocondrial (como Sirt3, Sirt4 y Sirt5. Aunque se ha documentado que Sirt3 también puede translocarse del núcleo a la mitocondria en condiciones de estrés celular) [106].

Dado que uno de los objetivos de la presente tesis doctoral fue determinar el papel del kaempferol en la modulación de la producción de la producción de ROS, y dado que existen evidencias que indican que el tratamiento con este compuesto induce la actividad de Sirt3 [107, 108], nos propusimos dilucidar qué alteraciones del proceso autofágico producidas por kaempferol pueden estar mediadas por la actividad de Sirt3. Para ello se utilizó la nicotinamida (NAM). Esta sustancia es la forma amida de la vitamina B3 (ácido nicotínico) y actúa como constituyente de los factores enzimáticos NAD^+ y NADP^+ siendo además producto de la reacción de desacetilación llevada a cabo por las sirtuínas [109].

Numerosas evidencias ponen de manifiesto que esta sustancia actúa como un inhibidor de la actividad de las sirtuínas, concretamente de Sirt1 y Sirt3, al unirse a su sitio catalítico favoreciendo una reacción inversa de intercambio de bases con un intermediario en el ciclo catalítico en lugar de la desacetilación [109].

No obstante, y aunque todas las sirtuínas sufren cierta inhibición por parte de la NAM debido a la reacción de intercambio de base, parece que existen diversos mecanismos que regulan la respuesta de las sirtuínas ante este compuesto en función de los papeles fisiológicos que desempeñen. En este sentido, aunque el papel de NAM como inhibidor de la actividad de sirtuínas está bien establecido, también hay resultados que apoyan que esta sustancia puede actuar como activadora de Sirt1, ya que ésta puede ser convertida a NAD^+ por la acción de la enzima nicotinamida fosforibosiltransferasa (Nampt) [110].

1.5. El coenzima Q

1.5.1. ¿Qué es y cómo podemos encontrarlo en la célula?

El coenzima Q (Q), también conocido como ubiquinona, es un lípido cuya estructura se compone de un anillo benzoquinónico conectado a una cola lateral de isoprenos, que es fundamental para su posición específica dentro de las membranas [111].

En todos los organismos vivos se encuentran distintas moléculas de Q que difieren en su estructura, concretamente en la longitud de la cola isoprenoide lateral. Por ejemplo, en *S. cerevisiae* encontramos Q_6 , cuya cola presenta 6 isoprenos; en *Arabidopsis thaliana* y roedores encontramos Q_9 (9 isoprenos) y en *Schizosaccharomyces pombe* y humanos se produce Q_{10} (10 isoprenos) [112-114]. Normalmente suele predominar un tipo concreto de Q en cada organismo, pero en ocasiones pueden detectarse otros tipos en menor proporción. Ejemplo de ello es lo que ocurre en humanos y roedores donde puede detectarse tanto Q_9 como Q_{10} [115].

Como compuesto redox, el Q puede encontrarse en tres estados de oxido-reducción diferentes: completamente oxidado, llamándose ubiquinona, parcialmente reducido denominándose ubisemiquinona ($\text{Q}^{\cdot-}$) o totalmente reducido recibiendo el nombre de ubiquinol (QH_2) [116] (ver figura In-10).

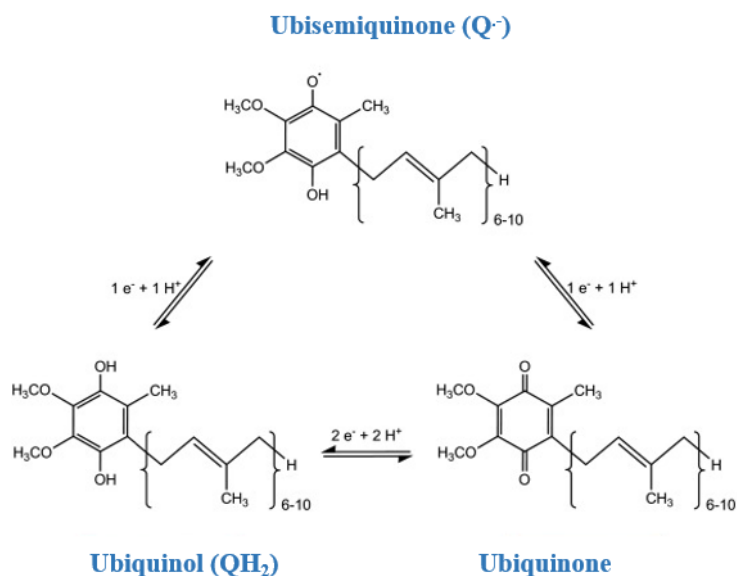


Figura In-10. Estructura del coenzima Q y sus estados redox. Figura tomada de Alcázar-Fabra *et.al* 2016 [117].

Debido a la naturaleza de su estructura, esta molécula se encuentra en las membranas de una forma determinada; es decir, la cola isoprenoide se localiza en la región central hidrofóbica, insertada en la bicapa lipídica, , mientras que el anillo benzoquinónico se localiza bien en la cara interna, bien en la cara externa de la membrana en función de los requerimientos de la célula [118]. El lugar que ocupa esta molécula en las membranas celulares confiere a las mismas una mayor fluidez [119].

1.5.2. Funciones biológicas del Q

Las funciones biológicas que puede desempeñar esta molécula son numerosas, pudiendo dividirse entre aquellas que realiza a nivel local en la mitocondria, y las que lleva a cabo en otros compartimentos celulares.

Entre las principales funciones mitocondriales que desempeña, podemos encontrarla formando parte de la CTE , donde actúa como transportador electrónico participando en última instancia en la formación de ATP [120]. Concretamente capta electrones provenientes de los complejos I y II (recibiéndolos a partir del NADH o del succinato respectivamente) y los dona al complejo III. Esta molécula también es capaz de actuar como cofactor de proteínas desacoplantes (UCPs), facilitando que éstas capten protones procedentes de los ácidos grasos [121]. Otras de sus funciones es prevenir la apertura del poro de transición de permeabilidad (PTPm), favoreciendo que no se desencadenen

ciertos eventos que podrían provocar la muerte celular por apoptosis, como una liberación excesiva de citocromo *c* al citosol o una disminución de los niveles de ATP [121]. También puede actuar como aceptor final de electrones en la síntesis de pirimidinas, reduciéndose a ubiquinol por los dos electrones recibidos en la formación de orotato [122]. Por último, estudios recientes han sugerido que la respuesta aguda a hipoxia es dependiente del ratio QH_2/Q y de su control en la producción de ROS por el complejo I mitocondrial [123].

En cuanto a las funciones extra-mitocondriales que desempeña podemos encontrarla formando parte del sistema rédox de la membrana plasmática (PMRS) encargado de transferir electrones a aceptores extracelulares desde donadores intracelulares [124] y también jugando un papel importante en la respuesta antioxidante celular frente al daño oxidativo causado por las ROS, constituyendo parte de la defensa no enzimática junto a otras moléculas como los flavonoides o el glutatión [119]. Se ha descrito que esta molécula es capaz de prevenir la oxidación de lípidos, la formación de grupos carbonilo en proteínas y de mitigar el daño a ADN, pues diversos estudios revelan que la administración de ubiquinol *in vitro* e *in vivo* reduce la rotura de esta molécula en hígado de ratón y en linfocitos humanos [125, 126].

1.5.3. Biosíntesis del Q

Aunque la ruta de síntesis del Q no se encuentra caracterizada por completo, el proceso puede dividirse en tres grandes pasos fundamentales: la síntesis de la cola isoprenoide, la unión de dicha cola al precursor del anillo benzoquinónico y las modificaciones del anillo para dar lugar finalmente a la molécula de Q. Los isoprenos necesarios para la formación de la cola isoprenoide del Q provienen de la ruta del mevalonato que, a través de la acción de las proteínas PDSS1 y PDSS2, formarán la cola isoprenoide con la longitud adecuada en cada especie [121, 127-129]. En cuanto a la formación del precursor del anillo, el ácido *para*-hidroxibenzoico (pHB), sintetizado en mamíferos a partir de los aminoácidos tirosina y fenilalanina, ha sido considerado durante años el principal precursor del mismo; de ahí la importancia de este compuesto en el presente estudio [130]. En 2010 dos estudios demostraron de forma paralela que el ácido *para*-aminobenzoico (PABA) es también capaz de actuar como precursor del anillo en levaduras [131, 132], pues esta sustancia presenta una gran homología estructural con el pHB, ya que únicamente cambia como sustituyente del ácido benzoico

un grupo amino (NH_2) por un grupo hidroxilo (OH). Un estudio posterior demostró, sin embargo, que las células de mamífero no pueden utilizar el PABA como precursor del anillo benzoquinónico del Q, pero sí otros compuestos como el resveratrol o el ácido *p*-cumárico [133]. Además, un reciente estudio ha descrito al flavonol kaempferol como capaz de servir de precursor del anillo del Q en células de mamífero [134]. Las proteínas implicadas en el proceso de biosíntesis del Q están codificadas por los genes *COQ*. Concretamente, la encargada de mediar la condensación de la cola isoprenoide y el precursor del anillo es la proteína *COQ2* [135].

Por último, en mamíferos, las proteínas *COQ3-7*, *ADCK3-4* y *COQ9-10* serán las encargadas de catalizar las diferentes reacciones que sufre el anillo benzoquinónico (incluyendo, una descarboxilación, tres hidroxilaciones, dos O-metilaciones y una C-metilación) hasta dar lugar al producto final. Aunque no se conocen con exactitud las funciones específicas de todas las proteínas que participan en el proceso biosintético del Q, se conoce (extrapolando de diversos estudios realizados en levaduras) que se agrupan en un complejo multiproteico denominado Complejo-Q para llevar a cabo su función, siendo todas esenciales para la correcta biosíntesis del Q [127, 136, 137].

1.6. Ácidos grasos.

1.6.1. ¿Qué son los ácidos grasos y cómo se clasifican?

Los ácidos grasos son moléculas orgánicas que presentan un grupo carboxilo unido a una cadena hidrocarbonada. La mayor parte de estas biomoléculas posee un número par de átomos de carbonos, puesto que su biosíntesis se produce a partir de la concatenación de unidades de C_2 , oscilando su longitud entre los 14 y los 22 carbonos.

La nomenclatura de los ácidos grasos sigue los criterios establecidos por la IUPAC (del inglés *International Union of Pure and Applied Chemistry*). No obstante, y debido a la importancia de estas moléculas en distintos procesos biológicos, en ocasiones se han propuesto nomenclaturas alternativas utilizadas normalmente en la literatura biomédica. Siendo así, y aunque según la IUPAC el C_1 es el que pertenece al grupo carboxilo, también puede comenzarse a contar desde el carbono perteneciente al grupo metilo terminal de la cadena (llamado carbono ω). De esta manera, y utilizando esta nomenclatura, el tercer carbono de la cadena sería el $\omega-3$.

1. Introducción

Atendiendo a la presencia de dobles enlaces presentes en los carbonos de la cadena lateral y a su posición, los ácidos grasos pueden clasificarse en dos tipos principalmente (ver figura In-11):

- Ácidos grasos saturados (SFA): en estas moléculas no aparecen insaturaciones (dobles enlaces) en la cadena hidrocarbonada, lo que les confiere un elevado punto de fusión. Pueden identificarse con la formulación abreviada n:0, donde “n” es el número de carbonos que forman la cadena lateral (por ejemplo, 16:0 es el ácido palmítico (PA) y 18:0 es el ácido esteárico (SA)).
- Ácidos grasos insaturados: en estas moléculas aparece al menos un doble enlace entre los carbonos que conforman la cadena lateral. En función del número de insaturaciones presentes, estos ácidos grasos se pueden clasificar en dos subtipos: ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). La mayor parte de estos lípidos poseen dobles enlaces entre las posiciones C9 y C10, y si aparece más de uno, éstos suelen aparecer cada tres carbonos en dirección al grupo metilo terminal de la molécula.

Dentro de los PUFA, los que presentan una mayor relevancia en el presente trabajo son los denominados como ω -3 o n-3 y los ω -6 o n-6. Siguiendo estas pautas, los ácidos grasos pueden identificarse de una manera simple como, por ejemplo, el ácido eicosapentaenoico (EPA) que se nombra como 20:5 ω -3, lo que indica que su cadena lateral se compone de 20 carbonos, con 5 dobles enlaces, localizándose el primero entre los carbonos ω -3 y ω -4, y de la misma manera el ácido docosahexaenoico (DHA) se nombra como 22:6 ω -3 (ver figura In-12).

Estas moléculas raramente se encuentran aisladas, sino que se asocian para dar lugar a moléculas más complejas. Uno, dos o tres ácidos grasos pueden experimentar un proceso de esterificación con un glicerol dando lugar a acilglicéridos, que pueden ser monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos, respectivamente. Además, la combinación de acilglicéridos con un grupo fosfato y un aminoalcohol da lugar a los fosfolípidos, que son los componentes estructurales de las membranas celulares.

1. Introducción

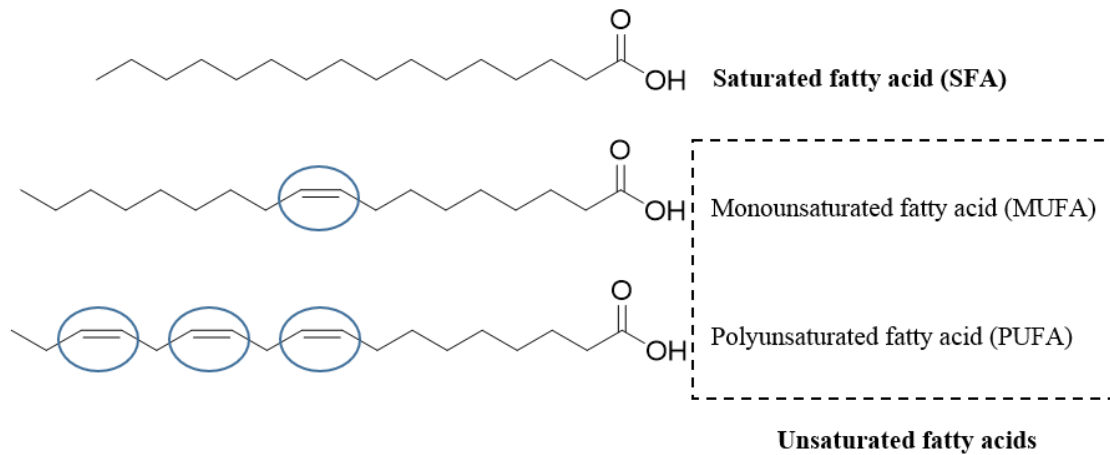


Figura In-11. Clasificación de los ácidos grasos atendiendo al número de dobles enlaces (insaturaciones).

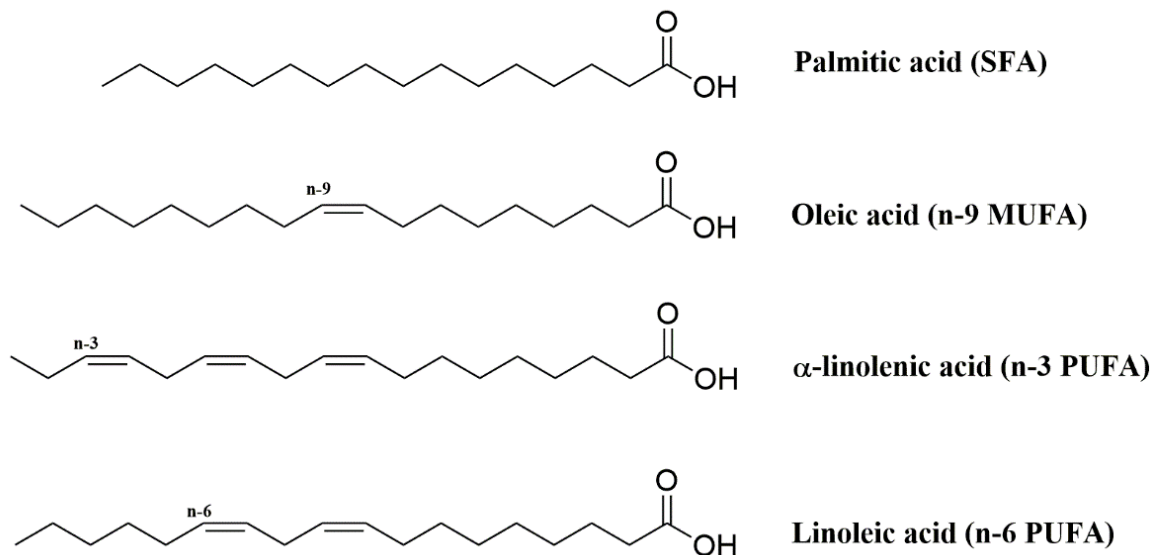


Figura In-12. Principales representantes de cada uno de los grupos de ácidos grasos. En la imagen se describe la estructura de un representante de cada uno de los grupos de ácidos grasos clasificados en función del número de insaturaciones. En el caso de los PUFA se representan las dos series principales de estos compuestos.

1.6.2. Ácidos grasos esenciales

Las células son capaces de sintetizar ácidos grasos en su citoplasma partiendo de acetil-CoA y NADPH mediante la acción de una serie de enzimas conocidas como ácido graso sintetasas. Estos ácidos grasos sintetizados por la propia célula se denominan “no esenciales”.

No obstante, las células no son capaces de sintetizar todos los ácidos grasos necesarios para las distintas funciones biológicas, por lo que han de ser capaces de

1. Introducción

captarlos a partir de la dieta. A estos ácidos grasos se les denomina “esenciales” o EFA [138]. El hecho de que los mamíferos no son capaces de sintetizar estos ácidos grasos se constató a partir de estudios realizados en ratas alimentadas con una dieta carente de grasas. Dichos animales presentaban una serie de desórdenes en el crecimiento, en la función reproductiva así como dermatitis [139]. No obstante los mayores avances a este respecto se deben a los hallazgos realizados a partir de los problemas de salud que presentaban pacientes alimentados con dieta parenteral libre de grasas [140].

Existen dos familias de EFA, los pertenecientes a la serie n-3 y los pertenecientes a la serie n-6. Ambos son sintetizados en plantas mediante reacciones relacionadas directamente con la síntesis de clorofila por la acción de enzimas desaturasas (no presentes en animales), que son capaces de introducir dobles enlaces en las posiciones n-3 y n-6 de la cadena hidrocarbonada del ácido graso. El ácido α -linolénico (ALA) es el EFA primario n-3, mientras que el ácido linoleico (LA) lo es para n-6.

Ambos EFA, tanto los de la serie n-3 como los de la serie n-6, desempeñan un importante papel en las características biofísicas de las bicapas lipídicas, incrementando su fluidez y afectando también a los patrones de oxidación. Además, estos ácidos grasos han sido relacionados positivamente con un gran número de patologías. Por ejemplo, los ácidos grasos de la serie n-3 presentan un papel protector ante afecciones cardiovasculares y desórdenes mentales [141] relacionándose también con alteraciones del sistema inmune y algunos tipos de cáncer [142]. Por otra parte, los ácidos grasos de la serie n-6 desempeñan un papel beneficioso frente a enfermedades cardiovasculares [143].

Los EFA son también precursores de eicosanoides, sustancias similares a las hormonas que pueden desempeñar un importante papel como señalizadores celulares. Ejemplos de ello son el EPA (n-3), precursor de las prostaglandinas y tromboxanos serie 3, y el ácido araquidónico (AA, n-6), precursor de las prostaglandinas y tromboxanos de la serie 2 [138].

1.6.3. Alteraciones del patrón lipídico celular inducidas por la dieta

Como hemos explicado anteriormente, los EFA son captados directamente de la dieta. Por ello, no es de extrañar que la composición lipídica de la misma tenga efectos sobre la salud a largo plazo. Algunos estudios han determinado la capacidad de las membranas celulares para adaptar su composición lipídica en función de la grasa predominante presente en la dieta [144-146], lo que puede conllevar una serie de alteraciones bioquímicas en las células y en especial en las membranas mitocondriales [147].

Las grasas ricas en PUFA, como por ejemplo el aceite de soja y el de pescado, dan lugar a membranas más susceptibles de sufrir daño oxidativo que aquellas grasas ricas en SFA y MUFA como son la grasa de origen animal y el aceite de oliva, respectivamente. Por tanto, estas alteraciones en el lipidoma pueden relacionarse con procesos como el envejecimiento [148].

1.6.4. Modulación de la autofagia a través los ácidos grasos

Dado el efecto de la composición de la dieta en las membranas lipídicas y en otros procesos celulares, numerosos estudios se han centrado en elucidar si existe algún tipo de relación entre los ácidos grasos y la ruta de autofagia.

A este respecto, estudios llevados a cabo en células β pancreáticas INS-1 de rata han puesto de manifiesto que el tratamiento con PA incrementa el número de vesículas autofágicas, la conversión de LC3I a LCII y la fusión de los autofagosomas con los lisosomas, mediado todo ello por la activación de la ruta JNK1 [149, 150]. No obstante, en otras investigaciones llevadas a cabo en células de hepatoma humano, HepG2, y hepatocitos primarios de ratón, se ha observado cómo el tratamiento con ácido oleico (OA) (monoinsaturado), y no con PA, es capaz de inducir la autofagia, incrementando la cantidad de autofagosomas y otras proteínas relacionadas con la ruta. Esta respuesta parece depender de señalización por ROS y de la presencia del complejo PI3K clase III y no por activación mediada por mTOR. En este caso el tratamiento con OA fue capaz de atenuar la apoptosis inducida por la acumulación de lípidos en esta línea celular. Además, en este estudio, también se determinó que la importancia de esta inducción radicaba más en la presencia de la insaturación en la estructura de la molécula que en la

1. Introducción

longitud de la misma [151]. Inyecciones intraperitoneales con oleato también fueron capaces de inducir respuesta autofágica en corazón, hígado y músculo esquelético de ratón. Esta respuesta se caracterizaba por una mayor lipidación de LC3, degradación de p62 y fosforilación de AMPK [152].

En cuanto a la implicación de los ácidos grasos poliinsaturados en la ruta de autofagia, se ha observado que en ratones transgénicos Fat-1, cuyos niveles de ω -3 en ciertos tejidos están incrementados, ya que son capaces de producir PUFA de esta serie a partir de PUFAs n-6 suministrados por la dieta, se produce una recuperación más eficiente frente al daño renal producido por isquemia-reperfusión (IRI) en comparación con animales control, gracias a una mejora en el proceso autofágico. Estos animales presentaron unos niveles incrementados de proteínas relacionadas con la autofagia como LC3, Beclina 1 y ATG7, mientras que los niveles de p62 se vieron disminuidos con respecto al grupo control. Además, se observó un incremento en la proteína AMPK, lo que se traduce en una inhibición de la actividad de mTOR y, por tanto, la inducción de la ruta autofágica [152].

Un hecho parecido se constató en estudios llevados a cabo en distintas líneas celulares de GBM, donde el tratamiento con DHA, produjo un incremento en la población G1 celular, un incremento en las células positivas para el ensayo TUNEL (indicativo de apoptosis), así como un aumento en la actividad autofágica mediada por un incremento en la activación de AMPK, y una disminución de la actividad de Akt y mTOR. Además, en ratones Fat-1 se produjo una disminución en el tamaño de los tumores tras la inyección de células de GBM acompañado de un aumento en la apoptosis y en marcadores de la ruta de autofagia. Por tanto, se pone de manifiesto el papel que pueden desempeñar los PUFA n-3 como agentes terapéuticos contra GBM [153].

Por último, en experiencias llevadas a cabo en *C. elegans*, se ha observado que el aporte de una dieta rica en PUFA n-6 es capaz de incrementar la esperanza de vida de este organismo mediante una activación de la autofagia, efecto que también se observa en líneas células animales como HeLa y fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs). Estos mismos investigadores establecieron una relación entre lipólisis e incremento en la longevidad máxima en *C. elegans*, sugiriendo que los PUFA n-6 activan respuestas que normalmente se ven favorecidas en condiciones de RC [154].

Todos estos datos ponen de manifiesto la importancia de los ácidos grasos como moduladores de la ruta de autofagia, siendo éstos capaces de actuar de manera diferencial en función de su naturaleza y de las condiciones metabólicas imperantes en cada situación, favoreciendo esta mejora en la ruta procesos tan dispares como la supervivencia o la muerte celular.

1.7. El envejecimiento y sus teorías

El envejecimiento puede definirse como la pérdida progresiva de función en los distintos tejidos de un organismo debido a la degradación de sus componentes a nivel molecular dependiente del tiempo, lo que implica una menor fertilidad y un aumento en la susceptibilidad de sufrir gran número de enfermedades de diversa índole, como procesos degenerativos de carácter nervioso o muscular, alteraciones del sistema inmune, o la aparición de distintos tipos de cáncer derivados de la desregulación de la proliferación celular, y una mayor mortalidad [155].

Numerosos estudios a nivel internacional tratan de identificar las “señales” que marcan el proceso de envejecimiento. Estas alteraciones afectan a numerosos procesos biológicos relacionados entre sí: disfuncionalidades metabólicas y mitocondriales, inestabilidad genómica, fallo en la maquinaria del control celular, alteraciones en las rutas de señalización celular que controlan el crecimiento y reciclado de las mismas, fallos en la comunicación célula-célula, y pérdida de la capacidad de regeneración [156, 157]. Consecuentemente, los cambios en la homeostasis metabólica así como en la respuesta inflamatoria [158, 159], influyen negativamente en el microambiente del tejido favoreciendo la creación de un ambiente más permisivo a la aparición de distintas enfermedades y a la progresión de las mismas.

Algunas de las teorías más aceptadas que han tratado de explicar por qué se produce el proceso de envejecimiento, se exponen a continuación.

1. La teoría de los telómeros sugiere que el número de divisiones que una célula es capaz de realizar es limitado, ya que conlleva el acortamiento sucesivo de los telómeros, que son secuencias repetitivas que flanquean los cromosomas protegiéndolos. Esta limitación en el número de divisiones protege al organismo de la aparición de células cancerosas, mientras que el envejecimiento vendría provocado por la imposibilidad de

1. Introducción

reemplazar estas células “viejas” por células más sanas que presenten la capacidad de dividirse [160].

2. Otra de las más aceptadas es la conocida como teoría de los radicales libres. Fue propuesta en el año 1956 por Denham Harman y aún hoy proporciona las bases para comprender parte del proceso de envejecimiento. En ella se postula que la producción de ROS, sobre todo a nivel mitocondrial, daña progresivamente distintas biomoléculas celulares, como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, comprometiendo la funcionalidad de las mismas [161, 162]. La imposibilidad de la célula de contrarrestar este daño oxidativo mediante la respuesta antioxidante resulta en la acumulación de lesiones y, en última instancia, en la pérdida de funcionalidad de estas biomoléculas [161].

En estrecha relación con la teoría de los radicales libres, se encuentra la hipótesis que propone que las características de los lípidos que conforman las membranas celulares, condicionan la intensidad del daño oxidativo al que se ven expuestas afectando, por tanto, al envejecimiento y la longevidad [163]. Siendo así, los ácidos grasos poliinsaturados, y en concreto los carbonos que forman parte de los dobles enlaces, son las moléculas más susceptibles de sufrir daño oxidativo.

Algunos estudios comparados han determinado la correlación entre la longevidad máxima de distintas especies y las características de los lípidos de sus membranas y han observado cómo los dos únicos parámetros que correlacionan significativamente con el incremento de la longevidad máxima, son la menor producción endógena de ROS y la menor insaturación de los lípidos de membrana [163]. En una comparativa realizada entre ocho especies de mamíferos, el parámetro conocido como índice de dobles enlaces (DBI) es mayor en animales con menor longevidad máxima. Al comparar distintas clases de vertebrados, entre aves y mamíferos del mismo peso corporal, las aves presentaron mayor longevidad y menor DBI [164]. La correlación inversa entre longevidad máxima y DBI, es válida para fosfolípidos mitocondriales y totales de corazón e hígado [165-167].

Otros modelos experimentales que introducen intervenciones dietéticas, incluyendo como componente graso mayoritario PUFAs o SFAs, demostraron una disminución en el DBI en respuesta a la dieta, lo que provocaba también menor peroxidación lipídica y carbonilación de proteínas [168].

Son numerosos los estudios que relacionan la composición de los lípidos de la membrana mitocondrial con el envejecimiento, siendo nuevamente la peroxidación lipídica el mecanismo que influye en gran medida sobre la longevidad máxima [169]. Además, la composición lipídica de la membrana mitocondrial puede influir sobre otros muchos procesos tales como la actividad de proteínas de membrana [170, 171], la permeabilidad de la misma [172, 173] y la producción de ROS [147, 174].

1.7.1. La restricción calórica como intervención anti-envejecimiento

Durante los últimos años, se ha puesto énfasis en estudiar las enfermedades relacionadas con la edad con el fin de profundizar en las bases biológicas que constituyen el propio envejecimiento. El concepto que subyace al nuevo término *GeroScience* [175] pretende encontrar estrategias que retrasen el envejecimiento en sí disminuyendo, por tanto, la vulnerabilidad a sufrir enfermedades asociadas a este proceso, lo que produciría también una menor morbilidad.

Una de las herramientas más valiosas en el estudio del envejecimiento es la RC. Desde las primeras documentaciones que se tienen sobre el efecto de la RC [176], 80 años de investigación han establecido que ésta es la intervención nutricional más robusta capaz de extender la longevidad media y máxima, así como de retrasar la aparición de patologías relacionadas con la edad [177].

Se ha observado que una reducción del 40% en la ingesta calórica, es capaz de aumentar la longevidad máxima en ratas, hecho que se ha reproducido en una gran cantidad de organismos, tales como levaduras, moscas y otros mamíferos [178-181].

La relación entre la ingesta de calorías y la longevidad sigue una curva en forma de U; es decir, tanto un consumo excesivo de calorías como una reducción que conlleve malnutrición provocan un impacto negativo en la supervivencia de los organismos. No obstante, entre ambos extremos hay una relación lineal inversa entre la longevidad máxima y la ingesta de calorías, lo que sugiere la existencia de una adaptación metabólica importante, que es la clave de la respuesta a la RC [182]. La aplicación de esta intervención nutricional, por tanto, causa cambios sustanciales en numerosas rutas de señalización que regulan el crecimiento, el metabolismo, el estrés oxidativo, la

reparación de daños en distintas estructuras, los procesos inflamatorios, la autofagia y la proteostasis. Todas esas rutas pueden, en mayor o menor grado, modular el proceso de envejecimiento [183].

1.7.1.1. Restricción calórica y producción de especies reactivas de oxígeno

La relación entre RC y ROS ha sido ampliamente estudiada, de manera que esta intervención nutricional parece actuar a tres niveles: sobre la generación de las especies, sobre la detoxificación de las mismas y sobre la corrección de los daños inducidos por ellas [184]. Ya que, como dijimos anteriormente, la mitocondria es una de las principales fuentes de generación de ROS a nivel celular, parte de los efectos beneficiosos de la RC sobre la longevidad provienen muy probablemente de una mejora en la función mitocondrial [183], lo que puede estar ligado a una menor producción de ROS. Esta idea está apoyada por estudios que determinan que la RC disminuye la producción de ROS en numerosos tejidos [185, 186]. Por ejemplo, se ha mostrado que periodos cortos de RC son capaces de disminuir la capacidad máxima de producción de ROS en hígado a nivel del complejo III mitocondrial [187]. En otros estudios se observó una disminución en la producción de radical superóxido por parte del complejo I [188-191]. Esta misma disminución en los niveles de ROS se observó en muestras de músculo esquelético de ratones sometidos tanto a periodos largos (1 año) como cortos de RC [192].

En cuanto protección antioxidante se refiere, la RC es capaz de prevenir la disminución de los niveles hepáticos de glutatión reducido y la disminución en la actividad de enzimas antioxidantes, como la SOD y la catalasa, eventos todos ellos producidos por el envejecimiento y que son, además, dependientes de tejido [193]. Por último, esta intervención nutricional incrementa la estabilidad del genoma impidiendo el descenso en la actividad del sistema de reparación del ADN por escisión de bases observado en animales viejos [194, 195].

1.7.1.2. Restricción calórica y grado de insaturación de los ácidos grasos en las membranas

La menor susceptibilidad de las membranas a sufrir daño oxidativo podría explicarse por una redistribución en el tipo de insaturación que se produce, en respuesta a la RC, en distintos órganos. En este sentido, esta intervención es capaz de incrementar la cantidad de MUFAs en hígado, mientras que disminuye los niveles de PUFAs [196]. Estas modificaciones también fueron observadas en otros estudios donde la RC resultó en una disminución del grado de insaturación en las membranas celulares, favoreciendo la acumulación de ácidos grasos como LA y ALA en detrimento de los de cadena más larga y con un mayor número de insaturaciones [197, 198].

De esta manera, las membranas de los animales sometidos a RC son menos propensas a sufrir daño oxidativo. El mecanismo por el cual se produce esta redistribución lipídica no está completamente dilucidado, pero parece ser que ciertas hormonas, cuyos niveles se alteran por la RC, como la insulina y las tiroideas (T3 y T4), ejercen regulación sobre enzimas elongasas y desaturasas que actúan sobre los ácidos grasos [199].

Ha sido mostrado que el tratamiento con la droga atenolol (β 1- bloqueante) es capaz de disminuir el grado de insaturación de los ácidos grasos mitocondriales en corazón y músculo esquelético, introduciendo cambios en el lipidoma que permiten la reversión de parte de las alteraciones deletéreas asociadas al envejecimiento en ratones. A pesar de ello, el tratamiento con esta droga no produce incremento en la longevidad, lo que puede ser debido en parte a otros efectos colaterales del tratamiento [200, 201].

1.7.2. Autofagia y envejecimiento. Papel de la restricción calórica en su modulación

Una disminución en la capacidad proteolítica celular ha sido considerada responsable, al menos en parte, de la acumulación de componentes celulares dañados en los tejidos de animales viejos [202-204]. De hecho, alteraciones en los sistemas lisosomales y acumulación de estructuras subcelulares anormales durante el envejecimiento, ya habían sido observados con anterioridad a la caracterización de los mecanismos moleculares que subyacen a estos procesos.

1. Introducción

Aunque la gran mayoría de estudios funcionales sobre autofagia y envejecimiento han sido llevados a cabo en hígado [204], se han observado características morfológicas que apuntan a una pérdida de eficiencia en la ruta de autofagia asociada al envejecimiento en órganos tales como corazón, cerebro músculo y riñón. Entre dichas características se encuentran la expansión de compartimentos lisosomales, la acumulación de vacuolas y la deposición de material no digerido rico en lipofucsina. Un fallo en el control de calidad de la célula promovido por la menor eficacia de la autofagia, es particularmente dañino en tejidos postmitóticos, ya que la redistribución del daño producido no podrá “diluirse” en las células hijas [205, 206].

Previos a los estudios genéticos que han permitido arrojar luz sobre la relación entre el envejecimiento y la autofagia, diversos estudios llevados a cabo en hígado ya sembraron los precedentes de esta relación. Siendo así, determinaciones de la actividad autofágica en hígado de roedores, revelaron la existencia de una disminución en la degradación mediada por lisosomas con la edad, hecho que coincide además con una mayor cantidad de agregados proteicos en este tejido [207]. Por otra parte, fallos en las hidrolasas presentes en los lisosomas debidos a la acumulación de lipofucsina, parece jugar un papel importante en la acumulación de vesículas de autofagia en este órgano [208]. Otros estudios llevados a cabo también en hígado, determinaron que los bajos niveles de insulina y glucagón obtenidos como consecuencia del envejecimiento, pueden mediar también los defectos observados en la ruta de autofagia [209, 210].

La primera evidencia que indicó que un aumento en la autofagia contribuye a un incremento de la esperanza de vida, vino dada por estudios realizados en *C. elegans*, donde se determinó que la inhibición de la ruta de señalización mediada por factores de crecimiento similares a insulina daba lugar a un incremento tanto de la autofagia como de la longevidad máxima, mientras que la inhibición de esta ruta por mutaciones en distintos genes *Atg* prevenía este incremento en la longevidad [211].

A raíz de este estudio son numerosas las investigaciones que indican que las proteínas ATG, así como otras requeridas para la inducción de la autofagia, como la sirtuina 1, reducen su expresión en tejidos envejecidos y, por tanto, la autofagia también se encuentra disminuida en ellos [30]. “Screenings” realizados en *S. cerevisiae* permitieron identificar gran cantidad de mutantes de vida corta con problemas en la ruta de autofagia, incluyendo 10 de los genes que codifican las proteínas *Atg* [212]. La

1. Introducción

pérdida de función de Atg1, Atg6, Atg18 y Beclina 1 también disminuyó significativamente la longevidad máxima en el nematodo *C. elegans* [213]. De forma similar, la deficiencia en la expresión de Atg1, Atg8 y Sestrina 1, provocó una disminución en la longevidad máxima de *D. melanogaster* [214, 215]. En ratones *knockout* para proteínas ATG, la pérdida de las mismas es letal durante el periodo postnatal temprano, ya que la autofagia es necesaria para la movilización de reservas energéticas en las primeras etapas de la vida del animal [4]. Cuando la falta de dichas proteínas es a nivel de tejido (*knockout* específicos de tejido) el fenotipo observado es menos dramático, pero la falta de estas proteínas dio lugar a la aparición de eventos propios de tejidos senescentes tales como acumulación de cuerpos de inclusión que contienen proteínas ubiquitiniladas, acumulación de lisosomas con lipofucsina en su interior, mitocondrias desorganizadas y proteínas oxidadas [216-219]. Éstos y otros resultados, sugieren que el envejecimiento está asociado a una autofagia insuficiente, lo que puede explicar, en cierta medida parte del fenotipo asociado al envejecimiento.

Ya que la RC es la intervención más robusta capaz de incrementar la longevidad en distintas especies, fueron nuevamente estudios realizados en hígado los que determinaron por primera vez que esta intervención nutricional era capaz de prevenir el mal funcionamiento de la ruta de autofagia asociado al envejecimiento [209, 210, 220].

Parece lógica la relación existente entre RC y autofagia, ya que esta ruta promueve los procesos catabólicos que se desencadenan en respuesta a la falta de nutrientes. Además, los individuos que son sometidos a esta intervención presentan una menor cantidad de componentes celulares y biomoléculas dañadas que los que son alimentados *ad libitum* [221]. Se ha descrito que la RC es capaz de inducir autofagia por la activación de dos “sensores energéticos a nivel celular”: AMPK [29, 30, 34, 221] y la sirtuina 1, los cuales establecen un bucle de retroalimentación positiva para su activación mutua [222]. Además, esta intervención es capaz de promover procesos autofágicos inhibiendo la ruta de señalización mediada por factores de crecimiento similares a insulina, lo que resulta finalmente en la inhibición de mTOR [222]. La inhibición de este regulador maestro de la ruta de autofagia, bien de forma farmacológica (mediante la administración de rapamicina, que es un inhibidor directo de la proteína mTOR), bien por aproximaciones genéticas, produce un incremento en la esperanza de vida en *C. elegans* [222], *D. melanogaster* [223] y ratones [224]. mTOR puede también actuar a nivel de otras proteínas quinasas como S6K y 4E-BP, cuya

actividad ha sido relacionada con un aumento de la longevidad en estos mismos organismos [224-226].

Ya que la disfunción mitocondrial ha sido identificada como uno de los marcadores de envejecimiento más importantes, resulta coherente pensar que parte de dicha disfunción venga mediada por defectos en la ruta de autofagia (mitofagia) y, por tanto, fallos, en el recambio eficiente de estos orgánulos [227, 228]. La acumulación de mitocondrias no funcionales provocará una insuficiencia energética a nivel celular por disfunciones en la fosforilación oxidativa, así como un incremento en la producción de ROS [229]. La importancia de la ruta de autofagia en el recambio mitocondrial se ha puesto de manifiesto de forma reiterada. Por ejemplo, mitocondrias aisladas de músculo esquelético de ratones deficientes en ATG7 mostraron una fosforilación oxidativa disfuncional, cambiando estos animales su metabolismo hacia procesos eminentemente glucolíticos [230]. De la misma manera, mitocondrias de músculo de ratones *knockout* para PINK1 (efector que media la ruta de mitofagia) eran deficientes en los complejos I y II de la cadena de transporte mitocondrial [231]. Parece que la RC es capaz de producir un incremento en proteínas relacionadas con el proceso de mitofagia (PINK1, Parkin y BNIP3L) en riñón de ratas viejas frente a otras alimentadas con una dieta altamente calórica [232].

Aunque parece evidente que un mejor funcionamiento de la ruta de autofagia previene la aparición de eventos asociados al envejecimiento, la activación persistente de esta ruta no parece ser una intervención anti-envejecimiento ideal. Recientes estudios llevados a cabo en modelos de ratón con envejecimiento prematuro (progeria), han mostrado cómo estos animales presentan unos niveles de autofagia elevados como consecuencia de cambios en el metabolismo de lípidos y glucosa disparados por el daño nuclear. Esta activación crónica de la autofagia contribuyó a la degeneración sistémica observada en estos animales [233].

1.7.2.1. Enfermedades asociadas a disfunciones en la ruta de autofagia

Las enfermedades relacionadas con el envejecimiento son un conjunto de desórdenes que presentan una alta prevalencia en la población envejecida y, por ello, se considera al envejecimiento como un factor de riesgo. A continuación se comentan

1. Introducción

brevemente algunos ejemplos de enfermedades en las cuales un mal funcionamiento de la autofagia provocado por el envejecimiento parece desempeñar un papel importante en la patogenia (revisado en [221]).

Desórdenes neurológicos

La enfermedad de Alzheimer (AD) y Parkinson (PD) son dos de las enfermedades neurodegenerativas con más alta prevalencia en individuos de edad avanzada, las cuales además aparecen en etapas tardías de la vida.

En neuronas de pacientes con AD se han observado alteraciones en la autofagia, mientras que defectos primarios en la autofagia mediada por chaperonas (CMA) han sido descritos en la PD. Las neuronas responden a fallos en la autofagia incrementando otros mecanismos proteolíticos que, en principio, no estarían afectados por esta enfermedad. Se ha propuesto que este mecanismo compensatorio de las neuronas se ve comprometido por la edad, ya que ésta disminuye la eficiencia de los procesos autofágicos. Estos defectos pueden incurrir en la acumulación de sustancias perjudiciales, muerte celular y aparición de síntomas relacionados con la pérdida de neuronas [234, 235].

Cáncer

La autofagia juega un papel fundamental en la supresión de tumores ya que permite la degradación de orgánulos dañados y reduce la inestabilidad cromosómica. Debido a los fallos en la ruta autofágica que promueve el envejecimiento, se produce un aumento en la acumulación de daños a nivel intracelular por la imposibilidad de “limpiar” la célula de sus componentes no funcionales y de aberraciones cromosómicas. Todo ello incrementa la probabilidad de las células somáticas de sufrir transformaciones oncogénicas [236, 237].

Inmunosenescencia

Parte del deterioro gradual del sistema inmune producido como consecuencia del envejecimiento, puede estar mediado por la pérdida de eficiencia de la ruta de autofagia. Alteraciones de esta ruta en células presentadoras de antígenos (células dendríticas, macrófagos y células B pueden conducir a la falta de activación de las células T y, por tanto, a un fallo en la respuesta inmune. Además, la incapacidad de las células de

presentar sus propios antígenos como consecuencia de defectos en la ruta de autofagia puede desencadenar procesos autoinmunes [238].

Miopatías

Los defectos en la degradación de autofagosomas observados en músculo de organismos viejos, pueden contribuir a la pérdida de masa muscular. La acumulación de estas vesículas puede provocar que las fibras musculares pierdan sus características contráctiles, lo que podría desencadenar su debilitamiento e incluso pequeñas roturas por tracción, pudiendo todo ello producir atrofia muscular [239, 240].

Ya que parte del presente trabajo se centró en el estudio de las alteraciones de la ruta de autofagia producidas por el envejecimiento en músculo esquelético, profundizaremos algo más en la relación entre los defectos en el flujo autofágico y la sarcopenia, fenómeno que puede definirse como la pérdida progresiva de fuerza y masa muscular producida como consecuencia del envejecimiento [241]. Este fenómeno puede estar favorecido por procesos tales como la acumulación de moléculas desnaturalizadas, mal plegadas o agregadas. Todos estos eventos pueden derivar en el declive de la masa y la fuerza del músculo esquelético [242].

Se han descrito diversos factores intrínsecos y extrínsecos capaces de desencadenar la sarcopenia. Entre los intrínsecos destacan la inflamación sistémica, alta cantidad de glucocorticoides, el mal funcionamiento mitocondrial asociado al envejecimiento, la pérdida de neuronas motoras, la excesiva apoptosis y la pérdida de células satélite. Entre los extrínsecos destacan algunas condiciones clínicas tales como las fracturas de cadera y los infartos [243, 244].

Recientemente se ha demostrado que la inhibición específica de la ruta de autofagia en músculo ejerce un importante impacto sobre las sinapsis neuromusculares y la fuerza muscular, afectándose por tanto la calidad y esperanza de vida en ratones y humanos [245]. Investigaciones previas llevadas a cabo en diversas especies mostraron que la atrofia muscular ligada al envejecimiento podía ser aliviada, al menos en parte, mediante la estimulación de esta ruta. Por ejemplo, se han observado niveles bajos de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia (ATG5, ATG7 y LC3) en el músculo esquelético de ratas viejas [246].

1. Introducción

Ya que, como explicamos anteriormente, la autofagia es un proceso que se regula mediante la interconexión de múltiples rutas y efectores que actúan en respuesta a diversos estímulos, es lógico pensar que estas rutas de señalización se vean afectadas por el proceso de envejecimiento y, por tanto, puedan favorecer la aparición de enfermedades como la sarcopenia.

Dada la importancia de la ruta de señalización de insulina/factor de crecimiento insulínico tipo 1 en el metabolismo muscular, numerosos estudios han mostrado alteraciones en la misma que pueden conducir a un peor funcionamiento de la ruta de autofagia, ya que esta vía de señalización es capaz de actuar a nivel de mTOR favoreciendo o reprimiendo la misma. Por ejemplo, la activación de la señalización de Akt mediada por insulina o IGF-1 inactiva los procesos de transcripción mediados por el factor FoxO, y se ha observado que en ratones *knockout* para los receptores de IGF-1, se produce una reducción en la masa muscular y en el número de fibras esqueléticas [247]. Además, este factor de transcripción puede dirigirse al núcleo e incrementar la expresión de proteínas como ubiquitin ligasas, atroginina-1 y MuRF1, favoreciéndose la eliminación de orgánulos mediante autofagia o mediante el sistema proteasoma-ubiquitina [243].

También es importante la regulación mediada por AMPK, proteína quinasa que es capaz de regular la síntesis de proteínas y degradación de las mismas por autofagia en músculo esquelético. Ésta, como ya vimos, puede regularse en condiciones de estrés nutricional, aunque también en respuesta a ejercicio. Su activación, por tanto, puede promover la inhibición de mTOR bien de forma directa, bien de forma indirecta *vía* activación de ULK1 y del factor de transcripción FoxO3, que regula la transcripción de proteínas ATG, favoreciendo la activación de la ruta autofágica [248].

Se ha demostrado que el ejercicio físico es beneficioso para la extensión de la longevidad máxima y la mitigación de la sarcopenia [243]. En este sentido, se ha demostrado que se produce una inducción de la ruta de autofagia en respuesta a distintos tipos de ejercicio, como los de resistencia [249]. El ejercicio activa la fosforilación del factor FoxO favoreciéndose la transcripción de genes cuyos productos son proteínas relacionadas con la autofagia [250].

No obstante, y aunque parece que un incremento en los procesos degradativos mediados por lisosomas parecen favorecer el retraso de la sarcopenia, una autofagia excesiva podría dar lugar también a la pérdida de músculo esquelético por la imposibilidad de reponer el material que está siendo degradado [243]. Podemos decir, por tanto, que las deficiencias en los niveles basales de autofagia son las que promueven la acumulación de agregados proteicos observados en músculo esquelético de animales viejos, mientras que una autofagia excesiva podría causar un estrés celular induciendo la pérdida de masa muscular esquelética debida al incremento en la degradación de proteínas.

1.8. Dinámica mitocondrial

La estructura de la mitocondria es altamente dinámica, pudiendo adaptarse a los requerimientos celulares de demanda energética, biogénesis de lípidos, síntesis de ácidos grasos, etc. Para ello, estos orgánulos están sujetos a modulación de sus propiedades dinámicas, siendo capaces de fusionarse, dividirse, moverse o anclarse a otros orgánulos como el RE [251].

Dos procesos claves de esta dinámica son la fusión y fisión mitocondrial. El balance entre ambos determinará cuál de ellos predominará en cada momento en función de los requerimientos celulares. Mientras que la fusión facilita la formación de redes mitocondriales en las células, lo que promoverá la comunicación y la dilución de sustancias entre compartimentos mitocondriales, la fisión facilita el transporte y distribución mitocondrial, así como la degradación del propio orgánulo cuando éste deja de ser funcional.

Ambos procesos están mediados por una gran familia de GTPasas englobadas dentro de la subfamilia DRPs (proteínas relacionadas con las dinaminas), que se ensamblan en las membranas mitocondriales y, mediante la hidrólisis de GTP, llevan a cabo los cambios conformacionales que las remodelan [251, 252].

1.8.1. Fusión mitocondrial

Durante este proceso se produce la fusión de las membranas externas e internas de las mitocondrias que interaccionan. Ambos procesos suceden de forma coordinada,

1. Introducción

ocurriendo normalmente de forma casi simultánea. La fusión mitocondrial es un fenómeno altamente regulado, pues requiere el reclutamiento de proteínas localizadas tanto en la membrana interna como en la membrana externa mitocondrial que permitirán que se mantenga la integridad de los compartimentos mitocondriales.

En mamíferos las principales proteínas implicadas en este proceso son las mitofusinas, concretamente la mitofusina 1 (Mfn1) y la mitofusina 2 (Mfn2), que median la fusión de la membrana externa, y la proteína de atrofia óptica 1 (OPA1), que media la fusión de la membrana interna [252].

En ratón, la falta *in vivo* de Mfn1 y Mfn2 provoca la letalidad embrionaria. Además, la disminución de los niveles de Mfn2 implica menor respiración celular y oxidación de glucosa en fibroblastos de ratón. Niveles reducidos de Mfn2 han sido encontrados también en modelos de obesidad (ratas Zucker y humanos), sugiriendo que la baja expresión de esta proteína puede estar relacionada con las perturbaciones metabólicas asociadas a la obesidad. En humanos las mutaciones de la proteína Mfn2 (pero no de Mfn1) producen la enfermedad de Charcot-Marie Tooth tipo 2A (CMT2A), que es un tipo de neuropatía caracterizado por la degeneración axonal y la distrofia muscular distal [252].

En mamíferos, la proteína OPA1 puede experimentar distintos procesamientos proteolíticos por parte de peptidasas de la membrana interna mitocondrial, por lo que puede aparecer tanto en su forma larga (L-OPA1) como en su forma corta (S-OPA1). Estudios recientes han determinado que la forma larga es suficiente para regular la fusión mitocondrial y el mantenimiento de la forma tubular del orgánulo. La forma corta, por su parte, ha sido asociada con procesos de fisión y fragmentación mitocondrial [253]. La ablación total de esta proteína en ratones es letal, mientras que cuando aparece en heterocigosis puede producir degeneración retinal y la consecuente pérdida de visión, así como la aparición tardía de disfunciones cardíacas [254].

Además del papel que juega en la fusión de membranas, OPA1 interviene también en el remodelado de las crestas mitocondriales y en el mantenimiento del ADN mitocondrial [255].

1.8.2. Fisión mitocondrial

En este proceso juega un papel clave la proteína GTPasa Drp1 (proteína 1 relacionada con dinamina). Ante determinados estímulos, esta proteína citosólica es reclutada a la mitocondria, concretamente a su membrana externa, y polimeriza formando estructuras helicoidales que envuelven al orgánulo. Tras la hidrólisis de GTP se produce una serie de modificaciones conformacionales en la estructura helicoidal formada, lo que provoca la constricción y posterior escisión de las membranas mitocondriales. La actividad de esta proteína está regulada por proteínas “adaptadoras” como Fis1 (proteína 1 de fisión mitocondrial), que permiten el anclaje de Drp1 a la superficie mitocondrial [252].

Las mitocondrias que no presentan Drp1 adoptan una morfología hipertubular, hecho que ha sido constatado en levaduras, gusanos y humanos. Pacientes con mutaciones en DRP1 presentan un desorden neonatal fatal caracterizado por microcefalia, atrofia óptica, acidosis láctica y elevados niveles de ácidos grasos de cadena larga en suero sanguíneo [256]. La delección de Drp1 en ratones es letal en estadios embrionarios, mientras que cuando se restringe a determinados tejidos o tipos celulares, promueve la aparición de cardiopatías e incluso infertilidad (cuando afecta a la línea germinal femenina) [252]. Curiosamente, la falta de esta proteína en hígado, confiere un efecto protector frente a la obesidad inducida por la dieta [257].

2. Objetivos

2. Objetivos

Uno de los principales objetivos del presente trabajo es analizar el papel del coenzima Q en relación con la fisiología mitocondrial y con la ruta de autofagia en distintos sistemas *in vitro* a través de intervenciones farmacológicas y nutricionales.

Para ello se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar las alteraciones en la fisiología mitocondrial, a nivel de subunidades de los complejos de la CTE y generación de ROS, en respuesta a tratamientos que incrementan los niveles de Q en la línea celular renal Tkpts. Dicho incremento se conseguirá tanto de manera endógena (proporcionando a los cultivos precursores reconocidos de su síntesis, como kaempferol y ácido *para*-hidroxibenzoico), como de manera exógena (mediante el aporte directo de coenzima Q₁₀). Además se intentará dilucidar el posible papel de la sirtuina mitocondrial (Sirt3) en los efectos mediados por el polifenol kaempferol.
2. Determinar las alteraciones en el proceso de dinámica mitocondrial y el posible papel del coenzima Q en su modulación en la línea celular renal Tkpts.
3. Estudiar las alteraciones en la ruta de autofagia mediadas por los niveles de coenzima Q en la línea celular renal Tkpts.
4. Determinar las alteraciones en la fisiología y funcionalidad mitocondrial mediadas por la naturaleza de distintos suplementos lipídicos en la línea celular de hepatocarcinoma murina Hepa 1.6.
5. Estudiar las alteraciones en la ruta autofágica, en respuesta a distintos suplementos lipídicos y la posible implicación de los niveles de coenzima Q en dicha respuesta, en la línea celular Hepa 1.6.

El otro objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es analizar de qué manera la restricción calórica y el componente graso de la dieta influyen a nivel de la ruta de autofagia en un modelo *in vivo*, analizando la respuesta de un tejido post-mitótico (músculo) y un tejido mitótico (hígado) de ratones sometidos a restricción calórica con tres tipos de componentes lipídicos, que difieren en el grado de insaturación de los ácidos grasos que los componen: manteca de cerdo, aceite de soja y aceite de

2. Objetivos

pescado que difieren en el grado de insaturación de los ácidos grasos que los componen: manteca de cerdo, aceite de soja y aceite de pescado.

Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos.

6. Determinar desde el punto de vista estructural, las alteraciones de la ruta de autofagia en ambos tejidos en respuesta a la restricción calórica y al componente graso de la dieta.
7. Analizar las alteraciones en la ruta de autofagia mediante la determinación de efectores proteicos que participan en la misma en función de la restricción calórica y la naturaleza de la grasa suministrada.

3. Material y Métodos

3.1. Modelo celular

3.1.1. Líneas celulares

Todos los cultivos se mantuvieron a 37 °C en condiciones estériles y en atmósfera húmeda con un 5% de CO₂. De manera rutinaria, las líneas celulares crecieron en su correspondiente medio de cultivo, siendo subcultivadas cada 3 o 4 días en función de la línea celular y una vez alcanzado el 80% de confluencia.

Las líneas celulares utilizadas en el presente trabajo, así como sus medios de cultivo correspondientes se detallan a continuación:

- **Células epiteliales de túbulo contorneado proximal de ratón (Tkpts):** esta línea fue mantenida en medio DMEM:F12 (proporción 1:1) 4,5g/L de glucosa, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, y gentamicina-anfotericina B (125 µg/ml y 5 mg/ml, respectivamente).
- **Células de hepatocarcinoma de ratón (Hepa 1.6):** estas células fueron cultivadas utilizando el mismo medio de cultivo descrito para la línea Tkpts.

La línea celular Hepa 1.6 fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC), mientras que la línea Tkpts fue cedida por la Dra. Elsa Bello-Reuss (Texas Tech University Health Science Center) y la Dra. Judit K. Magyesi (University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, AR).

3.1.2. Determinación de la viabilidad celular

3.1.2.1. Tinción con azul tripán

Se trata de un colorante de exclusión que permite discernir entre las células vivas y muertas de una determinada población celular [258]. Las células vivas son capaces de excluir activamente este colorante azul, ya que mantienen la integridad de su membrana plasmática, conservando por tanto el color amarillo-brillante que se observa al examinarlas al microscopio invertido. Por su parte, las células muertas, al tener daños en dicha membrana, son completamente permeables a este colorante quedando su citoplasma teñido de azul. Para la determinación de la viabilidad de un determinado

3. Material y Métodos

cultivo, la suspensión de células se mezcló a partes iguales con la solución de azul tripán (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) y, posteriormente, se procedió al análisis visual de dicha mezcla mediante microscopio invertido (Nikon, TMS).

3.1.2.2. Ensayo MTT

Este ensayo se basa en la conversión del bromuro de *3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio* (MTT), a través de la succinato-deshidrogenasa (complejo II de la cadena de transporte electrónico mitocondrial), en cristales de formazán, que presentan una coloración morada cuya absorbancia máxima es cercana a los 590 nm. Las células viables son capaces de realizar la reducción de este producto y la consecuente formación de los cristales coloreados, mientras que las no viables no, por lo que el mayor o menor desarrollo de color servirá como un buen marcador de la viabilidad de un cultivo [259].

Para llevar a cabo el ensayo, las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos, a una densidad determinada en función de la línea celular, y tratadas con el compuesto de interés durante 48 horas. Una vez pasado este tiempo, se añadió a cada pocillo 50 µl/ml de una solución stock 5 mg/ml de MTT (Sigma Aldrich) y se incubó durante 2 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo se retiró el medio de cultivo y se solubilizaron los cristales formados con HCl 0.04 M en isopropanol absoluto, siendo necesaria una agitación de 15 minutos en agitador orbital para la completa solubilización de los mismos. Posteriormente dicha solución se transfirió a cubetas de plástico desechables y se determinó su absorbancia a 590 nm y utilizando como blanco isopropanol absoluto.

3.1.3. Tratamientos

El proceso experimental llevado a cabo para todos los tratamientos fue sustancialmente el mismo, las células se sembraron a 4.000 cél. /cm² o a 15.000 cél. /cm² en el caso de que los tratamientos fueran emulsiones lipídicas. Cada producto fue disuelto de acuerdo con las instrucciones del fabricante y utilizando siempre el solvente como tratamiento en los controles, con el fin de eliminar los posibles efectos que éste

3. Material y Métodos

podiera tener sobre la línea de estudio. Todas las células fueron cultivadas bajo las mismas condiciones estándar (37 °C, 5% CO₂). En el caso de estudiar parámetros de la ruta de autofagia, de las 48 horas de tratamiento, las últimas 24 fueron sin suplemento de suero con el fin de inducir dicho flujo.

3.1.3.1. Emulsiones lipídicas

Para estudiar el efecto de diferentes fuentes grasas sobre la fisiología mitocondrial y la ruta de autofagia, las células fueron tratadas con tres emulsiones lipídicas, utilizadas normalmente en nutrición hospitalaria parenteral, a una concentración de 7 µl/ml. La composición de cada una es la siguiente:

- Lipofundina MCT/LCT 20%, con una composición basada principalmente en aceite de soja y rica, por tanto, en ácidos grasos poliinsaturados n-6 (PUFA). Contiene 100 g/L de aceite de soja y 100 g/L de triglicéridos de cadena media (MCT).
- Lipoplus 20%, compuesta por 100 g/L de MCT, 80 g/L de aceite de soja y 20 g/L de triglicéridos con PUFA n-3, característicos de una dieta enriquecida en aceite de pescado.
- ClinOleic 20%, compuesta principalmente por aceite de oliva purificado (160 g/L) y aceite de soja (40 g/L), utilizada por tanto como una fuente de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) n-9.

Resultados previos de nuestro grupo de investigación revelaron que estas emulsiones son altamente tóxicas en líneas derivadas de riñón, tales como las Tkpts, por lo que estos tratamientos únicamente se utilizaron en la línea celular Hepa 1.6. Además, para llevar a cabo los diferentes ensayos, fue necesario sembrar las células a una densidad muy elevada (12.000-15.000 cél/cm²), ya que a bajas densidades se observó una acusada caída de la viabilidad en presencia de estos tratamientos.

Durante el desarrollo de este estudio B. Braun Melsungen AG suspendió la comercialización de la Lipofundina MCT/LCT 20% y, por lo tanto, sólo pudieron llevarse a cabo un número reducido de experimentos con ella.

3.1.3.2. Compuestos fenólicos precursores de la síntesis de Q

En el presente estudio se utilizaron dos compuestos fenólicos que actúan como precursores de la síntesis de Q. Uno de ellos fue el ácido *p*-hidroxibenzoico (pHB) (Sigma Aldrich), que actúa como precursor del anillo benzoquinónico de esta molécula, y que fue utilizado a una concentración de 1 μ M. El otro precursor utilizado fue el kaempferol (3,5,7,4-tetrahidroxiflavona) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, Estados Unidos), que aparte de desempeñar distintas funciones, como por ejemplo activador de la autofagia [94] o la apoptosis [107], es capaz de actuar como precursor de Q de la misma manera que el pHB. En nuestro caso, fue utilizado a una concentración de 10 μ M, ya que en estudios previos de dosis-respuesta realizados en nuestro grupo de investigación, esa fue la concentración que más aumentó los niveles de Q en la línea celular Tkpts sin comprometer la viabilidad de la misma [134].

3.1.3.3. Suplemento con Coenzima Q₁₀

Como complemento a los estudios realizados con precursores de la síntesis de Q, y con el propósito de determinar si los efectos mediados por el Q de síntesis endógena son los mismos que los producidos por el Q aportado de manera exógena, se introdujo el suplemento con Q₁₀ (Sigma Aldrich) a distintas concentraciones dentro de unos rangos fisiológicos entre 2 y 10 μ M [260].

3.1.3.4. Inhibidores

3.1.3.4.1. Ácido *p*-aminobenzoico (PABA)

Con el fin de dilucidar si los efectos observados con los diferentes tratamientos se debían a la biosíntesis de la quinona, se utilizó el ácido *p*-aminobenzoico (PABA) (Sigma Aldrich), un inhibidor de la polipreniltransferasa COQ2 y que por tanto impide la biosíntesis de Q. La concentración utilizada fue de 1 mM, utilizando como referencia trabajos previos de nuestro grupo en los que se demuestra que esta concentración es suficiente para ejercer el efecto inhibidor deseado [261].

3.1.3.4.2. Nicotinamida (NAM)

Se trata de la forma amida de la vitamina B3 (ácido nicotínico) y actúa como constituyente de los cofactores enzimáticos NAD⁺ y NADP⁺. Existen evidencias de que la nicotinamida (NAM) actúa como inhibidora de la actividad deacetilasa de las sirtuínas [109]. Por ello, en el presente trabajo se usa en combinación con kaempferol 10 mM, con el objeto de discernir entre los efectos del polifenol mediados o no por la actividad de las sirtuínas.

3.1.3.5. Inhibidores de la ruta de autofagia

3.1.3.5.1. Tioconazol, inhibidor de la proteína ATG4

El tioconazol es una droga utilizada como antifúngico que es capaz de unirse al sitio activo de la proteína ATG4A/B [16], que es una de las numerosas proteínas que están implicadas en la maquinaria de la ruta autofágica. Concretamente, esta proteína es una de las encargadas del procesamiento de pro-LC3 a LC3I y de la posterior delipidación de LC3II a LC3I. El tioconazol (Sigma Aldrich) fue utilizado a una concentración final de 5 μ M, que fue previamente definida mediante una curva de toxicidad en la línea Tkpts.

3.1.3.5.2. Cloroquina

La cloroquina (Cq) es un compuesto muy utilizado en la clínica para el tratamiento de enfermedades como la malaria [262] y otras patologías de carácter autoinmune [263]. Además, actúa como inhibidor de la autofagia en sus pasos más tardíos debido a la naturaleza de su estructura. Se trata de una base débil que presenta una serie de características hidrofóbicas que permiten que difunda al interior de los lisosomas, donde se protona y queda atrapada provocando un incremento del pH lisosomal [264, 265]. Los tratamientos con este inhibidor fueron de 18 horas a una concentración de 10 μ M.

3.1.4. Obtención de extractos celulares

3.1.4.1. Electroforesis y western blot

Una vez finalizados los tratamientos correspondientes, las células se lavaron dos veces en solución de Hanks y despegadas de la superficie de crecimiento (placas de 6 pocillos o botellas de 75 cm² en función de los requerimientos del experimento) con la ayuda de un rascador en un pequeño volumen (50-100 µl) de tampón de ensayo para radio inmunoprecipitación (RIPA)(Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM, deoxicolato 0,5%, SDS 0,1%, ditiotretitol (DTT) 1 mM, Triton X-100 1%). Con el propósito de mejorar la preservación de las muestras, el tampón RIPA se suplementó con dos inhibidores de proteasas: CLAP (cóctel de quimiostatina, leupeptina, antipaina y pepstatina) a 20 µg/ml de cada uno de sus componentes y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a 1 mM. Además, se utilizaron dos cócteles de inhibidores de fosfatasas 2 y 3 (Sigma Aldrich) a una dilución 1:100.

Con el fin de eliminar los restos celulares no solubilizados, las suspensiones celulares resultantes fueron agitadas vigorosamente en vórtex durante 15 segundos y posteriormente centrifugadas a 10.000 g durante 15 minutos. Los sobrenadantes fueron guardados a -80 °C para posteriores determinaciones de los niveles de proteína mediante western blot.

3.1.4.2. Extracciones lipídicas

Para la extracción de lípidos, las células se sembraron a una densidad de 4.000 cél/cm² en placas de 6 pocillos. Una vez finalizados los tratamientos correspondientes, las células se lavaron con solución de Hanks y, posteriormente, fueron despegadas de la superficie de crecimiento con la ayuda de un rascador en 1 ml de esta misma solución. Posteriormente, la suspensión celular se centrifugó a baja velocidad (1.500 rpm) y se secó la pella resultante. Ésta se puede congelar a -80 °C para su posterior procesamiento, o bien resuspenderse en 90 µl de solución de Hanks para comenzar su solubilización. Una vez resuspendida, se añadieron 10 µl de SDS al 10% seguido de 200 µl de una mezcla de 95:5 etanol-isopropanol. Tras agitar vigorosamente con vórtex, se añadieron 500 µl de hexano y las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 5 minutos a 4 °C. Los lípidos se recogieron cuidadosamente de la fase superior de hexano,

3. Material y Métodos

repitiéndose el proceso dos veces más. Las fases de hexano se mezclaron y el solvente se evaporó en condiciones de vacío. Los extractos lipídicos fueron guardados a -80 °C hasta su posterior uso.

3.1.5. Aislamiento de mitocondrias a partir de cultivos celulares

Para la homogeneización y el posterior aislamiento de la fracción mitocondrial, se sembraron una media de 4 botellas de cultivo de 75 cm² por condición a una densidad de 4.500 cél/cm², a fin de obtener un volumen apreciable de material.

Tras el correspondiente tratamiento, las células se lavaron dos veces con solución de Hanks y se recogieron utilizando un rascador. Posteriormente la suspensión celular fue centrifugada a 1.500 rpm durante 5 minutos, y se secó la pella de cualquier resto de líquido, resuspendiéndose en un tampón hiposmótico (Tris-acetato 10 mM, pH 6,7, KCl 10 mM y MgCl 15 mM) suplementado con PMSF 1 mM y CLAP 20 µg/ml). El volumen de este tampón varió en función de la cantidad de células recogidas, oscilando entre los 200 µl y los 2 ml. Las células se mantuvieron en este tampón y en frío durante 20-25 minutos para producir la hinchazón de las células por choque osmótico, favoreciéndose así la posterior homogeneización. Transcurrido este tiempo las células fueron homogeneizadas con un homogeneizador Potter Elvehjem (teflón-vidrio) acoplado a motor dando varios pulsos de dos minutos a velocidad máxima, con parada entre los mismos para evitar el excesivo calentamiento de la muestra. Todos los procesos que se indican a continuación, además del paso de homogeneización descrito anteriormente, se llevaron a cabo en frío para mantener la integridad de las mitocondrias. Transcurrido este tiempo, se añadió un volumen de tampón concentrado (Tris-acetato 10 mM, pH 7,5, KCl 10 mM, MgCl 15 mM y 0,5 M de sacarosa) igual al de tampón hiposmótico previamente añadido, de manera que se restablecieran las condiciones de osmolaridad. El homogenado se llevó a tubos de centrifuga de vidrio (Corex de 15 ml) completándose el volumen hasta 10 ml con tampón isosmótico (Tris-acetato 10 mM, pH 7, KCl 10 mM, MgCl 15 mM y sacarosa 0,25 mM).

Se realizó una primera centrifugación a 1.200 g durante 5 minutos en una centrífuga J2-21 (Beckman Coulter Inc, Brea, California, Estados Unidos) con rotor de ángulo fijo JA-20 a 4 °C con el fin de descartar núcleos y material no fragmentado. El sobrenadante

3. Material y Métodos

se sometió a otra centrifugación de 5.000 g durante 15 minutos a 4 °C. Tras esta última, obtenemos en la pella la fracción mitocondrial cruda, que fue resuspendida en un volumen de 200 µl de tampón isosmótico suplementado con PMSF 1 mM y CLAP 20 µg/ml. Las fracciones se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

3.1.6. Aislamiento de ARN a partir de cultivos celulares

El ARN fue extraído a partir de células crecidas en placas de 6 pocillos. Se retiró el medio de cultivo y se lavó la superficie dos veces con solución de Hanks. Para proceder a la extracción del ARN se utilizó el kit de columnas RNA/DNA/Protein Purification Plus Kit (NORGEN biotek corp. Ontario, Canadá) siguiendo el procedimiento detallado por el fabricante. La concentración y pureza del ARN se determinó con un Nanodrop™ 2000 (ThermoFisher) midiendo la absorbancia a 260 nm y la ratio 260 nm/280 nm, respectivamente.

3.2. Modelo animal

3.2.1. Animales y dietas

Para el presente trabajo se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL/6 con tres meses de edad, obtenidos de los laboratorios Charles River (Massachussets, Estados Unidos). Esta colonia recibió los cuidados y atenciones estipulados en el documento “Guide for care and use of laboratory animals” (National Research Council, Estados Unidos), la ley “Animal Welfare Act” (PL 89-544, Estados Unidos) y el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, siendo los protocolos aprobados por los comités éticos de experimentación animal de las universidades de California (Davis, Estados Unidos) y Pablo de Olavide (Sevilla).

Los animales fueron mantenidos en las instalaciones del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (Universidad Pablo de Olavide), en jaulas individuales, para así garantizar el control exacto de la ingesta. Los ciclos de luz y oscuridad fueron de 12 horas, la temperatura del habitáculo de 22 °C y los individuos tenían acceso ilimitado al agua. Durante 3 semanas se calculó la ingesta media de un grupo de 30 ratones, elegidos

3. Material y Métodos

al azar, para establecer un criterio en base al cual calcular el aporte calórico suministrado en las diferentes dietas del estudio.

A 10 semanas de edad, los ratones se asignaron de manera aleatoria a uno de los diferentes grupos experimentales y fueron alimentados con una dieta purificada AIN-93M (Research Diets, Nueva Jersey, Estados Unidos) cuya única diferencia era la fuente grasa principal.

Con el fin de evitar una ganancia excesiva de peso que podría derivar en obesidad, el grupo control fue alimentado con un 95% del aporte diario previamente calculado. Los individuos que pertenecían al resto de grupos experimentales, todos ellos en restricción calórica (RC), recibieron un 60% de dicha cantidad, que contenía no obstante todos los componentes minerales y vitamínicos que aseguraran los mismos niveles absolutos en todas las dietas de estudio.

Como se comentó anteriormente, la única diferencia entre las dietas que recibieron los distintos grupos fue la fuente lipídica principal, de manera que el grupo control (Ctrl.) se alimentó con una dieta cuya grasa principal era el aceite de soja (alto en PUFA n-6, Super Store Industries, Lathrop, CA) mientras que los 3 grupos sometidos a RC se alimentaron con dietas que incorporaban este mismo aceite de soja, manteca de cerdo (alta en SFA y MUFA; ConAgra Foods, Omaha, NE) o aceite de pescado (alto en PUFA n-3: 18% ácido eicosapentaenoico y 12% de ácido docosahexaenoico; Jedwards International, Inc., Quincy, MA). La composición de las dietas así como el análisis de los ácidos grasos presentes en la grasa principal de la misma se detallan en las tablas M1 y M2.

Se establecieron además dos grupos de edad para cada intervención nutricional: el primero de ellos siguió una intervención de 6 meses y el otro durante un periodo más largo, de 18 meses.

3. Material y Métodos

Tabla M1. Composición de las dietas utilizadas para cada grupo de estudio. Tanto para la dieta del grupo control como la dieta del grupo RC-Soja el componente graso utilizado fue el aceite de soja. Todas las dietas contenían mezclas de minerales (S10022G) y vitaminas (V10037) [187].

Ingredientes	Dieta de manteca de cerdo (g/kg)	Dieta de aceite de soja (g/kg)	Dieta de aceite de pescado (g/kg)
Caseína	200	200	200
Maicena	397,48	397,48	397,48
Dextrosa	132	132	132
Sacarosa	100	100	100
Celulosa	50	50	50
Aceite de soja	-	70	10
Manteca de cerdo	70	-	-
Aceite de pescado	-	-	60
t-butilhidroquinona	0,014	0,014	0,014
Mezcla de minerales	35	35	35
Mezcla de vitaminas	10	10	10
L-cisteína	3	3	3
Bitartrato de colina	2,50	2,50	2,50

Tabla M2. Composición en ácidos grasos de cada una de las grasas utilizadas en la elaboración de dietas. Los valores aparecen expresados en porcentaje [266].

Ácidos grasos	Manteca de cerdo (%)	Aceite de soja (%)	Aceite de pescado (%)
Saturados	40,3	14,8	28,3
Monoinsaturados	39,2	21,2	8,7
n-6 totales	16	55	3,2
n-3 totales	0,7	8,1	33,9
Ratio n6/n-3	24,4	6,8	0,1

Una vez transcurrido el periodo de intervención, los animales fueron sacrificados en las instalaciones de la Universidad Pablo de Olavide mediante dislocación cervical. Los tejidos fueron extraídos y preservados en tampón de congelación (manitol 0,21 M, sacarosa 0,07 M, DMSO 20%) y sumergidos en nitrógeno líquido para su posterior conservación a -80 °C. También se tomaron muestras para su posterior estudio con el microscopio electrónico de transmisión (ver apartado 3.11).

3.2.2. Obtención de homogenados totales de tejido

El músculo esquelético y el hígado procedentes de todos los grupos de estudio, se procesó siguiendo el protocolo establecido previamente por nuestro grupo de investigación para la obtención de homogenados totales [267, 268]. El músculo de la pata trasera fue troceado y homogeneizado a 4 °C en tampón frío cuya composición era Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, KCl 40 mM, sacarosa 0,2 M, PMSF 1 mM, EDTA 10 mM y CLAP 20 µg/ml, usando para ello un homogeneizador Potter Elvehjem (teflón-vidrio). Se realizó un segundo paso de homogeneización y dispersión del tejido utilizando un dispersor de cabezal metálico (Ultra-Turrax T25, IKA, Staufen, Alemania) y los homogenados totales así obtenidos se almacenaron a -80 °C hasta su posterior uso.

En el caso del hígado el proceso llevado a cabo para la homogeneización fue sustancialmente el mismo cambiando la composición del tampón utilizado (Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, manitol 0,225 M, sacarosa 0,075 M, EDTA 10 mM, EGTA 0,5 mM, PMSF 1 mM y CLAP 20 µg/ml).

3.3. Determinación de la cantidad de proteína en las muestras

En todos los casos, la concentración de proteína fue determinada usando la modificación del protocolo establecido por Stoscheck en 1990 [269] del método descrito previamente por Bradford [270]. Se tomaron triplicados de cada una de las muestras y se mezclaron con 50 µl de NaOH 1 M, que facilitará la solubilización de la misma, añadiendo finalmente 1 ml de reactivo de Bradford (ácido fosfórico 55%, etanol 30%, colorante Blue G 0.67 g/l) (Bio-Rad, Hércules, California, Estados Unidos). Las muestras se mezclaron con vórtex y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se determinó la absorbancia a 595 nm utilizando un espectrofotómetro DU-640 (Beckman Coulter). Para determinar la concentración final de proteína, se realizó una recta patrón con concentraciones conocidas crecientes de γ -globulina (de 0 a 20 µg/ml).

3.4. Separación electroforética de las proteínas y western blot

3.4.1. Preparación de las muestras

Generalmente se tomaron 50 µg de extracto proteico, proveniente de extractos celulares o de homogenado total de músculo esquelético o hígado, y se mezclaron con tampón de carga SDS-DTT 1X (Tris-HCl 60 mM, pH 6,8, sacarosa 10%, EDTA 2 mM, SDS 1,5%, DTT 20 mM y azul de bromofenol al 0,01 %). Posteriormente, las muestras fueron hervidas a 100 °C durante 5 minutos. En el caso de que las muestras fueran a utilizarse para la inmunodetección de proteínas de membrana, éstas se calentaron a 45 °C durante 5 minutos para evitar agregados proteicos que pueden formarse por la presencia de SDS a altas temperaturas. Como particularidad, las muestras que se utilizaron para la detección de subunidades de los complejos de la cadena de transporte mitocondrial, que son también proteínas de membrana, fueron calentadas 5 minutos a 37 °C para preservar la señal del complejo IV, que se pierde progresivamente con el aumento de la temperatura. Además, en ambos casos se añadió al tampón de carga inhibidores de proteasas PMSF (100 mM) y CLAP (5 mg/ml) en proporciones 18:1:1.

3.4.2. Electroforesis

Para la separación electroforética de las proteínas se utilizaron geles en gradiente de poliacrilamida TGX 4-20% (Bio-Rad) de 18 o 26 pocillos, en función de los requerimientos del experimento y cargando siempre uno de ellos con un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein All Blue Standards, Bio-Rad). El sistema utilizado para electroforesis fue un Criterion system (Bio-Rad) programado a un voltaje constante de 200 V y amperaje máximo de 150 mA durante un tiempo de 30-40 minutos.

3.4.3. Transferencia y control de carga

Una vez completada la electroforesis, las proteínas embebidas en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (tamaño de poro de 0,2 µm) incluida en el kit de transferencia semisecca Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Se utilizó

3. Material y Métodos

el sistema de transferencia que lleva este mismo nombre con un programa rápido de 7 minutos a 25 V y amperaje máximo de 2,5 A.

Finalizada la transferencia, la membrana se tiñó con el colorante rojo Ponceau S diluido en ácido acético al 1% durante 2 minutos en agitación a temperatura ambiente. Ya teñida, el exceso de colorante de la membrana fue retirado realizando varios lavados con ácido acético al 1%. El patrón proteico así obtenido se digitalizó con el sistema ChemiDoc™ Image System (Bio-Rad).

3.4.4. Bloqueo, inmunotinción y revelado

Una vez digitalizada la imagen, la membrana se sometió a dos pasos de bloqueo, de media hora mínimo cada uno, con el tampón TTBSL (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, NaCl 0,85%, Tween-20 0,05% y leche desnatada en polvo al 5%). Una vez bloqueada, la membrana puede guardarse a -20 °C para su posterior uso o bien continuar con la inmunotinción.

En caso de continuarse con la detección de las proteínas de interés, la membrana se incubó en agitación durante 15 horas aproximadamente y a 4 °C con el anticuerpo primario correspondiente, preparado a la concentración óptima en cada caso, en tampón TTBSL. En las tablas M3-M5 se muestran los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el presente estudio, así como las concentraciones de trabajo y sus referencias.

Concluida esta incubación, la membrana se lavó 3 veces a temperatura ambiente y en agitación durante 5 minutos con una solución de TTBS (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, NaCl 0,85%, Tween-20 0,05%). Posteriormente se añadió el anticuerpo secundario, encargado de reconocer al anticuerpo primario previamente usado, y que se encuentra acoplado a enzima peroxidasa. Éste también se prepara en TTBSL y el tiempo de incubación fue de una hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se retiró el anticuerpo secundario y se llevaron a cabo tres lavados con TTBS (5 minutos cada uno) y un lavado final de 10 minutos con TBS (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 y NaCl 0,85%). El revelado de las imágenes se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia usando el kit Clarity™ Western ECL Blotting Substrates (Bio-Rad). Dicha señal quimioluminiscente, producto de la reacción catalizada por la peróxidasa acoplada al

3. Material y Métodos

anticuerpo secundario, fue captada por el equipo ChemiDoc™ Imaging System (Bio-Rad). Las imágenes resultantes se cuantificaron y normalizaron utilizando el control de carga obtenido mediante la tinción con rojo Ponceau S de la membrana, con el fin para minimizar las diferencias debidas a la carga de proteína, y usando el software ImageLab™ (Bio-Rad).

Tabla M3. Anticuerpos utilizados en la determinación de proteínas implicadas en la ruta de autofagia, mitofagia y patrón de acetilación proteico. Cada anticuerpo primario fue utilizado en combinación con el anticuerpo secundario indicado a su derecha. Los códigos que comienzan por SC pertenecen a Santa Cruz Biotechnologies, los indicados únicamente con un número, pertenecen a Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, Estados Unidos) y el indicado con la letra P a Sigma Aldrich.

Anticuerpo primario	Dilución	Referencia	Anticuerpo secundario	Dilución	Referencia
mTOR	1:1000	SC-8913	Anti Ig-G de conejo	1:2000	SC-2004
Fosfo mTOR	1:1000	2971	Anti Ig-G de conejo	1:2000	SC-2004
Beclina 1	1:500	SC-10086	Anti Ig-G de cabra	1:2000	Sigma A-5420
p62	1:2000	P0067	Anti Ig-G de conejo	1:2000	SC-2004
LC3	1:1000	4108	Anti Ig-G de conejo	1:2000	SC-2004
PINK1	1:1000	SC-33796	Anti Ig-G de conejo	1:2000	SC-2004
Parkin	1:250	2132	Anti Ig-G de conejo	1:2000	SC-2004
Acetil Lisina	1:1000	9441	Anti Ig-G de conejo	1:2000	SC-2004

Tabla M4. Anticuerpos utilizados en la determinación de subunidades de los complejos de la cadena de transporte electrónico (ThermoFisher Scientific), de tioredoxina 1 (Trx 1), y en la detección de los grupos DNP de proteínas carboniladas (EMD Millipore, Burlington, Massachusetts, Estados Unidos).

Anticuerpo primario	Dilución	Referencia	Anticuerpo secundario	Dilución	Referencia
Anti-Rt/Ms Total OXPHOS Complex Kit	1:2000	458099	Anti Ig-G de ratón	1:2000	Sigma A-9044
Trx 1	1:500	N/A	Anti Ig-G de cabra	1:2000	Sigma A-5420
Anti DNP	1:250	S7150	Anti Ig-G Cabra y Conejo	1:300	S7150

3. Material y Métodos

Tabla M5. Anticuerpos utilizados en la determinación proteínas de fusión y fisión mitocondrial.

Anticuerpo primario	Dilución	Referencia	Anticuerpo secundario	Dilución	Referencia
Drp 1	1:1000	SC-32898	Anti Ig-G de conejo	1:2000	SC-2004
Fis 1	1:1000	SC-98900	Anti Ig-G de conejo	1:2000	SC-2004
Mfn 1	1:1000	SC-50330	Anti Ig-G de conejo	1:2000	SC-2004
Mfn2	1:1000	SC-50331	Anti Ig-G de conejo	1:2000	SC-2004
OPA 1	1:1000	SC-30573	Anti Ig-G de cabra	1:2000	Sigma A-5420

3.5. Medida de los niveles de coenzima Q₉ y Q₁₀ mediante HPLC

Todas las medidas cromatográficas se llevaron a cabo utilizando el equipo Beckman System Gold (Beckman Coulter) conectado a un detector electroquímico Coulochem II (ESA, Chelmsford, Massachusetts, Estados Unidos) equipado con una célula analítica Model 5010 con potenciales -500 mV y +300 mV en los electrodos 1 y 2. La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando una columna de fase reversa C18 (4.6 mm × 25 cm, Ultrasphere ODS, de 5 µm de tamaño de partícula) con una fase móvil compuesta por una proporción 53:45:2 de metanol-isopropanol- acetato amónico 1 M, pH 4,4, a un flujo de 1 ml/ minuto. La fracción lipídica extraída se resuspendió en 30 µl de metanol y fue sometida a un paso de reducción previo a la inyección, añadiendo 1 µl de borohidruro sódico 50 mM. El tiempo de retención de las hidroquinonas resultantes fue 10-11 minutos para el Q₉ y 14-15 minutos para el caso del Q₁₀. Para la cuantificación de los cromatogramas, las unidades de área de los picos de las hidroquinonas se refirieron a un estándar de Q₁₀ inyectado previamente y los datos fueron normalizados en función de la cantidad de proteína de cada muestra.

3.6. Ensayos enzimáticos de la cadena de transporte electrónico

La actividad citrato sintasa, así como las actividades de los complejos mitocondriales, se llevaron a cabo mediante técnicas espectrofotométricas, en un volumen final de un 1ml, midiendo los cambios de absorbancia en un espectrofotómetro termostatzado (Beckman Coulter, DU-640) a 30 °C (citrato-sintasa y complejos I, II,

III, I+III, II+III) o 37 °C (complejo IV) y en agitación constante utilizando cubetas de vidrio.

3.6.1. Actividad citrato sintasa

La citrato sintasa (CS) es una enzima que desempeña un importante papel en el ciclo de Krebs y se localiza en la matriz mitocondrial. Por esta razón, es utilizada como marcador cuantitativo de la integridad mitocondrial posterior a un proceso de aislamiento [271]. El producto de la reacción catalizada por la CS es el ácido tionitrobenzoico (TNB) que se irá monitorizando determinando el aumento de absorbancia a 412 nm. El medio de reacción consta de DTNB a una concentración final de 0,1 mM (Sigma Aldrich), Tritón X-100 0,25% (Sigma Aldrich), oxalacetato 0,5 mM (Sigma Aldrich), acetil CoA 0,10 mM (Sigma Aldrich), añadiéndose una cantidad de proteína de 35 µg en un volumen final de 1 ml para cada ensayo. El coeficiente de extinción del TNB es $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.6.2. Actividad simple de los complejos

La cantidad de proteína tomada para la realización de los ensayos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial fue de 100 µg.

3.6.2.1. Complejo I

El método utilizado determina la actividad del complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa) y está basado en la monitorización a 600 nm de la reducción del 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) por los electrones del decilubiquinol (DBH_2), el cual se reduce tras la oxidación del NADH por el complejo I [272]. La reducción del DCPIP (cuyo coeficiente de extinción molar es de $19,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) se monitorizó durante 10 minutos y se llevó a cabo en un tampón cuya composición fue: KH_2PO_4 25 mM, pH7,8, BSA 3,5 g/L, 60µM DCIP, antimicina A 1 µM y NADH 0,2 mM. Las medidas se llevaron a cabo en presencia y ausencia de un inhibidor específico del complejo I, la rotenona (1 mM) (Sigma Aldrich).

3.6.2.2. Complejo II

La actividad del complejo II se analizó midiendo la reducción del DCPIP dependiente de succinato y decilubiquinona a 600 nm. El medio de reacción contenía tampón fosfato 25 mM, pH 7,2, MgCl₂ 5,56 mM y succinato 20 mM. Tras 10 minutos de incubación a 30 °C para la activación del complejo que podría no ser funcional por la presencia de oxalacetato, se añadió antimicina A 5 µg/ml, rotenona 5 µg/ml, KCN 2 mM, DCPIP 50 µM y, finalmente, 65 µM de DB [273, 274].

3.6.2.3. Complejo III

La actividad del complejo III (ubiquinol-ferricitocromo oxidoreductasa) se midió a partir de la reducción del citocromo c dependiente de DBH₂ y sensible a antimicina A (5 µg/ml). La mezcla de reacción contenía 25mM de tampón fosfato, pH 7,2, MgCl₂ 5,56mM, 2,5 mg/ml de BSA, 0,6 mM de Tritón X-10, rotenona 5µg/ml, KCN 2mM, DBH₂ 60 µM, y finalmente citocromo c 50mM. El DBH₂ se obtuvo a partir de la reducción de la DB con ditionito sódico[275]. La reacción se monitorizó a 550 nm durante 1-2 minutos, siendo el coeficiente de extinción molar del citocromo c 1mM⁻¹ cm⁻¹) [273, 276].

3.6.2.4. Complejo IV

La actividad del complejo IV (ferrocitocromo c oxidasa) fue medida siguiendo el protocolo de Storrie y Madden[277], modificando el Lubrol-PX como agente permeable por 0,025% de Tritón-X 100. El tampón de reacción estaba compuesto por tampón fosfato 40 mM, pH 6,2, y citocromo c reducido 25 mM. La oxidación del citocromo se monitorizó a 550 nm durante tres minutos (siendo el coeficiente de extinción molar del citocromo c 1 mM⁻¹ cm⁻¹).

3.6.3. Actividad combinada de los complejos

La actividad combinada de los complejos I+III se llevó a cabo monitorizando la reducción del citocromo c dependiente de NADH y sensible a rotenona, en un medio de reacción que contenía tampón fosfato 55,56 mM, pH 7,4, NADH 10 mM, KCN 2 mM,

3. Material y Métodos

citocromo c 80 μM . Tras 2-3 minutos de monitorización de la señal a 550 nm, se añadió la rotenona 5 $\mu\text{g/ml}$ y se continuó con la medida durante 4 minutos más (siendo el coeficiente de extinción molar del citocromo c $1\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Por último, la actividad combinada del complejo II+III se determinó, nuevamente, mediante la reducción del citocromo c. El medio de reacción contenía tampón fosfato 47,06 mM, pH 7,4, succinato 20 mM, KCN 2 mM, rotenona 5 $\mu\text{g/ml}$ y citocromo c 30 μM . La muestra fue pre incubada durante 10 minutos a 30°C con el fin de activar el complejo II. Una vez transcurrido ese tiempo se monitorizó la reacción durante 5 minutos [278-280].

3.7. Tinción de lípidos mediante Oil-red O

Con el fin de determinar si en la línea celular Hepa 1.6 se produce alguna modificación en la acumulación de gotas lipídicas en respuesta al tratamiento con las emulsiones, se realizó una tinción de lípidos neutros con el colorante Oil-Red O [281].

Las células se sembraron a una densidad de 15.000 cél/cm² en placas de 6 pocillos. Una vez transcurridas las 48 horas de tratamiento, se retiró el medio que contenía la emulsión y se lavaron los pocillos dos veces con solución de Hanks. Posteriormente se añadió una solución de paraformaldehído (PFA) al 4%, pH 7,4, en solución acuosa en cada pocillo y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se retiró el PFA y se lavaron los pocillos con isopropanol al 60%, retirando esta solución y dejando secar los pocillos durante 30 minutos. A continuación se añadió la solución de trabajo de Oil-Red O (Sigma Aldrich) 17mM y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Terminada la incubación se retiró la solución con el colorante, se lavaron los pocillos con abundante agua destilada y se solubilizaron las células con isopropanol 100% durante 10 minutos. Por último, se recogió el volumen y se pasó a cubetas de plástico desechables para determinar la absorbancia de la solución a 500 nm en un espectrofotómetro (DU-640, Beckman Coulter).

En caso de que las células fueran a utilizarse para microscopía óptica, el protocolo de tinción fue sustancialmente el mismo, con la particularidad de que las células fueron crecidas en portaobjetos estériles. Una vez terminada la tinción, los portas fueron montados en portaobjetos utilizando para ello medio de montaje glicerol:PBS en

proporción 1:1. Las fotografías de las preparaciones fueron tomadas a 40X utilizando un microscopio óptico Leica DM5000 B.

3.8. Medidas de daño oxidativo

3.8.1. Determinación del grado de peroxidación de los lípidos

La peroxidación lipídica se determinó en muestras de extracto total de células Hepa 1.6 tratadas con emulsiones lipídicas, usándose 100 µg de proteína por ensayo. El método de determinación se basa en la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} mediada por hidroperóxidos y en presencia de naranja de xilenol (Sigma Aldrich) bajo condiciones ácidas [282]. El medio de reacción para este ensayo es conocido como reactivo de FOX, cuya composición fue: naranja de xilenol 100 µg, sulfato amónico ferroso 250 µM, ácido sulfúrico 25 mM, butilhidroxitolueno (BHT) 4 mM y metanol 90% v/v grado HPLC. El grado de peroxidación se determinó incubando los extractos proteicos con el reactivo de FOX durante 75 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Una vez transcurrido ese tiempo, la absorbancia del complejo Fe^{3+} -xilenol, cuyo coeficiente de extinción molar es $43 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, fue medida a 560 nm en cubetas de plástico utilizando un espectrofotómetro DU-640 (Beckman Coulter).

3.8.2. Determinación del grado de oxidación de las proteínas

Un marcador típico de estrés oxidativo a nivel de proteínas es la formación de grupos carbonilos, aldehídos y cetonas principalmente en sus cadenas laterales, lo cual puede dar lugar a la variación de la estructura conformacional de las mismas alterando finalmente su función. Para llevar a cabo determinaciones del grado del daño, se utilizó el kit Oxyblot™ (Merck, Darmstadt, Alemania) cuya metodología desarrolló inicialmente Shacter y colaboradores en 1994 [283]. El fundamento consiste en derivatizar los grupos carbonilo de las proteínas con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), lo que da lugar a un producto de reacción muy estable: la dinitrofenilhidrazona (DNP). Una vez neutralizada la reacción de derivatización, tal y como se indica en las instrucciones del fabricante, las muestras se separan electroforéticamente en gel de poliacrilamida, procediéndose de la manera detallada previamente en el apartado 3.4.

Finalmente, se utilizó un anticuerpo primario anti-DNP que permitió la detección de los grupos carbonilo formados [284].

3.8.3. Análisis mediante citometría de flujo

El procedimiento de preparación de muestras para su posterior análisis mediante citometría de flujo fue siempre el mismo, con independencia de los tratamientos y la línea celular utilizada. Las células fueron sembradas a las mismas densidades que las especificadas en apartados anteriores.

Tras los correspondientes tratamientos, se retiró el medio de cultivo de las placas y se añadió la sonda fluorescente de interés resuspendida en su correspondiente medio de cultivo a la concentración estipulada por el fabricante. Tras la incubación en oscuridad de la misma (de tiempo variable en función del fluoróforo) se procedió al lavado de los pocillos con solución de Hanks. Posteriormente las células fueron recogidas en solución de despegado no enzimática (Sigma Aldrich) con la ayuda de un rascador, y transferidas directamente a tubos de plástico para su análisis inmediato. Todo el proceso se realizó en frío y en condiciones de oscuridad relativa. Para las determinaciones se utilizó un citómetro de flujo EPICS XL (Beckman Coulter) equipado con láser de argón de 488 nm.

3.8.3.1. Determinación de los niveles de superóxido intracelular

La cuantificación de los niveles de superóxido se realizó utilizando la sonda hidroetidina (HEt; Sigma Aldrich). Esta molécula penetra a través de la membrana plasmática y, una vez en el citosol, es oxidada por el anión superóxido produciéndose 2-hidroxi-etidio (2-OH-Et) [285]. Este producto puede unirse al ADN nuclear emitiendo una señal fluorescente roja. Las células fueron incubadas con la sonda a una concentración final de 4 μ M (preparada a partir de una solución madre de 4 mM en DMSO) durante 20 minutos. La señal resultante se registró a 830 nm en el canal FL3.

3.8.3.2. Determinación de los niveles de hidropéroxido intracelular

La cuantificación de los niveles de hidropéroxido se llevó a cabo usando la sonda diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCDHF-DA; Sigma Aldrich) [286], que es capaz de atravesar la membrana plasmática. Una vez en el citoplasma, las esterasas intracelulares cortan el grupo acetato de la misma de manera que la diclorodihidrofluoresceína (DCDHF) es retenida en el interior celular reaccionando con los peróxidos y dando lugar a la forma fluorescente diclorofluoresceína (DCF). Las células se incubaron con la sonda a una concentración de 10 µg/ml (preparada a partir de una solución madre de 10 mg/ml en DMSO) durante 20 minutos en oscuridad. La señal fluorescente se registró a 680 nm en el detector FL-1.

3.8.3.3. Determinación de los niveles de superóxido mitocondrial

Para la cuantificación de los niveles de superóxido mitocondrial se utilizó la sonda MitoSOX (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos). Este compuesto lipofílico entra en la mitocondria siendo oxidado por el superóxido mitocondrial, emitiendo entonces una señal fluorescente. Las células se incubaron durante 10 minutos con el fluoróforo a una concentración de 5 µM (preparada a partir de una solución madre de 5 mM en DMSO) en oscuridad. La señal fluorescente se registró a 850 nm en el detector FL-2.

3.8.3.4. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$)

Para llevar a cabo medidas de potencial mitocondrial, se utilizó la sonda 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-yoduro de tetraetil-benzimidazol-carbocianina, también conocida como JC-1 (BD Biosciences, Nueva Jersey, Estados Unidos). Esta sonda lipofílica puede encontrarse en dos estados, en forma monomérica o bien formando agregados, ambos con un espectro de emisión diferente. Al incubar las células con la sonda, ésta penetra a través de la membrana plasmática en forma de monómero y la asimilación posterior de la misma por parte de la mitocondria dependerá del potencial mitocondrial

3. Material y Métodos

que este orgánulo posea [287]. Si la mitocondria se encuentra despolarizada el fluorocromo no será capaz de entrar en la mitocondria y quedará mayoritariamente en el citosol, presentando en este estado una señal verde que sería registrada en el detector FL-1. Por el contrario, si la mitocondria está polarizada la sonda será capaz de entrar en ella produciéndose un aumento del compuesto a nivel mitocondrial lo que favorecerá que se formen agregados de JC-1. Cuando esto sucede, se produce un cambio en el espectro de emisión del compuesto, recogiendo la señal emitida en el canal FL-3. El valor de potencial mitocondrial será un ratio de la señal recogida FL3 (640 nm) /FL1 (527 nm).

3.8.3.5. Determinación de la masa mitocondrial

Para llevar a cabo medidas de masa mitocondrial se utilizó la sonda MitoTracker[®]Green FM, que es independiente de potencial mitocondrial. Esta sonda difunde de forma pasiva por la membrana plasmática acumulándose finalmente en la mitocondria. Las células se incubaron durante 20 minutos con la sonda a una concentración de 100 nM (preparada a partir de una solución madre de 1 mM en DMSO) en oscuridad. La señal fluorescente se registró a 600 nm en el detector FL-1.

3.8.3.6. Determinación del flujo autofágico

Para la determinación de flujo autofágico se utilizó el kit CYTO-ID[®]Autophagy Detection Kit (Enzo Biochem, Inc. Farmingdale, Nueva York, Estados Unidos). La sonda utilizada en este kit se une a las vesículas formadas durante el proceso de autofagia, emitiendo una señal fluorescente. La acumulación de autofagosomas puede representar, o bien un incremento en la formación de los mismos, lo que implicaría un aumento del flujo autofágico, o bien un bloqueo del flujo a nivel de la conversión de los autofagosomas a autolisosomas. La utilización de este kit permite distinguir entre ambos procesos, pues usa cloroquina (Cq), sustancia que incrementa el pH lisosomal impidiendo que los autofagosomas se fusionen con los lisosomas. Al usar esta sustancia se produce un bloqueo del flujo, lo que permite cuantificar la cantidad de autofagosomas formados. Para hallar el valor de flujo autofágico se realizaron medidas en ausencia y presencia de Cq, siendo la diferencia entre ambos valores el flujo autofágico.

3. Material y Métodos

Las células fueron incubadas con la sonda durante 30 minutos, a la concentración indicada por el fabricante, en un medio bajo en suero y sin rojo fenol (Opti-MEM, Gibco Thermofisher). En el caso de que las medidas se hicieran con el inhibidor de flujo autofágico Cq, ésta se añadió al medio 18 horas antes de proceder con el ensayo a una concentración de 10 μ M (preparada a partir de una solución madre de 60 mM en DMSO). Como control positivo en cada ensayo se determinó también el flujo autofágico de muestras tratadas con rapamicina (500 nM) (RAP) sustancia inhibidora de la proteína mTOR y que, por tanto, induce el flujo. La señal fluorescente resultante se midió a 700 nm en el detector FL-1.

3.9. Medidas de metabolismo celular

Para la determinación de la capacidad glucolítica de las líneas celulares de interés se utilizó un analizador Seahorse XFe24 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, Estados Unidos) y el kit Cell Energy Phenotype Test, de la misma casa comercial. Este kit contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo medidas de potencial metabólico *in vivo*, los cuales son inyectados a los pocillos donde se encuentran las células en crecimiento. Una de estas sustancias es la oligomicina, que inhibe al complejo V de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y, por tanto, la síntesis de ATP. Induciendo así unas condiciones de estrés en las que se obliga a la célula a producir ATP de una manera independiente a la fosforilación oxidativa, concretamente, por la vía de la glucolisis. El otro reactivo es el carbonilcianuro-*p*-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), un agente desacoplante que se incorpora en la membrana mitocondrial interna y rompe el gradiente de protones obligando a las células a incrementar su consumo de oxígeno con el fin de restaurar el potencial de membrana perdido. Los parámetros que podemos determinar mediante la utilización de esta técnica son dos: el consumo de oxígeno (OCR), que se determinará con la medida de oxígeno en el medio de ensayo y el ratio de acidificación extracelular (ECAR).

Las células crecieron en las placas de 24 pocillos suministradas en el Seahorse XFe24 flux pack. Transcurrida la duración de los tratamientos, las células se lavaron con el medio de cultivo específico para ensayos (Agilent) suplementado con L-Glutamina 2 mM (Sigma Aldrich), glucosa 25 mM y piruvato 1 mM (Sigma Aldrich) y se incubaron en este mismo medio durante 30 minutos a 37 °C, y en ausencia de CO₂, antes de

3. Material y Métodos

proceder a la realización del ensayo. Se cargaron los puertos de los cartuchos suministrados en el kit con la oligomicina y el FCCP (1 μ M) y, una vez terminado el proceso de calibración previo del mismo en el analizador, se cargó la placa donde crecían las células para llevar a cabo el ensayo. La visualización y análisis de los resultados se llevó a cabo utilizando el software Wave 2.4. (Agilent). Los resultados obtenidos se normalizaron refiriendo a la cantidad de proteína de cada pocillo.

3.10. Análisis de expresión génica mediante RT-PCR a tiempo real

Los cebadores utilizados para amplificar las secuencias de interés (los genes *Maplc3a*, *Maplc3b* y *Txn 1*) se diseñaron usando el software Primer3 a partir de las secuencias codificantes de cada uno de los genes. Se seleccionaron aquellas parejas que no difirieran más de 0,5 °C en la temperatura de hibridación. En el caso de los genes *Hprt* [288] y *Sqtsm1* [289], las secuencias fueron tomadas de la bibliografía. La secuencia de los mismos se detalla en la tabla M6:

Tabla M6. Cebadores utilizados para la amplificación de los genes de interés y sus secuencias.

Cebadores	Sentido	Antisentido
<i>Hprt</i>	CAGTCAACGGGGGACATAAA	AGAGGTCCTTTTCACCAGCAA
<i>Sqtsm 1</i>	GGTGCACCCCAATGTGATCT	ATGAGCTTGCTGTGTTCCCT
<i>Txn 1</i>	CCCACCTTTTGACCCTTTTT	TTCTCTGCTACGTGGTGTGG
<i>Map1lc3a</i>	GGTTGACCAGCAGGAAGAAG	GCCTGTCCTGGATAAGACCA
<i>Map1lc3b</i>	CCATTCACCAGGAGGAAGAA	AGCGATACAAGGGGGAGAAG

3.10.1. Validación de la eficiencia de los cebadores

3.10.1.1. Síntesis de ADN copia

En el presente estudio, para la validación de los cebadores, se utilizó como molde para los mismos ADN copia de la línea celular Tkpts, concretamente de células no tratadas (control). Ese fue nuestro control positivo. Para la síntesis de ADN copia se utilizó el kit RevertAid First strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher) a partir de 1 μ g de ARN total. Los productos obtenidos fueron utilizados o bien para la validación de los

3. Material y Métodos

cebadores, en un primer momento, por PCR convencional, o bien para cuantificación de la expresión génica por amplificación por qRT-PCR a tiempo real de las muestras de interés. Cada muestra se amplificó por triplicado utilizando los cebadores a una concentración final de 2 μ M.

3.10.1.2. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

A partir del ADN copia sintetizado, se realizaron una serie de PCRs convencionales para comprobar la especificidad de los cebadores diseñados previamente. Las condiciones de amplificación fueron: pre incubación 10 minutos a 94 °C, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C, 1 minuto de hibridación de secuencias a 60 °C y por último un paso de extensión a 72 °C durante 1 minuto. El producto de PCR de cada gen fue corrido en un gel de agarosa (1%), observándose una única banda del peso molecular esperado. Esto indica una correcta y específica amplificación con los cebadores sin contaminación con ADN genómico u amplificación de otros transcritos no deseados.

3.10.1.3. RT-PCR cuantitativa a tiempo real

Una vez validados los cebadores, se llevó a cabo la determinación de los niveles de ARN mensajero de los genes de interés mediante qRT-PCR, utilizando un termociclador iCycler Optical Module (Bio-Rad). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ l conteniendo 5 μ l de reactivo SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), 2 μ l de cada cebador (5 μ M concentración final) y 1 μ l de ADN copia. Las condiciones de PCR utilizadas fueron: pre incubación 3 minutos a 95 °C, desnaturalización (40 ciclos) 20 segundos a 95 °C, alineamiento 20 segundos a 60 °C, extensión 20 segundos a 72 °C, 90 ciclos de 10 segundos (+0.5 °C/ciclo) y un último ciclo, indefinido, a 4 °C. Como control interno se utilizó el gen de la hipoxantina ribosiltransferasa (*Hprt*), que presenta muy poca variabilidad y gran estabilidad entre condiciones experimentales, tal y como fue descrito en estudios previos de nuestro grupo de investigación [290]. Para la posterior cuantificación de la expresión génica de cada muestras se usó el método de cálculo $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ [291].

3.11. Análisis de figuras de autofagia mediante microscopía electrónica

3.11.1. Preparación de muestras de hígado y músculo esquelético para microscopía electrónica

Los tejidos procedentes de entre 5-7 animales sometidos a cada una de las intervenciones nutricionales fueron cortados en pequeños bloques de 1 mm³. En el caso del músculo esquelético, se tomaron zonas del gastrocnemio interno y en el de hígado, pequeñas secciones de los distintos lóbulos hepáticos. Una vez troceadas, las muestras fueron lavadas dos minutos en tampón cacodilato sódico 0,1 M, pH 7,4, y fijadas en una mezcla de 2.5% de glutaraldehído y 2% de PFA en el mismo tampón durante un periodo de 12 horas. Posteriormente, las muestras se postfijaron en una solución de tetróxido de osmio al 1%, también en tampón cacodilato, durante 1 hora a 4 °C. Tras la deshidratación de las muestras en una serie de alcoholes de concentraciones ascendentes (50°-70°-90°-100°, este último por triplicado) en pasos de 15 minutos, éstas se infiltraron en resina Embed812 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, Estados Unidos). Previamente, las piezas se incubaron con óxido de propileno, agente que actúa como vehículo de la resina utilizada. La infiltración se llevó a cabo de forma escalonada mezclando el óxido de propileno con la resina en proporciones óxido de propileno:resina 2:1, 1:1 y 1:2 en pasos de una duración aproximada de 8 horas. Pasado este tiempo, las muestras se transfirieron a resina pura durante 24 horas más para, posteriormente, realizar los bloques en moldes de silicona que fueron introducidos en estufa a 65 °C hasta la total polimerización de la resina, lo que ocurre tras 36-48 horas de incubación.

Una vez hechos los bloques, fueron tallados y posteriormente cortados con un ultramicrotomo Ultracut Reicher (Leica, Wetzlar, Alemania), realizándose paralelamente cortes semifinos (0,5-1 µm de grosor) que fueron montados en portaobjetos de vidrio. Estos cortes permiten una visualización rápida de la muestra y la selección de los mejores bloques para ser procesados para microscopía electrónica. Para ello, estos cortes semifinos se tiñeron con una solución acuosa compuesta por azul de toluidina al 1% y bórax 1% durante 1-2 minutos.

3. Material y Métodos

Las secciones finas de los bloques (40-70 nm de grosor) fueron montadas en rejillas de níquel y se contrastaron con acetato de uranilo al 4% y citrato de plomo de Sato [292]. Las muestras fueron observadas y fotografiadas utilizando un microscopio electrónico Philips CM-10 o Jeol JEM 1400, en el Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba, España.

3.11.2. Análisis ultraestructural cuantitativo de figuras de autofagia y mitofagia

Una vez tomadas las micrografías, se analizó la frecuencia con la que aparecían figuras de autofagia, ya fueran autofagosomas o autolisosomas, utilizando técnicas planimétricas y estereológicas. En la mayoría de los casos se observaron mitocondrias anormales, las cuales presentaban un aumento en su volumen, una menor densidad electrónica en su matriz, un número reducido de crestas mitocondriales y, además, se encontraban rodeadas de una membrana menos definida que las mitocondrias normales. Ya que estas mitocondrias probablemente estuvieran abocadas a sufrir un proceso de mitofagia, que converge finalmente en la ruta de autofagia celular, tomamos en cuenta estas mitocondrias para nuestros análisis [293]. Éste se llevó a cabo utilizando el software ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, Estados Unidos).

En el caso de los análisis estereológicos, se siguió el método de “Análisis de Puntos” de Weibel [294] por el cual se superpuso una gradilla de puntos separados 0,2 μm a cada micrografía y, de esta manera, se calcularon parámetros tales como densidad de volumen (“ V_v ”: volumen de referencia ocupado por figuras de autofagia) y fracción de área (“ N_a ”: número de figuras de autofagia por unidad de superficie de célula en μm^2).

3.12. Análisis estadístico

Para la realización del análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 5.3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). En todos los casos, los datos representan las medias \pm el error estándar de la mismas (SEM), de un mínimo de 4 réplicas biológicas en cada caso. La normalidad de los datos se comprobó mediante distintos tests estadísticos (Kolmogorov-Smirnov, D’Agostino-Pearson y Shapiro-Wilk). En aquellos casos en los que

3. Material y Métodos

los datos no pasaran el test de normalidad, debido a un tamaño de muestra reducido, a igualdad de varianzas se consideró que éstos seguían una distribución normal. Las medias fueron comparadas utilizando tests t de Student de doble cola o tests no paramétricos de Mann-Whithney en función de la distribución de los datos. Las diferencias significativas se expresaron como: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$). Cuando en la comparación de grupos de datos las diferencias significativas se obtuvieron utilizando un t-test de una cola (menos restrictivo) se habló de “tendencias”, representadas con la letra “t”.

Para la interpretación de resultados es importante tener en cuenta que cada columna, que representa una condición experimental, se marca con una letra. Las diferencias entre grupos, se representan con la letra de la condición experimental correspondiente situada sobre la columna con respecto a la que presenta cambios, indicándose dichas diferencias estadísticas en forma de asteriscos o la letra t.

4. Resultados

4.1. Regulación de la fisiología mitocondrial y de la ruta autofágica mediada por coenzima Q en la línea celular Tkpts.

Basándonos en estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, para la realización de experimentos en los que se determinan parámetros de fisiología mitocondrial, generación de ROS y alteraciones de la ruta de autofagia y la posible implicación de los niveles de coenzima Q en ellas, se tomaron unas concentraciones definidas de kaempferol (K) (10 μ M) y ácido *p-hidroxibenzoico* (pHB)(1 μ M), previamente optimizadas, las cuales incrementaban de manera significativa los niveles de Q en la línea celular Tkpts sin afectar negativamente la viabilidad celular[134]. De igual manera se procedió en aquellos experimentos en los que se utilizó el ácido *p-aminobenzoico* (PABA) (1 mM) como inhibidor de la actividad COQ2 y por tanto, inhibidor de la síntesis endógena de Q en células de mamífero [261]. En el caso de los tratamientos con suplementos de Q₁₀, se realizaron determinaciones cromatográficas de los niveles de Q en esta línea celular a dos concentraciones diferentes: 2 y 10 μ M para comprobar que realmente este suplemento con Q₁₀ exógeno también era capaz de aumentar los niveles de Q en estas células.

Como se muestra en la figura Tk-1, el suplemento con Q₁₀ tanto a 2 como a 10 μ M, elevó muy significativamente los niveles de esta forma de la quinona con respecto a las condiciones control. Por su parte, los niveles de Q₉ no se afectaron en presencia de estos suplementos, lo cual contrasta con estudios previos realizados en modelos *in vivo*, en los que se demuestra que el suplemento de la dieta de roedores de experimentación con Q₁₀ es capaz de incrementar también el Q₉, su homólogo predominante en ratas y ratones [295]. No obstante, y debido al acusado incremento de los niveles de Q₁₀, los niveles de Q total se incrementaron de forma estadísticamente significativamente en presencia de cualquiera de las dos concentraciones de Q₁₀ suministradas.

4. Resultados

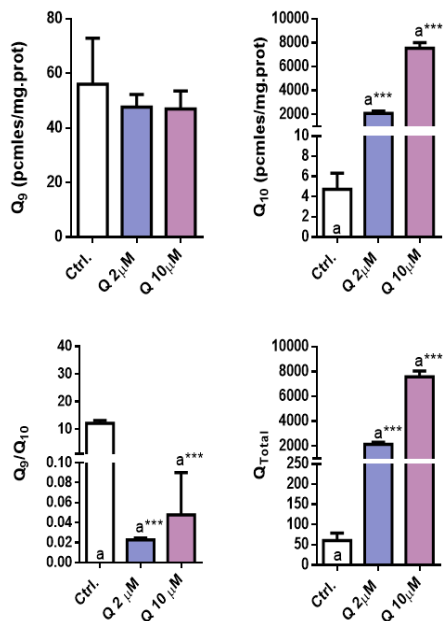


Figura Tk-1: Niveles Q₉, Q₁₀, ratio Q₉/Q₁₀ y Q total. Efecto del tratamiento con suplementos de Q₁₀ a 2 y 10 μM. Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero. Los datos representados son los valores medios ± SEM de 3 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones experimentales se atribuye la letra “a” a la condición control y cuando esta aparece sobre las otras columnas acompañada de asteriscos (***) (p < 0.001) indica las diferencias existentes entre el control y los suplementos de Q₁₀.

4.1.1. Alteraciones en la cadena de transporte electrónico en respuesta al tratamiento con kaemperol, pHB y suplemento exógeno de Q₁₀

Dada la estrecha relación existente entre el coenzima Q y la mitocondria [117, 296], se llevaron a cabo determinaciones de la expresión de subunidades de la cadena de transporte electrónico (CTE) con el fin de determinar si el aumento en los niveles Q que producen los tratamientos con K y pHB, así como el suplemento con Q₁₀ exógeno, tuvo algún efecto a este nivel. En la figura Tk-2 se representan los niveles de expresión de subunidades de cada uno de los complejos de la CTE de células sometidas a los diferentes tratamientos. Como puede observarse, los niveles de expresión de subunidades de los complejos I, II y III (figuras Tk-2A-C) se incrementaron de manera significativa en respuesta al tratamiento con K y pHB, mientras que el complejo IV no experimentó modificaciones en sus niveles ante estos tratamientos (figura Tk-2D). Por su parte, los niveles de la subunidad del complejo V sólo tendieron a incrementarse de manera significativa en presencia del tratamiento con pHB (figura Tk-2E). En el caso del complejo I se observó una leve tendencia al incremento de la expresión en presencia de PABA, mientras que no se produjo modificación alguna a este nivel como respuesta a los tratamientos combinados. La expresión del complejo II por su parte, experimentó una bajada muy acusada en sus niveles en presencia del tratamiento con intervenciones combinadas. Analizando los resultados obtenidos en los niveles del complejo III, se observó un descenso significativo en presencia del tratamiento simple con PABA con

4. Resultados

respecto a las condiciones control. Además, dicho descenso no fue revertido en presencia de los tratamientos combinados con K y pHB, alcanzándose niveles de esta proteína inferiores a los observados con sus respectivos tratamientos simples (figuraTk-2C).

4. Resultados

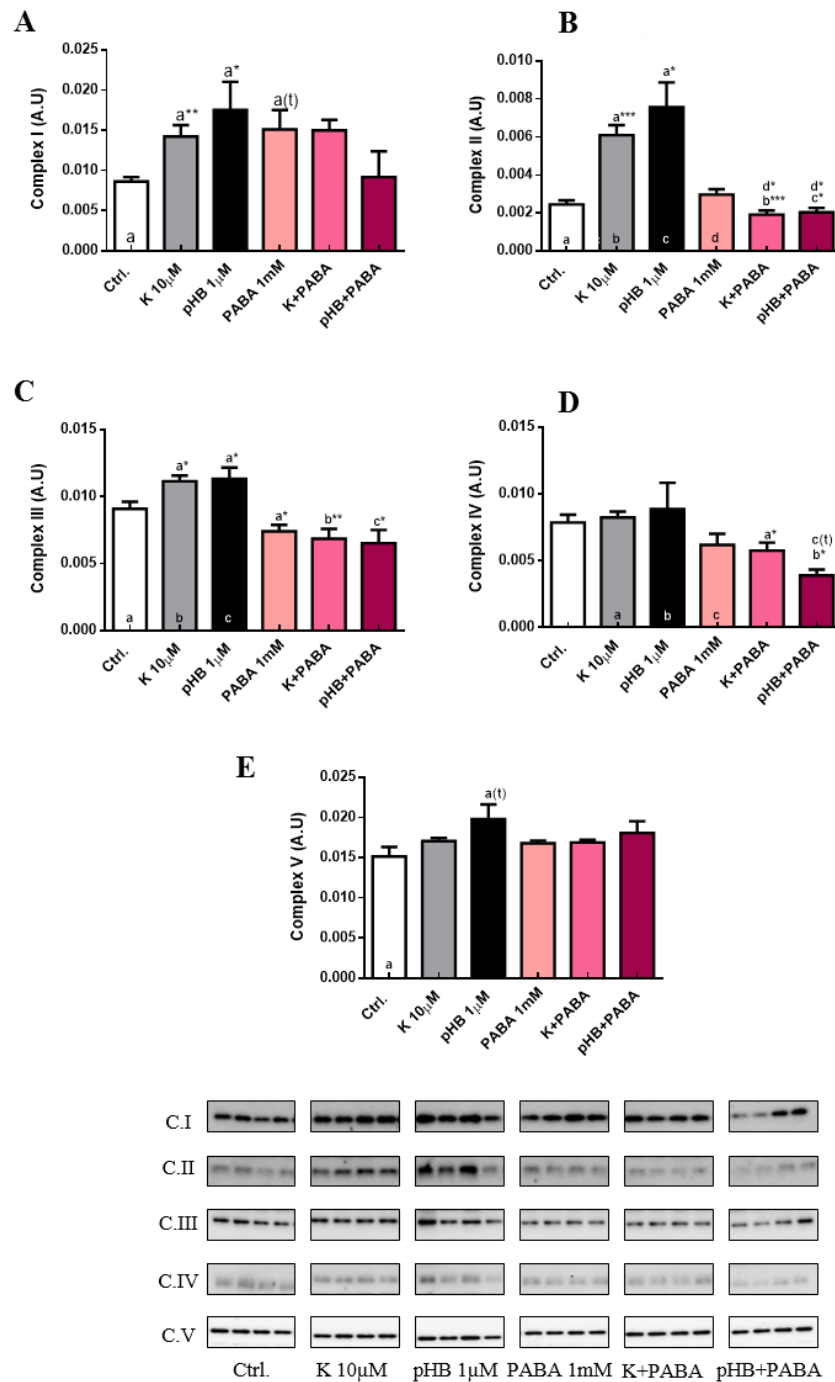


Figura Tk-2: Niveles de subunidades marcadoras de complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol (K) y ácido *p*-hidroxibenzoico (pHB) e inhibidor, ácido *p*-aminobenzoico (PABA), de la síntesis endógena de Q sobre los niveles de expresión de subunidades de los complejos de la CTE I (A), II (B), III (C), IV (D) y V (E). Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones experimentales se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (*($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y ***($p < 0.001$)) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

4. Resultados

Una vez determinado el posible papel de los precursores de Q a nivel de los complejos de la CTE, se llevaron a cabo experimentos con suplementos de Q₁₀ exógeno. Esto se hizo con el propósito de profundizar en el efecto real del coenzima Q a este nivel, ya que los otros dos compuestos utilizados, K y pHB podrían actuar a nivel de otras dianas celulares, enmascarando su implicación a nivel de las subunidades de los complejos de la CTE. Además, se utilizaron dos concentraciones diferentes de suplemento, una a 2 μM y otra a 10 μM para estudiar si los posibles efectos eran también dosis-dependientes.

En la figura Tk-3 y Tk-4 se representan los niveles de las distintas subunidades de los complejos mitocondriales en células TKPTS tratadas con Q₁₀ exógeno a 2 y 10 μM respectivamente. Como puede observarse, la respuesta en la expresión de los complejos mitocondriales siguió una tendencia muy constante en función de los tratamientos suministrados y con independencia del complejo del que se trate. Cuando el suplemento de Q₁₀ fue de 2 μM observamos que no se produjeron cambios en la expresión de los distintos complejos con respecto a las condiciones control; no obstante, sí que se observó que en presencia del tratamiento combinado PABA+Q los complejos III y IV disminuyeron significativamente con respecto al tratamiento simple sólo con Q₁₀ (figura Tk-3C y E). Por otro lado, el suplemento con Q₁₀ a 10 μM fue capaz de aumentar de manera significativa los niveles de todos los complejos, exceptuando el V (Tk-4A-E). Nuevamente, el tratamiento combinado con PABA+Q disminuyó los niveles de expresión de todas las proteínas con respecto a aquellas células tratadas con sólo con Q₁₀, alcanzando, en la mayoría de los casos, valores similares a los obtenidos en condiciones control.

Dado que la respuesta más significativa a nivel de complejos mitocondriales se observó cuando el suplemento de Q₁₀ fue 10 μM, los experimentos consecutivos fueron realizados con esta concentración.

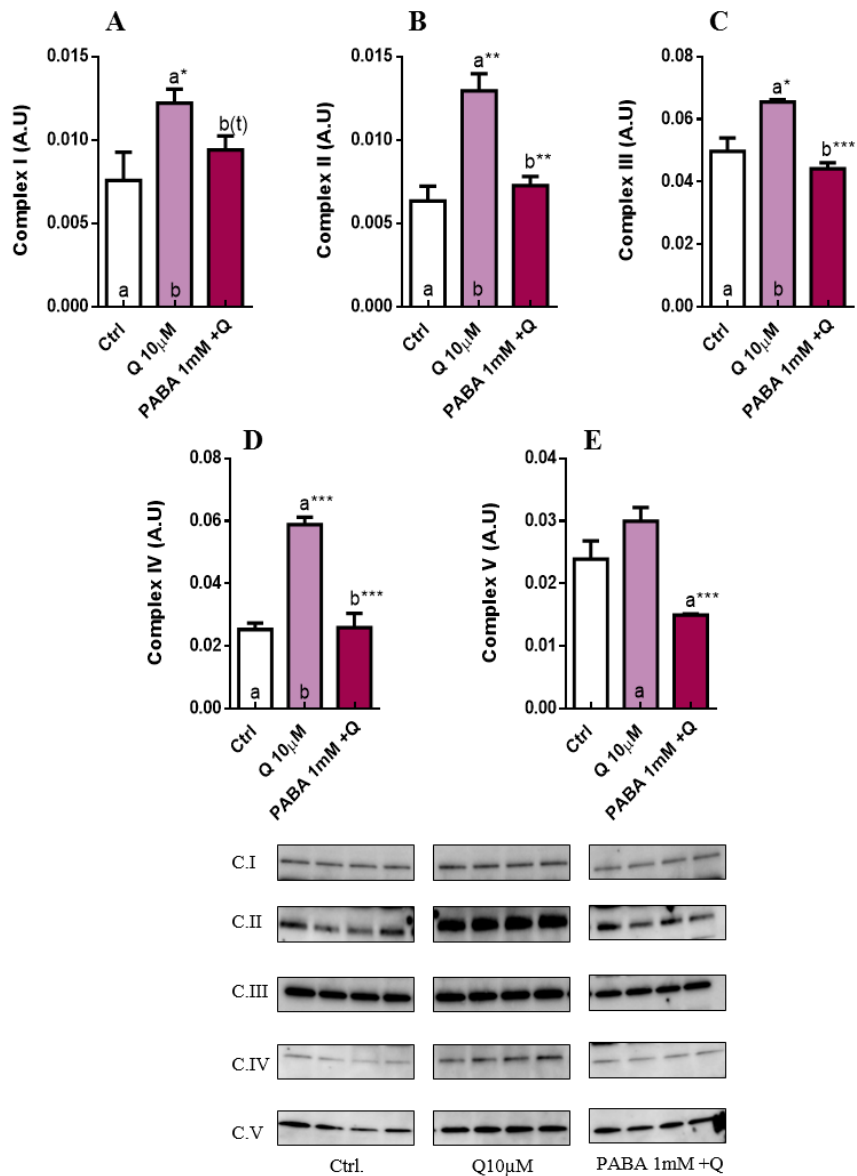


Figura Tk-3: Niveles de subunidades marcadoras de complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en extractos totales de células Tkpts. Efecto del suplemento con Q₁₀ exógeno a 2 µM y del tratamiento combinado con el inhibidor de su síntesis endógena ácido *p*-aminobenzoico (PABA) sobre los niveles de expresión de subunidades de los complejos de la CTE, I (A), II (B), III (C), IV (D) y V (E). Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios ± SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones experimentales se atribuye la letra “a” al tratamiento con Q₁₀ 2µM, mientras que cuando ésta aparece sobre la columna de PABA+Q acompañada de asteriscos (* (p<0.05) y ** (p<0.01)) indicó las diferencias existentes entre el tratamiento simple y el combinado.

4. Resultados

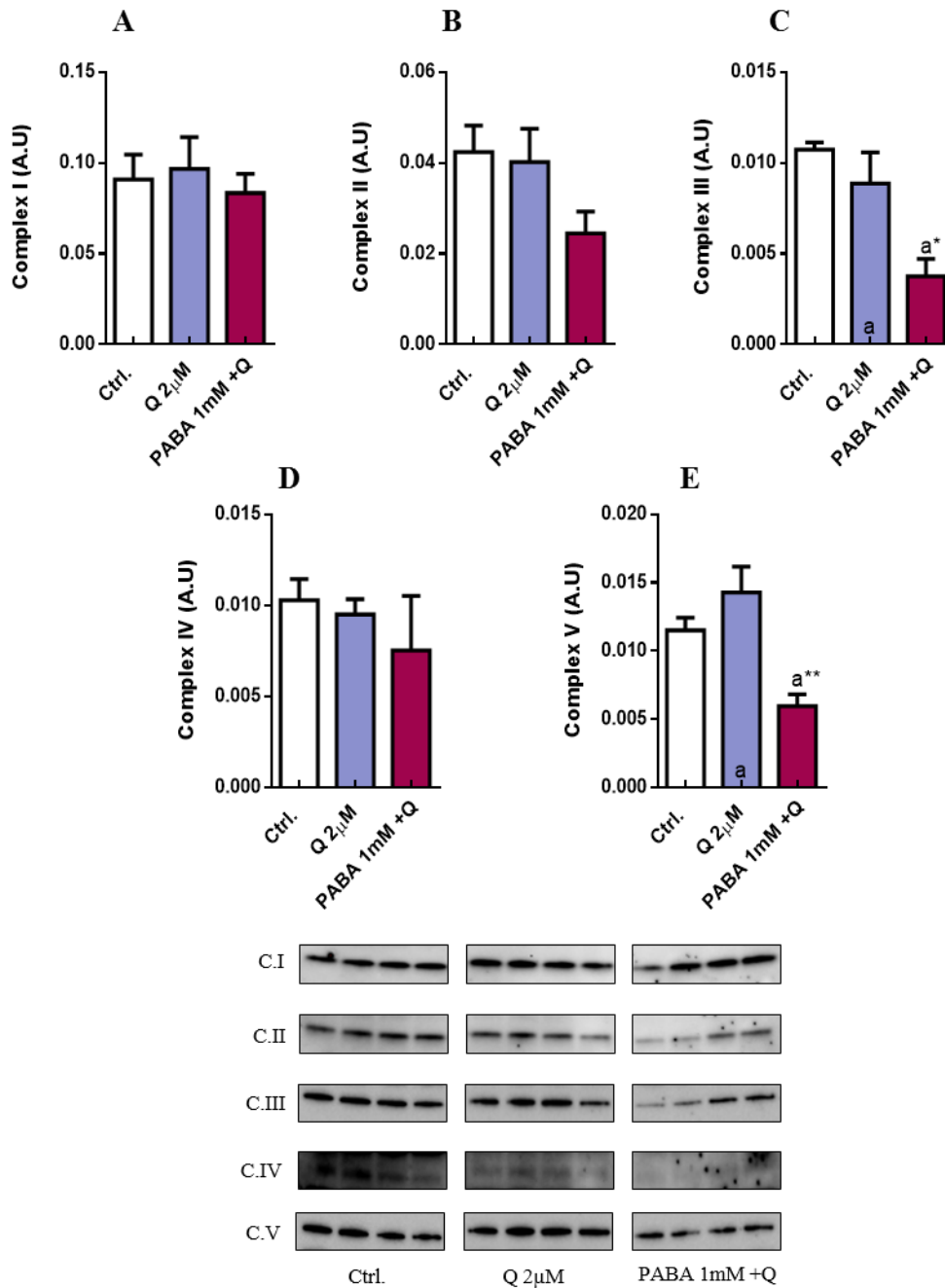


Figura Tk-4: Niveles de subunidades marcadoras de complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en extractos totales de células Tkpts. Efecto del suplemento con Q₁₀ exógeno a 10 μ M y del tratamiento combinado con el inhibidor de su síntesis endógena ácido *p*-aminobenzoico (PABA) sobre los niveles de expresión de subunidades de los complejos de la CTE, I (A), II (B), III (C), IV (D) y V (E). Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones experimentales se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (* ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$)) o la letra t (($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

4.1.2. Modificaciones en el consumo de O₂ y la capacidad respiratoria y glucolítica celular

Ya que se observaron cambios en los niveles de subunidades de los complejos de la CTE en respuesta a los diferentes tratamientos, nuestro siguiente objetivo fue determinar si estos cambios eran capaces de provocar alteraciones en la bioenergética celular.

Para ello se llevaron a cabo determinaciones de consumo de oxígeno (OCR) y acidificación del medio (ECAR, que puede ser indicativa de la capacidad glucolítica celular[297]) en un analizador Seahorse XFe24 utilizando el kit Phenotype test, cuyo fundamento se desarrolló en el apartado 3.9 del Material y Métodos.

En la figura Tk-5, se muestran los niveles de OCR y ECAR de células tratadas con suplemento de Q₁₀ 10 μM y PABA tanto en condiciones basales como en condiciones de estrés, que son inducidas tras el tratamiento con oligomicina y FCCP. Los resultados muestran que el tratamiento con PABA disminuyó significativamente el consumo de O₂ con respecto a las condiciones control, revirtiéndose éste en presencia del tratamiento combinado PABA+Q (figura Tk-5A). En condiciones de estrés se vuelve a observar la misma respuesta que la obtenida en condiciones basales (figura Tk-5C). Por su parte los niveles de ECAR no variaron bajo ninguna condición experimental, ni en condiciones basales ni en condiciones de estrés (figura Tk-5B y 5D).

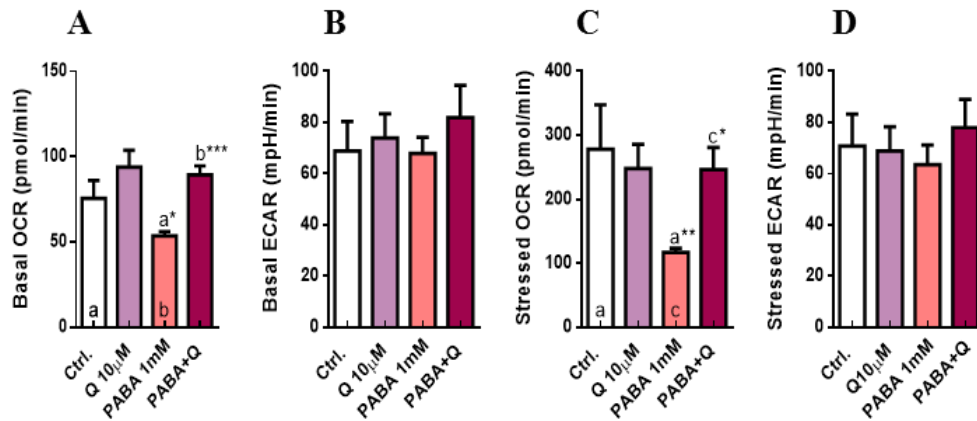


Figura Tk-5: Niveles de OCR y ECAR en células Tkpts. Efecto del tratamiento con Q₁₀ exógeno y ácido *p*-aminobenzoico (PABA) sobre la ratio de consumo de O₂ (OCR) en condiciones basales (A) y estresantes (C) y sobre la ratio de acidificación extracelular (ECAR) en condiciones basales (B) y de estrés (D). Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos. Los datos representados son los valores medios ± SEM de 5 réplicas de cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones experimentales se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (* (p < 0.05) y ** (p < 0.01)) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

Por su parte, el tratamiento con pHB reprodujo en parte los efectos producidos por el suplemento con Q₁₀ (figura Tk-6). En condiciones basales, el consumo de oxígeno disminuyó significativamente en presencia de PABA, mientras que el tratamiento combinado con pHB+PABA disminuyó también de forma muy acusada el OCR con respecto al alcanzado en células tratadas sólo con pHB (figura Tk-6A). En condiciones estresantes el consumo de oxígeno disminuyó nuevamente en presencia de PABA, disminución que no fue revertida en presencia del tratamiento combinado pHB+PABA (figura Tk-6C). Por su parte el ECAR no se vio alterado en respuesta a ninguno de los tratamientos y bajo ninguna de las condiciones de ensayo (figura Tk-6B y 6D).

4. Resultados

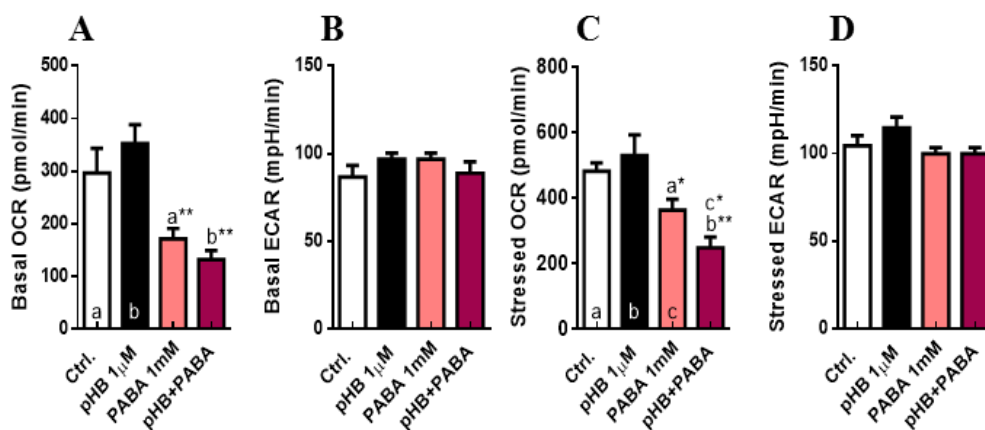


Figura Tk-6: Niveles de OCR y ECAR en células Tkpts. Efecto del tratamiento con ácido *p*-hidroxibenzoico (pHB) y ácido *p*-aminobenzoico (PABA) sobre la ratio de consumo de O₂ (OCR) en condiciones basales (A) y estresantes (C) y sobre la ratio de acidificación extracelular (ECAR) en condiciones basales (B) y de estrés (D). Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos. Los datos representados son los valores medios ± SEM de 5 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones experimentales se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (* (p < 0.05) y ** (p < 0.01)) o la letra t ((p < 0.05) utilizando un test estadístico de una cola) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

Por último, el tratamiento con K produjo unos efectos diferentes a los observados con los dos tratamientos anteriores (figura Tk-7). En presencia de este tratamiento el consumo de oxígeno disminuyó significativamente con respecto al control. Estos niveles decayeron aún más con PABA, mientras que el tratamiento combinado provocó una bajada significativa de este parámetro con respecto a las células tratadas sólo con K (figura Tk-7A). En condiciones de estrés se reproducen los efectos de los distintos tratamientos sobre el OCR, produciéndose además una bajada del consumo de O₂ en presencia del tratamiento combinado (K+PABA) con respecto al simple con K (figura Tk-7C). Por otra parte, el ECAR tendió a disminuir en presencia de K en condiciones basales, mientras que el tratamiento combinado produjo una menor acidificación del medio que la alcanzada con el tratamiento con PABA. En condiciones estresantes se produjo la misma respuesta generada por cada tratamiento, observándose además una disminución del ECAR con K+PABA si se compara con el tratamiento simple con K (figura Tk-7B y 7D).

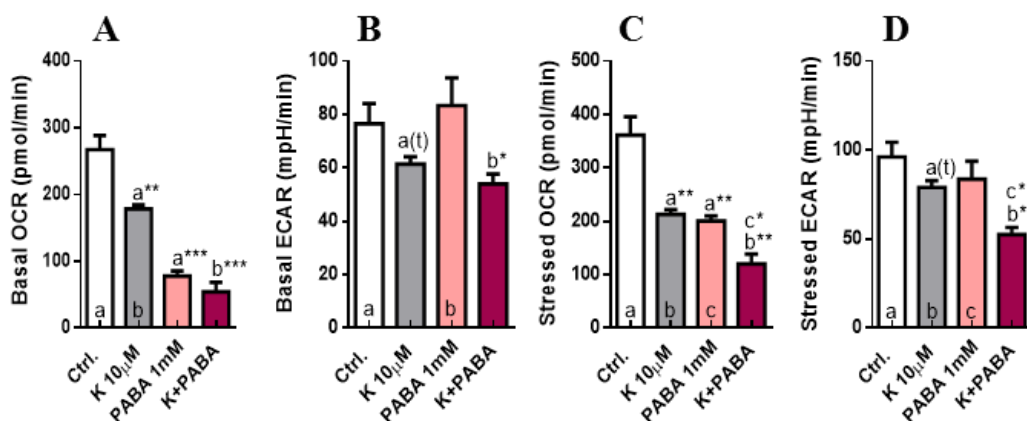


Figura Tk-7: Niveles de OCR y ECAR en células Tkpts. Efecto del tratamiento con kaempferol (K) y ácido *p*-aminobenzoico (PABA) sobre la ratio de consumo de O₂ (OCR) en condiciones basales (A) y estresantes (C) y sobre la ratio de acidificación extracelular (ECAR) en condiciones basales (B) y de estrés (D). Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos. Los datos representados son los valores medios \pm de 5 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones experimentales se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (* ($p < 0.05$) y ** ($p < 0.01$)) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

4.1.3. Alteraciones de la fisiología mitocondrial y daño oxidativo en respuesta al tratamiento con kaempferol y pHB

Dados los cambios observados en cuanto a niveles de subunidades de los complejos de la CTE, así como en las ratios de consumo de oxígeno (OCAR) y acidificación del medio (ECAR) se llevaron a cabo determinaciones de producción de ROS a nivel mitocondrial, potencial de membrana ($\Delta\Psi$) y daño oxidativo a proteínas con los diferentes tratamientos precursores de Q, K y pHB.

En la figura Tk-8A se representan los niveles de superóxido (O₂⁻) mitocondrial en respuesta a los diferentes tratamientos. Se observó como el tratamiento con K fue capaz de disminuir significativamente la producción de O₂⁻ con respecto a las condiciones control, mientras que con el tratamiento con pHB estos niveles permanecieron invariables. Por su parte el tratamiento con PABA supuso un incremento muy significativo en la generación de O₂⁻, niveles que se mantuvieron igualmente elevados en presencia de los tratamientos combinados, tanto con K como con pHB.

Por otra parte, los resultados de potencial mitocondrial (Figura Tk-8B) mostraron que ninguno de los tratamientos simples fue capaz de alterar dicho potencial, con

4. Resultados

excepción del PABA, que sí que tendió a disminuirlo. La disminución en estos niveles tendió a revertirse de forma ligera en presencia del tratamiento combinado con K+PABA, mientras el potencial mitocondrial tendió a disminuir con el suplemento de pHB+PABA con respecto a las células tratadas con el tratamiento simple con pHB. No obstante, los cambios observados en este parámetro en respuesta a los distintos tratamientos fueron de poca magnitud.

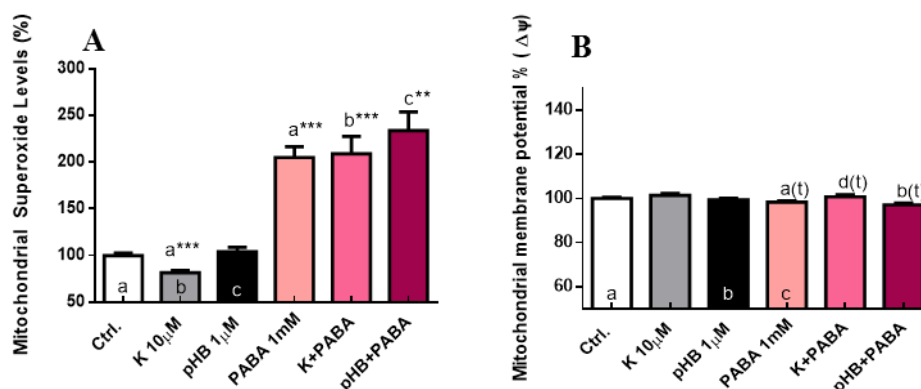


Figura Tk-8. Niveles de superóxido mitocondrial y potencial de membrana ($\Delta\Psi$) en células Tkpts. Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol (K) y ácido *p*-hidroxibenzoico (pHB) e inhibidor, ácido *p*-aminobenzoico (PABA), de la síntesis endógena de Q sobre la generación de superóxido mitocondrial (A) y el potencial de membrana ($\Delta\Psi$) (B). Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos. Los valores representados son los correspondientes al porcentaje de las medianas \pm SEM de la señal fluorescente en el caso de la figura A, y al porcentaje de la ratio FL3/FL1 de las medianas \pm SEM de la señal fluorescente en el caso de la figura B, de al menos 3 experimentos independientes. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones experimentales se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (** ($p < 0.01$ y *** $p < 0.001$)) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

Ya que el tratamiento con K produjo una disminución en los niveles de $O_2^{\cdot -}$ mitocondrial, llevamos a cabo medidas del grado de oxidación de proteínas. Dicha determinación se llevó a cabo con el fin de observar si la ventaja antioxidante que produce el tratamiento se traducía en menor daño oxidativo a nivel de proteína. Para ello se utilizó el kit Oxyblot, cuyo fundamento se expuso en el apartado 3.8.2 del Material y Métodos, detectándose mediante western blot la presencia de grupos carbonilo en las proteínas con los diferentes tratamientos.

La figura Tk-9 muestra que ninguno de los tratamientos simples produjo modificaciones en el daño oxidativo de proteínas, ya que no se observaron diferencias con respecto a las condiciones control. Sólo aparecieron diferencias en presencia del

4. Resultados

tratamiento combinado con pHB+PABA, donde sí se observó un incremento en los niveles de oxidación con respecto a las condiciones PABA y una tendencia al incremento con respecto al tratamiento con pHB.

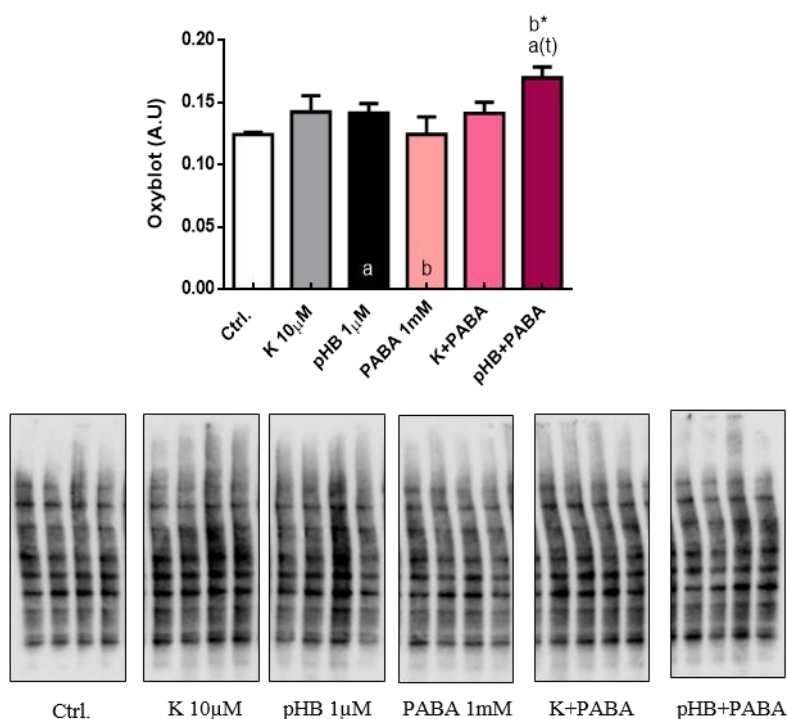


Figura Tk-9. Grado de oxidación de proteínas en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol (K) y ácido *p*-hidroxibenzoico (pHB) e inhibidor, ácido *p*-aminobenzoico (PABA), de la síntesis endógena de Q sobre el grado de oxidación de proteínas. Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones experimentales se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos ($*p < 0.05$) o la letra t ($t(p < 0.05)$) utilizando un test estadístico de una cola) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

A la luz de estos resultados, podemos concluir que ni el tratamiento con K, ni el tratamiento con pHB son capaces de producir modificaciones a nivel del daño oxidativo en proteínas.

No obstante, y para confirmar estos resultados se llevó a cabo un aislamiento de la fracción mitocondrial de células sometidas a estos mismos tratamientos y se determinaron nuevamente los niveles de oxidación de proteínas de dicha fracción. Esta aproximación experimental se llevó a cabo debido a que las mejoras que producen estos compuestos parecen operara nivel mitocondrial. De esta manera, comprobaríamos si

realmente no se producían modificaciones en el “oxi-proteoma” en respuesta a los mismos o, por el contrario, sí que se producen pero sólo a nivel mitocondrial.

Tal y como se muestra en la figura Tk-10, no se produjo modificación alguna en los grupos carbonilos de las proteínas mitocondriales en respuesta a los tratamientos con precursores de Q, K o pHB.

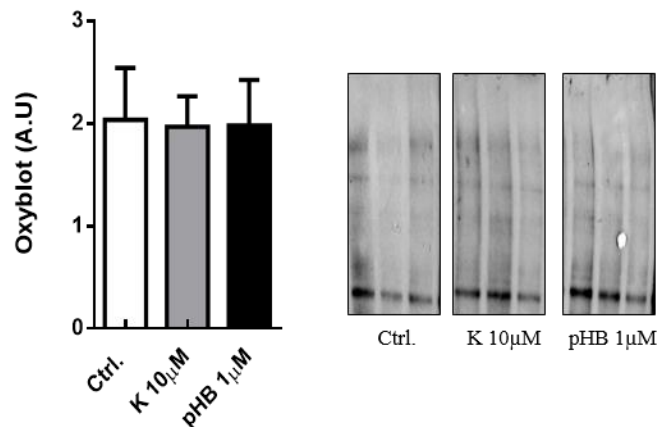


Figura Tk-10. Grado de oxidación de proteínas en extractos mitocondriales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con los precursores de la síntesis de Q, kaempferol (K) y ácido *p*-hidroxibenzoico (pHB), sobre el grado de oxidación de proteínas mitocondriales. Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 3 réplicas para cada condición experimental.

4.1.4. Posible papel de la sirtuina mitocondrial 3 (Sirt3) en los efectos mediados por kaempferol

Ha sido descrito que, además de incrementar los niveles de Q en la línea celular Tkpts, el tratamiento con kaempferol (K) es también capaz de incrementar la expresión de la sirtuina mitocondrial 3 (Sirt3) en esta misma línea celular, hecho que ha sido constatado en otros modelos [107, 134, 298]. El incremento en los niveles de esta proteína ha sido relacionado con una mejora en los procesos redox [299], y es por ello que en el presente estudio se pretende determinar si una activación de Sirt3 inducida por el tratamiento con K, podría mediar algún tipo de respuesta relacionada con la generación de especies reactivas de oxígeno y masa mitocondrial en esta línea celular.

Para discernir entre los posibles efectos mediados por la actuación de sirtuínas y aquellos que son independientes de la misma, las células fueron tratadas con K tanto en presencia como en ausencia de nicotinamida (NAM), sustancia que actúa como inhibidora de la actividad desacetilasa de las sirtuínas [109]. En primer lugar, y para

4. Resultados

confirmar realmente que en nuestras condiciones experimentales NAM a 10 mM actúa como inhibidor de la actividad de las sirtuínas, se estudió el patrón global de acetilación de las proteínas celulares en las distintas condiciones experimentales, utilizando para ello un anticuerpo anti-lisina acetilada.

En la figura Tk-11 se muestra que, efectivamente, el nivel de acetilación de proteínas se incrementa de manera muy significativa en presencia de NAM 10mM. Por lo tanto, para los experimentos sucesivos este compuesto fue utilizado con el fin de discernir entre efectos dependientes o independientes de la actividad de la actividad de sirtuínas.

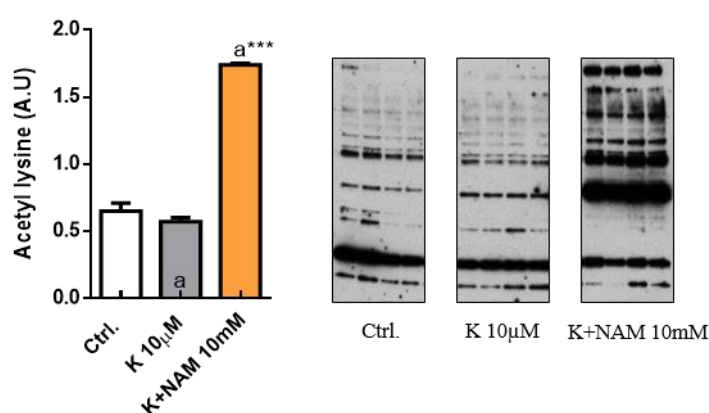


Figura Tk-11: Patrón de acetilación de proteínas en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento simple con kaempferol (K) y combinado con kaempferol y nicotinamida (NAM) sobre el patrón de proteínas acetiladas. Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son las medias \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones experimentales se atribuye la letra “a” al tratamiento con K, mientras que cuando esta letra apareció sobre la columna de K+NAM acompañada de asteriscos (***) $p < 0.001$ indicó las diferencias existentes entre el tratamiento simple y combinado.

4.1.5. Posible papel de Sirt3 en el efecto del kaempferol sobre la generación de especies reactivas de oxígeno

Como se indicó en el apartado 4.1.3 del presente capítulo de Resultados, el tratamiento con K indujo una disminución de los niveles de $O_2^{\cdot -}$ mitocondrial. Quisimos, por tanto, investigar la posible participación de la activación de las sirtuínas en este efecto antioxidante del K. Para ello, procedimos a comprobar el efecto del inhibidor de la actividad desacetilasa de las sirtuínas (NAM) sobre los niveles de peróxidos intracelulares (determinados con la sonda fluorescente

4. Resultados

diclorodihidrofluoresceína diacetato, DCDHF-DA), $O_2^{\cdot-}$ intracelular (determinado con la sonda hidroetidina, Het) y $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial (determinado con la sonda MitoSOX) en células tratadas con K. En todos los casos, las medidas se realizaron mediante citometría de flujo.

Tal y como se muestra en la figura Tk-12A, los niveles de peróxido intracelular permanecen invariables frente a todas las condiciones experimentales. Ocurre de la misma manera con los niveles de $O_2^{\cdot-}$ (figura Tk-12B), que no varían en respuesta al tratamiento simple con K o al tratamiento combinado con K+NAM.

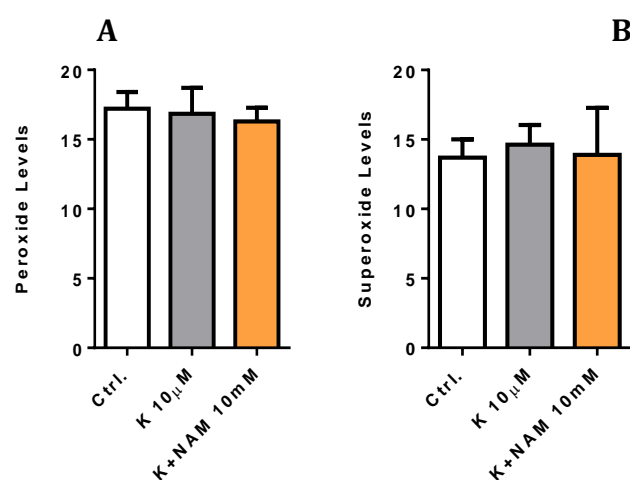


Figura Tk-12. Niveles de peróxido y superóxido intracelulares en células Tkpts. Efecto del tratamiento simple con kaempferol (K) y combinado con kaempferol y nicotinamida (NAM) sobre la producción de peróxido (A) y superóxido (B) a nivel intracelular. Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos. Los valores representados son los correspondientes a la mediana \pm SEM de la señal fluorescente de 5 réplicas para cada condición experimental.

En cuanto a los niveles de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial, los resultados muestran que el tratamiento con K produce, nuevamente, una disminución significativa en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial con respecto a los detectados en las condiciones control. Por el contrario, el tratamiento combinado K+NAM tendió a incrementar la producción de $O_2^{\cdot-}$ con respecto al tratamiento simple con K (Figura Tk-13).

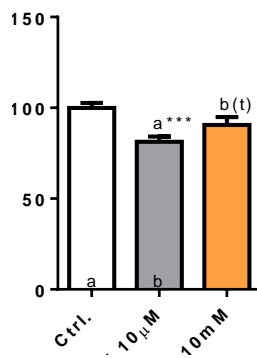


Figura Tk-13. Niveles de superóxido mitocondrial en células Tkpts. Efecto del tratamiento simple con kaempferol (K) y combinado con kaempferol y nicotinamida (NAM) sobre la producción de superóxido mitocondrial. Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos. Los valores representados son los correspondientes al porcentaje de las medianas \pm SEM de la señal fluorescente de al menos 3 experimentos independientes. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones experimentales se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando éstas aparecen sobre columnas acompañadas de asteriscos (***) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola) indican diferencias significativas entre esa condición experimental y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

4.1.6. Implicación de Sirt3 en las alteraciones de la masa mitocondrial en respuesta al tratamiento con kaempferol

Con el fin de determinar si el tratamiento con K producía algún tipo de modificación en el contenido mitocondrial de estas células y el posible papel de Sirt3 en esas alteraciones, se llevaron a cabo distintas técnicas de cuantificación de la masa mitocondrial en células tratadas con K en presencia o en ausencia de NAM.

En primer lugar, se realizaron determinaciones de los niveles de distintas proteínas marcadoras de membrana mitocondrial, tanto externa (la porina VDAC) como interna (subunidad alfa del complejo V). En la figura Tk-14A se muestran los niveles de VDAC en respuesta a los distintos tratamientos. Observamos cómo se produjo una leve tendencia al incremento de los niveles de expresión de esta proteína en respuesta al tratamiento con K con respecto a células no tratadas. Por otra parte, no se observaron modificaciones de este marcador en respuesta al tratamiento combinado.

Por su parte, los niveles de la subunidad alfa del complejo V tampoco mostraron ninguna modificación significativa con respecto a las condiciones control (figura Tk-14B).

4. Resultados

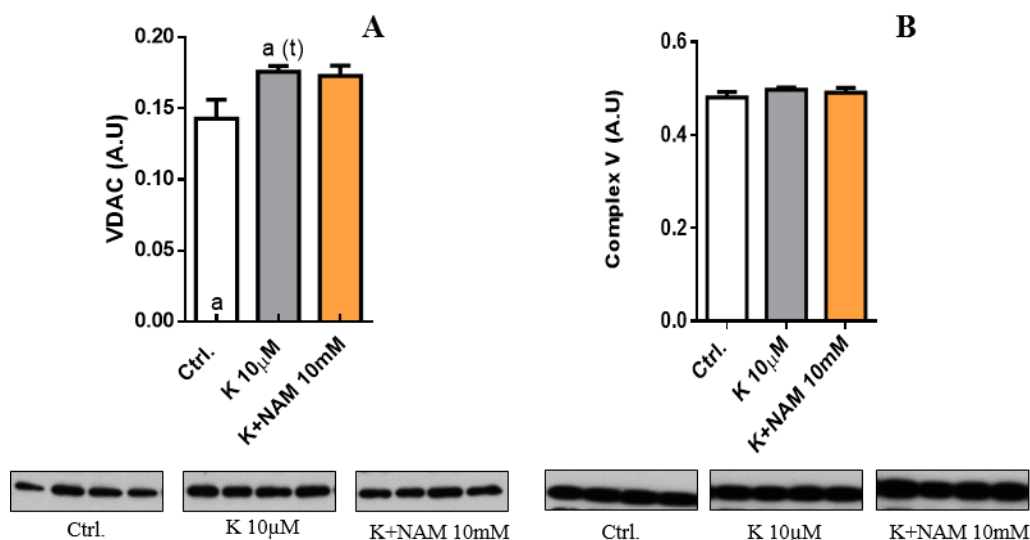


Figura Tk-14. Niveles de VDAC y Complejo V en extractos totales de células Tkpts Efecto del tratamiento simple con kaempferol (K) y combinado con kaempferol y nicotinamida (NAM) sobre marcadores de membrana mitocondrial externa, VDAC (A), e interna, Complejo V (B). Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones experimentales se atribuye la letra “a” a la condición control, mientras que cuando esta letra aparece sobre la columna de K acompañada de la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola) indicó las diferencias existentes entre el control y este tratamiento.

Como los resultados con los distintos marcadores de membrana no fueron concluyentes, se llevó a cabo la determinación de la cantidad de mitocondrias mediante citometría de flujo y la sonda MitoTracker[®]Green FM. Tal y como se observa en la figura Tk-15, no se produjo modificación alguna en la cantidad de mitocondrias de las células Tkpts ante ninguno de los tratamientos, ya fuera simple o combinado.

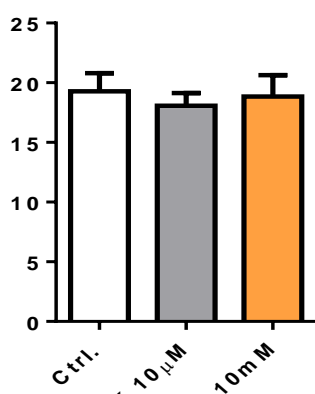


Figura Tk-15. Niveles de masa mitocondrial. Efecto del tratamiento simple con kaempferol (K) y combinado con kaempferol y nicotinamida (NAM) sobre el potencial mitocondrial. Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos. Los valores representados son los correspondientes a la mediana \pm SEM de la señal fluorescente de 6 réplicas para cada condición experimental.

Una vez observado el discreto efecto que produce la inhibición de las sirtuínas en los parámetros determinados, decidimos no continuar con la experimentación en este

sentido, centrándonos en el incremento de los niveles de Q promovidos por los distintos precursores y suplementos externos, y su implicación en la dinámica mitocondrial y la ruta autofágica.

4.1.7. Niveles de Q y dinámica mitocondrial

La estructura de la mitocondria no es estática, sino que está sujeta a modulación de sus propiedades dinámicas sometiéndose a procesos de fusión/fisión. La fusión se encuentra mediada principalmente por las mitofusinas Mfn1/Mfn2 y la proteína OPA1, mientras que la fisión está regulada por Drp1 y proteínas adaptadoras como Fis1 [251, 252].

Para investigar si los tratamientos que modifican los niveles de Q inducen modificaciones en la dinámica mitocondrial, se determinaron marcadores de fisión (Drp1 y Fis1) y fusión mitocondrial (Mfn1, Mfn2 y OPA1). Comenzando por los marcadores de fisión, en la figura Tk-16 se muestran los niveles de la proteína Drp1. En este caso se observa un aumento significativo en la expresión de esta proteína en presencia de K, pHB y PABA en comparación con los niveles basales. No obstante, no se produce ninguna alteración añadida en los niveles de la proteína en los tratamientos combinados.

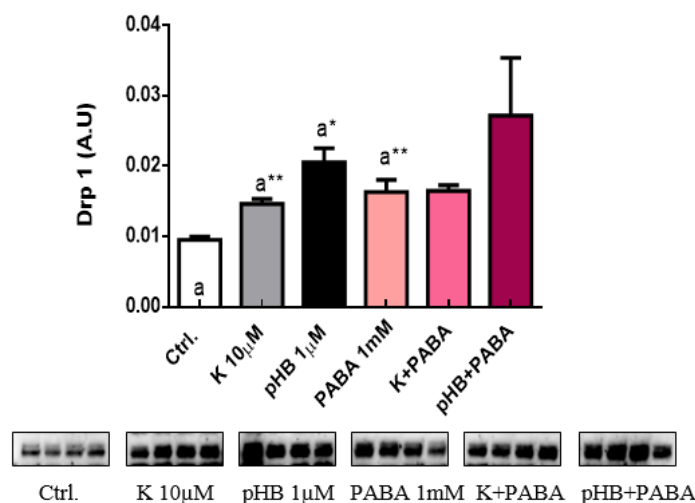


Figura Tk-16: Niveles de Drp 1 en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol (K) y ácido *p*-hidroxibenzoico (pHB) e inhibidor, ácido *p*-aminobenzoico (PABA), de la síntesis endógena de Q sobre los niveles de expresión de Drp 1. Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas de cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre tratamientos se atribuye la letra “a” a la condición control y cuando ésta aparece sobre las otras columnas acompañada de asteriscos (* $(p < 0.05)$ y ** $(p < 0.01)$), indicó las diferencias existentes entre el control y los tratamientos correspondientes.

4. Resultados

El otro marcador de fisión cuyos niveles se determinaron fue Fis1 (Figura Tk-17). La expresión de esta proteína tendió a aumentar en presencia de pHB, mientras que no se observaron cambios con el resto de los tratamientos comparando éstos con las condiciones control. Por su parte el aumento observado con pHB tiende a ser revertido en el tratamiento combinado pHB+PABA.

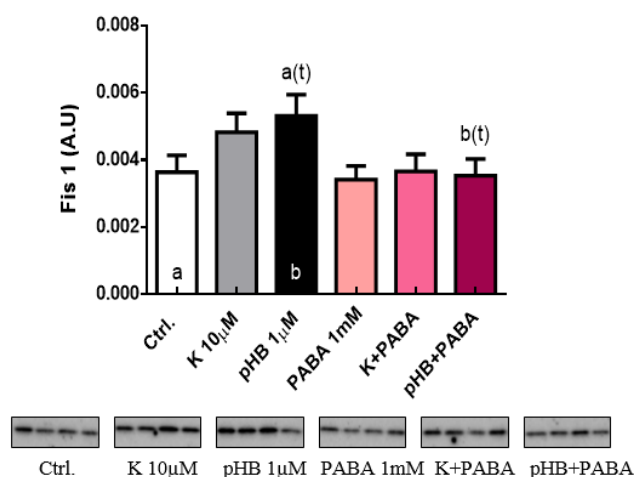


Figura Tk-17: Niveles de Fis 1 en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol (K) y ácido *p*-hidroxibenzoico (pHB) e inhibidor, ácido *p*-aminobenzoico (PABA), de la síntesis endógena de Q sobre los niveles de expresión de Fis 1. Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

En cuanto a los marcadores de fusión mitocondrial, en la figuraTk-18 se muestran los niveles de expresión de la proteína Mfn1. En este caso se observó un descenso significativo en los niveles de este marcador en presencia de K con respecto a las células no tratadas, ocurriendo de la misma manera con el tratamiento con pHB. Por su parte, ambos tratamientos combinados tienden a incrementar los niveles de Mfn1 de manera muy significativa en comparación con sus respectivos tratamientos simples en ausencia de PABA.

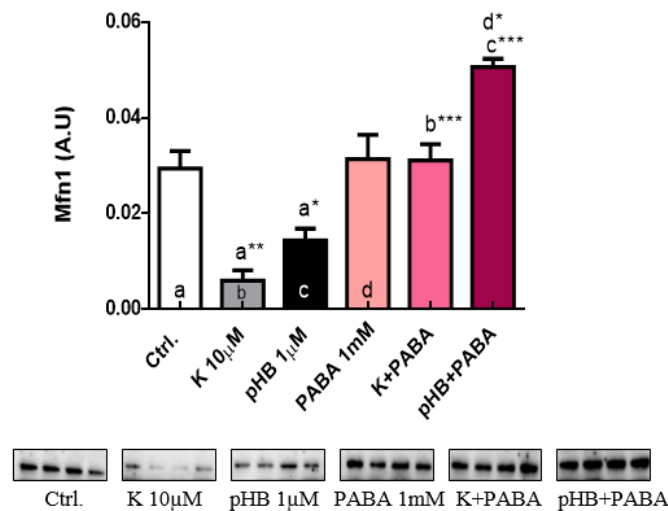


Figura Tk-18: Niveles de Mfn1 en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol (K) y ácido *p*-hidroxibenzoico (pHB) e inhibidor, ácido *p*-aminobenzoico (PABA), de la síntesis endógena de Q sobre los niveles de expresión de Mfn1. Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (**($p < 0.01$) y ***($p < 0.001$)) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

Los niveles de la otra mitofusina mitocondrial, Mfn2, se muestran en la figura Tk-19. En ella observamos cómo, nuevamente, el tratamiento con K fue capaz de disminuir los niveles de expresión esta proteína con respecto al control, como ya hiciera con Mfn1. Por su parte, el tratamiento con pHB en este caso no produjo efecto alguno; mientras que en células tratadas con PABA se observó una tendencia al incremento en los niveles de esta proteína. El tratamiento combinado con K+PABA incrementó Mfn2 con respecto al tratamiento con kaempferol, mientras que tendió a disminuir los niveles si se comparan éstos con los alcanzados en el tratamiento con PABA. Finalmente, en células tratadas con pHB+PABA, los niveles de Mfn2 cayeron drásticamente en comparación con los obtenidos en presencia de pHB y PABA suministrados de manera única.

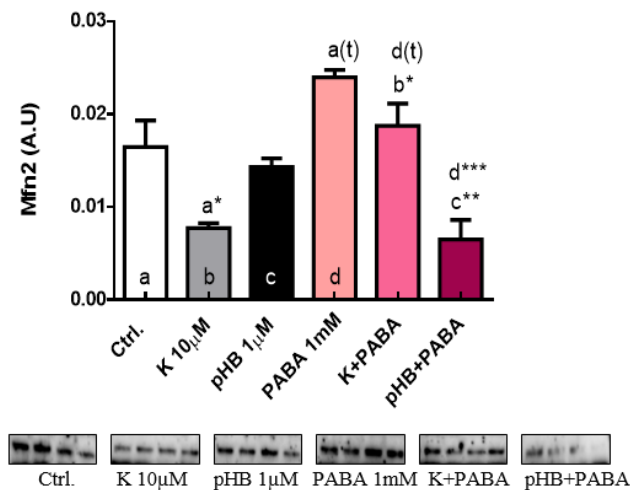


Figura Tk-19: Niveles de Mfn2 en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol (K) y ácido *p*-hidroxibenzoico (pHB) e inhibidor, ácido *p*-aminobenzoico (PABA), de la síntesis endógena de Q sobre los niveles de expresión de Mfn2. Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (*($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$)) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

Finalmente, para concluir con los marcadores de fusión mitocondrial, se analizaron los niveles de OPA1. En la figura Tk-20 podemos observar que se produjo un aumento significativo en los niveles de esta proteína en todas las condiciones experimentales con respecto a la condición control. Cabe destacar que las células sometidas a tratamientos combinados fueron las que experimentaron un incremento más llamativo en los niveles de OPA1, comparando éstos con sus correspondientes tratamientos simples (K, pHB y PABA).

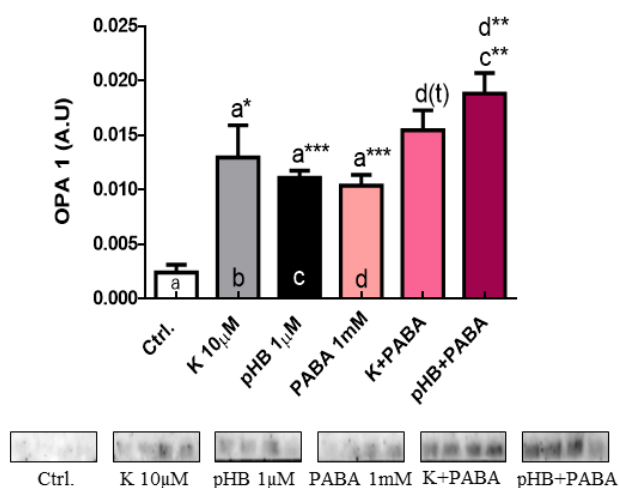


Figura Tk-20: Niveles de OPA1 en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol (K) y ácido *p*-hidroxibenzoico (pHB) e inhibidor, ácido *p*-aminobenzoico (PABA), de la síntesis endógena de Q sobre los niveles de expresión de OPA1. Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (* $(p < 0.05)$, ** $(p < 0.01)$ y *** $(p < 0.001)$) o la letra t ($(p < 0.05)$) utilizando un test estadístico de una cola) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

4.1.8. Niveles de Q y señalización autofágica

Aunque la relación entre los niveles celulares de Q y la regulación de la autofagia ha sido poco estudiada, trabajos previos llevados a cabo en fibroblastos procedentes de pacientes con deficiencias genéticas en la síntesis de Q, han determinado la relación entre esta molécula y la ruta de autofagia como un método de promover la supervivencia celular en condiciones de deficiencia de Q [300]. De esta manera, en el presente trabajo nos centraremos en estudiar los posibles efectos de los precursores de la síntesis de Q endógena (K y pHB), así como del aporte exógeno de Q₁₀ sobre este proceso, recreando además de manera farmacológica la deficiencia de Q en esta línea celular mediante el tratamiento con PABA. Para ello se determinaron los niveles de efectores proteicos localizados a distintos niveles en la ruta de señalización autofágica. El primero de ellos fue la proteína quinasa mTOR y su forma fosforilada, y por tanto activa, fosfo mTOR. Esta proteína es considerada un regulador maestro de esta ruta, actuando principalmente como un inhibidor de la progresión de la misma [28].

4. Resultados

Atendiendo a la forma total de la proteína mTOR (Tk-21A), se observó un incremento en presencia del tratamiento con pHB el cual fue revertido en presencia del tratamiento combinado con pHB+PABA. Sin embargo, el K no presentó efecto alguno en los niveles de esta proteína, aunque sí observó una tendencia a la disminución en presencia del tratamiento combinado con K+PABA frente a los niveles alcanzados con los tratamientos simples K o PABA. Por su parte, el aporte exógeno de Q₁₀ incrementó los niveles de mTOR observándose una tendencia en este mismo sentido con el tratamiento con PABA (Tk-21D).

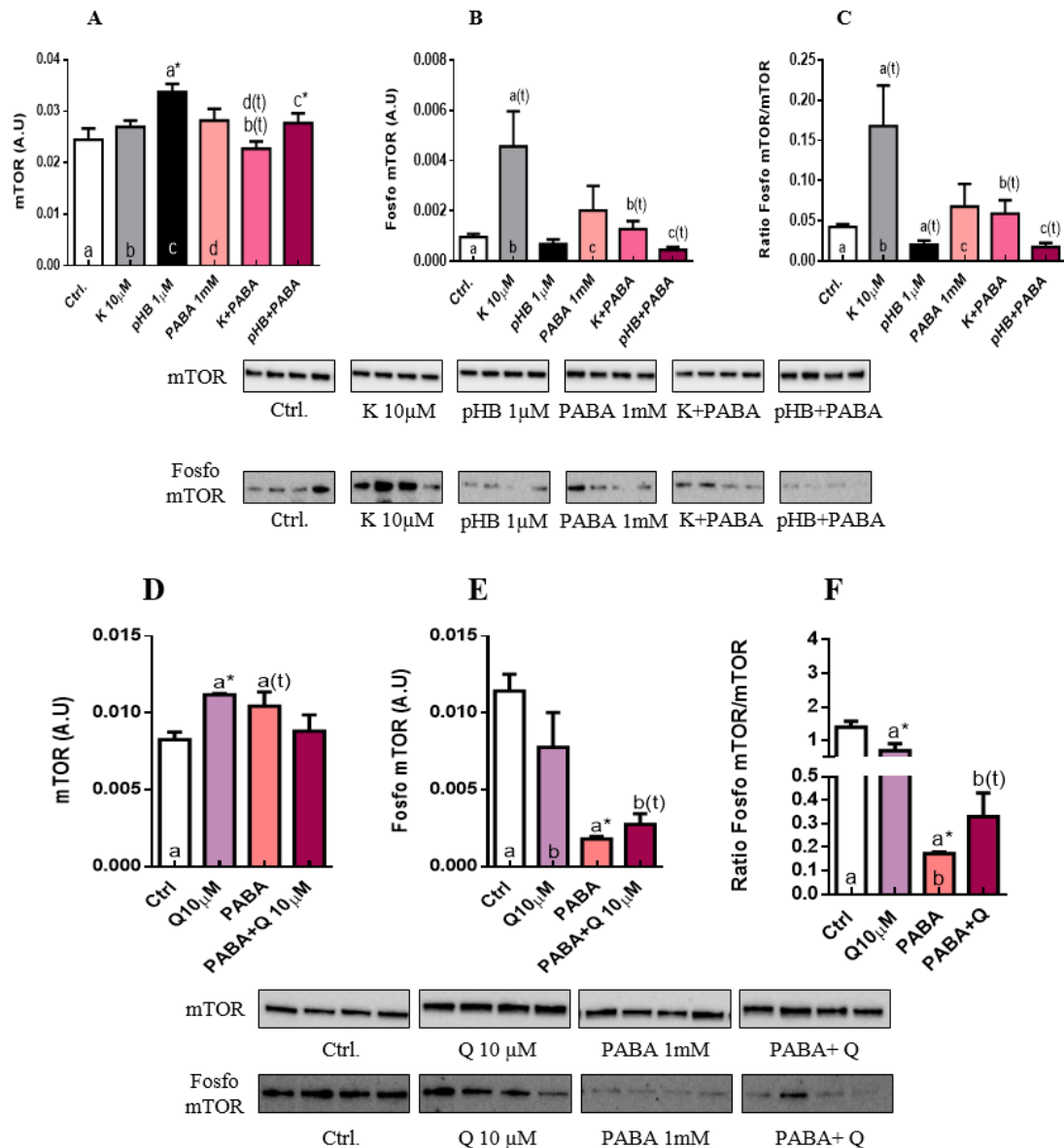


Figura Tk-21: Niveles de mTOR, fosfo mTOR y ratio fosfo mTOR/mTOR en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol (K) y ácido *p*-hidroxibenzoico (pHB) e inhibidor, ácido *p*-aminobenzoico (PABA), de la síntesis endógena de Q y del tratamiento con Q₁₀ exógeno sobre los niveles de expresión mTOR (A, D), fosfo mTOR (B, E) y ratio fosfo mTOR/mTOR (C, F). Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (* $p < 0.05$), o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

4. Resultados

Analizando los niveles de fosfo mTOR (forma activa de esta proteína), se observó una tendencia al aumento en el caso de K que, a su vez, tiende a anularse en presencia de PABA, no observándose cambios cuando las células fueron tratadas con pHB (Tk-21B). Por su parte, el aporte exógeno de Q₁₀ no produjo cambios en los niveles de esta proteína, mientras que éstos disminuyeron de manera muy significativa en las células tratadas con PABA, efecto que se mantuvo en presencia del tratamiento combinado PABA+Q (Tk-21E).

Por último, la ratio de ambas proteínas, que indicaría qué cantidad de proteína total se fosforila para ser finalmente activa, tendió a incrementarse en presencia de K, hecho que tendió a revertirse con el tratamiento K+PABA. El pHB tendió a disminuir este parámetro, continuando sus valores bajos en presencia del tratamiento combinado pHB+PABA (Tk-21C). Por su parte, el tratamiento con Q₁₀ disminuyó significativamente la ratio de ambas proteínas, ocurriendo de igual manera en presencia de PABA. Este parámetro se recuperó con el tratamiento combinado respecto a los valores obtenidos en el tratamiento sólo con PABA (Tk-21F).

Estos resultados ponen de manifiesto la divergencia de la respuesta de estas células al tratamiento con PABA, tanto en los niveles de mTOR como de fosfo mTOR, traduciéndose a su vez en variaciones en los resultados obtenidos en la ratio de ambas proteínas. Esta falta de consistencia entre respuestas, sumadas al hecho de que se produce una gran variabilidad dentro de cada grupo experimental con los precursores de la síntesis de Q (K y pHB) y sus respectivos tratamientos combinados en la proteína fosfo mTOR, parecen indicar que los niveles de Q no juegan un papel fundamental en la regulación de estas proteínas, ya que pueden verse afectadas en gran medida por factores externos al tratamiento, como por ejemplo la densidad de siembra de cada experimento, el estado del cultivo, la disponibilidad de nutrientes entre otros, al tratarse de un regulador maestro de la ruta de autofagia que actúa respondiendo a una gran cantidad de estímulos.

Continuando con otro de los efectores de la ruta que se encuentra aguas abajo de la regulación de mTOR, se analizaron los niveles de Beclina 1. Como se muestra en la figura Tk-22, la expresión de esta proteína no se alteró en respuesta al tratamiento con K o pHB; no obstante, sí se observó una bajada significativa en la expresión de la misma cuando las células fueron tratadas con PABA. Este acusado descenso fue revertido en

4. Resultados

presencia de los tratamientos combinados, siendo más llamativo en el caso del tratamiento con pHB+PABA.

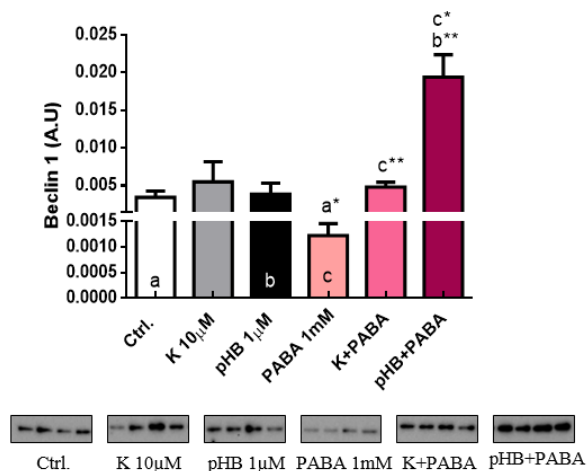


Figura Tk-22: Niveles de Beclina 1 en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol (K) y ácido *p*-hidroxibenzoico (pHB) e inhibidor, ácido *p*-aminobenzoico (PABA), de la síntesis endógena de Q sobre los niveles de expresión de Beclina 1. Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (* ($p < 0.05$) y ** ($p < 0.01$)) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

Por su parte, el tratamiento con Q₁₀ aumentó significativamente los niveles Beclina 1 con respecto al control, mientras que el tratamiento combinado con PABA+Q los disminuyó frente a los alcanzados con el suplemento de Q₁₀ (figura Tk-23).

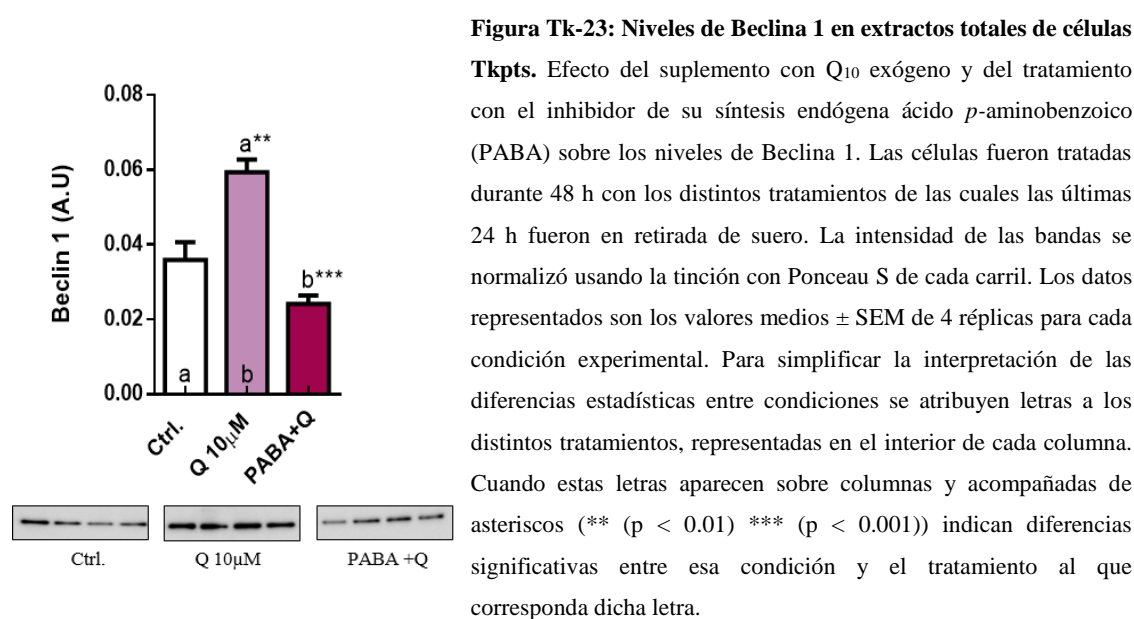


Figura Tk-23: Niveles de Beclina 1 en extractos totales de células Tkpts. Efecto del suplemento con Q₁₀ exógeno y del tratamiento con el inhibidor de su síntesis endógena ácido *p*-aminobenzoico (PABA) sobre los niveles de Beclina 1. Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (** ($p < 0.01$) *** ($p < 0.001$)) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

Continuando con la caracterización de las alteraciones de diferentes marcadores de la ruta de autofagia en respuesta a los tratamientos ensayados, se determinaron los niveles de p62. A nivel de este marcador, no se observaron cambios significativos en presencia de ninguno de los tratamientos suministrados (figura Tk-24A). No obstante, sí se encontraron modificaciones cuando el tratamiento fue con suplemento de Q₁₀exógeno (figura Tk-24C). La proteína p62 es la encargada de reclutar “cargas” ubiquitiniladas para su posterior incorporación al fagóforo en formación, para lo que necesita previamente ser ubiquitinilada y fosforilada [46]. Cuando tratamos las células con Q₁₀ pudimos observar que la forma “nativa” de la proteína no experimentó cambios (figura Tk-24B), mientras que el patrón característico en escalera que se corresponde con las formas ubiquitiniladas, y por tanto activas, se incrementó. Ocurrió de igual manera en el tratamiento combinado PABA+Q (Tk-24C).

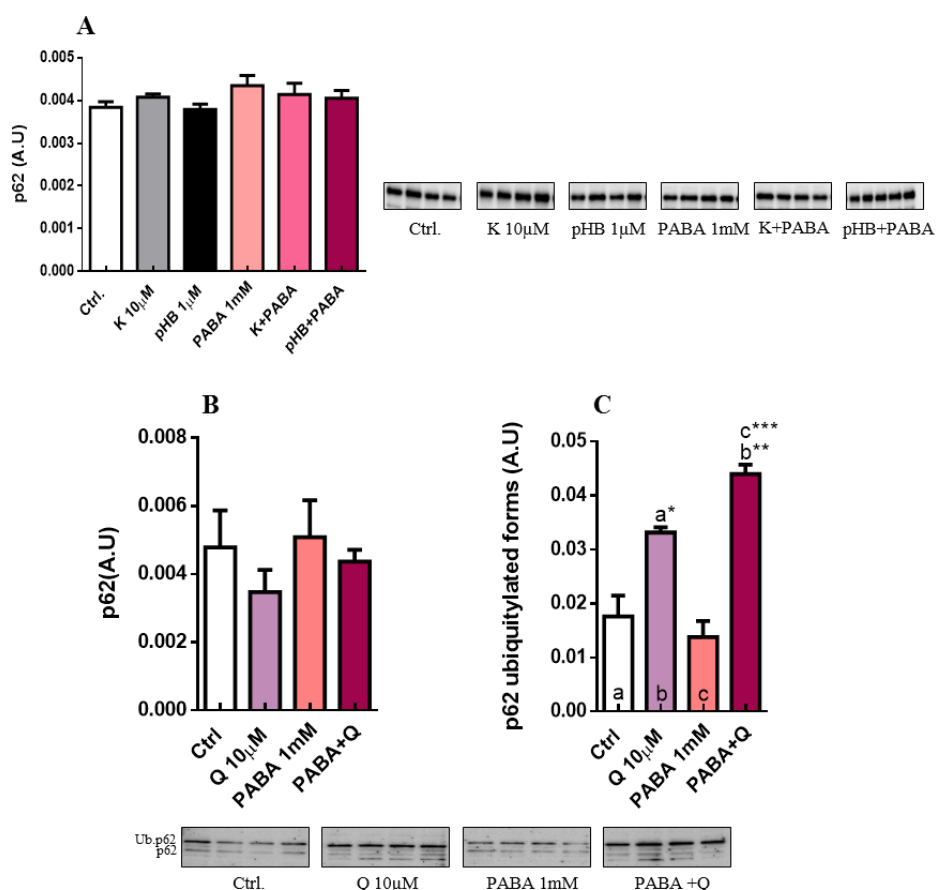


Figura Tk-24: Niveles de p62y sus formas ubiquitiniladas en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol (K) y ácido *p*-hidroxibenzoico (pHB) e inhibidor, ácido *p*-aminobenzoico (PABA), de la síntesis endógena de Q sobre los niveles de expresión de p62 (A) y efecto del suplemento con Q₁₀ exógeno y del tratamiento con el inhibidor de su síntesis endógena ácido PABA (B) sobre los niveles de expresión de este mismo marcador y sus formas ubiquitiniladas (C). Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (* ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$)) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

Como puede observarse en la figura Tk-24, no siempre se detectan las formas ubiquitiniladas de p62, lo que puede deberse a que la inmunotinción de ambos experimentos se realizó con anticuerpos diferentes. Uno de ellos parece ser más específico para la proteína p62 “nativa” sin ningún tipo de modificación, mientras que el otro es capaz también de reconocer a las formas ubiquitiniladas de esta proteína. Lamentablemente, durante la realización del presente trabajo se dejó de comercializar el

segundo, por lo que en algunos experimentos, que no han seguido la cronología que se presenta en este manuscrito, no pudieron detectarse dichas formas.

Por último y para concluir con el estudio de los marcadores principales de la ruta de autofagia, se determinaron los niveles de la proteína LC3. Esta proteína juega un papel fundamental en los últimos estadios de la ruta, concretamente en la formación y maduración de los autofagosomas. Para ello experimenta un procesamiento proteolítico desde la forma primitiva (pro-LC3) a LC3I para ser posteriormente modificada, en esta ocasión mediante la conjugación de fosfatidiletanolamina (PE), pasando a denominarse LC3II [8].

En la figuraTk-25 se muestran los niveles de expresión de LC3I y LC3II, así como la ratio de ambas formas $LC3II/(LC3I+LC3II)$. En primer lugar, observamos cómo el tratamiento con K y pHB incrementó significativamente los niveles de LC3I y LC3II, mientras que el PABA *per se* no tuvo efecto en los niveles de ambas formas. No obstante, tanto LC3I como LC3II disminuyeron drásticamente en los tratamientos combinados frente a sus respectivos tratamientos simples (K y pHB). La ratio, por su parte, se incrementó significativamente en presencia de pHB, mientras que tendió a hacer lo mismo cuando las células fueron tratadas con K y PABA. El tratamiento combinado con K+PABA disminuyó los valores de este parámetro al compararlos con sus respectivos tratamientos simples.

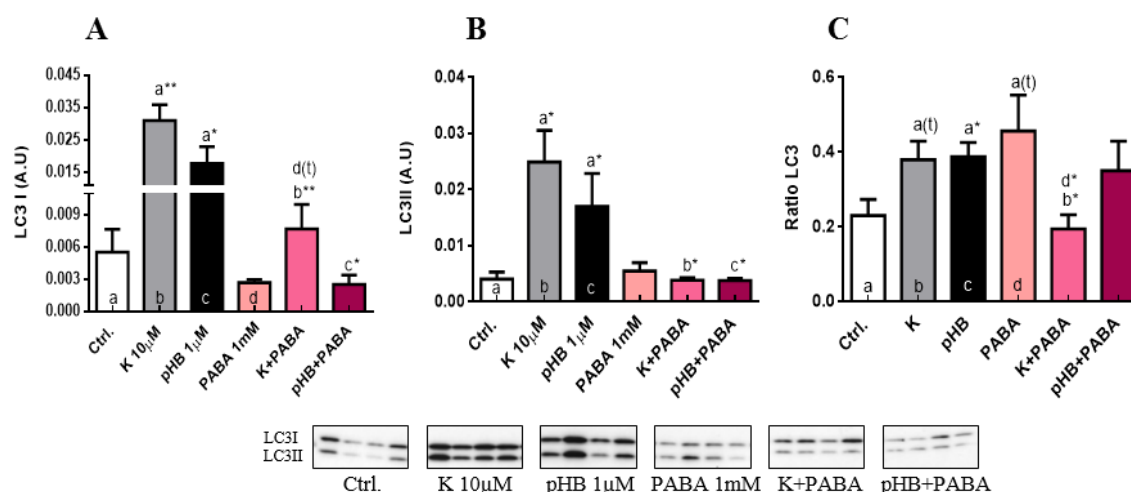


Figura Tk-25: Niveles de LC3 en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol (K) y ácido *p*-hidroxibenzoico (pHB) e inhibidor, ácido *p*-aminobenzoico (PABA), de la síntesis endógena de Q sobre los niveles de LC3I (A), LC3II (B) y la ratio LC3 (LC3II/(LC3I+LC3II))(C). Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (* ($p < 0.05$) y ** ($p < 0.01$)) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

Cuando el tratamiento consistió en un suplemento de Q₁₀ se observaron los mismos cambios que los encontrados en el tratamiento con precursores de la síntesis endógena de Q, K y pHB; es decir, un aumento de ambas formas de LC3 (LC3I y LC3II) (figura Tk-26). Sin embargo, a diferencia de los experimentos anteriores llevados a cabo con precursores biosintéticos del Q, el tratamiento combinado con PABA+Q no supuso cambios en ninguna de las proteínas con respecto al tratamiento simple con Q. Tampoco se observaron alteraciones en respuesta a estos tratamientos en la ratio de ambas proteínas.

4. Resultados

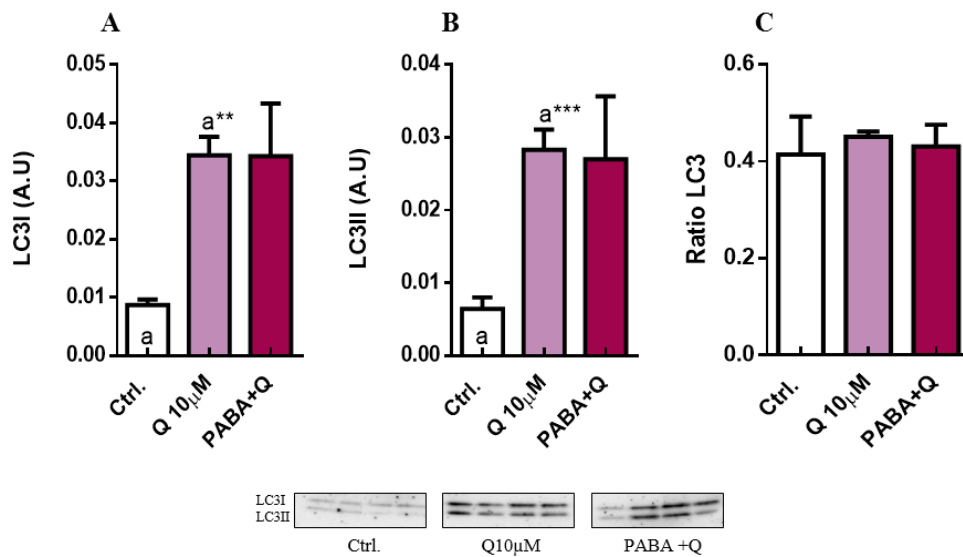


Figura Tk-26: Niveles de LC3 en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con Q₁₀ exógeno y ácido *p*-aminobenzoico (PABA) sobre los niveles de expresión de LC3I (A) y LC3II (B) y ratio LC3 (LC3II/(LC3I+LC3II)) (C). Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones se atribuye la letra “a” a la condición control. Cuando esta letra aparece sobre columna Q₁₀ 10 μ M acompañada de asteriscos (** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$)) indica diferencias significativas entre el control y el suplemento de Q₁₀ exógeno.

Estos resultados son consistentes con la idea de que el aumento en los niveles de Q en la línea celular Tkpts, ya sea producido por un incremento en la síntesis mediada por precursores biosintéticos (tratamientos con K y pHB) o por un aporte directo de manera exógena (tratamiento con Q₁₀ 10 μ M), es capaz de modular los últimos pasos de la ruta de autofagia.

Con el fin de profundizar en las posibles modificaciones del flujo autofágico producidas por el incremento en los niveles celulares de Q, llevamos a cabo ensayos de citometría de flujo utilizando el kit CYTO-ID[®]AutophagyDetection. En éste, y tal y como se describió previamente en el apartado 3.8.3.6. del Material y Métodos, se utiliza una sonda fluorescente que marca los autofagosomas formados en combinación con el inhibidor de su degradación (cloroquina, Cq), lo que permite hacer una determinación de la cantidad de vesículas formadas y, en definitiva, cuantificar el flujo autofágico [301].

4. Resultados

En este caso, los resultados indican que en presencia de Cq se produce una menor acumulación de autofagosomas en los tratamientos con pHB (se eligió este tratamiento ya que la respuesta de LC3 en presencia de K y pHB fue la misma) y suplemento de Q₁₀ exógeno (figura Tk-27A); mientras que dicha acumulación es mayor en el tratamiento con PABA (figura Tk-27B).

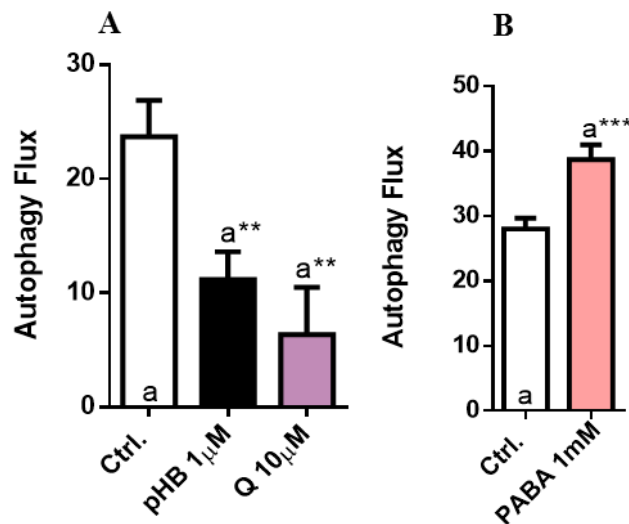


Figura Tk-27: Determinación del flujo autofágico mediante citometría de flujo en células Tkpts. Efectos sobre el flujo autofágico de tratamientos que incrementan los niveles de Q, bien por aumento de su síntesis endógena (ácido *p*-hidroxibenzoico (pHB)), bien por aporte exógeno directo Q₁₀ (A). Efectos sobre el flujo autofágico del tratamiento con un inhibidor de la síntesis endógena de Q, ácido *p*-aminobenzoico (PABA) (B). Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero y las últimas 18h en presencia de Cq (en el caso que procediese) Los datos representados fueron las medianas ± SEM de la señal fluorescente de 5 réplicas de cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre tratamientos se atribuye la letra “a” a la condición control y cuando esta aparece sobre las otras columnas acompañada de asteriscos (** (p < 0.01) y *** (p < 0.001) indicó las diferencias existentes entre el control y los tratamientos correspondientes.

Este nuevo abordaje podría estar indicando que, aunque podemos observar un incremento de los niveles de las dos formas de LC3, en las condiciones en las que aumentan los niveles de Q, la formación de vesículas autofágicas se ve realmente disminuida por estos tratamientos.

4.1.9. Niveles de ARNm de marcadores de la ruta de autofagia

Para comprobar si los cambios a nivel de proteína observados en los principales marcadores de señalización autofágica, p62 y LC3, estabandeterminados por cambios en la expresión génica, se llevaron a cabo determinaciones de los niveles de ARNm de los genes *Sqtsm1* (p62), *Mapl3ca* y *Mapl3cb*, en células tratadas con suplemento de Q₁₀,

4. Resultados

PABA, K y tratamiento combinado, K+PABA. Ya que los resultados a nivel de proteína de estos marcadores respondían de la misma manera ante el tratamiento con K y pHB, sólo se llevaron a cabo las medidas utilizando el primer tratamiento.

Como puede observarse en la figura Tk-28, no se produjeron cambios en la expresión de los genes de interés bajo ninguna de las condiciones experimentales.

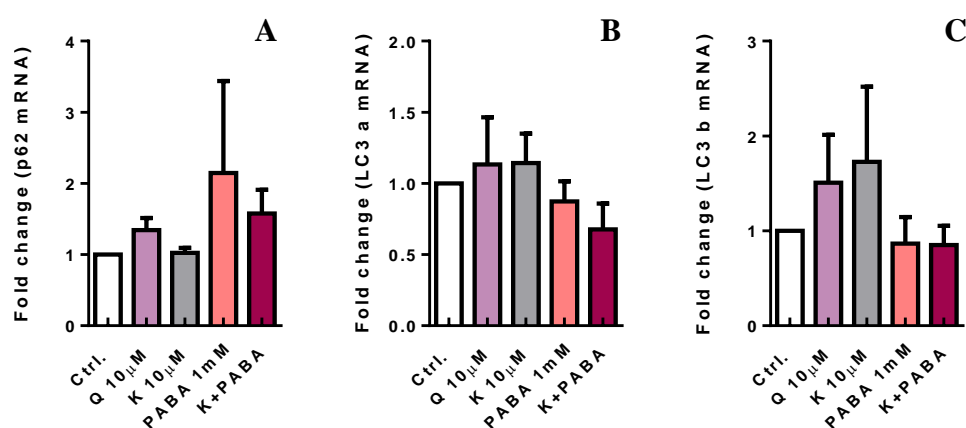


Figura Tk-28: Niveles de expresión de ARNm de los genes Sqtsm1 (p62), Mapl3ca y Mapl3cb. Efecto de tratamientos que incrementan los niveles de Q, tanto de forma endógena (kaempferol (K)) como exógena (Q₁₀) o que lo disminuyen inhibiendo su biosíntesis (*p*-aminobenzoico (PABA)) sobre la expresión de los genes Sqtsm1 (p62) (A), Mapl3ca (B) y Mapl3cb (C). Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 3 réplicas para cada condición experimental.

4.1.10. Posible papel de la tioredoxina 1 en la regulación del flujo autofágico mediada por Q

A la vista de los resultados obtenidos, que muestran un incremento de los efectores de la ruta de autofagia en los pasos finales de la misma (LC3I y LC3II) regulado por Q, llevamos a cabo determinaciones de los niveles de la tioredoxina 1 (Trx1). Estudios recientes llevados a cabo en levaduras han determinado que Trx1 es capaz de modular la actividad de la proteína ATG4, [302]. Concretamente en mamíferos, esta enzima es la encargada de procesamiento de pro-LC3 a LC3 I y de la posterior delipidación de LC3II a LC3I, de ahí el interés que suscita su actuación en el presente estudio.

4. Resultados

Los resultados mostraron que, en presencia de los tratamientos simples (K y pHB), los niveles de Trx1 se incrementaron significativamente, mientras que esta subida se revertía en presencia de tratamientos combinados con PABA (figura Tk-29).

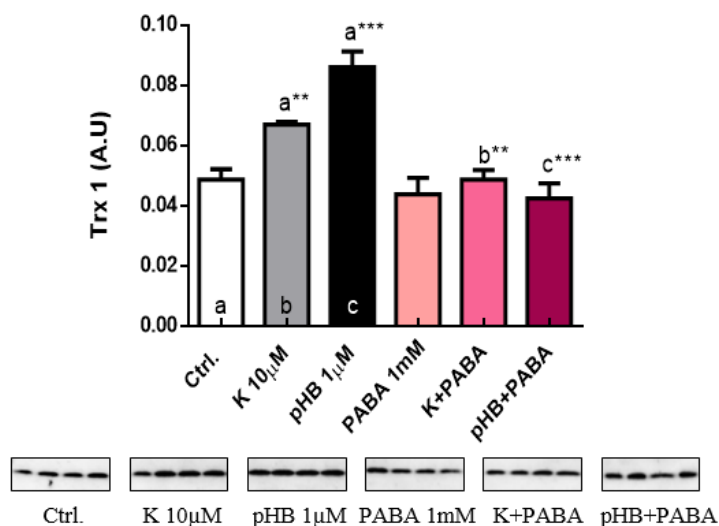


Figura Tk-29: Niveles de Trx 1 en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con los precursores kaempferol (K) y ácido *p*-hidroxibenzoico (pHB) e inhibidor, ácido *p*-aminobenzoico (PABA), de la síntesis endógena de Q sobre los niveles de Trx 1. Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones experimentales se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$)) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

Estos datos concuerdan, en parte, con los obtenidos cuando el tratamiento fue con suplemento de Q₁₀ (Figura Tk-30). En este caso los niveles de Trx 1 tendieron a aumentar en presencia del suplemento con Q₁₀, mientras que no hubo modificación posterior cuando el tratamiento con Q₁₀ se llevó a cabo en presencia de PABA.

4. Resultados

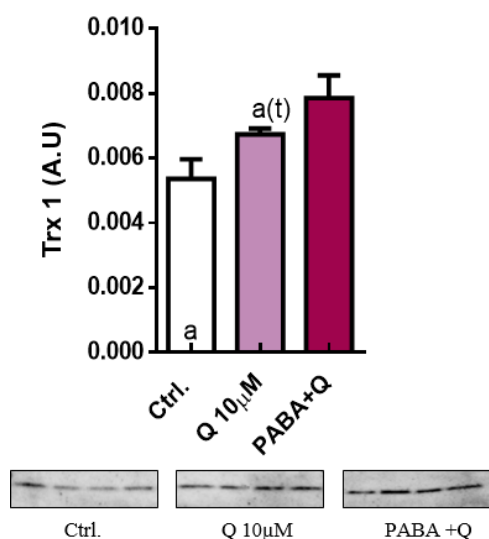


Figura Tk-30: Niveles de Trx 1 en extractos totales de células Tkpts. Efecto del tratamiento con Q₁₀ exógeno y ácido *p*-aminobenzoico (PABA) sobre los niveles de expresión de Trx 1. Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas halladas entre condiciones experimentales se atribuye la letra “a” a la condición control. Cuando esta letra aparece sobre la columna Q₁₀ acompañada de letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola) indica las diferencias significativas entre el control y el suplemento de Q₁₀ exógeno.

Con el fin de determinar si este cambio en la expresión de Trx 1 venía acompañado de un aumento en la expresión de ARNm, se determinaron los niveles de expresión del gen Txn1 en respuesta a los tratamientos con suplemento de Q₁₀, PABA, K y tratamiento combinado, K+PABA. Ya que los resultados a nivel de proteína de estos marcadores respondían de la misma manera ante el tratamiento con K y pHB, sólo se llevaron a cabo las medidas utilizando el primer tratamiento. Los resultados, representados en la figura Tk-31, muestran que no se produjo modificación alguna de los niveles de mensajero del gen Txn 1 bajo ninguna de las condiciones experimentales.

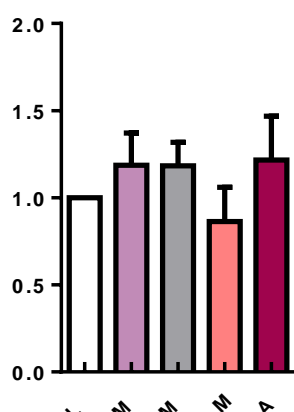


Figura Tk-31: Niveles de expresión de ARNm del gen Txn 1 en células Tkpts. Efecto de tratamientos que incrementan los niveles de Q, tanto de forma endógena (kaempferol (K)) como exógena (Q₁₀) o que lo disminuyen inhibiendo su biosíntesis (*p*-aminobenzoico (PABA) sobre la expresión del gen Txn 1. Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 3 réplicas para cada condición experimental.

4.1.11. Alteraciones en el flujo autofágico mediadas por la inhibición de ATG4

El incremento en la expresión de Trx1 en presencia de los diferentes tratamientos nos llevó a investigar la actuación de la proteína ATG4. Concretamente, quisimos estudiar el efecto de su inhibición sobre los niveles de LC3. Basándonos en estudios de *screening* llevados a cabo con distintos fármacos inhibidores de esta proteína, se eligió el tioconazol (Tc) como un eficiente inhibidor de la actividad de ATG4 [16].

En primer lugar se llevó a cabo un estudio de la viabilidad celular mediante ensayo con MTT, a distintas concentraciones de Tc, para determinar su toxicidad, tomando como punto de partida distintas concentraciones utilizadas en el estudio de referencia [16].

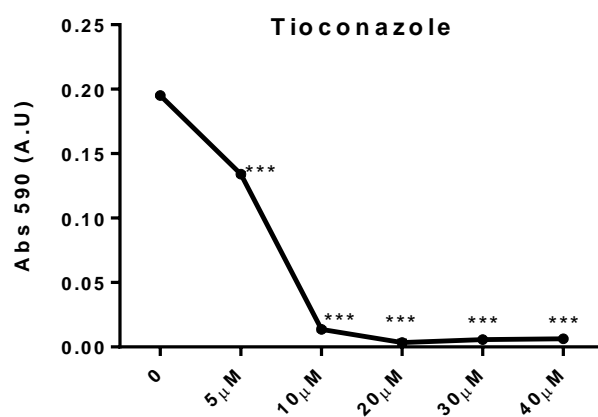


Figura Tk-32: Curva de toxicidad del tratamiento con tioconazol. Efecto del tratamiento con tioconazol (Tc) a distintas concentraciones sobre la viabilidad celular. Las células fueron tratadas durante 48 h con Tc de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Los asteriscos (***) $p < 0.001$) representan las diferencias estadísticas existentes entre cada tratamiento y las condiciones control.

Como puede observarse en la figura Tk-32, la viabilidad de las células se ve fuertemente afectada por el tratamiento con Tc, produciéndose una disminución estadísticamente significativa a partir del tratamiento con 5 μ M de Tc, decreciendo aún más dramáticamente a partir de 10 μ M. A la vista de estos resultados, se eligió 5 μ M de Tc como la concentración máxima a la que se llevaron a cabo los distintos experimentos, ya que aunque compromete parcialmente la viabilidad celular, a esta concentración el tratamiento actúa como un eficaz inhibidor de la actividad de ATG4 [16].

Posteriormente, y para comprobar si el tratamiento con Tc, producía realmente una disminución en los niveles de la proteína LC3 en la línea celular Tkpts, se comprobaron éstos mediante western blot de extractos celulares obtenidos de células sometidas a

4. Resultados

tratamiento con Tc a concentraciones de 0.5, 1 y 5 μM , y posterior inmunotinción. Como se muestra en la figura Tk-33A y B, los niveles de LC3I y LCII disminuyeron de forma muy significativa en respuesta al tratamiento con Tc 5 μM , con respecto a los niveles obtenidos en condiciones control. La ratio entre las formas procesadas de LC3, por su parte, disminuyó significativamente en presencia de Tc a 1 μM , observándose el efecto opuesto cuando el tratamiento fue a 5 μM . Por tanto, finalmente se eligió esta concentración más elevada para llevar a cabo los siguientes experimentos con agentes que modulan los niveles celulares de Q (figura Tk-33C).

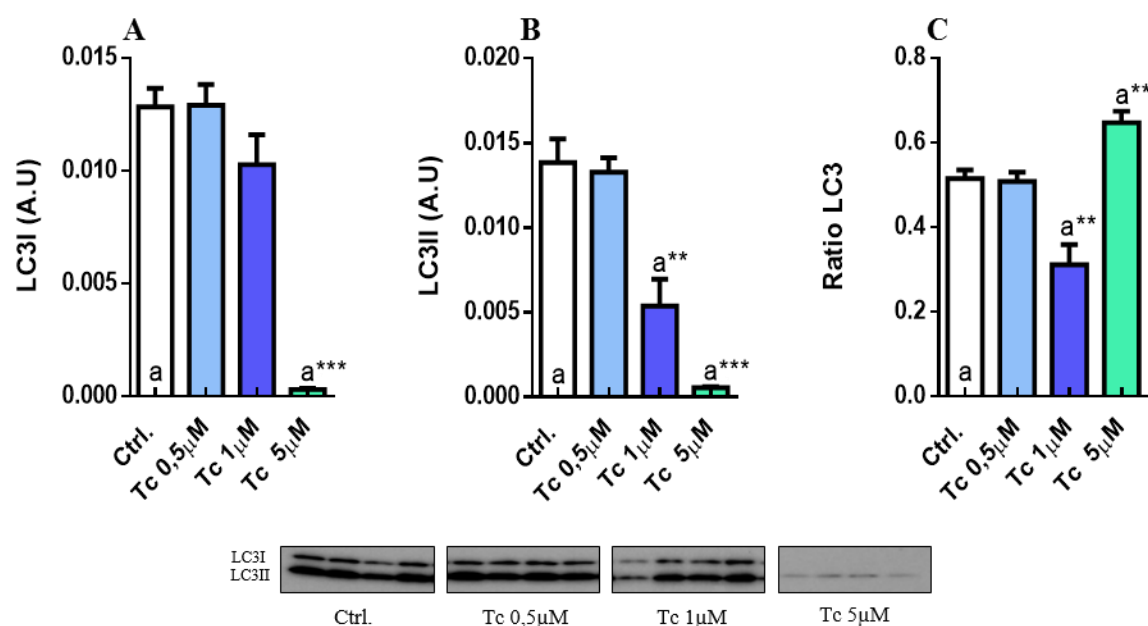


Figura Tk-33. Efecto del tratamiento con tioconazol sobre los niveles de LC3 en extractos totales de células Tkpts. Se muestran los resultados de la cuantificación de los niveles de LC3I (A) y LCII (B) y la ratio LC3 (LC3II/(LC3I+LC3II)) (C). Las células fueron tratadas durante 48 h de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre tratamientos se atribuye la letra “a” a la condición control y cuando esta aparece sobre las otras columnas acompañada de asteriscos (** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$)) indica las diferencias existentes entre el control y los tratamientos correspondientes.

También se llevaron a cabo determinaciones de los niveles de expresión de Trx 1 con el fin de observar si la presencia del inhibidor de ATG4, Tc, también afectaba a sus niveles de alguna manera. En la figura Tk-34 se muestran los niveles de Trx 1 en respuesta al tratamiento con distintas concentraciones de Tc. Cómo puede observarse, se produce un acusado descenso en los niveles de esta proteína como respuesta al tratamiento con 5 μM de Tc con respecto a las condiciones control.

4. Resultados

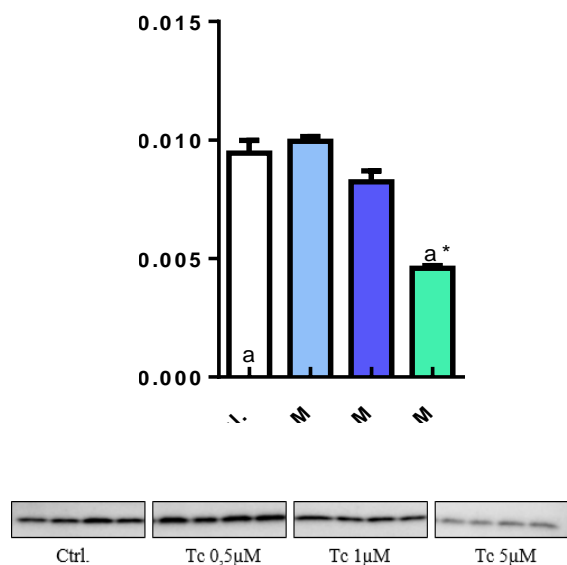
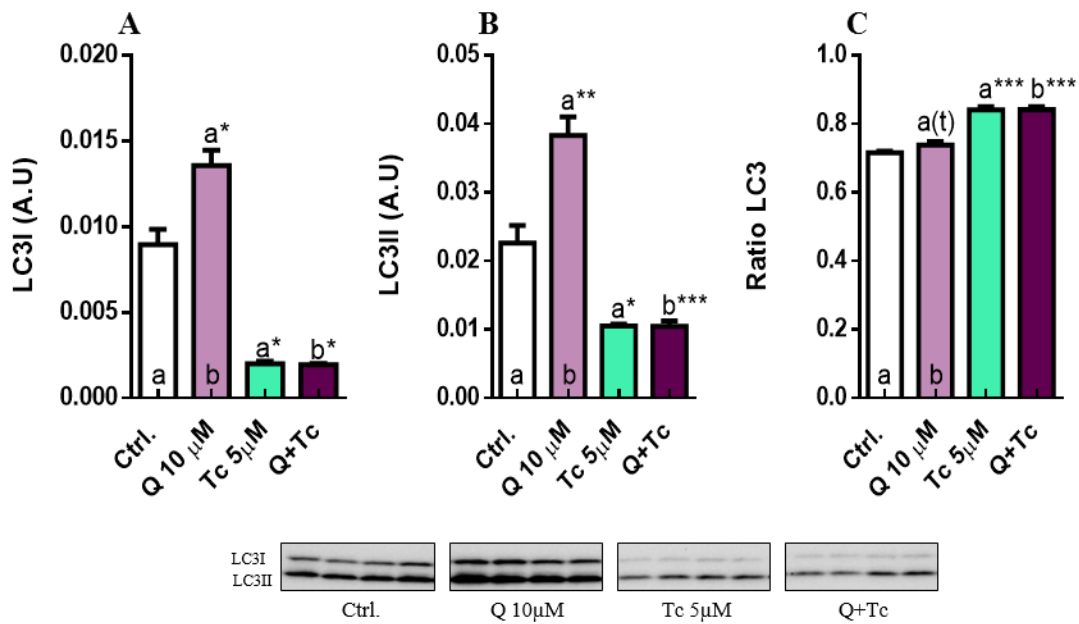


Figura Tk-34: Efecto del tratamiento con tioconazol sobre los niveles de Trx 1 en extractos totales de células Tkpts. Las células fueron tratadas durante 48 h de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados fueron los valores medios \pm de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre tratamientos se atribuye la letra “a” a la condición control y cuando esta aparece sobre las otras columnas acompañada de asteriscos (* ($p < 0.05$)) indica las diferencias existentes entre el control y los tratamientos correspondientes.

Una vez comprobado que el tratamiento con Tc a 5 μ M inhibía la actividad de ATG4 en la línea celular de estudio, pasamos a analizar el posible efecto del Q sobre esta proteína. Para ello, se llevaron a cabo experimentos en los que se determinaron los niveles de expresión de LC3I y II y Trx 1 en células tratadas con Q₁₀, Tc 5 μ M y Q+Tc.

Como se muestra en la figura Tk-35, se produjo un incremento significativo en ambas formas de la proteína LC3 en presencia de suplemento con Q₁₀, hecho constatado previamente en la figura Tk-25. Esta comparativa reafirma la teoría de que este sistema celular se afecta por el suplemento farmacológico con Q₁₀ en los últimos pasos de la ruta de autofagia. Además, se observó nuevamente que el tratamiento con Tc 5 μ M disminuyó de una manera muy acusada los niveles de ambas proteínas con respecto a su control siendo más llamativa, si cabe, en el caso de LC3I.

Por su parte, en presencia del tratamiento combinado, no se observó restablecimiento alguno en los niveles ambas formas de la proteína, siendo la expresión significativamente menor cuando la comparamos con la alcanzada en células tratadas con Q₁₀. Por último, la ratio de LC3 tendió a incrementarse en presencia del tratamiento con Q₁₀, mientras que se observó un aumento significativo de estos niveles en respuesta al tratamiento simple con Tc y al tratamiento combinado con Q+Tc.



FiguraTk-35: Efecto del tratamiento combinado con Q₁₀ y tioconazol sobre los niveles de LC3 en extractos totales de células Tkpts. Se muestra el efecto del tratamiento con suplemento de Q₁₀, tioconazol (Tc) y Q+Tc sobre los niveles de expresión de LC3I (A), LCII (B) y la ratio LC3 (LC3II/(LC3I+LC3II)) (C). Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas halladas entre condiciones experimentales se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (* (p<0.05) ** (p < 0.01) y *** (p < 0.001) o la letra t ((p<0.05) con test estadístico de una cola) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

Ya que el tratamiento con Tc afectó a los niveles de Trx1, quisimos comprobar el efecto sobre esta proteína del tratamiento combinado con Q+ Tc. Como podemos observar en la figura Tk-36, los niveles de Trx 1 se vieron de nuevo afectados de forma importante por el tratamiento con Tc 5 μ M, puesto que se observó un dramático descenso en los niveles de expresión de la misma en respuesta al tratamiento con el inhibidor tal y como ya observamos en la figura Tk-34. Además, se observó el mismo efecto en presencia del tratamiento combinado con Q+Tc.

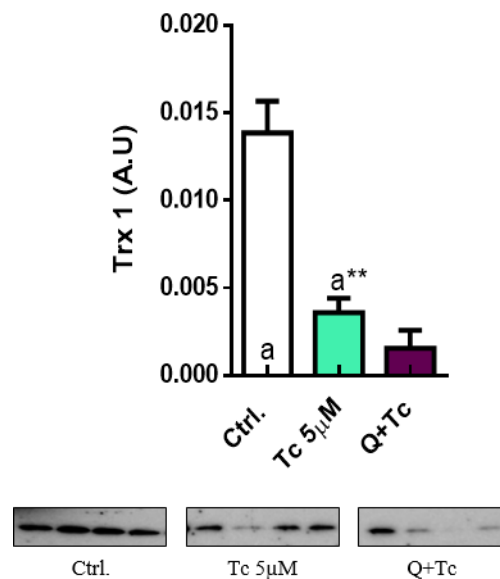


Figura Tk-36: Efecto del tratamiento combinado con Q₁₀ y Tc sobre los niveles de Trx 1 en extractos totales de células Tkpts. Se muestra el efecto del tratamiento simple con tioconazol (Tc) y combinado con Q+Tc sobre los niveles de Trx 1. Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas halladas entre condiciones experimentales se atribuye la letra “a” a la condición control. Cuando esta letra aparece sobre la columna Tc 5µM y acompañada de asteriscos (** ($p < 0.01$)) indica diferencias significativas entre el control y el tratamiento con Tc 5µM.

4.2. Papel de los ácidos grasos en la fisiología mitocondrial y la ruta de autofagia en la línea celular Hepa 1.6. Posible implicación del coenzima Q

Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, han determinado que la adición de emulsiones lipídicas, tradicionalmente usadas en alimentación parenteral, ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), y en menor medida monoinsaturados (MUFA), son capaces de inducir un aumento en los niveles de Q en la línea celular Hepa 1.6, afectando su ruta de biosíntesis de manera diferencial en función de la naturaleza de dichas grasas [108]. Cada una estas emulsiones son ricas en un tipo concreto de ácidos grasos: PUFA n-6 (Lipofundina), PUFA n-3 (Lipoplus) o MUFA n-9 (ClinOleic).

Dada la relevancia del coenzima Q en los sistemas celulares, en los cuales desempeña una gran variedad de funciones [119], en el presente trabajo nos centramos en el efecto que produce el tratamiento con estas emulsiones sobre la

fisiología mitocondrial y la ruta de autofagia, con el fin de determinar si los efectos observados en los parámetros determinados están mediados, al menos en parte, por el aumento en los niveles de Q observados previamente en esta línea celular en respuesta a las emulsiones, separando estos efectos de aquéllos vinculados con el mero suplemento graso, independientemente del Q.

Con estos antecedentes, las concentraciones de la emulsión, así como la densidad de siembra para los distintos experimentos, se eligieron sobre la base de estos estudios previos en los que se determinó que la concentración adecuada de emulsión para los diferentes ensayos era de 7 $\mu\text{l/ml}$, y la densidad de siembra debía ser elevada (15.000 cél/cm^2), ya que si el tratamiento se produce sobre células cultivadas a baja densidad, se observa una disminución en el crecimiento celular que puede ser prevenida de manera muy eficiente llevando a cabo los tratamientos a la densidad indicada [108].

4.2.1. Efecto del tratamiento con emulsiones sobre la formación de gotas lipídicas

Con el objetivo de observar si la línea celular Hepa 1.6 incrementaba su capacidad de albergar una mayor cantidad de reservas lipídicas en respuesta a los diferentes tratamientos, se llevó a cabo una tinción con Oil-Red O, técnica que permite teñir los lípidos neutros.

Como se muestra en la figura He-1 se observó que las células aumentaron de manera importante los acúmulos de gotas lipídicas en presencia del suplemento con cualquiera de estas emulsiones, siendo más eficiente el efecto en el caso del tratamiento con MUFA (n-9).

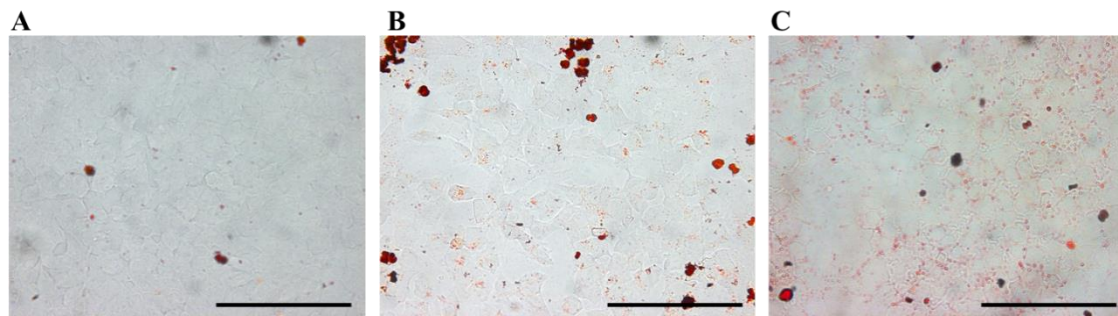


Figura He-1: Acumulación de gotas lipídicas en las células Hepa 1.6 tratadas con emulsiones lipídicas. Se muestran los efectos sobre la acumulación de gotas lipídicas en células no tratadas (A) y en respuesta a la utilización de las emulsiones Lipoplus (B) y ClinOleic (C). Las células se cultivaron durante 48 h con los distintos suplementos. Las fotografías tomadas se realizaron a 40X, utilizando un microscopio Leica DM5000 B. La línea negra que acompaña a las imágenes representa la escala (60 μ m).

Para obtener datos cuantitativos se determinó la absorbancia a 500 nm, característica de la tinción con el colorante Oil Red O, que aumentó de manera muy significativa en las células tratadas con las emulsiones respecto a las condiciones control (figura He-2). Además, de acuerdo con lo observado al microscopio, este incremento fue más acusado cuando la emulsión utilizada fue rica en n-9 en comparación con su homóloga rica en n-3.

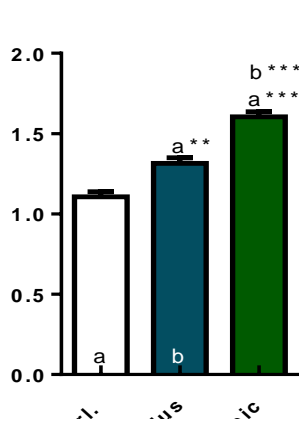


Figura He-2: Cuantificación del grado de acumulación de gotas lipídicas en las células Hepa 1.6. Efectos sobre la acumulación de gotas lipídicas en respuesta a la utilización de las emulsiones Lipoplus y ClinOleic. Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos suplementos. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Con el objeto de simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones experimentales se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$)) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

Ya que la acumulación de gotas lipídicas se vio incrementada en respuesta a los tratamientos con las emulsiones, decidimos investigar el papel de Mfn2 en relación a dicho aumento, pues se ha descrito la importancia de esta proteína mediando la interacción entre las gotas lipídicas, las mitocondrias y el retículo endoplásmico (RE) [303, 304].

4. Resultados

En la figura He-3 se representan los niveles de Mfn2 en respuesta a los tratamientos con Lipoplus y ClinOleic. Como se puede observar, se produjo un incremento significativo en la expresión de esta proteína como respuesta al tratamiento con los distintos suplementos grasos con independencia de la naturaleza de los mismos.

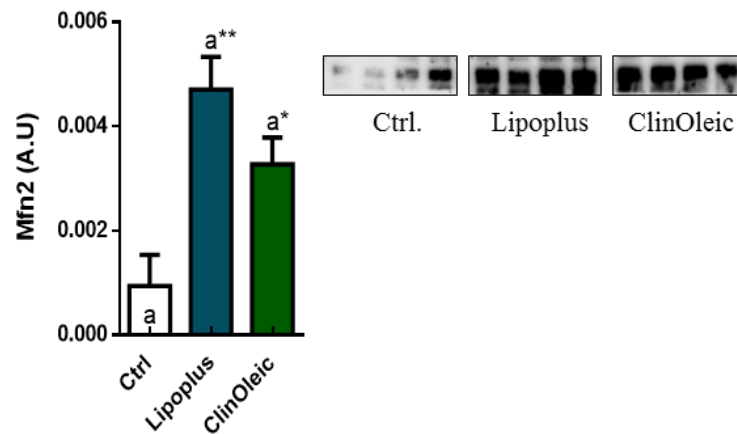


Figura He-3: Niveles de Mfn2 en extractos totales de células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con emulsiones lipídicas (Lipoplus y ClinOleic) sobre los niveles de Mfn2. Las células fueron tratadas con las distintas emulsiones durante 48 h. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas de cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre tratamientos se atribuye la letra “a” a la condición control y cuando esta letra aparece sobre las otras columnas acompañada de asteriscos (* ($p < 0.05$) y ** ($p < 0.01$)) indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el control y el tratamiento correspondiente.

4.2.2. Alteraciones en la actividad de los complejos de la CTE en respuesta a las distintas fuentes grasas

Para determinar si el tratamiento con distintas fuentes lipídicas suponía algún tipo de modificación sobre la funcionalidad de la CTE mitocondrial, se llevaron a cabo medidas de la actividad de cada uno de los complejos multiproteicos que la componen (Complejos I, II, III, IV), así como medidas de las actividades combinadas entre los complejos I+III y II+III. Estas determinaciones únicamente se llevaron a cabo en células tratadas con las emulsiones Lipofundina y Lipoplus, ya que eran las que se tenían disponibles en el momento de la realización de estos ensayos.

En la figura He-4 podemos observar que ninguna de las actividades de los complejos se vio alterada de manera significativa en respuesta a los tratamientos con las emulsiones, aunque se observó una tendencia al incremento con respecto a las condiciones control en el caso de la actividad del complejo IV en presencia de

Lipofundina (Figura He-4D). Por su parte, las actividades combinadas tampoco mostraron alteraciones llamativas en respuesta a los tratamientos. Cabe destacar que en presencia de Lipoplus se observó una tendencia al incremento de las actividades de los complejos I, III, IV (Figuras He-4A, C y D) y de las actividades combinadas I+II y II+III con respecto a las células control, no obstante estas diferencias no alcanzaron la significación estadística (Figuras He-4E y F). Una posible explicación para la variabilidad observada entre réplicas puede ser el hecho de que las actividades fueron llevadas a cabo a partir de mitocondrias aisladas partiendo de cultivos celulares. Debido a la gran cantidad de material necesario para hacer cada uno de los ensayos bioquímicos, fueron necesarias varias extracciones sucesivas de mitocondrias, lo que probablemente pudo incrementar la variabilidad entre réplicas sometidas a los mismos tratamientos. Este hecho pudo hacer que se perdieran diferencias significativas existentes a nivel de la actividad de la CTE entre las células control y las tratadas con emulsiones. Por tanto, serán necesarios más experimentos para alcanzar resultados concluyentes a este respecto.

4. Resultados

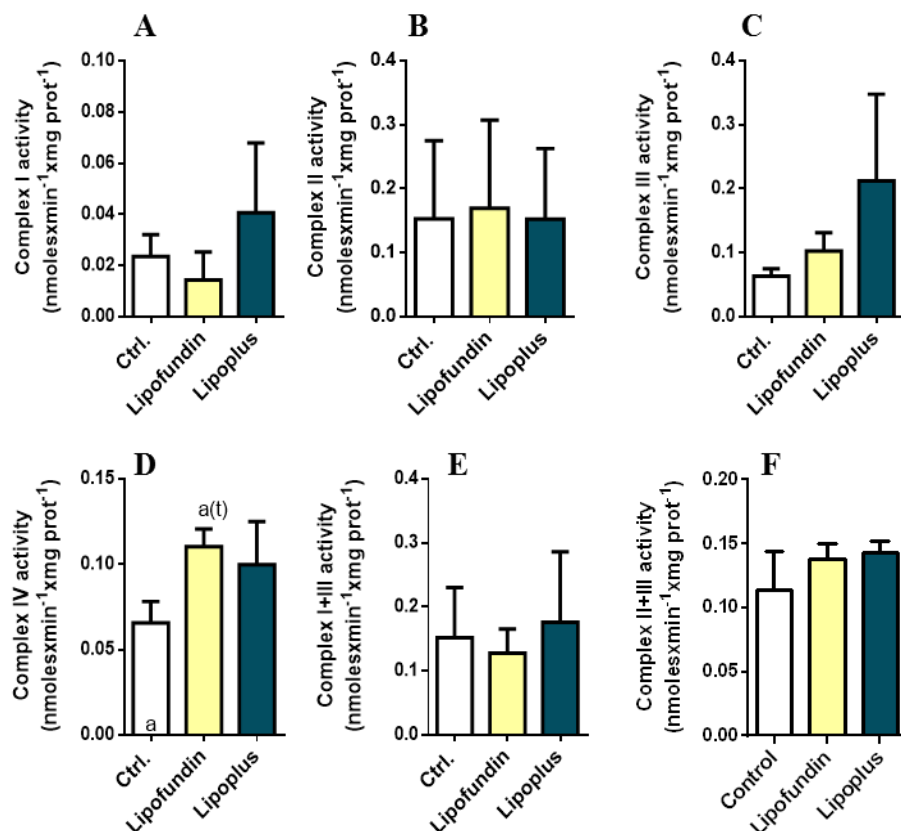


Figura He-4: Actividades de la cadena de transporte electrónico de mitocondrias aisladas a partir de células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con emulsiones lipídicas (Lipoplus y Lipofundina) sobre la actividad de complejos de la CTE. Complejo I (A), II (B), III (C), IV (D), I+III (E) y II+III (F). Las células fueron tratadas con las distintas emulsiones durante 48 h. Cada uno de los valores de actividad obtenidos se normalizó entre la actividad citrato sintasa (CS), que es un marcador de la cantidad de mitocondrias. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 3 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre tratamientos se atribuye la letra “a” a la condición control y cuando esta letra aparece sobre las otras columnas acompañada de la letra t ($p < 0,05$, con un test estadístico de una cola) indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el control y el tratamiento correspondiente.

Ya que los ensayos de actividad enzimática no fueron concluyentes a la hora de determinar si realmente se producía algún cambio en la fisiología mitocondrial en respuesta a los tratamientos, se llevaron a cabo medidas de consumo de oxígeno y acidificación del medio para así observar si la respiración mitocondrial y la bioenergética celular estaban experimentando algún tipo de alteración en las células con niveles incrementados de coenzima Q [108] debido al tratamiento con emulsiones lipídicas.

En la figura He-5A y B aparecen representados el OCR y el ECAR en condiciones basales de células no tratadas y tratadas con Lipoplus y ClinOleic. Estos resultados revelan que no se produce ningún tipo de alteración en estos parámetros bajo ninguna de

las condiciones experimentales. Además, tampoco se observó ningún cambio significativo de estos parámetros en condiciones de estrés (Figura He-5C y D).

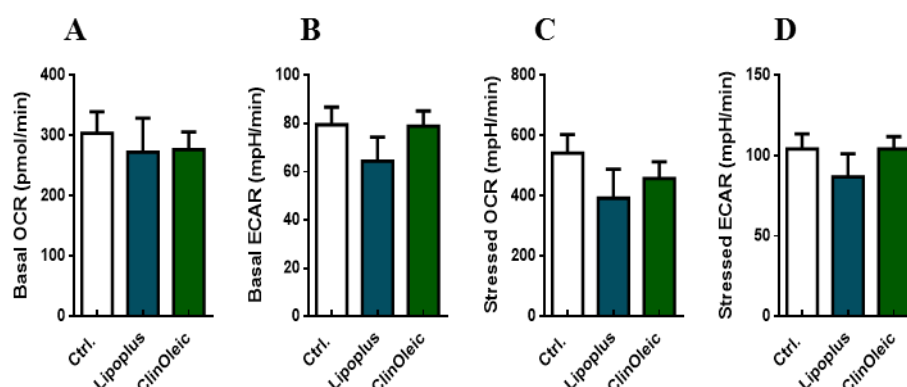


Figura He-5: Niveles de OCR e ECAR en células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con emulsiones lipídicas (Lipoplus y ClinOleic) sobre la ratio de consumo de O₂ (OCR) en condiciones basales (A) y estresantes (C) y sobre la ratio de acidificación extracelular (ECAR) en condiciones basales (B) y de estrés (D). Las células fueron tratadas durante 48 h con las distintas emulsiones. Los datos representados son los valores medios ± SEM de 5 réplicas para cada condición experimental

4.2.3. Alteraciones en la masa mitocondrial en respuesta al tratamiento con distintas fuentes grasas

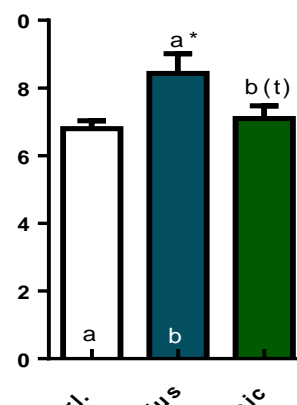
Como se ha indicado anteriormente, los tratamientos con ambas emulsiones lipídicas (en especial con Lipoplus), son capaces de inducir un incremento muy significativo en los niveles de Q de esta línea celular [108]. Ya que esta molécula está íntimamente ligada a la función de la mitocondria, se llevaron a cabo determinaciones de la masa mitocondrial de las células en cultivo mediante citometría de flujo con la sonda MitoTracker®Green FM. Además, se determinaron también los niveles de distintas subunidades marcadoras de la abundancia de los complejos de la CTE mediante western blot. Este análisis fue complementario a estudios previos de microscopía electrónica llevados a cabo en nuestro laboratorio utilizando esta misma línea celular.

Los resultados obtenidos muestran cómo se produjo un incremento significativo en la cantidad de mitocondrias presentes en células tratadas con Lipoplus frente a células control (figura He-6). El tratamiento con ClinOleic por su parte, no produjo ninguna modificación a este nivel respecto a células no tratadas, observándose por tanto una leve disminución en la cantidad de mitocondrias frente a células tratadas con Lipoplus.

4. Resultados

Figura He-6. Niveles de masa mitocondrial en células Hepa 1.6.

Efecto del tratamiento con emulsiones lipídicas (Lipoplus y ClinOleic) sobre la masa mitocondrial. Las células fueron tratadas durante 48 h con las distintas emulsiones. Los valores representados son los correspondientes a las medianas \pm SEM de la señal fluorescente de 6 réplicas para condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones experimentales se atribuyeron letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (* ($p < 0.05$)) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.



El hecho de que se observe un incremento en la cantidad de mitocondrias en respuesta al suplemento con PUFA n-3, podría estar relacionado con un incremento en la biogénesis mitocondrial, aunque también podría deberse a una conservación de las mitocondrias existentes por una disminución de la mitofagia.

Con el fin de determinar si la ruta de degradación de mitocondrias contribuía al aumento de la masa mitocondrial global, se cuantificaron dos marcadores de esta ruta: PINK1 y Parkin. En mitocondrias despolarizadas, marcadas por tanto para su degradación autofágica, PINK1 queda en la membrana externa mitocondrial en forma de dímeros y se autofosforila, siendo activa a su vez para fosforilar los dominios de poliubiquitinación de Parkin. Una vez marcada Parkin por cadenas de ubiquitinas, éstas se fosforilan nuevamente favoreciéndose la degradación autofágica de la mitocondria [53].

Tal y como se observa en la figura He-7A, los niveles de expresión de PINK1 disminuyeron de manera significativa en presencia del tratamiento con Lipoplus en comparación con células no tratadas. Por su parte el tratamiento con ClinOleic no alteró los niveles de esta proteína con respecto al control.

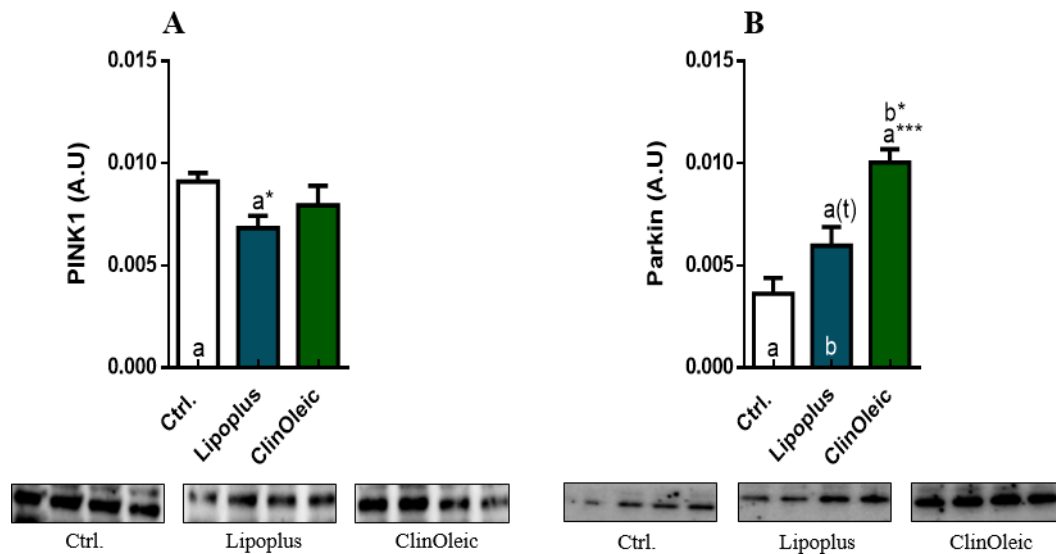


Figura He-7: Niveles de PINK1 y Parkin en extractos totales de células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con emulsiones lipídicas (Lipoplus y ClinOleic) sobre los niveles de PINK1 (A) y Parkin (B). Las células fueron tratadas durante 48 h con las distintas emulsiones. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones experimentales se atribuyeron letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (* ($p < 0.05$) y *** ($p < 0.001$)) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

En cuanto a los niveles de Parkin mostrados en la figura He-7B, se observó un incremento significativo con respecto al control en células tratadas con ClinOleic, mientras que el tratamiento con PUFA n-3 sólo tendió a incrementar estos niveles de forma ligera respecto al control sin emulsión.

Posterior al análisis de masa mitocondrial mediante citometría de flujo, se determinaron las posibles alteraciones de los niveles de subunidades de proteínas marcadores de los complejos de la CTE. Los resultados aparecen representados en la figura He-8.

En primer lugar, el tratamiento con Lipoplus produjo un incremento muy significativo de los niveles del complejo I con respecto a células control, mientras que la respuesta al tratamiento con ClinOleic fue justamente la opuesta, ya que se observó una tendencia a la disminución de este complejo. Cabe destacar la drástica disminución de este complejo si se comparan células tratadas con Lipoplus frente a células tratadas con ClinOleic (Figura He-8A).

4. Resultados

Los niveles del complejo II (Figura He-8B) disminuyeron de manera muy significativa en presencia de ClinOleic, mientras que, a nivel de este complejo, el tratamiento con Lipoplus no indujo ninguna alteración con respecto a las condiciones control. Al comparar el efecto de la naturaleza de la grasa suministrada, observamos que los niveles de este complejo disminuyen de manera muy drástica en presencia de la emulsión rica en MUFA n-9 con respecto a la emulsión rica en PUFA n-3.

Por su parte, la expresión del complejo III tendió a aumentar en presencia de Lipoplus con respecto a células sin tratamiento, no observándose modificación alguna cuando la grasa suministrada fue ClinOleic (Figura He-8C).

Los niveles del complejo IV disminuyeron de forma significativa en presencia de ambas emulsiones con respecto a las condiciones control (Figura He-8D). No obstante, los resultados obtenidos en este complejo no son concluyentes ya que existe una gran variabilidad entre réplicas del mismo grupo experimental. Esto puede deberse a que la expresión de este complejo es la que más se afecta por el procesamiento de las muestras. La misma casa comercial (Thermo Fisher Scientific) hace referencia a que esta subunidad es altamente hidrofóbica y muy sensible a variaciones en la temperatura; por tanto, es posible que durante el procesado de las muestras se produjeran alteraciones en esta proteína entre réplicas biológicas, lo que dificulta observar el efecto real del tratamiento.

Por último, los niveles del complejo V no mostraron cambios destacables en respuesta a ninguna de las emulsiones lipídicas suministradas (figura He-8E).

4. Resultados

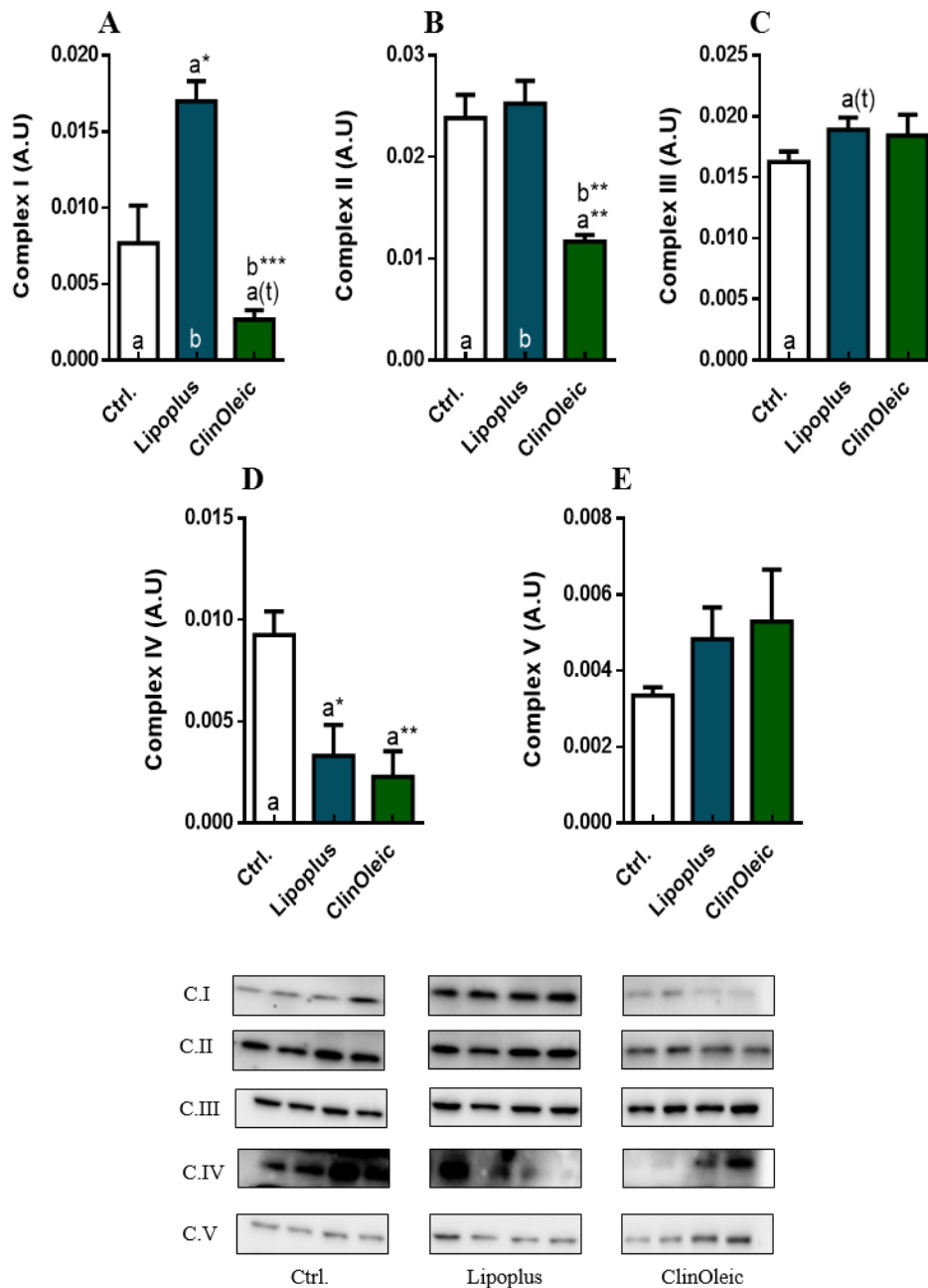


Figura He-8: Niveles de subunidades marcadoras de complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en extractos totales de células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con emulsiones lipídicas (Lipoplus y ClinOleic) sobre los niveles de expresión de subunidades marcadoras de la abundancia de los complejos de la CTE, I (A), II (B), III (C), IV (D) V (E). Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados fueron los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones experimentales se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (* ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$)) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que correspondiera dicha letra.

4.2.4. Generación de especies reactivas de oxígeno y alteraciones en el potencial mitocondrial en respuesta a suplementos lipídicos

Con el fin de determinar si el tratamiento con emulsiones lipídicas era capaz de modificar en forma alguna la producción de especies reactivas de oxígeno, se llevaron a cabo medidas de la generación de peróxido y superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a nivel intracelular, y determinaciones de la producción de $O_2^{\cdot-}$ a nivel mitocondrial. Además, se realizaron medidas de potencial mitocondrial para valorar el estado fisiológico de las mitocondrias en respuesta a los distintos tratamientos.

En la figura He-9A se observa cómo los niveles peróxido incrementaron de manera drástica en presencia de ambas emulsiones con respecto a las condiciones control, siendo más elevados cuando la emulsión suministrada fue rica en n-9.

En cuanto a los niveles de $O_2^{\cdot-}$, mostrados en la figura He-9B, observamos que éstos también se incrementaron en presencia de ambas emulsiones con respecto a células no tratadas con independencia de la naturaleza de la grasa.

Por su parte, los niveles de $O_2^{\cdot-}$ mitocondriales también experimentaron un aumento muy significativo en presencia de Lipoplus y ClinOleic con respecto a las condiciones control, siendo más acusado cuando la emulsión fue rica en PUFA n-3 (Fig. He-9C).

4. Resultados

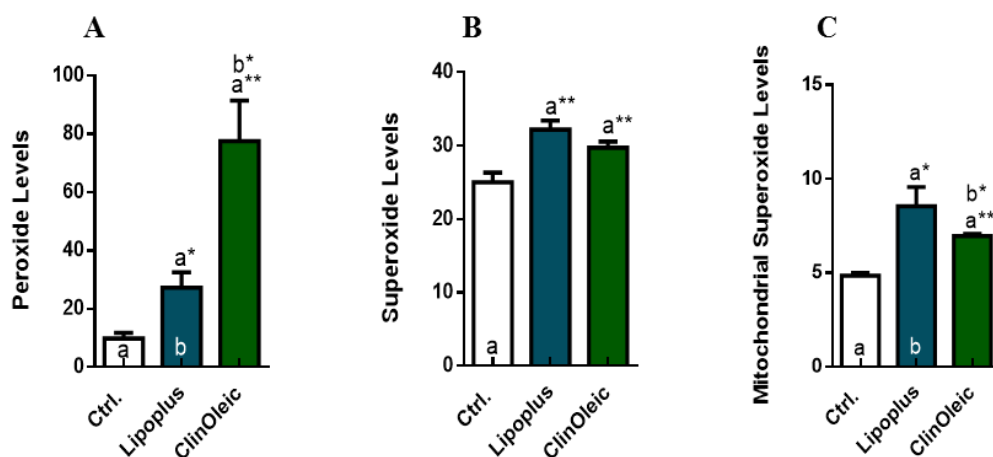
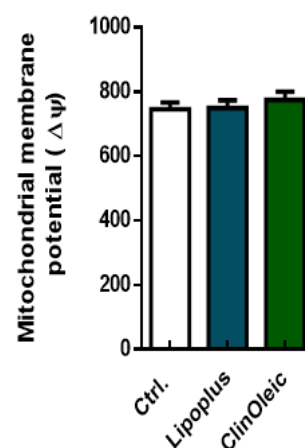


Figura He-9. Generación de especies reactivas de oxígeno en células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con emulsiones lipídicas (Lipoplus y ClinOleic) sobre la generación de especies reactivas de oxígeno a nivel intracelular: Niveles de peróxidos (A) y superóxido (B) y a nivel intracelular y niveles de superóxido mitocondrial (C). Las células fueron tratadas durante 48 h con las distintas emulsiones. Los valores representados son los correspondientes a la mediana \pm SEM de la señal fluorescente de 6 réplicas para condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones experimentales se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (* ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$)) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

Por su parte el potencial de membrana mitocondrial no experimentó cambio alguno en respuesta a los tratamientos con las emulsiones (figura He-10)

Figura He-10. Determinaciones de potencial mitocondrial ($\Delta\Psi$) en células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con emulsiones lipídicas (Lipoplus y ClinOleic) sobre el potencial de membrana mitocondrial. Las células fueron tratadas durante 48 h con las distintas emulsiones. Los valores representados son los correspondientes a la ratio FL3/FL1 de las medianas \pm SEM de la señal fluorescente de 6 réplicas para cada condición experimental.



4.2.5. Determinación de daño oxidativo en proteínas y lípidos en respuesta a las distintas fuentes grasas

Ya que los niveles de ROS se incrementaron significativamente en presencia de los tratamientos con las diferentes emulsiones, se llevaron a cabo medidas de la oxidación de proteínas y de la peroxidación lipídica con el fin de determinar si este aumento afectaba también a distintos componentes celulares.

En la figura He-11 se representa el grado de carbonilación de proteínas que, como ya se explicó, es indicativo de la oxidación de las mismas. Tal y como se observa, no se produjeron alteraciones significativas en el daño oxidativo global a proteínas como respuesta al tratamiento con emulsiones con independencia de la fuente grasa aportada.

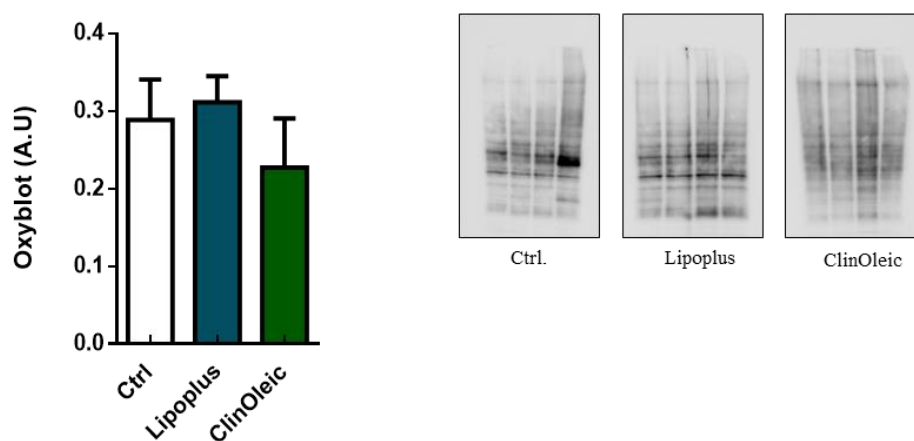


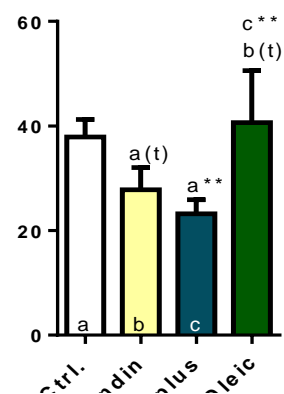
Figura He-11. Determinación del grado de oxidación de proteínas en extracto total de células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con emulsiones lipídicas (Lipoplus y ClinOleic) sobre el grado de oxidación de proteínas. Las células fueron tratadas durante 48 h con las distintas emulsiones. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental.

Otro indicativo del daño oxidativo producido a nivel celular, es el grado de peroxidación lipídica que sufren las membranas en respuesta a los distintos tratamientos. Estas medidas se llevaron a cabo mediante ensayos espectrofotométricos, tal y como se detalla en el apartado 3.8.1 del Material y Métodos.

Observamos en la figura He-12 cómo el grado de peroxidación lipídica tendió a disminuir en células tratadas con Lipofundina con respecto a las condiciones control, mientras que esta disminución sí fue significativa en el caso del tratamiento con

Lipoplus. Por su parte, el tratamiento con ClinOleic no produjo cambios significativos en el nivel de hidroperóxidos con respecto a los niveles de células no tratadas. No obstante, éstos sí que aumentaron con respecto al resto de emulsiones.

Figura He-12. Niveles de hidroperóxidos en extractos totales de células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con emulsiones lipídicas (Lipoplus, Lipofundina y ClinOleic) sobre nivel de hidroperóxidos, que es indicativo de la peroxidación lipídica de las membranas celulares. Las células fueron tratadas durante 48 h con las distintas emulsiones. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4-7 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones experimentales se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (** ($p < 0.01$)) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra



4.2.6. Efecto de las emulsiones lipídicas sobre la ruta de autofagia

La relación entre los niveles de Q celular y su implicación en la ruta de autofagia ha sido poco estudiada. No obstante, experiencias previas llevadas a cabo en condiciones de deficiencia de Q, han determinado la relación entre esta molécula y la ruta de autofagia como método para favorecer la supervivencia celular [300].

Ya que, como se ha expuesto anteriormente, el tratamiento con las distintas emulsiones lipídicas incrementa los niveles de Q en la línea celular Hepa 1.6 [108], se determinaron los niveles de distintos marcadores de la ruta autofágica mediante western blot para investigar las posibles alteraciones de la misma y su relación con los niveles de Q.

El primer marcador analizado fue la proteína mTOR y su forma fosforilada fosfo mTOR. En la figura He-13A se observó cómo los niveles de expresión de la proteína total tendían a incrementarse en presencia del tratamiento con Lipoplus, mientras que el aumento fue estadísticamente significativo en presencia de ClinOleic con respecto a las condiciones control. Además, en el caso de este

4. Resultados

marcador la proteína incrementó significativamente sus niveles en presencia de la grasa rica en n-9 frente a la rica en n-3.

Por su parte, la forma activa de la proteína, fosfo mTOR (figura He-13B), respondió de manera similar a estos tratamientos. Aunque el incremento con Lipoplus en este caso no fue significativo a nivel estadístico, se volvió a poner de manifiesto una subida notable de los niveles de esta forma de mTOR en presencia del tratamiento con la emulsión rica en MUFA n-9 con respecto a las células no tratadas. Sin embargo, la ratio entre ambas formas de la proteína no se modificó en ninguna de las condiciones experimentales (Figura He-13C), lo que indicaría que el tratamiento produce un aumento de los niveles globales de mTOR manteniéndose su grado de fosforilación.

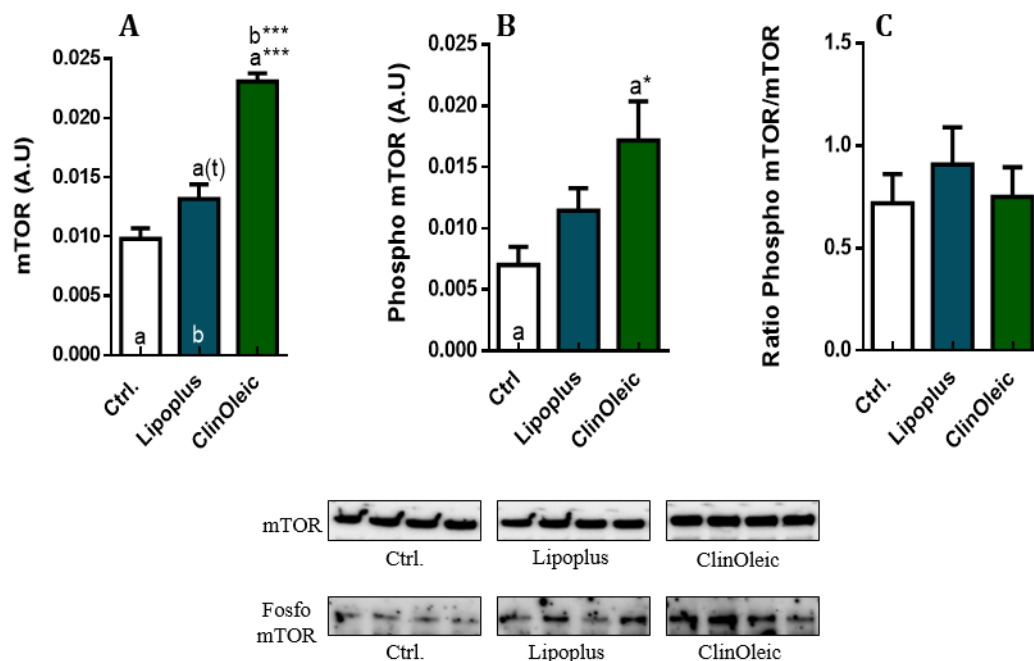


Figura He-13: Niveles de mTOR, fosfo mTOR y ratio fosfo mTOR/mTOR en extractos totales de células Hepa 1.6. Efecto del suplemento con emulsiones lipídicas (Lipoplus y ClinOleic) sobre los niveles de mTOR (A), fosfo mTOR (B) y ratio fosfo mTOR/mTOR (C). Las células fueron tratadas durante 48 h con las distintas emulsiones de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones experimentales se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (* ($p < 0.05$) y *** ($p < 0.001$)) o la letra t ($p < 0.05$ utilizando un test estadístico de una cola) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

Continuando con el análisis de marcadores de la ruta de autofagia, se determinaron los niveles de la proteína Beclina 1. En la figura He-14 se observó un incremento de

esta proteína en presencia del tratamiento con ClinOleic en comparación con las condiciones control, mientras que no se encontró modificación alguna cuando el tratamiento fue con Lipoplus. Una vez más se observó el efecto diferencial de la naturaleza de la grasa suministrada, ya que los niveles de Beclina 1 aumentaron de manera significativa cuando la emulsión aportada era rica en MUFA n-9, pero no cuando era rica en PUFA n-3.

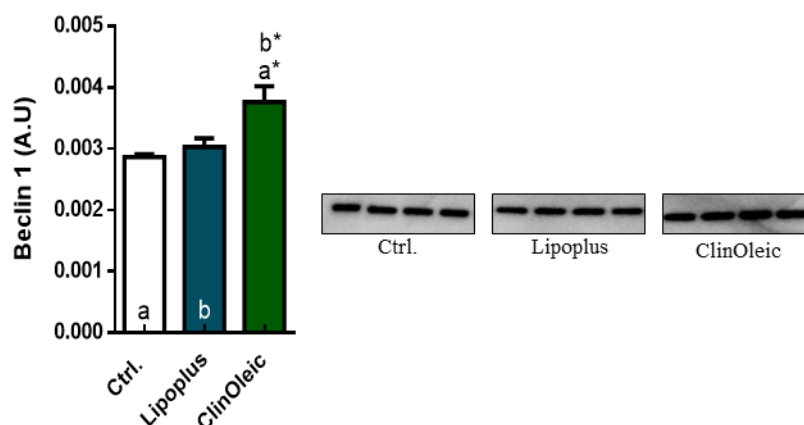


Figura He-14: Niveles de Beclina 1 en extractos totales de células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con emulsiones lipídicas (Lipoplus y ClinOleic) sobre los niveles de Beclina 1. Las células fueron tratadas durante 48 h con las distintas emulsiones de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas de cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones experimentales se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (* ($p < 0.05$)) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

Por su parte la expresión de la proteína p62 (figura He-15A) tendió a disminuir en presencia del tratamiento con Lipoplus en comparación con los niveles hallados en células no tratadas. No obstante, estos cambios no fueron estadísticamente significativos. El tratamiento con ClinOleic tendió, por el contrario, a aumentar la expresión de esta proteína, aunque estas diferencias tampoco superaron la significación estadística. Analizando las formas ubiquitiniladas de p62 (figura He-15B) observamos que en presencia de ClinOleic, se produce un fuerte incremento en la expresión de estas formas con respecto a las células no tratadas y a las tratadas con Lipoplus.

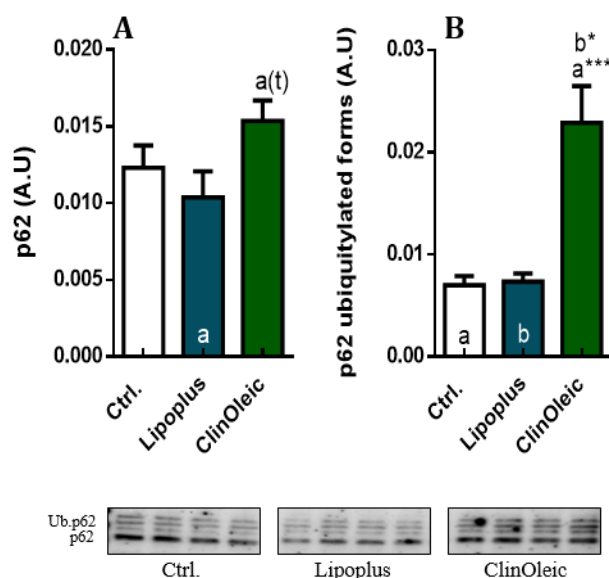


Figura He-15: Emulsiones lipídicas y niveles de p62 en extractos totales de células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con emulsiones lipídicas sobre los niveles de expresión de p62 (A) y sus formas ubiquitiniladas (B). Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas entre condiciones experimentales se atribuyen letras a los distintos tratamientos, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (* ($p < 0.05$) y *** ($p < 0.001$)) o la letra t ($p < 0.0$) utilizando un test estadístico de una cola) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

Con el fin de seguir profundizando en las posibles modificaciones del flujo autofágico en respuesta al aporte graso diferencial, llevamos a cabo la determinación de los niveles de expresión de las proteínas LC3 I y LC3II. En este caso, introdujimos además un tratamiento combinado con la correspondiente emulsión y Cq (10 μ M), compuesto que, como indicamos con anterioridad, actúa produciendo un bloqueo en el flujo autofágico ya que impide la unión de los autofagosomas con los lisosomas impidiendo su degradación. El tratamiento combinado con Cq permite determinar la cantidad de autofagosomas que se forman en respuesta al tratamiento con las dos emulsiones.

En la figura He-16A observamos que los niveles de LC3I no se modificaron en presencia de ninguna de las emulsiones con respecto a las células no tratadas. No

obstante, sí que queda patente un aumento significativo de esta forma de la proteína cuando comparamos las células tratadas sólo con las emulsiones, tanto Lipoplus como ClinOleic, con las células sometidas al tratamiento combinado con Lipoplus+Cq y ClinOleic+Cq respectivamente. Además, estos valores fueron también superiores a los alcanzados en células tratadas sólo con Cq.

En cuanto a los niveles de LC3II, cuya acumulación suele estar relacionada con un aumento del flujo autofágico al ser la forma de la proteína que va anclada finalmente a los autofagosomas, se produjo un aumento significativo en presencia de Lipoplus con respecto a las condiciones control, mientras que con ClinOleic no se observó cambio alguno con respecto a estas células no tratadas, pero sí una disminución significativa con respecto a los niveles alcanzados con el tratamiento con Lipoplus. Nuevamente, se produjo un aumento muy patente de LC3II en presencia de todos los tratamientos con Cq con respecto a sus correspondientes tratamientos simples (figura He-16B). Cabe destacar que, aunque el tratamiento con ambas emulsiones y Cq fue capaz de incrementar los niveles de esta proteína con respecto al tratamiento sólo con Cq, fue con suplemento rico en PUFA n-3 el que consiguió unos niveles más elevados de LC3II.

Por su parte, la ratio de LC3 no mostró cambios significativos entre los tratamientos simples, sólo se produjeron incrementos significativos al comparar los combinados con sus respectivos tratamientos en ausencia de Cq (figura He-16C).

4. Resultados

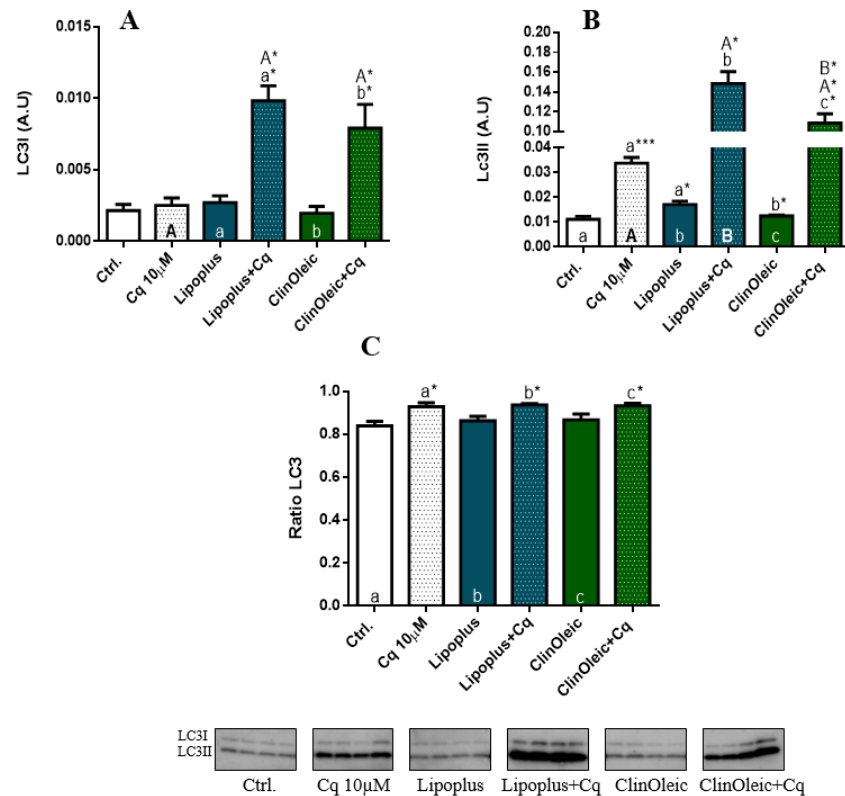


Figura He-16: Emulsiones lipídicas y niveles de LC3 en extractos totales de células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con emulsiones lipídicas (Lipoplus y ClinOleic) y cloroquina (Cq) sobre los niveles de LC3I (A), LCII (B) y la ratio de LC3 (LC3II/ (LC3I+LC3II)) (C). Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero y las últimas 18h en presencia de Cq (en el caso que procediese). La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas halladas entre condiciones experimentales se atribuyen letras minúsculas a los distintos tratamientos simples y letras mayúsculas a los distintos tratamientos combinados con Cq y se representan en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (* ($p < 0.05$) y *** ($p < 0.001$)) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

A partir de los niveles de las dos formas de LC3 en presencia y en ausencia de Cq, podemos calcular la dinámica de estos marcadores; es decir, la cantidad de proteína que formará parte del autofagosoma (la que observamos en presencia de algún bloqueo del flujo, como sería el tratamiento con Cq) con respecto a la cantidad de proteína presente (que será un balance entre la cantidad de proteína que se procesa y la que será degradada finalmente en los autofagolisosomas).

En las figuras He-17A y B se muestra cómo se produjo un claro incremento en la dinámica de ambas formas de la proteína con respecto al control, siendo no obstante

4. Resultados

más llamativo en presencia del tratamiento con Lipoplus. Además, observamos que la dinámica de LC3II se ve favorecida en presencia del suplemento con n-3 frente al suplemento con n-9.

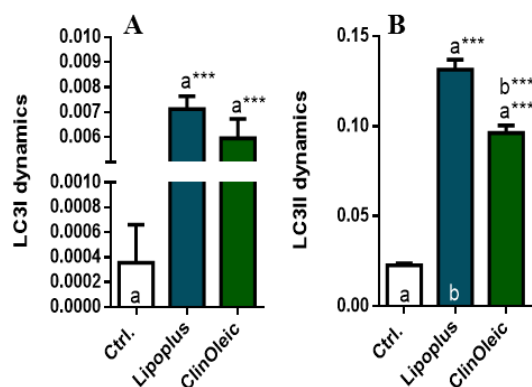


Figura He-17: Dinámica de LC3. Efecto del tratamiento con emulsiones lipídicas (Lipoplus y ClinOleic) sobre la dinámica de LC3I (A) y LC3II (B). Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas halladas entre condiciones experimentales se atribuyen letras a los distintos tratamientos representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (***) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

Para comprobar si estos cambios de expresión en los marcadores de la ruta se traducían en alteraciones del flujo autofágico como respuesta a las distintas grasas, se llevaron a cabo determinaciones directas del mismo mediante citometría de flujo utilizando la sonda CYTO-ID[®] Autophagy Detection Kit.

Tal y como se muestra en la figura He-18, el flujo autofágico se incrementó de manera muy significativa en presencia de Lipoplus, mientras que no mostró cambios con respecto al control en el caso del tratamiento con ClinOleic. El flujo autofágico, además, se vio afectado diferencialmente por la naturaleza de la grasa aportada ya que disminuyó en presencia de ClinOleic frente al aporte de Lipoplus.

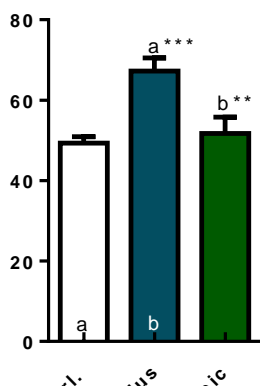


Figura He-18: Efecto de las emulsiones lipídicas sobre el flujo autofágico determinado mediante citometría de flujo en células Hepa 1.6. Efectos del tratamiento con emulsiones lipídicas (Lipoplus y ClinOleic) sobre el flujo autofágico. Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero y las últimas 18h en presencia de Cq (en el caso que procediese). Los valores representados son los correspondientes a la mediana \pm SEM de la señal fluorescente de 5 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas halladas entre condiciones experimentales se atribuyen letras a los distintos tratamientos representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (** ($p < 0.05$) y *** ($p < 0.001$)) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

4.2.7. Posible implicación de los niveles de Q sobre la ruta de autofagia en células Hepa 1.6

Habiendo observado que el tratamiento con Lipoplus produjo un incremento del flujo autofágico, y sabiendo que esta emulsión lipídica es además capaz de incrementar en gran medida la síntesis de Q en esta línea celular, nos preguntamos si el efecto observado en las últimas etapas de la ruta de autofagia es mediado, al menos en parte, por los mayores niveles de Q endógenos alcanzados en las células tratadas con la emulsión.

Para abordar este objetivo determinamos los niveles de p62 y LC3 en células tratadas con Lipoplus en presencia del inhibidor competitivo de COQ2, el ácido *p*-aminobenzoico (PABA) con el fin de observar si la inhibición en la síntesis de Q provocaba algún efecto sobre los principales marcadores de autofagia. Además, se suministraron tratamientos combinados con Cq para determinar si se producía efecto sobre la formación de autofagosomas.

En la figura He-19A se representan los niveles de p62 ante las distintas condiciones experimentales. Como era de esperar, todos los tratamientos con Cq supusieron un aumento de los niveles de expresión de p62 con respecto a sus correspondientes tratamientos simples. Se observó, además, un incremento significativo de p62 en células tratadas con Lipoplus+Cq frente a las células tratadas únicamente con cloroquina. La dinámica de la proteína reveló que, efectivamente, el tratamiento con Lipoplus incrementaba la cantidad de autofagosomas formados, mientras que éstos disminuían al tratar las células con Lipoplus+PABA (figura He-19B).

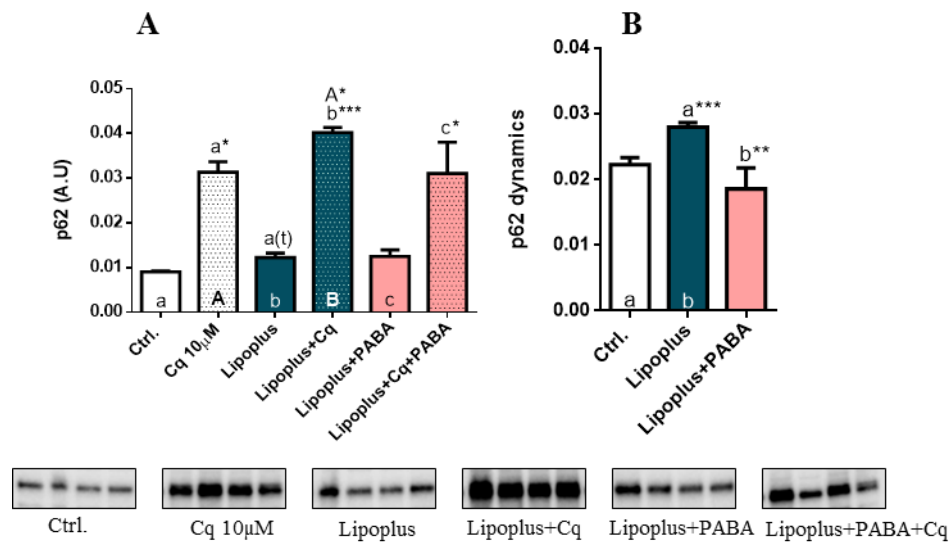


Figura He-19: Inhibición de la biosíntesis de Q con PABA y niveles de p62 en extractos totales de células Hepa

1.6. Efecto del tratamiento con Lipoplus, cloroquina (Cq) y del tratamiento combinado con Lipoplus+PABA sobre los niveles de expresión de p62 (A) y la dinámica de la proteína (B). Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero y las últimas 18h en presencia de Cq (en el caso que procediese). La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas halladas entre condiciones experimentales se atribuyen letras minúsculas a los distintos tratamientos simples y letras mayúsculas a los distintos tratamientos combinados con Cq, representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (* ($p < 0.05$), ** $p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$)) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

Por su parte, los niveles de LC3I se incrementaron con el tratamiento con Lipoplus+Cq frente al tratamiento simple con Cq pero, además, quedó patente que los niveles de dicha proteína fueron significativamente menores en presencia del tratamiento combinado con Lipoplus+PABA+Cq frente al tratamiento sin el inhibidor de la síntesis de Q, Lipoplus+Cq (figura He-20A).

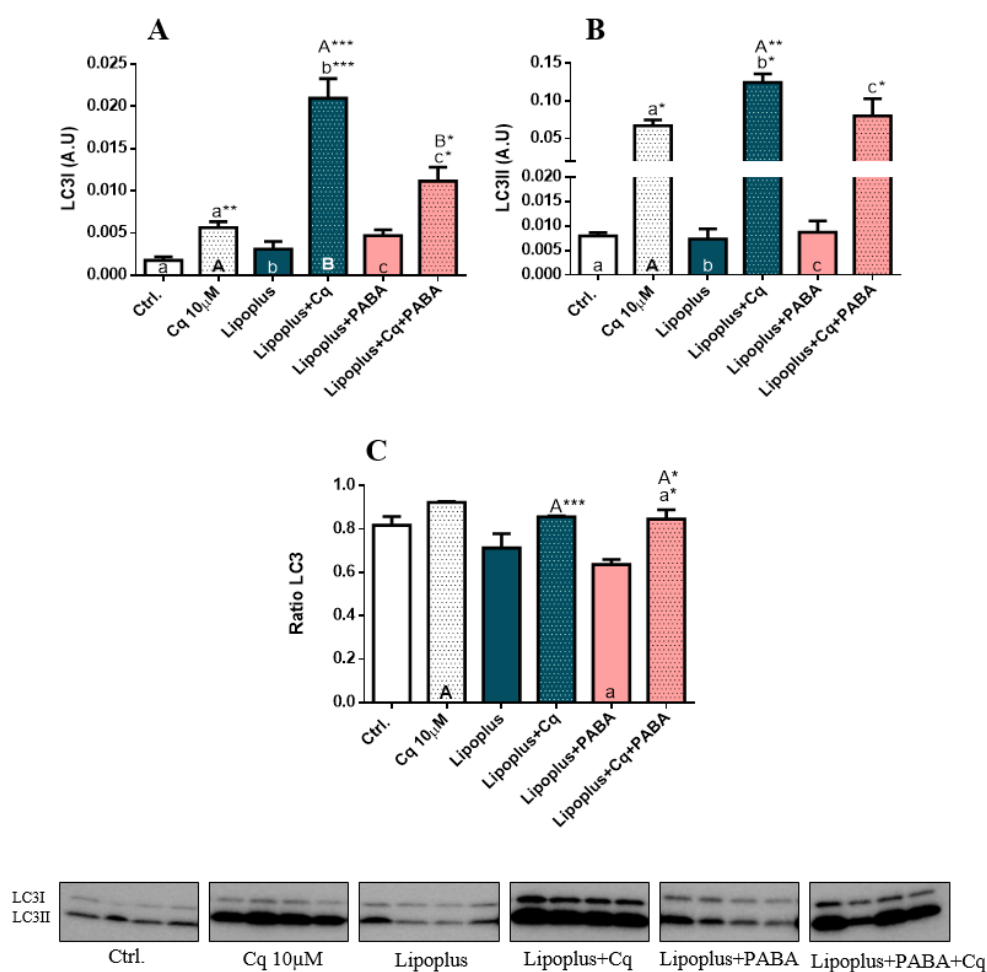


Figura He-20: Inhibición de la biosíntesis de Q con PABA y niveles de LC en extractos totales de células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con Lipoplus, cloroquina (Cq) y del tratamiento combinado con Lipoplus+PABA sobre los niveles de expresión de LC3I (A), LCII (B) y la ratio de LC3 (LC3II/ (LC3I+LC3II)) (C). Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero y las últimas 18h en presencia de Cq (en el caso que procediese). La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas halladas entre condiciones experimentales se atribuyen letras minúsculas a los distintos tratamientos simples y letras mayúsculas a los distintos tratamientos combinados con Cq, representándose en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (* ($p < 0.05$), ** $p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

Las observaciones anteriores podrían indicar que el incremento en la síntesis de Q que se produce como respuesta al tratamiento con la emulsión Lipoplus, podría estar jugando un papel importante a nivel del procesamiento de pro-LC3 a LC3I, ya que es a

este nivel dónde observamos una caída de los niveles en presencia de PABA (figura He-20A).

Los niveles de LC3II se incrementaron nuevamente en presencia del tratamiento con Lipoplus+Cq, mientras que, aunque se observó una leve tendencia a la disminución de los mismos en presencia de PABA, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (figura He-20B).

Finalmente, la ratio de ambas formas de la proteína LC3 disminuyó significativamente en células tratadas con Lipoplus+Cq frente a tratadas sólo con Cq, mientras que el tratamiento con Lipoplus+PABA+Cq disminuyó este parámetro frente a las células sometidas al tratamiento simple (Lipoplus+PABA) y a las tratadas con Cq (figura He-20C). Como puede observarse en la ratio calculada a partir de este blot, encontramos cambios significativos entre las condiciones Lipoplus +Cq y Cq, mientras que en otro experimento donde se recrearon estas mismas condiciones no se observaron dichas diferencias (figura He-16C). Esta inconsistencia puede deberse a que este parámetro se calcula a partir de una operación matemática donde pequeñas variaciones pueden suponer diferencias significativas importantes. No obstante, los niveles de ambas proteínas responden de igual manera al tratamiento con Lipoplus en ambos experimentos.

Estos mismos resultados se ponen de manifiesto en las dinámicas de las proteínas LC3I y LC3II (estimadas a partir de la diferencia entre los niveles de éstas en presencia y ausencia de Cq), que se incrementaron significativamente con respecto al control en el caso del tratamiento con Lipoplus, mientras que disminuyeron en presencia de PABA (figura He-21). Cabe destacar cómo es necesaria la adición de Cq para observar los cambios en los niveles de estas proteínas marcadoras del proceso de autofagia. Este hecho denota que el incremento en el flujo autofágico producido por la emulsión no permite observar los niveles reales de LC3I y II, ya que éstos están sometidos a un rápido balance entre síntesis y degradación, por lo que es necesaria la utilización de un bloqueo de dicho flujo (proporcionado por el tratamiento conjunto en presencia de Cq) para tener así una estimación neta adecuada de la entrada del marcador en la ruta autofágica.

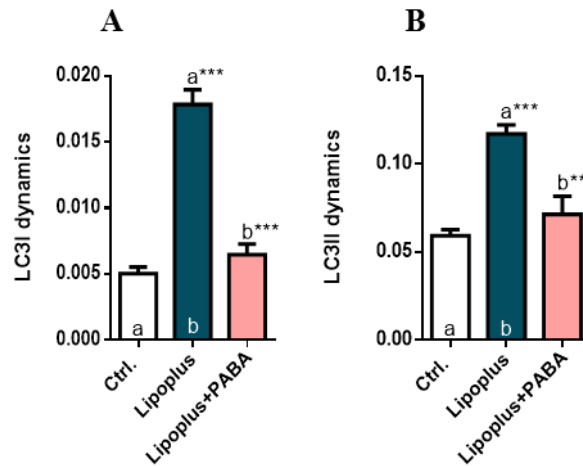


Figura He-21: Efecto de la inhibición de la biosíntesis de Q sobre la dinámica de LC3. Efecto del tratamiento simple con Lipoplus y combinado con Lipoplus+PABA sobre la dinámica de LC3I (A) y LC3II (B). Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas halladas entre condiciones experimentales se atribuyen letras a los distintos tratamientos representadas en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$)) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

A la vista de los resultados obtenidos en presencia de Lipoplus+PABA, nuestras observaciones son compatibles con el hecho de que el incremento de Q producido por la emulsión podría estar regulando, al menos en parte, las etapas finales de la ruta de autofagia. Por tanto, nos planteamos si esta posible regulación se llevaba a cabo de igual manera cuando el Q era sintetizado de manera endógena, por la propia célula, o cuando esta molécula provenía de aporte exógeno. Para ello, se trataron las células con un suplemento de Q₁₀ exógeno (5 μ M) y se cuantificaron los niveles de las proteínas p62 y LC3. Además, se introdujo nuevamente el tratamiento combinado con Cq para observar los efectos del tratamiento a nivel de formación de autofagosomas.

En la figura HA-22A se representan los niveles de p62 en respuesta a los diferentes tratamientos. Como podemos observar, los niveles de esta proteína no se vieron afectados por el suplemento con Q₁₀, aunque se detectó una leve tendencia a la disminución en la expresión de la misma con respecto al control que no fue estadísticamente significativa. Como era de esperar, los tratamientos combinados con Cq incrementaron de manera notable los niveles de p62 con respecto a sus correspondientes tratamientos simples. La dinámica de p62, por su parte, tampoco experimentó cambios en células tratadas con el suplemento de Q₁₀ con respecto a células no tratadas (figura He-22B).

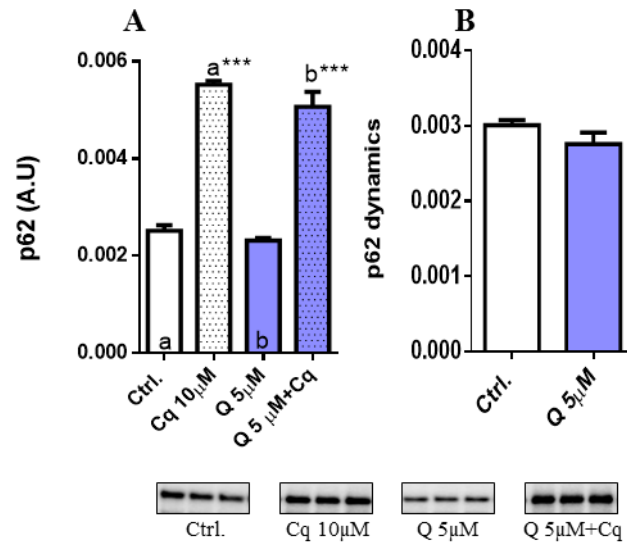


Figura He-22: Efecto del suplemento con Q₁₀ exógeno sobre los niveles de p62 (A) y la dinámica de la proteína (B) en extractos totales de células Hepa 1.6. Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero y las últimas 18h en presencia de Cq (en el caso que procediese). La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 3 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas halladas entre condiciones experimentales se atribuyen letras a los distintos tratamientos representándose en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (***) ($p < 0.001$) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

En relación a LC3I, sus niveles en respuesta al suplemento con Q₁₀, se representan en la figura He-23A. Como puede observarse, se produjo un incremento significativo de LC3I en células tratadas con el suplemento de Q frente a las no tratadas. Además, quedó patente un llamativo aumento de esta proteína en células tratadas con Q +Cq frente a las tratadas únicamente con Cq. Estos resultados son compatibles con la interpretación de que el tratamiento Q₁₀ exógeno actúa a nivel del procesamiento de pro LC3 a LCI.

El suplemento de Q₁₀ incrementó de manera significativa los niveles de LC3II con respecto al control. Nuevamente, el tratamiento con Cq aumentó muy llamativamente la expresión de esta proteína frente a las células provenientes de los tratamientos simples (figura He-23B).

Por último, la ratio entre las dos formas de LC3 aumentó significativamente en respuesta a los tratamientos combinados en presencia de Cq, al compararlos con sus correspondientes tratamientos simples. Además, este valor disminuyó de manera

4. Resultados

significativa con el tratamiento Q+Cq frente a la ratio alcanzada con el tratamiento sólo con Cq (figura He-23C).

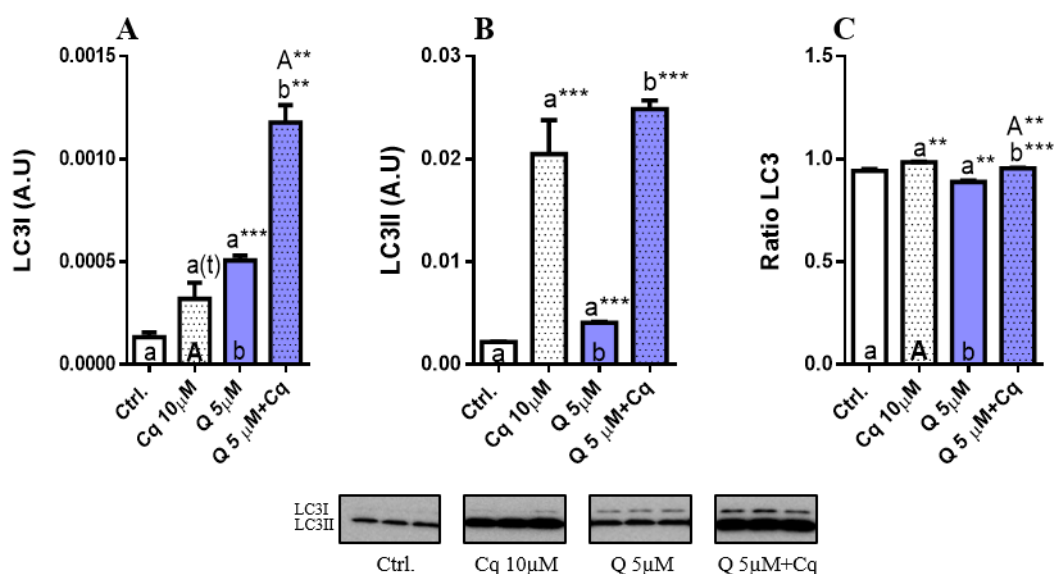


Figura He-23: Efecto del suplemento con Q₁₀ exógeno sobre los niveles de LC3 en extractos totales de células Hepa 1.6. Efecto del tratamiento con Q₁₀ y cloroquina (Cq) sobre los niveles de LC3I (A), LC3II (B) y la ratio de LC3 (LC3II/ (LC3I+LC3II)) (C). Las células fueron tratadas durante 48 h con los distintos tratamientos de las cuales las últimas 24 h fueron en retirada de suero y las últimas 18h en presencia de Cq (en el caso que procediese). La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 3 réplicas para cada condición experimental. Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas halladas entre condiciones experimentales se atribuyen letras minúsculas a los distintos tratamientos simples y la letra “A” al tratamiento con Cq, representándose en el interior de cada columna. Cuando estas letras aparecen sobre columnas y acompañadas de asteriscos (** $p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola) indican diferencias significativas entre esa condición y el tratamiento al que corresponda dicha letra.

Para finalizar con el análisis de los efectos del aporte de Q₁₀ sobre las últimas etapas de la ruta de autofagia, se determinaron las dinámicas de LC3I y LC3II en presencia de este tratamiento (figura He-24). Como pudo observarse, este tratamiento produjo un incremento muy significativo de la dinámica de LC3I con respecto a las condiciones control, mientras que sólo tendió a aumentarlo en el caso de LC3II.

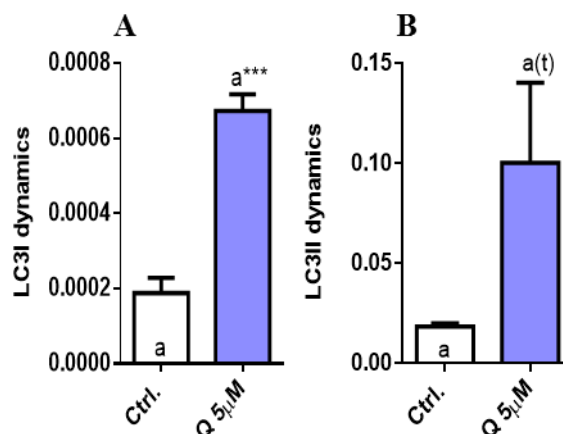


Figura He-24: Efecto del suplemento con Q₁₀ exógeno sobre la dinámica de LC3. Efecto del tratamiento con Q₁₀ sobre la dinámica de LC3I (A) y LC3II (B). Para simplificar la interpretación de las diferencias estadísticas halladas entre condiciones experimentales se atribuye la letra “a” a la condición control. Cuando ésta aparece sobre la columna Q₁₀ 5 μ M acompañada de asteriscos (***) ($p < 0.001$) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola) indica las diferencias existentes entre el control y el suplemento de Q₁₀.

4.3. Autofagia, estrés oxidativo y mitocondria. Efectos del envejecimiento, la restricción calórica y el componente graso de la dieta en músculo esquelético como modelo de tejido post-mitótico

4.3.1. Efecto de las intervenciones dietéticas y el envejecimiento sobre la autofagia en músculo esquelético. Análisis cuantitativo ultraestructural

Con el fin de determinar si el envejecimiento y las intervenciones nutricionales produjeron cambios en la ruta autofágica de músculo esquelético, se llevó a cabo en primer lugar un análisis de imágenes de microscopía electrónica en busca de figuras relacionadas con autofagia. En estas imágenes se analizó el tamaño y forma de dichas figuras, determinando su área y perímetro. Además, se diferenció entre zonas del tejido; es decir, se analizaron diferencialmente las figuras observadas en zonas intermiofibrilares y zonas subsarcolémicas del músculo. Por último, también se determinó la abundancia de estas figuras por unidad de área (datos representados bajo el parámetro “Na”) y el volumen de célula ocupado por las mismas (datos representados bajo el parámetro “Vv”).

Tal y como se observa en la figura Mu-1A, se produjo una disminución significativa en el tamaño de las figuras de autofagia de las zonas intermiofibrilares en respuesta al envejecimiento, puesto que en el grupo control el área de las figuras encontradas en los animales de 21 meses de edad (tras 18 meses de intervención) fue menor que en los animales de 9 meses (tras 6 meses de intervención). Cuando se compararon las figuras autofágicas de los animales viejos sometidos a restricción calórica (RC) con las del grupo control de la misma edad, encontramos que las primeras mostraron un mayor tamaño (Ctrl.Soy18 vs. CR.Soy18m). Aunque las diferencias no fueron de gran extensión, éstas alcanzaron la significación estadística (figura Mu-1A).

Atendiendo a los efectos de la naturaleza de la grasa de la dieta en condiciones de RC, observamos cómo en animales alimentados con CR.Lard, volvió a observarse la disminución en el área de las figuras de autofagia asociada al envejecimiento, respuesta que, sin embargo, se pierde cuando la dieta fue CR.Fish (figura Mu-1). En intervenciones a medio plazo (6 meses) se observó una disminución en el tamaño de las figuras en respuesta a dietas cuya componente graso era rico en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), ya que este parámetro disminuyó significativamente con respecto a los animales alimentados con la dieta CR.Lard. Por último, tras 18 meses de intervención, observamos una disminución en el tamaño de las figuras autofágicas en animales alimentados con la dieta CR.Soy frente a CR.Lard, la cual no se encontró en el caso de la dieta CR.Fish (CR.Soy18m vs. CR.Fish 18m) (figura Mu-1A).

Por otro lado, analizando las figuras observadas en las zonas subsarcolémicas de las fibras musculares, vemos cómo existe una respuesta opuesta a la observada en zonas intermiofibrilares; es decir, a grandes rasgos se produce un incremento generalizado de las figuras de esta zona en respuesta al envejecimiento (figura Mu-1B).

Como hemos indicado previamente, el tamaño de las figuras de autofagia se incrementa significativamente en respuesta al envejecimiento en el caso de animales alimentados con la dieta control. Al analizar el efecto de la RC, observamos cómo se produjo un aumento notable en el tamaño de estas figuras en la intervención a medio plazo cuando la comparamos con el grupo de animales de la misma edad alimentados con la dieta control. En este caso no se observó el aumento en el tamaño de las figuras asociado al envejecimiento (CR.Soy 6m vs. CR.Soy 18m). No obstante, el tamaño

4. Resultados

alcanzado por las mismas a los 18 meses de intervención fue significativamente mayor (Ctrl.Soy 18m vs. CR.Soy 18m) (figura Mu-1B).

En cuanto al efecto de las distintas dietas en RC, observamos cómo la respuesta de animales alimentados con las dietas CR.Lard y CR.Soy fue sustancialmente la misma, mientras que aquellos animales que fueron alimentados con la dieta CR.Fish experimentaron un aumento en las figuras de autofagia similar al observado en animales control (figura Mu-1B). En los animales alimentados con la dieta CR.Fish, se produjo una disminución en el área de las figuras a los 6 meses de edad al compararla con la de los grupos alimentados con las otras dietas (CR.Lard 6m y CR.Soy 6m) lo que se tradujo en un posterior incremento de estas figuras a los 18 meses de intervención (figura Mu-1B).

Estos resultados ponen de manifiesto la respuesta diferencial a nivel de este parámetro de las distintas zonas de la fibra.

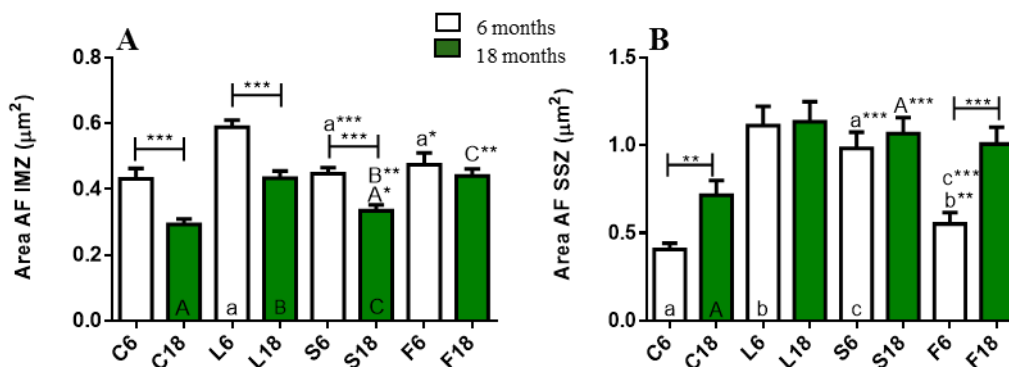


Figura Mu-1: Área de las figuras de autofagia en zonas intermiofibrilares y subsarcolemáticas. Alteraciones en el área de las figuras de autofagia de zonas intermiofibrilares (IMZ) (A) y subsarcolemáticas (SSZ) (B). Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 5-7 individuos de cada condición experimental de los cuales se analizó una media de 15 imágenes por individuo. En el eje de ordenadas aparecen las distintas intervenciones dietéticas (C6: Ctrl.Soy 6m, C18: Ctrl.Soy 18m, L6: CR.Lard 6m, L18: CR.Lard 18m, S6: CR.Soy 6m, S18: CR.Soy 18m, F6: CR.Fish 6m y F18: CR.Fish 18m). Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta las diferencias se representan con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asterisco, siendo * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) *** ($p < 0.001$). Para simplificar la interpretación de los datos cuando se hallan diferencias entre grupos de la misma edad pero diferente intervención nutricional se asigna una letra minúscula (en el caso de 6 meses de intervención) o mayúscula (en el caso de 18 meses) a las diferentes dietas representándose dentro de la correspondiente columna. Dicha letra acompañada de su correspondiente significación estadística se sitúa sobre la condición con respecto a la que presenta cambios.

Centrándonos ahora en el análisis del perímetro de las figuras de autofagia de la zona intermiofibrilar, vemos cómo se produjo una disminución generalizada en

respuesta al envejecimiento. En el grupo de animales control se observó una disminución del perímetro de las figuras de autofagia en animales viejos con respecto a animales jóvenes (Ctrl.Soy 6m vs. Ctrl.Soy 18m), ocurriendo de la misma manera en animales sometidos a RC dónde, además, se observó un ligero aumento del perímetro a los 18 meses de intervención con respecto al grupo control homólogo en edad (Ctrl.Soy 18m vs. CR.Soy 18m) (figura Mu-2A).

En cuanto al papel de la naturaleza de la grasa de la dieta, vemos cómo la disminución del perímetro en las figuras de autofagia se produjo igualmente en animales alimentados con las dietas CR.Lard y CR.Soy, pero no en aquellos alimentados con la dieta CR.Fish. A los 6 meses de intervención se observó una disminución en el perímetro de las figuras en animales alimentados con suplemento graso rico en PUFA con respecto a los individuos alimentados con una grasa rica en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA). En intervenciones largas (18 meses) se produjo un incremento en el perímetro de las figuras en el grupo de animales alimentado CR.Fish en comparación con aquéllos alimentados con la dieta CR.Soy (figura Mu-2A).

En las zonas subsarcolémicas, por su parte, no se observó una respuesta consistente en función de la edad. Tras 6 meses de intervención se observó un aumento en el perímetro de figuras de animales alimentados con la dieta CR.Soy en comparación con el grupo control (Ctrl.Soy 6m vs. CR.Soy 6m). Estos altos valores de perímetro se vieron disminuidos en animales alimentados con la dieta CR.Fish (CR.Lard 6m vs. CR.Fish 6m y CR.Soy 6m vs. CR.Fish 6m). Se produjo, además, una leve tendencia a la disminución en animales viejos alimentados con la dieta CR.Soy con respecto a su grupo homólogo de dieta a 6 meses (CR.Soy 6m vs. CR.Soy 18m) y un aumento significativo en el perímetro de figuras de animales alimentados con CR.Fish a los 18 meses con respecto al grupo alimentado con CR.Fish a los 6 meses (figura Mu-2B).

4. Resultados

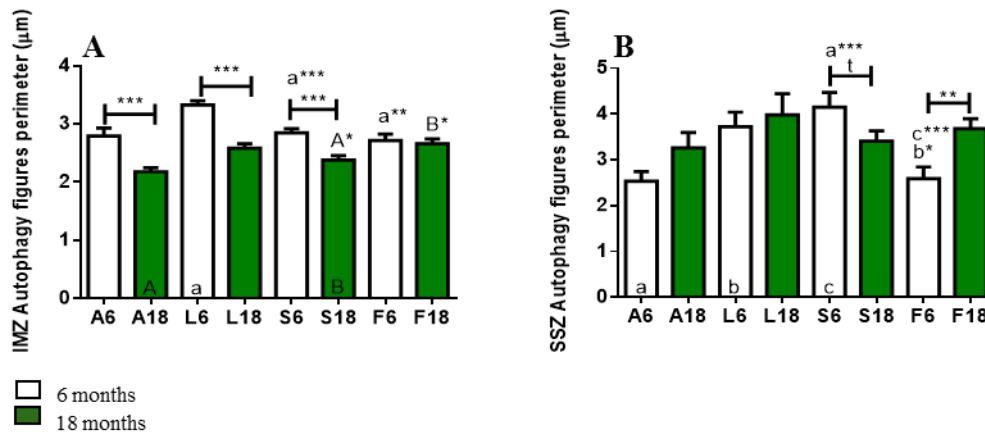


Figura Mu-2: Perímetro de las figuras de autofagia en zonas intermiofibrilares y subsarcolemáticas. Alteraciones en el perímetro de las figuras de autofagia de zonas intermiofibrilares (IMZ) (A) y subsarcolemáticas (SSZ) (B). Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 5-7 individuos de cada condición experimental de los cuales se analizó una media de 15 imágenes por individuo. En el eje de ordenadas aparecen las distintas intervenciones dietéticas (C6: Ctrl.Soy 6m, C18: Ctrl.Soy 18m, L6: CR.Lard 6m, L18: CR.Lard 18m, S6 :CR.Soy 6m, S18: CR.Soy 18m, F6: CR.Fish 6m y F18: CR.Fish 18m) Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta las diferencias se representan con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asteriscos, siendo * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) *** ($p < 0.001$) o la letra t ($p < 0.05$ utilizando un test estadístico de una cola). Para simplificar la interpretación de los datos cuando se hallan diferencias entre grupos de la misma edad pero diferente intervención nutricional se asigna una letra minúscula (en el caso de 6 meses de intervención) o mayúscula (en el caso de 18 meses) a las diferentes dietas representándose dentro de la correspondiente columna. Dicha letra acompañada de su correspondiente significación estadística se sitúa sobre la condición con respecto a la que presenta cambios.

Por otra parte, resultantes del análisis estereológico de las micrográficas encontramos las representaciones de densidad numérica (“Na”) y densidad de volumen (“Vv”) de las figuras de autofagia.

El parámetro “Na” representa la cantidad de figuras de autofagia presentes por μm^2 de área de referencia. Observamos cómo en la zona intermiofibrilar no se produjo alteración alguna de este parámetro en respuesta al envejecimiento en animales control, mientras que sí se observó una disminución generalizada de estos valores en las distintas dietas (CR.Lard y CR.Soy) en respuesta al envejecimiento, exceptuando el caso de la dieta CR.Fish, en la que los animales experimentaron un ligero aumento de “Na” entre animales jóvenes y viejos (CR.Fish 6m vs. CR.Fish 18m) (figura Mu-3A). A los 6 meses de intervención es cuando se producen las mayores alteraciones a nivel de este parámetro, ya que en animales sometidos a la dieta CR.Soy se produjo un fuerte incremento en “Na” con respecto al grupo control homólogo en edad (Ctrl.Soy 6m vs. CR.Soy 6m). Atendiendo al origen de la grasa de la dieta, la rica en MUFA fue la que produjo un mayor incremento de los niveles de este parámetro en intervenciones a

medio plazo, disminuyendo significativamente cuando el componente graso fue PUFA. Por su parte también se observó una disminución considerable en “Na” en animales sometidos a la dieta CR.Fish con respecto a los alimentados con la dieta CR.Soy (CR.Soy 6m vs. CR.Fish 6m) (figura Mu-3A).

En las zonas subsarcolémicas, por su parte, los efectos observados como consecuencia del envejecimiento y la dieta, coincidieron sustancialmente con los observados en las zonas intermiofibrilares de la fibra muscular. Mientras que en el grupo control no se observaron cambios ligados a la edad, en los animales que fueron alimentados con las dietas CR.Lard y CR.Soy sí que se observó una disminución significativa de este parámetro entre animales viejos y jóvenes, perdiéndose cualquier tipo de diferencia cuando la dieta aportada fue CR.Fish (figura Mu-3B). Nuevamente, a los 6 meses de intervención es cuando se producen las alteraciones más llamativas, ya que los animales sometidos a RC presentaron una tendencia al incremento de “Na” con respecto a los controles. Además, los animales alimentados con las dietas CR.Lard y CR. Soy durante 6 meses, fueron los que tuvieron una mayor cantidad de figuras de autofagia por área de referencia, las cuales se vieron disminuidas en la dieta CR.Fish (CR.Lard 6m vs. CR.Fish 6m y CR.Soy 6m vs. CR.Fish 6m) (figura Mu-3B).

4. Resultados

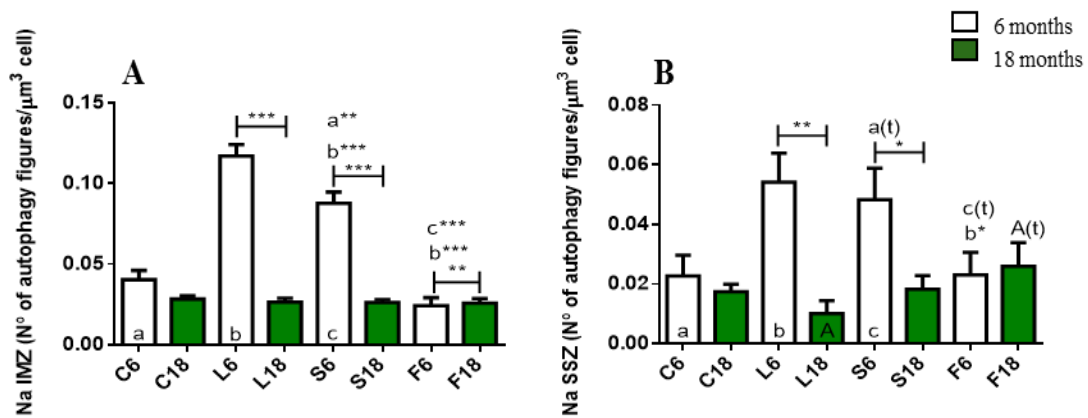


Figura Mu-3: Densidad numérica de las figuras de autofagia en zonas intermiofibrilares y subsarcolemáticas.

Alteraciones en la densidad numérica (“Na”) de las figuras de autofagia de zonas intermiofibrilares (IMZ) (A) y subsarcolemáticas (SSZ) (B). Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 5-7 individuos de cada condición experimental de los cuales se analizó una media de 15 imágenes por individuo. En el eje de ordenadas aparecen las distintas intervenciones dietéticas (C6:Ctrl.Soy 6m, C18: Ctrl.Soy 18m, L6: CR.Lard 6m, L18: CR.Lard 18m, S6: CR.Soy 6m, S18: CR.Soy 18m, F6: CR.Fish 6m y F18: CR.Fish 18m) Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta las diferencias se representan con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asterisco, siendo * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) *** ($p < 0.001$) y t ($p < 0.05$ utilizando un test estadístico de una cola). Para simplificar la interpretación de los datos cuando se hallan diferencias entre grupos de la misma edad pero diferente intervención nutricional se asigna una letra minúscula (en el caso de 6 meses de intervención) o mayúscula (en el caso de 18 meses) a las diferentes dietas representándose dentro de la correspondiente columna. Dicha letra acompañada de su correspondiente significación estadística se sitúa sobre la condición con respecto a la que presenta cambios.

La densidad de volumen (“Vv”), por su parte, representa el volumen que ocupan las figuras de autofagia en comparación con el volumen celular. Podemos observar cómo en las zonas intermiofibrilares se produjo un incremento en el volumen que ocupan estas figuras en animales viejos sometidos a la dieta control con respecto a animales jóvenes, ocurriendo de manera opuesta en animales sometidos a RC, donde este parámetro disminuye (figura Mu-4A). Este mismo efecto, en el sentido de un aumento con la edad, se observó en animales sometidos a la dieta CR.Fish (figura Mu-4A).

Se observó, además, un incremento de “Vv” en animales sometidos a CR.Soy durante 6 meses en comparación con sus homólogos de edad del grupo control (Ctrl.Soy 6m vs. CR.Soy 6m) (figura Mu-4A). Atendiendo al componente graso de la dieta, vimos cómo la respuesta más llamativa se produjo a los 6 meses de intervención, donde la

4. Resultados

dieta CR.Lard disparó los valores de “Vv” con respecto a los alcanzados con las dietas CR.Soy y CR.Fish (figura Mu-4A).

Para concluir con el estudio estereológico, se determinó el parámetro “Vv” en las zonas subsarcolémicas. En la figura Mu-4B observamos cómo se produjo un incremento muy significativo en este parámetro en respuesta al envejecimiento en los grupos control (Ctrl.Soy 6m vs. Ctrl.Soy 18m), mientras que no se observó modificación alguna en estos niveles en animales sometidos a RC en función de la edad (CR.Soy 6m vs. CR.Soy 18m). Una vez más, se volvió a encontrarla misma respuesta que la experimentada en el grupo control cuando la dieta suministrada fue CR.Fish (CR.Fish 6m vs. CR.Fish 18m). En los animales sometidos a RC a medio plazo se observó un aumento de “Vv” en comparación con el grupo control homólogo en edad (Ctrl.Soy 6m vs. CR.Soy 6m). Analizando el componente graso de la dieta, sólo se observaron diferencias a los 6 meses de intervención, dónde los niveles de “Vv” observados en animales alimentados con la dieta CR.Fish disminuyeron con respecto a los alcanzados en el grupo de CR.Lard (CR.Lard 6m vs. CR.Fish 6m) (figura Mu-4B).

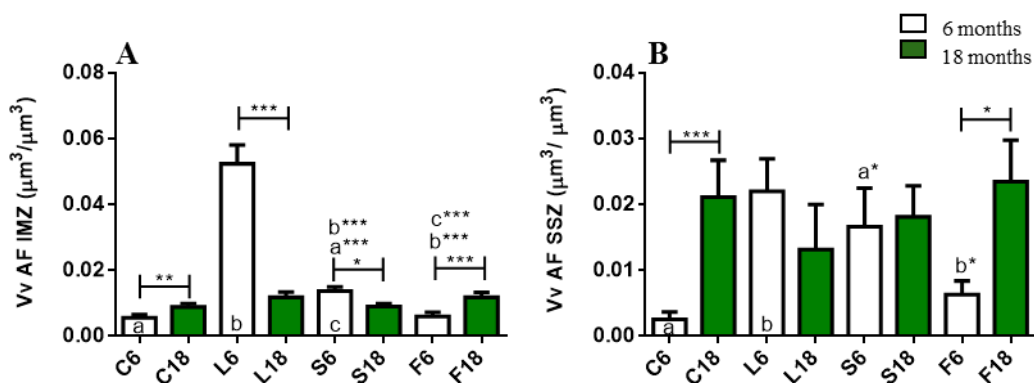


Figura Mu-4: Densidad de volumen de las figuras de autofagia en zonas intermiofibrilares y subsarcolémicas.

Alteraciones en la densidad de volumen (“Vv”) de las figuras de autofagia de zonas intermiofibrilares (IMZ) (A) y subsarcolémicas (SSZ) (B). Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 5-7 individuos de cada condición experimental de los cuales se analizó una media de 15 imágenes por individuo. En el eje de ordenadas aparecen las distintas intervenciones dietéticas (C6:Ctrl.Soy 6m, C18: Ctrl.Soy 18m, L6: CR.Lard 6m, L18: CR.Lard 18m, S6: CR.Soy 6m, S18: CR.Soy 18m, F6: CR.Fish 6m y F18: CR.Fish 18m) Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta las diferencias se representan con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asterisco, siendo * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) *** ($p < 0.001$). Para simplificar la interpretación de los datos cuando se hallan diferencias entre grupos de la misma edad pero diferente intervención nutricional se asigna una letra minúscula (en el caso de 6 meses de intervención) o mayúscula (en el caso de 18 meses) a las diferentes dietas representándose dentro de la correspondiente columna. Dicha letra acompañada de su correspondiente significación estadística se sitúa sobre la condición con respecto a la que presenta cambios.

4. Resultados

A continuación se muestran dos paneles de figuras donde se representan ejemplos de las imágenes de microscopía electrónica tomadas y analizadas para la realización del presente estudio cuantitativo y ultraestructural.

En el primero de ellos (figura Mu-5) se muestran cortes transversales de fibras musculares rojas de gastrocnemio de ratones sometidos a las diferentes intervenciones nutricionales. En ellas se muestra el aspecto general que presentan estas células cuando se examinan al microscopio electrónico, además de diferenciarse las zonas subsarcolémicas e intermiofibrilares a las que nos hemos referido previamente en este capítulo de resultados. En estas imágenes además se pueden apreciar mitocondrias alteradas en ambas localizaciones las cuales, muy posiblemente, sufran procesos de autofagia selectiva (mitofagia). Para una observación más detallada de estas mitocondrias alteradas, así como de figuras vinculadas directamente con el proceso autofágico (autofagosomas) en la figura Mu-6 se muestran ejemplos significativos de dichas estructuras.

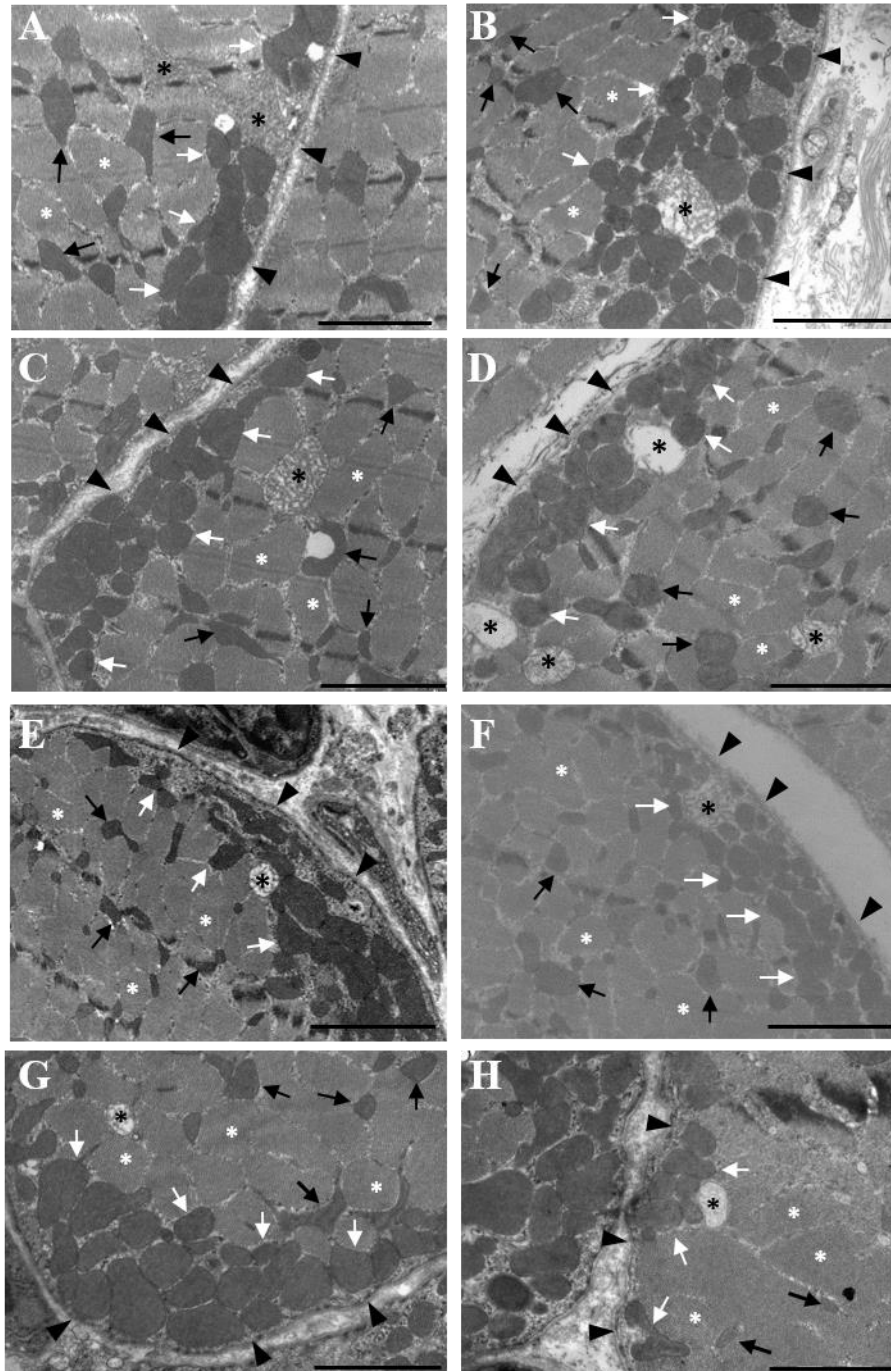


Figura Mu-5: Fibras rojas cortadas transversalmente procedentes del músculo gastrocnemio de ratones sometidos a las distintas intervenciones nutricionales observadas mediante microscopía electrónica. En ellas se diferencian dos poblaciones de mitocondrias, las subsarcolémicas (flechas blancas) localizadas entre el plasmalema (puntas de flecha negras) y las miofibrilares (asteriscos blancos) y las intermiofibrilares (flechas negras) localizadas entre las miofibrillas en el sarcoplasma. Las mitocondrias con morfología alterada se marcan con asteriscos negros. Cada imagen se corresponde con: A, animales alimentados con la dieta Ctrl.Soy 6m, B con la dieta CR.Lard 6m, C con la dieta CR.Soy 6m, D con la dieta CR.Fish 6m, E con la dieta Ctrl.Soy 18m, F con la dieta CR.Lard 18m, G con la dieta CR.Soy 18m y H con la dieta CR.Fish 18m. Las barras que aparecen en la esquina inferior derecha de cada imagen se corresponden con la escala 2 μ m.

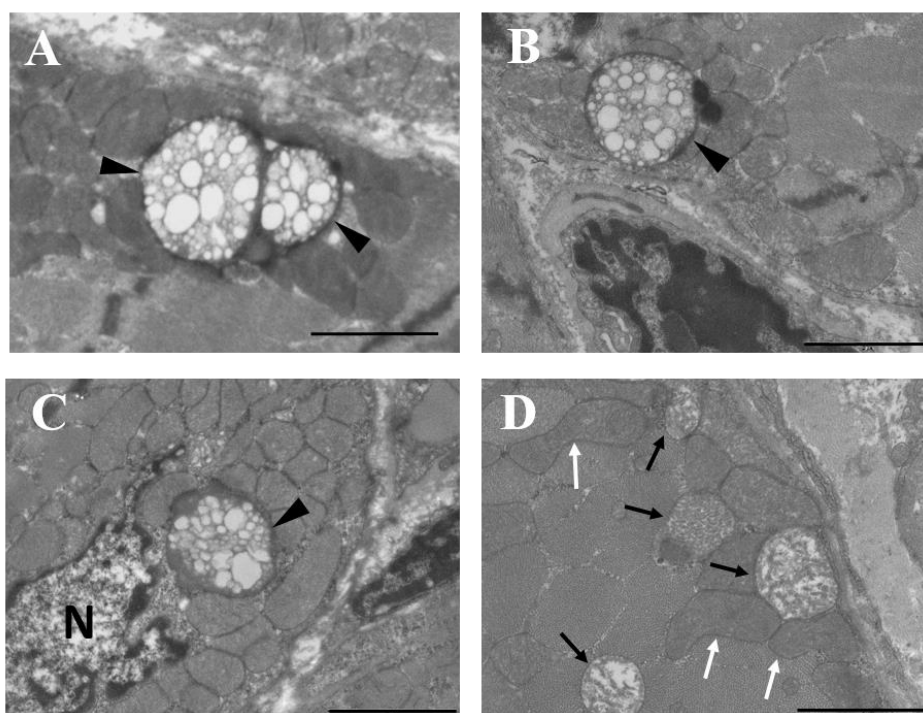


Figura Mu-6. Figuras de autofagia y mitocondrias alteradas en fibras de músculo esquelético. Autofagosomas (marcados con puntas de flecha) en fibras musculares de animales control tras 18 meses de intervención (A) o en animales sometidos a restricción calórica durante este mismo periodo (B, animales alimentados con la dieta CR.Lard 18m y C, animales alimentados con la dieta CR.Fish 18m). Estas estructuras se localizaron principalmente en las zonas subsarcolémicas de la fibra muscular. En la figura D se muestran algunas mitocondrias con estructura alterada en zonas subsarcolémicas e intermiofibrilares (flechas negras), mientras que las mitocondrias inalteradas se marcan con flechas blancas. La letra N corresponde al núcleo. Las barras que aparecen en la esquina inferior derecha de cada imagen se corresponden con la escala 2 μ m.

4.3.2. Análisis de efectores de la ruta de autofagia y posible efecto de las intervenciones nutricionales y el envejecimiento

Con el fin de determinar si las modificaciones ultraestructurales observadas en las figuras de autofagia de los distintos grupos experimentales tenían un reflejo directo a nivel de la expresión de distintos marcadores de la ruta autofágica y viceversa, se llevó a cabo la determinación de los niveles de distintos efectores de la ruta mediante western blot.

El primer marcador analizado fue la proteína Beclina 1. Tal y como puede observarse en la figura Mu-7A, se produjo un incremento significativo en la expresión de esta proteína en respuesta al envejecimiento (Ctrl.Soy 6m vs. Ctrl.Soy 18m), efecto que tiende a desaparecer en condiciones de RC, donde no se observaron diferencias

4. Resultados

significativas. Tampoco se observaron cambios en los niveles de esta proteína en respuesta al componente al componente graso de la dieta en condiciones de RC (figura Mu-7B).

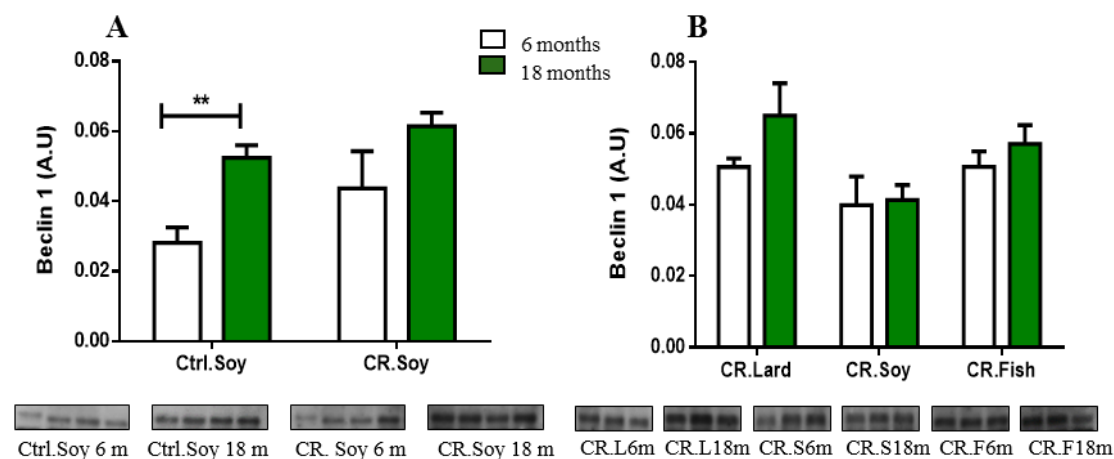


Figura Mu-7: Niveles de Beclina 1 en homogenado total de músculo esquelético de los distintos grupos dietéticos. Efecto de la restricción calórica (A) y del componente graso de la dieta en condiciones de restricción calórica (B) sobre los niveles de Beclina 1 tras 6 y 18 meses de intervención. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 3-4 individuos de cada condición experimental. Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta las diferencias se representan con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asterisco, siendo ** ($p < 0.01$). En las figuras de los blots de tres dietas las letras L, S y F, se corresponden con las dietas Lard, Soy y Fish, respectivamente.

Otro de los marcadores analizados en homogenado total de músculo fue p62. Como observamos en la figura Mu-8 los niveles de p62 se incrementaron de manera muy significativa en función de la edad (Ctrl.Soy 6m vs. Ctrl.Soy 18m), hecho que podría estar indicando un bloqueo del flujo autofágico como consecuencia del envejecimiento [305, 306] su parte, en animales sometidos a RC observamos cómo se perdió este efecto, equiparándose la expresión de este marcador en ambos grupos de edad (CR.Soy 6m vs. CR.Soy 18m). Cabe destacar que a los 6 meses de intervención se produjo un aumento significativo en la expresión de p62 en animales alimentados con la dieta CR.Soy frente al grupo control homólogo en edad (Ctrl.Soy 6m vs. CR.Soy 6m), mientras que en intervenciones más largas (18 meses), los animales sometidos a RC presentaron unos niveles significativamente más bajos de esta proteína en comparación con su respectivo grupo control (figura Mu-8A). Estos resultados parecen indicar que la RC, al menos a nivel de este marcador, estaría favoreciendo una mejora en el flujo autofágico, el cual se ve mermado como causa del envejecimiento.

4. Resultados

Atendiendo ahora a la naturaleza de la grasa de la dieta, no se observaron cambios a nivel de este marcador con excepción de los grupos alimentados con CR.Lard, dónde se observó un incremento significativo en función de la edad (CR.Lard 6m vs. CR.Lard18) (figura Mu-8B).

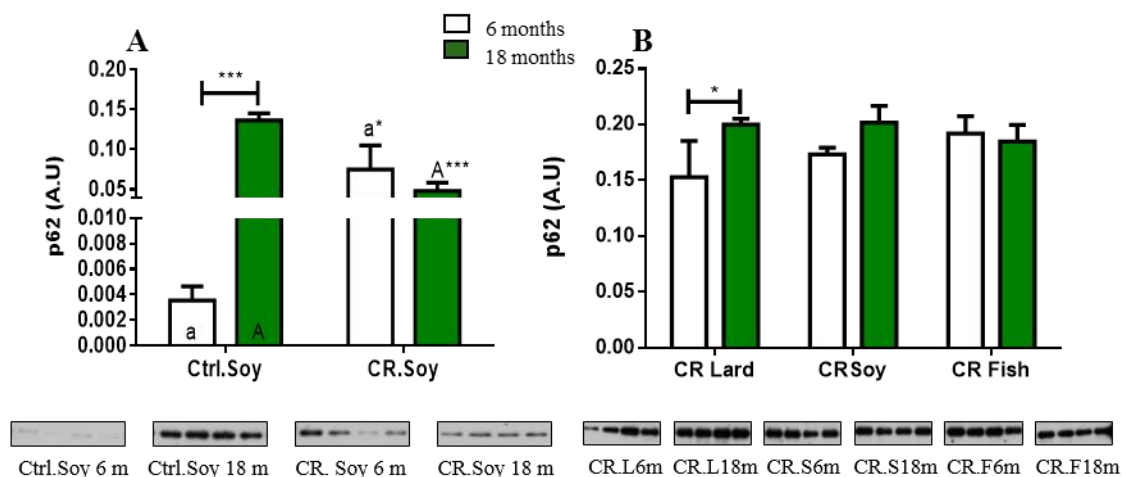


Figura Mu-8: Niveles de p62 en homogenado total de músculo esquelético de los distintos grupos dietéticos. Efecto de la restricción calórica (A) y del componente graso de la dieta en condiciones de restricción calórica (B) sobre los niveles de p62 tras 6 y 18 meses de intervención. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 individuos de cada condición experimental. Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta las diferencias se representan con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asterisco (* (p<0.05) y *** (p < 0.001)). Para simplificar la interpretación de los datos cuando se hallan diferencias entre grupos de la misma edad pero diferente intervención nutricional se asigna una letra minúscula (en el caso de 6 meses de intervención) o mayúscula (en el caso de 18 meses) a las diferentes dietas representándose dentro de la correspondiente columna. Dicha letra acompañada de su correspondiente significación estadística se sitúa sobre la condición con respecto a la que presenta cambios. En las figuras de los blots de tres dietas las letras L, S y F, se corresponden con las dietas Lard, Soy y Fish, respectivamente.

Otro marcador importante en la ruta de autofagia es la proteína LC3, concretamente sus formas procesadas LC3I y LC3II. En la figura Mu-9 se muestran los niveles de expresión de estos marcadores en animales sometidos a las distintas intervenciones nutricionales. En primer lugar, observamos cómo en condiciones control no se produjo modificación alguna en los niveles de LC3I en respuesta al envejecimiento. No obstante, sí se observó una llamativa disminución en la expresión de esta proteína en los grupos de animales sometidos a RC en respuesta a la edad (CR.Soy 6m vs. CR.Soy 18m) (figura Mu-9A). Además, se observó un incremento significativo de LC3I a los 6 meses de intervención en comparación con su grupo homólogo de edad alimentado con

la dieta control (Ctrl.Soy 6m vs. CR.Soy 6m). Los niveles de expresión de esta proteína tendieron a ser significativamente menores a los 18 meses de intervención en animales alimentados con la dieta CR.Soy frente a aquellos alimentados con la dieta Ctrl.Soy (figura Mu-9A).

Por su parte, atendiendo al componente graso de la dieta en condiciones de RC, observamos una disminución generalizada en los niveles de LC3I con el envejecimiento en todas las dietas suministradas, siendo algo más atenuada en el caso del grupo alimentado con la dieta CR.Soy. A los 6 meses de intervención se observó una disminución en los niveles de esta proteína en animales sometidos a la dieta CR.Soy frente al grupo alimentado con la dieta CR.Lard. Esta disminución fue revertida cuando la dieta suministrada fue CR.Fish (CR.Soy 6m vs. CR.Fish 6m). Por su parte, en el caso de intervenciones más largas se observó un aumento en los niveles de LC3I en el grupo de individuos sometidos a la dieta CR.Fish con respecto a su homólogo en edad alimentado con la dieta CR.Soy (figura Mu-9B).

4. Resultados

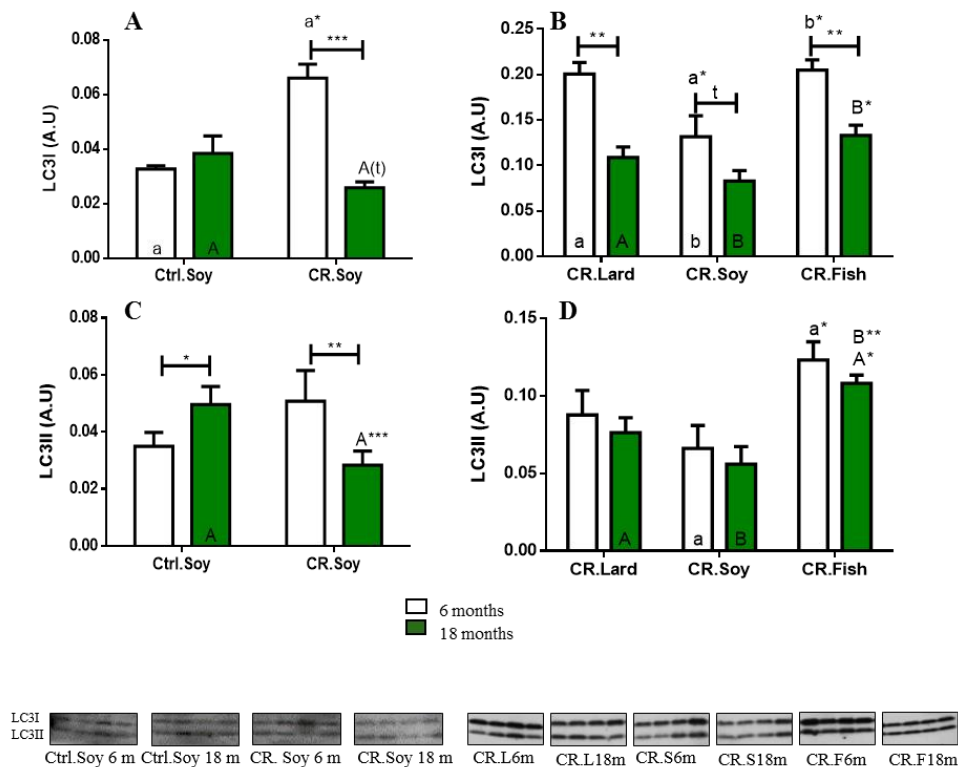


Figura Mu-9: Niveles de LC3I y LC3II en homogenado total de músculo esquelético de los distintos grupos dietéticos. Efecto de la restricción calórica (A y C) y del componente graso de la dieta en condiciones de restricción calórica (B y D) sobre los niveles de LC3I y LC3II tras 6 y 18 meses de intervención. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 individuos de cada condición experimental. Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta las diferencias se representan con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asterisco (* ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola). Para simplificar la interpretación de los datos cuando se hallan diferencias entre grupos de la misma edad pero diferente intervención nutricional se asigna una letra minúscula (en el caso de 6 meses de intervención) o mayúscula (en el caso de 18 meses) a las diferentes dietas representándose dentro de la correspondiente columna. Dicha letra acompañada de su correspondiente significación estadística se sitúa sobre la condición con respecto a la que presenta cambios. En las figuras de los blots de tres dietas las letras L, S y F, se correspondieron con las dietas Lard, Soy y Fish, respectivamente.

Analizando los niveles de expresión de LC3II, observamos que se produjo un incremento asociado a la edad en los grupos control. Este resultado fue revertido por completo en animales sometidos a RC, donde se encontró una disminución en los niveles de este marcador entre animales jóvenes y viejos. Además, la expresión alcanzada en el grupo de animales viejos sometidos a RC fue significativamente menor que la observada en el grupo control de la misma edad (Ctrl.Soy 18m vs. CR.Soy 18m) (figura Mu-9C). Por su parte, no se observaron cambios significativos de LC3II en función de las distintas grasas suministradas en condiciones de RC en relación con el

4. Resultados

envejecimiento. A pesar de ello, fue el grupo sometido a la dieta con CR.Fish el que alcanzó unos niveles más altos de este marcador en ambos periodos de intervención (figura Mu-9D).

Por último, la ratio de ambas formas de la proteína LC3 se representa en la figura Mu-10. Cómo se puede observar, no se produjo alteración alguna en la ratio de LC3 entre los grupos sometidos a dieta control, pero sí observamos un incremento significativo de este parámetro en condiciones de RC, donde la ratio se incrementa con el envejecimiento. Esta ratio, por otro lado, se ve disminuida los 6 meses de intervención al comparar el grupo control con el grupo alimentado con la dieta CR.Soy (figura Mu-10A). Centrándonos en el componente graso de la dieta en condiciones de RC, se produjo una tendencia generalizada de esta ratio a aumentar en función de la edad, aunque sólo fue estadísticamente significativa en el caso de animales alimentados con las dietas CR.Fish (CR.Fish 6 vs. CR.Fish 18m). Además, en los animales viejos sometidos a esta dieta encontramos una ratio mayor en comparación con la obtenida para individuos sometidos a la dieta CR.Soy (figura Mu-10B).

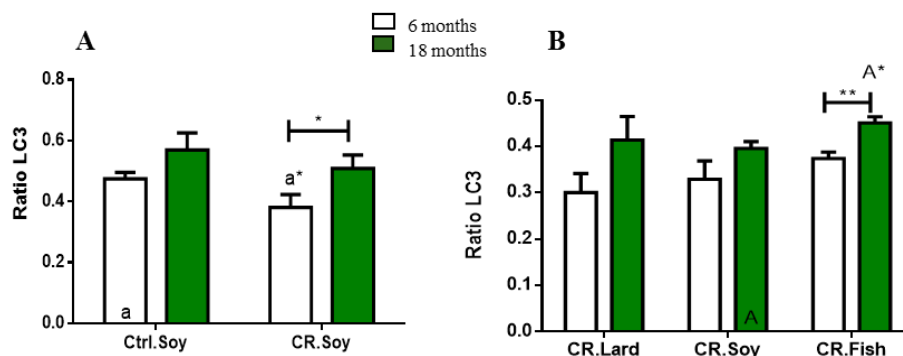


Figura Mu-10: Ratio LC3. Efecto de la restricción calórica (A) y del componente graso de la dieta en condiciones de restricción calórica (B) sobre la ratio de LC3 (LC3II/LC3I+LC3II) tras 6 y 18 meses de intervención. Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta las diferencias se representan con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asterisco (* ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$)). Para simplificar la interpretación de los datos cuando se hallan diferencias entre grupos de la misma edad pero diferente intervención nutricional se asigna una letra minúscula (en el caso de 6 meses de intervención) o mayúscula (en el caso de 18 meses) a las diferentes dietas representándose dentro de la correspondiente columna. Dicha letra acompañada de su correspondiente significación estadística se sitúa sobre la condición con respecto a la que presenta cambios.

Complementaria a la caracterización de la ruta general de autofagia llevada a cabo en muestras de músculo esquelético, se llevaron a cabo también determinaciones de los niveles de proteínas involucradas en la degradación autofágica específica de mitocondrias (mitofagia), concretamente de PINK1 y Parkin [2, 53].

4. Resultados

El primer marcador determinado fue PINK1. Tal y como aparece en la figura Mu-11A, los niveles de esta proteína no se vieron alterados por el envejecimiento y tampoco como consecuencia de la RC. No obstante, cuando analizamos el efecto del componente graso de la de la dieta en condiciones de RC, observamos cómo en los animales alimentados con la dieta de CR.Lard se produjo un incremento significativo en los niveles de esta proteína en animales viejos frente a jóvenes (CR.Lard 6m vs. CR.Lard 18m). Además, los niveles de PINK1 alcanzados con la dieta rica en MUFA fueron significativamente mayores que los obtenidos en el resto de grupos animales alimentados con las dietas CR.Soy y CR.Fish, tanto en intervenciones a medio plazo (6 meses) como a largo (18 meses) (figura Mu-11B).

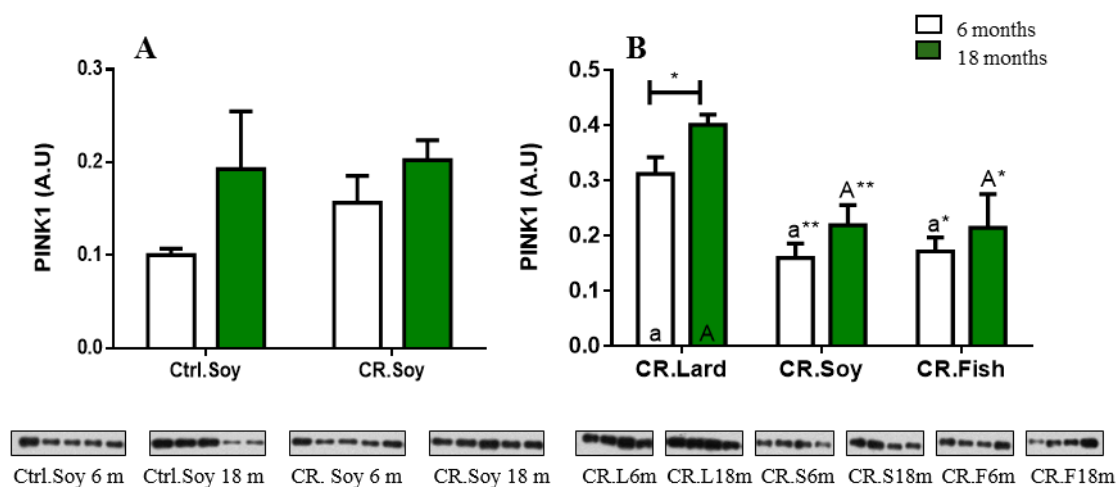


Figura Mu-11: Niveles de PINK1 en homogenado total de músculo esquelético de los distintos grupos dietéticos. Efecto de la restricción calórica (A) y del componente graso de la dieta en condiciones de restricción calórica (B) sobre los niveles de PINK1 tras 6 y 18 meses de intervención. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4-5 individuos de cada condición experimental. Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta las diferencias se representan con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asterisco (* $p < 0.05$) y ** ($p < 0.01$). Para simplificar la interpretación de los datos cuando se hallan diferencias entre grupos de la misma edad pero diferente intervención nutricional se asignó una letra minúscula (en el caso de 6 meses de intervención) o mayúscula (en el caso de 18 meses) a las diferentes dietas representándose dentro de la correspondiente columna. Dicha letra acompañada de su correspondiente significación estadística se sitúa sobre la condición con respecto a la que presenta cambios. En las figuras de los blots de tres dietas las letras L, S y F, se correspondieron con las dietas Lard, Soy y Fish, respectivamente.

Con el fin de profundizar en el efecto de las distintas fuentes grasas sobre la mitofagia, se determinaron los niveles de la proteína Parkin. Como podemos observar en la figura Mu-12A, no se produjeron alteraciones en los niveles de esta proteína en respuesta al envejecimiento en grupos control, pero sí se observó una disminución de este marcador en condiciones de RC. Esto es así ya que a los 6 meses de intervención

4. Resultados

Parkin tendió a disminuir en animales alimentados con la dieta CR.Soy frente a la dieta control, mientras que esta disminución se hizo aún más llamativa a los 18 meses de intervención (Ctrl.Soy 18 m vs. CR.Soy 18m).

Al analizar el efecto de la naturaleza de la fuente grasa de la dieta en animales sometidos a RC, vimos como nuevamente se produjo un incremento de este marcador en animales alimentados con la dieta CR.Lard en respuesta a la edad (CR.Lard 6m vs. CR.Lard 18m). Aunque la tendencia fue la misma en los grupos sometidos a las distintas dietas en RC, estos cambios sólo fueron estadísticamente significativos en respuesta a la dieta rica en MUFA. Además, se observó un aumento en los niveles de expresión de Parkin a los 6 meses de intervención en animales alimentados con CR.Soy frente a los bajos niveles de expresión alcanzados en CR.Lard (CR.Lard 6m vs. CR.Soy 6m) (figura Mu-12B).

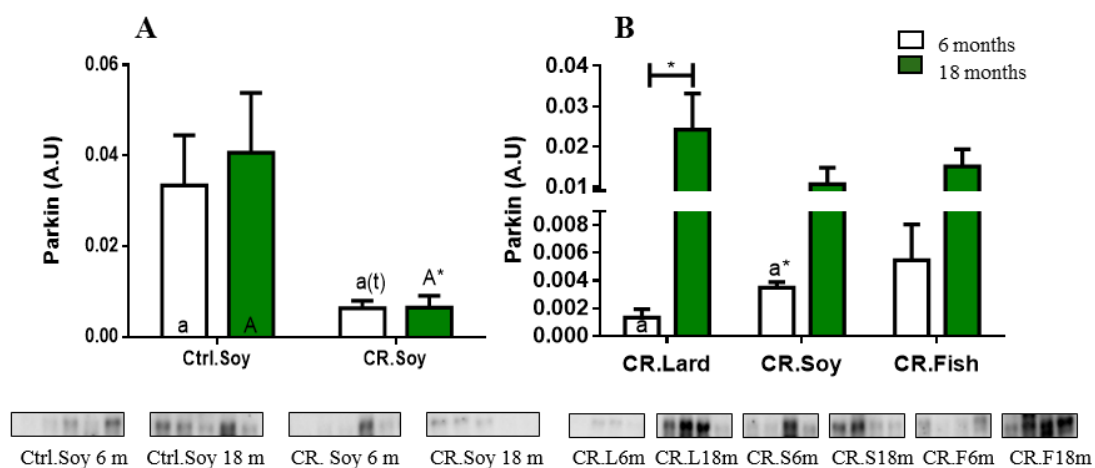


Figura Mu-12: Niveles de Parkin en homogenado total de músculo esquelético de los distintos grupos dietéticos. Efecto de la restricción calórica (A) y del componente graso de la dieta en condiciones de restricción calórica (B) sobre los niveles de Parkin tras 6 y 18 meses de intervención. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4-5 individuos de cada condición experimental. Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta las diferencias se representaron con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asteriscos (* ($p < 0.05$) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola). Para simplificar la interpretación de los datos cuando se hallan diferencias entre grupos de la misma edad pero diferente intervención nutricional se asignó una letra minúscula (en el caso de 6 meses de intervención) o mayúscula (en el caso de 18 meses) a las diferentes dietas representándose dentro de la correspondiente columna. Dicha letra acompañada de su correspondiente significación estadística se sitúa sobre la condición con respecto a la que presenta cambios. En las figuras de los blots de tres dietas las letras L, S y F, se correspondieron con las dietas Lard, Soy y Fish, respectivamente.

4.3.3. Niveles de daño oxidativo en proteínas, envejecimiento y restricción calórica

Con el fin de determinar si la RC y la grasa de la dieta producen alguna modificación en el daño oxidativo a nivel de proteínas, se determinaron los grupos carbonilos de las mismas mediante el kit Oxyblot™.

Tal y como se muestra en la figura Mu-13A, el grado de oxidación en proteínas tendió a disminuir con la edad en animales control (Ctrl.Soy 6m vs. Ctrl.Soy 18m). Este daño oxidativo disminuyó de forma muy significativa en animales sometidos a RC alimentados con la dieta CR.Soy en respuesta al envejecimiento. En el resto de grupos de animales sometidos a RC con aporte graso de distinta naturaleza, encontramos una disminución significativa generalizada en los niveles de carbonilación de proteínas en respuesta a intervenciones largas (18 meses) (figura Mu-13B). El daño oxidativo no cambió en función de la grasa de la dieta en intervenciones cortas (6 meses), pero a los 18 meses se observó un incremento en la cantidad de grupos carbonilo en animales sometidos a la dieta CR.Soy, frente a CR.Lard y CR.Fish (figura Mu-13B).

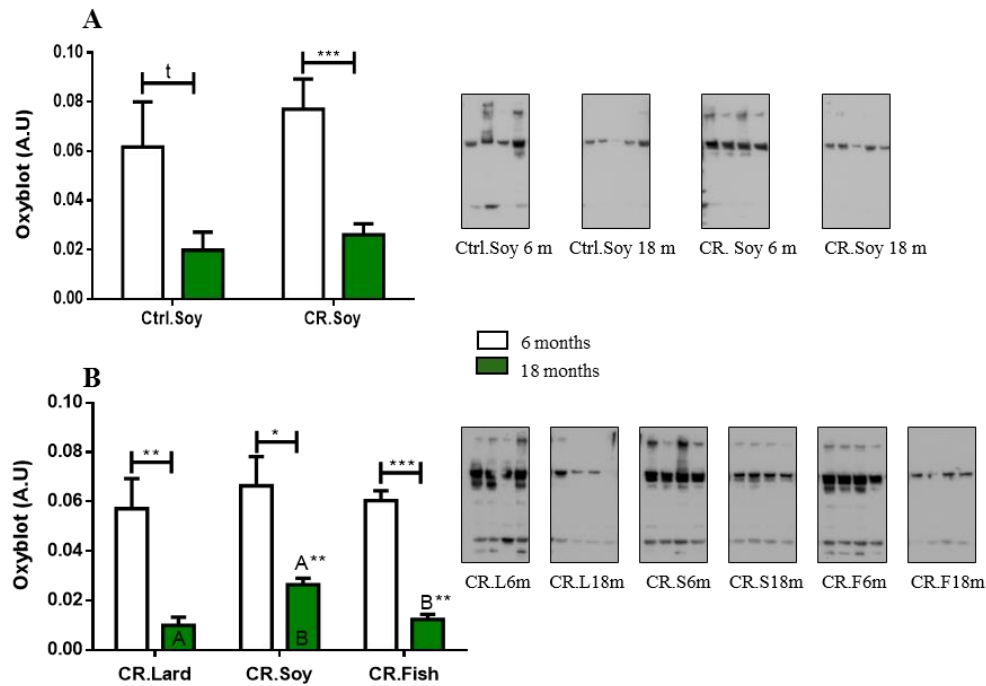


Figura Mu-13: Daño oxidativo en proteínas en homogenado total de músculo esquelético de los distintos grupos dietéticos. Efecto de la restricción calórica (A) y del componente graso de la dieta en condiciones de restricción calórica (B) sobre los niveles de carbonilación de proteínas tras 6 y 18 meses de intervención. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4-5 individuos de cada condición experimental. Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta las diferencias se representan con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asteriscos (* ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$)) o la letra t (($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola). Para simplificar la interpretación de los datos, cuando se hallan diferencias entre grupos de la misma edad (18 meses) pero diferente intervención nutricional se asignó una letra mayúscula a las distintas dietas, representándose dentro de su correspondiente columna. Dicha letra acompañada de su correspondiente significación estadística se sitúa sobre la condición con respecto a la que presenta cambios. En las figuras de los blots de tres dietas las letras L, S y F, se correspondieron con las dietas Lard, Soy y Fish, respectivamente.

4.3.4. Cambios en la cadena de transporte electrónico en respuesta al envejecimiento y a la dieta

Con el fin de observar si se producían cambios en la masa mitocondrial del músculo esquelético en respuesta a las diferentes intervenciones nutricionales, se determinaron los niveles de subunidades de los complejos multiproteicos que forman la cadena de transporte electrónico mitocondrial, mediante western blot.

En las figuras Mu-14 y Mu-15 se representan los niveles de subunidades marcadoras para cada uno de los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial

(CTE), determinados en animales control y animales alimentados con la dieta CR.Soy, en 6 y 18 m. por un lado y los tres grupos de RC por otro.

En primer lugar, sólo se produjeron alteraciones en la expresión del complejo I en respuesta al envejecimiento en animales del grupo control, dónde estos niveles disminuyeron de manera significativa (Ctrl.Soy 6m vs. Ctrl.Soy 18 m) (figura Mu-14A). Pudo observarse también esta misma tendencia, aunque no estadísticamente significativa, en los marcadores del complejo II y IV (figuras Mu-14B y D) mientras que no se produjo cambio alguno en los niveles de los marcadores para los complejos III y V (figuras Mu-14C y E) en los grupos control de 6 y 18 meses.

En el grupo sometido a RC y alimentado con la dieta CR.Soy, a los 6 meses, se observó una disminución en la expresión del complejo I en comparación con la observada con su respectivo grupo control homólogo de edad (figura Mu-14A). Además, la expresión del complejo III se vio fuertemente disminuida en respuesta al envejecimiento en animales alimentados con la dieta CR.Soy, siendo a los 18 meses la expresión de este complejo significativamente menor a la observada en el grupo Ctrl.Soy 18m (figura Mu-14C).

Por otro lado, analizando ahora la naturaleza del componente graso de la dieta en condiciones de RC observamos que no se produjo modificación alguna en los niveles de proteína de la subunidad del complejo I, II y V (figuras Mu-15A, B y E) en los grupos sometidos a las diferentes dietas en RC en función de la edad. No obstante, los niveles del marcador del complejo III disminuyeron en animales viejos frente a jóvenes en grupos de animales alimentados con las dietas CR.Soy y CR.Fish (figura Mu-15C), observándose esta misma tendencia en los niveles de la subunidad del complejo IV en animales alimentados con esta última dieta (figura Mu-15D). A los 6 meses de intervención, se observó un aumento en la subunidad del complejo II en animales sometidos a la dieta CR.Fish frente al grupo de la misma edad alimentado con CR.Lard (figura Mu-15B), un incremento de los niveles del complejo III en presencia de todas las dietas cuyas grasas eran ricas en PUFA frente a la grasa rica en MUFA (CR.Lard 6m vs. CR.Soy 6m y CR.Lard 6m y CR.Fish 6m) (figura Mu-15C) y un aumento significativo del complejo IV al comparar la dieta rica en aceite de pescado, frente a la rica en aceite de soja (CR.Soy 6m vs, CR.Fish 6m) (figura Mu-15D). No obstante, todos estos efectos fueron suprimidos cuando la intervención nutricional fue más larga (18 meses).

4. Resultados

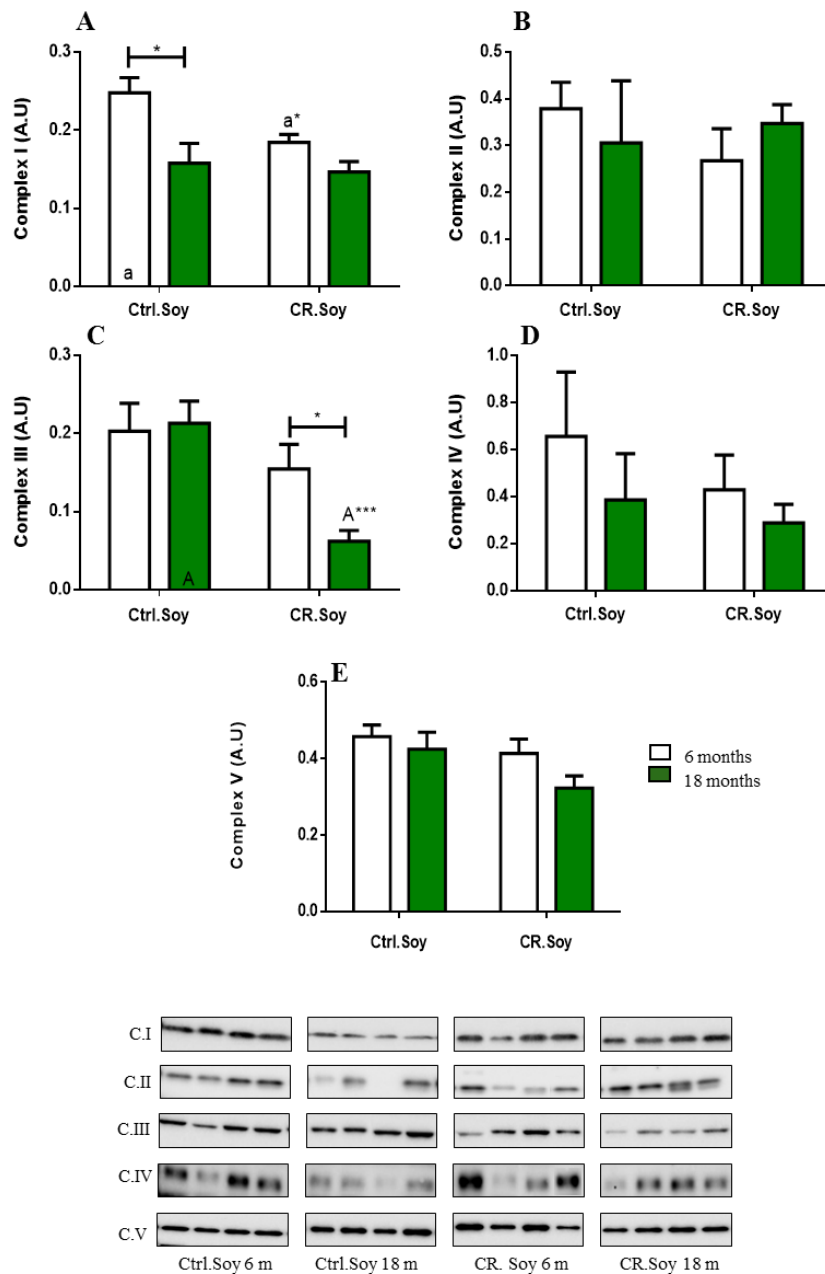


Figura Mu-14: Niveles de subunidades marcadoras de complejos de la cadena de transporte mitocondrial en homogenado total de músculo esquelético de los distintos grupos dietéticos. Efecto de la restricción calórica sobre los niveles de expresión de subunidades de la CTE tras 6 y 18 meses de intervención. Complejo I (A), II (B), III (C), IV (D) y V (E). La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 individuos de cada condición experimental. Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta las diferencias se representan con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asteriscos (* ($p < 0.05$), y *($p < 0.001$)). Para simplificar la interpretación de los datos cuando se hallan diferencias entre grupos de la misma edad pero diferente intervención nutricional se asigna una letra minúscula (en el caso de 6 meses de intervención) o mayúscula (en el caso de 18 meses de intervención) a las distintas dietas representadas dentro de la correspondiente columna. Dicha letra acompañada de su correspondiente significación estadística se sitúa sobre la condición con respecto a la que presentó cambios. En las figuras de los blots de tres dietas las letras L, S y F, se correspondieron con las dietas Lard, Soy y Fish, respectivamente.

4. Resultados

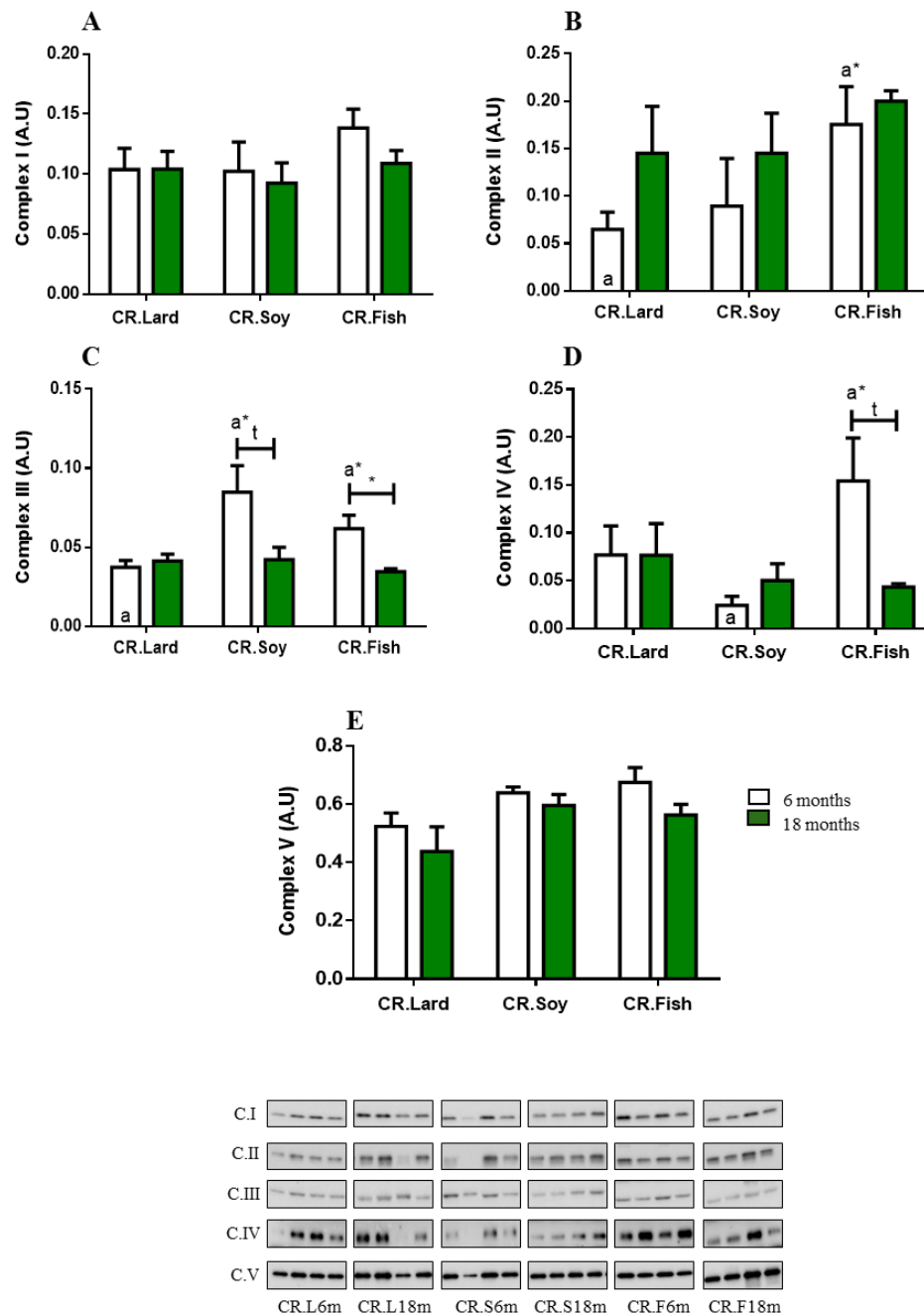


Figura Mu-15: Niveles de subunidades marcadoras de complejos de la cadena de transporte mitocondrial en homogenado total de músculo esquelético de los distintos grupos dietéticos. Efecto del componente graso de la dieta con condiciones de restricción calórica sobre los niveles de subunidades CTE tras 6 y 18 meses de intervención. Complejo I (A), II (B), III (C), IV (D) y V (E). La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 individuos de cada condición experimental. Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta las diferencias se representan con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asteriscos (* ($p < 0.05$)) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola). Para simplificar la interpretación de los datos cuando se hallan diferencias entre grupos de la misma edad (6 meses) pero diferente intervención nutricional se asigna una letra minúscula a las distintas dietas representadas dentro de la correspondiente columna. Dicha letra acompañada de su correspondiente significación estadística se sitúa sobre la condición con respecto a la que presentó cambios. En las figuras de los blots de tres dietas las letras L, S y F, se correspondieron con las dietas Lard, Soy y Fish, respectivamente.

4.4. Autofagia, estrés oxidativo y mitocondria. Efectos del envejecimiento, la restricción calórica y el componente graso de la dieta en hígado como modelo de tejido mitótico

4.4.1. Envejecimiento, intervenciones dietéticas y autofagia: estudio morfológico y cuantitativo

Con el fin de determinar si el envejecimiento y las intervenciones nutricionales produjeron cambios en la ruta autofágica en hígado, en primer lugar se llevó a cabo el análisis de micrografías de microscopía electrónica de hepatocitos en busca de estructuras relacionadas con la autofagia. Se analizó el tamaño y forma de dichas figuras, determinando su área y perímetro, así como los parámetros estereológicos densidad numérica (“Na”) y densidad de volumen (“Vv”).

Tal y como se muestra en la figura Hi-1A se produjo un aumento muy significativo del tamaño de las figuras de autofagia con el envejecimiento, ya que las encontradas en animales viejos (18 meses) presentaban un área mucho mayor que las observadas en individuos jóvenes (6 meses). Cuando se introduce la variable de restricción calórica (RC), no se observó cambio alguno como consecuencia de la intervención a medio plazo (6 meses) con respecto al control. No obstante, aunque el área de las figuras de animales de 18 meses se incrementó como consecuencia del envejecimiento, lo hizo en menor medida que los animales alimentados con la dieta Ctrl.Soy.

4. Resultados

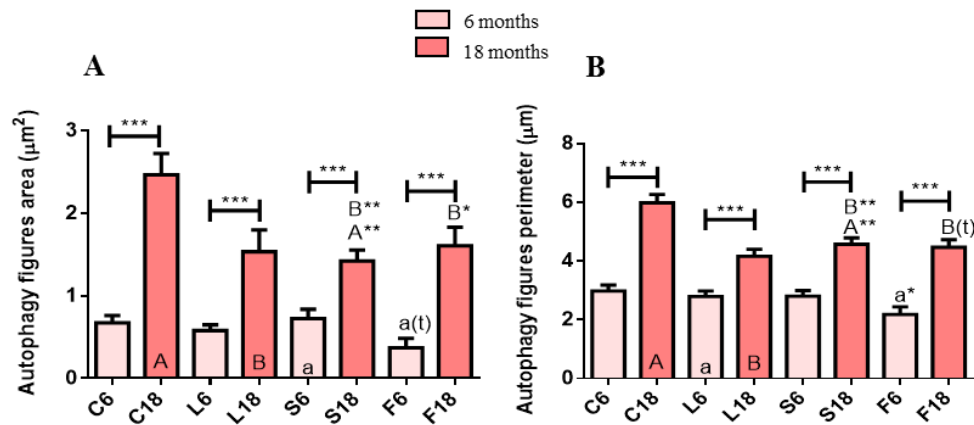


Figura Hi-1: Área (A) y perímetro (B) de las figuras de autofagia en hepatocitos. En las figuras referentes al análisis morfológico, los datos representados son los valores medios \pm SEM de 5-7 individuos de cada condición experimental de los cuales se analizó una media de 15 imágenes por individuo. En el eje de ordenadas aparecen los distintos parámetros a estudiar y en el de abscisas se encuentran las distintas intervenciones dietéticas (C6: Ctrl.Soy 6m, C18: Ctrl.Soy 18m, L6: CR.Lard 6m, L18: CR.Lard 18m, S6: CR.Soy 6m, S18: CR.Soy 18m, F6: CR.Fish 6m y F18: CR.Fish 18m). Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta, las diferencias se representan con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asteriscos (* ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$)) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola). Para simplificar la interpretación de los datos cuando se hallan diferencias entre grupos de la misma edad pero diferente intervención nutricional se asigna una letra minúscula (en el caso de 6 meses de intervención) o mayúscula (en el caso de 18 meses) a las diferentes dietas representándose dentro de la correspondiente columna. Dicha letra acompañada de su correspondiente significación estadística se sitúa sobre la condición con respecto a la que presenta cambios.

Atendiendo al efecto de la naturaleza de la grasa de la dieta en condiciones de RC, observamos que no se produjo cambio alguno en el área de las figuras de autofagia bajo ninguna condición experimental a los 6 meses de intervención, exceptuando una tendencia a la disminución en el caso de animales alimentados con dieta rica en aceite de pescado frente a aquellos alimentados con la dieta que contenía aceite de soja. No obstante quedó patente un aumento de dichas áreas en todos los individuos de 18 meses en comparación con su grupo homólogo de individuos jóvenes con independencia de la grasa predominante en la dieta. Por su parte, los animales alimentados durante 18 meses con una dieta que contenía aceite de soja (CR.Soy 18m) presentaron una menor área de estas figuras en comparación con las figuras observadas en el grupo alimentado con manteca (CR.Lard 18m), hecho que no ocurrió cuando la dieta suministrada fue rica en aceite de pescado (CR.Fish 18m) (figura Hi-1A).

Analizando el perímetro de las figuras de autofagia (figura Hi-1B), se observaron sustancialmente las mismas modificaciones que las encontradas para el área de dichas figuras: se incrementó el perímetro de las mismas en el grupo control de animales viejos

con respecto a su homólogo de animales jóvenes, ocurriendo de la misma manera con el resto de intervenciones nutricionales. No obstante, nuevamente se observó cómo en condiciones de RC se produjo una disminución del perímetro, como ya sucediera anteriormente con el área, al comparar Ctrl.Soy 18mvs. CR.Soy 18m.

Centrándonos en el efecto del componente graso de la dieta en condiciones de RC, se observó una disminución del perímetro de las figuras observadas en animales de 6 meses alimentados con grasa de pescado frente a aquellos alimentados con manteca (CR.Fish 6m vs. CR.Lard 6m). En las intervenciones a largo plazo se observó cómo las figuras autofágicas en los hepatocitos de animales alimentados con dietas que contenían aceite de soja o de pescado (PUFA) incrementaron su perímetro en referencia al grupo alimentado con la dieta de manteca (CR.Lard 18m vs. CR.Soy 18m y CR.Lard 18m y CR.Fish 18m) (figura Hi-1B).

Por otro lado, resultantes del análisis estereológico de las micrografías encontramos las representaciones de “Na” y “Vv”. En lo referente a “Na” observamos cómo en el grupo control la cantidad de figuras autofágicas tendió a disminuir como consecuencia de la edad, aunque dicha disminución no fue estadísticamente significativa (figura Hi-2A). Por su parte, esta disminución con el envejecimiento sí fue estadísticamente significativa cuando la grasa de la dieta fue manteca (CR.Lard 6m vs. CR.Lard 18m) o aceite de soja (CR.Soy 6m vs. CR.Soy 18m) en condiciones de RC, mientras que no se observó dicho efecto cuando la grasa fue aceite de pescado (CR.Fish 6m vs. CR.Fish 18m) (figura Hi-2A). En individuos jóvenes encontramos que la RC tendió a incrementar el número de figuras de autofagia con respecto a los animales control (Ctrl.Soy 6m vs. CR.Soy 6m), aunque estos cambios no alcanzaron la significación estadística, produciéndose una disminución en el número de las mismas cuando la intervención nutricional fue más larga (Ctrl.Soy 18m vs. CR.Soy 18m). Como efecto diferencial de la grasa de la dieta, se observó que en animales de 6 meses disminuyó el número de estructuras de autofagia cuando la grasa suministrada fue aceite de pescado (CR.Fish 6m) en comparación con sus homólogos de edad alimentados con manteca (CR.Lard 6m) y aceite de soja (CR.Soy 6m), mientras que en 18 meses esta intervención fue la que produjo un mayor número de figuras de autofagia en comparación con las otras dietas (CR.Fish 18m) (figura Hi-2A).

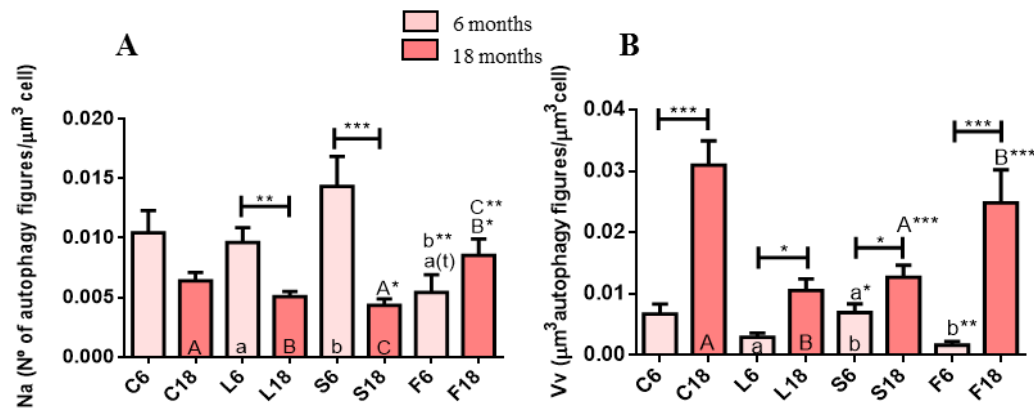


Figura Hi-2: Densidad numérica(A) y densidad de volumen (B) de las figuras de autofagia en hepatocitos. En las figuras referentes al análisis estereológico, los datos representados son los valores medios \pm SEM de 5-7 individuos de cada condición experimental de los cuales se analizó una media de 15 imágenes por individuo. En el eje de ordenadas aparecen los distintos parámetros a estudiar y en el de abscisas se encuentran las distintas intervenciones dietéticas (C6: Ctrl.Soy 6m, C18: Ctrl.Soy 18m, L6: CR.Lard 6m, L18: CR.Lard 18m, S6: CR.Soy 6m, S18: CR.Soy 18m, F6: CR.Fish 6m y F18: CR.Fish 18m). Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta, las diferencias se representan con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asteriscos (* ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$)) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola. Para simplificar la interpretación de los datos cuando se hallan diferencias entre grupos de la misma edad pero diferente intervención nutricional se asigna una letra minúscula (en el caso de 6 meses de intervención) o mayúscula (en el caso de 18 meses) a las diferentes dietas representándose dentro de la correspondiente columna. Dicha letra acompañada de su correspondiente significación estadística se sitúa sobre la condición con respecto a la que presenta cambios.

En lo referente al parámetro “Vv” se observó cómo en individuos control las figuras de autofagia ocuparon un mayor volumen relativo de la célula en el caso de los animales más viejos (Ctrl.Soy 6m vs Ctrl.Soy 18m) (figura Hi-2B). Esta misma tendencia se observó como consecuencia del envejecimiento en condiciones de RC con independencia de la grasa de la dieta suministrada. Analizando el efecto en sí el efecto de la RC, (Ctrl.Soy 6m vs.CR.Soy 6m) observamos cómo en animales sometidos a 6 meses de intervención no se produjo alteración alguna en este parámetro con respecto al grupo control, mientras que individuos de 18 meses la RC disminuyó de manera significativa el volumen ocupado por estas figuras sí se compara con los animales control (Ctrl.Soy 18m vs. CR.Soy 18m). Atendiendo al efecto del componente grasa de la dieta en condiciones de RC, observamos que los animales jóvenes que fueron alimentados con una dieta que contenía aceite de soja presentaron un aumento en este parámetro en comparación con los que fueron alimentados con una dieta que contenía manteca (CR.Lard 6m vs. CR.Soy 6m). Este aumento se revirtió cuando la grasa predominante de la dieta fue aceite de pescado (CR.Soy 6m vs. CR.Fish 6m). Por su parte, en animales viejos, se produjo un incremento significativo de “Vv” para las

4. Resultados

figuras de autofagia en aquellos individuos alimentados con aceite de pescado frente a los alimentados con manteca (CR.Lard 18m vs. CR.Fish 18m) (figura Hi-2B).

A continuación se muestran dos paneles de figuras donde se representan ejemplos de las imágenes de microscopía electrónica tomadas y analizadas para la realización del presente estudio cuantitativo y ultraestructural.

En ambos paneles se muestran porciones de hepatocitos de ratones sometidos a las distintas intervenciones nutricionales durante 6 (figura Hi-3) o 18 meses (figura Hi-4). En estas imágenes se observan ejemplos de mitocondrias normales, mitocondrias alteradas y figuras de autofagia, así como otras estructuras que pueden aparecer en este tejido como gotas lipídicas o canalículos biliares.

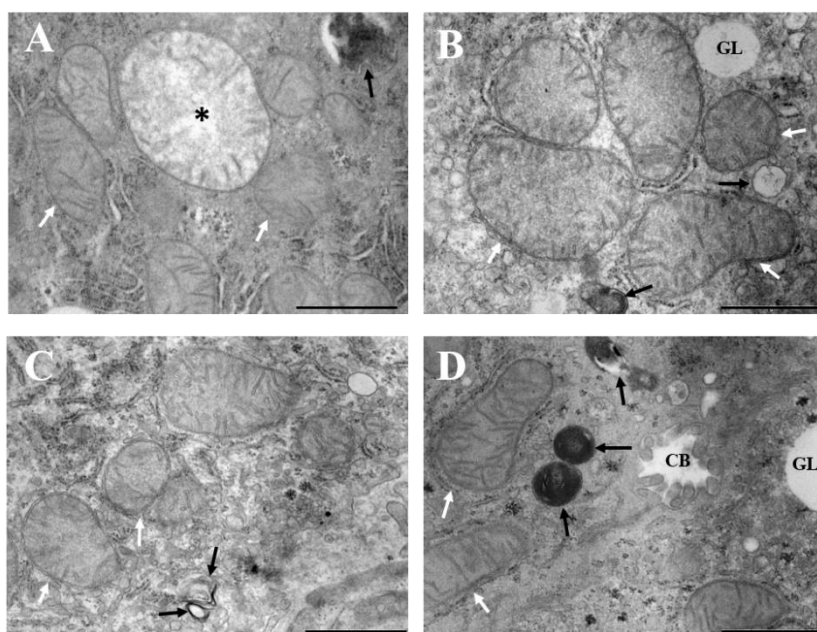


Fig. Hi-3. Porciones de hepatocitos de ratones sometidos a las diferentes intervenciones nutricionales durante 6 meses observadas al microscopio electrónico. En las imágenes se aprecian mitocondrias normales (flechas blancas), mitocondrias alteradas (*, con escasas crestas y matriz con baja densidad electrónica) y figuras de autofagia (flechas negras). GL, gota lipídica; CB, canalículo biliar. Cada imagen se corresponde con: A, animales alimentados con la dieta Ctrl.Soy 6m, B con la dieta CR.Soy 6m, C con la dieta CR.Fish 6m, D con la dieta CR.Lard 6m. Las barras que aparecen en la esquina inferior derecha de cada imagen se corresponden con la escala 1 μ m.

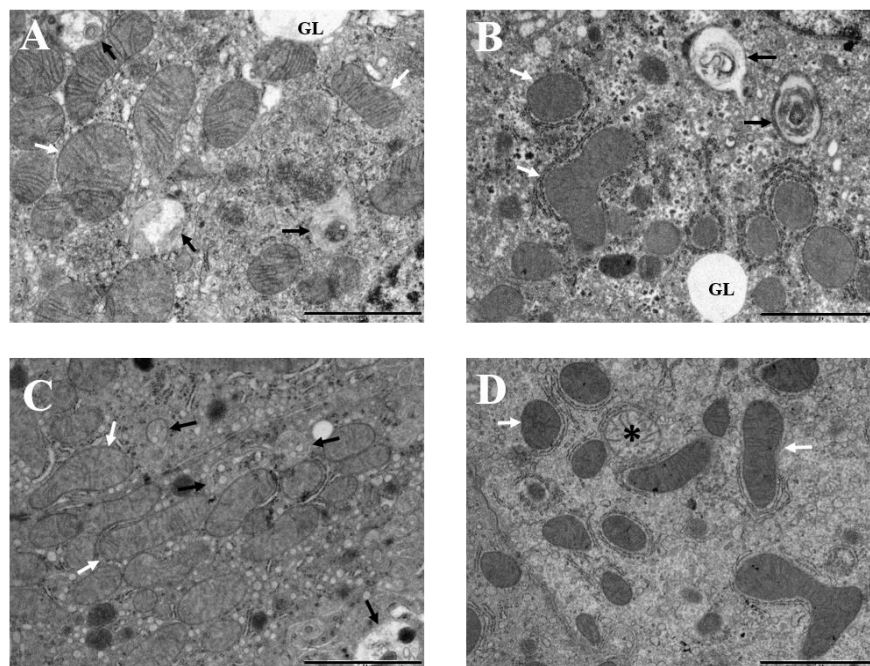


Fig. Hi-4. Porciones de hepatocitos de ratones sometidos a las diferentes intervenciones nutricionales durante 18 meses observadas al microscopio electrónico. En las imágenes se aprecian mitocondrias normales (flechas blancas), mitocondrias alteradas (*, con escasas crestas y matriz con baja densidad electrónica) y figuras de autofagia (flechas negras). GL, gota lipídica; CB, canalículo biliar. Cada imagen se corresponde con: A, animales alimentados con la dieta Ctrl.Soy 6m, B con la dieta CR.Soy 6m, C con la dieta CR.Fish 6m, D con la dieta CR.Lard 6m. Las barras que aparecen en la esquina inferior derecha de cada imagen se corresponden con la escala 2 μ m.

4.4.2. Análisis de efectores de la ruta de autofagia y posible efecto de las intervenciones nutricionales y el envejecimiento

Con el fin de establecer posibles correlaciones entre las modificaciones ultraestructurales y el nivel de proteína de distintos marcadores de la ruta autofágica, se llevó a cabo la determinación de los niveles de distintos efectores de la misma mediante western blot.

El primer marcador analizado fue la proteína Beclina 1. Tal y como se puede observar en la figura Hi-5A, se produjo un incremento significativo de sus niveles en condiciones control cuando se comparan animales jóvenes frente a animales viejos (Ctrl.Soy 6m vs. Ctrl.Soy 18m), mientras que este efecto de la edad no se apreció en condiciones de RC (CR.Soy 6m vs. CR.Soy 18m). No obstante, se observó que a los 6 meses de intervención se produjo en estos animales un incremento significativo de Beclina 1 en comparación con los niveles alcanzados por el grupo control (Ctrl.Soy 6m vs. CR.Soy 6m).

4. Resultados

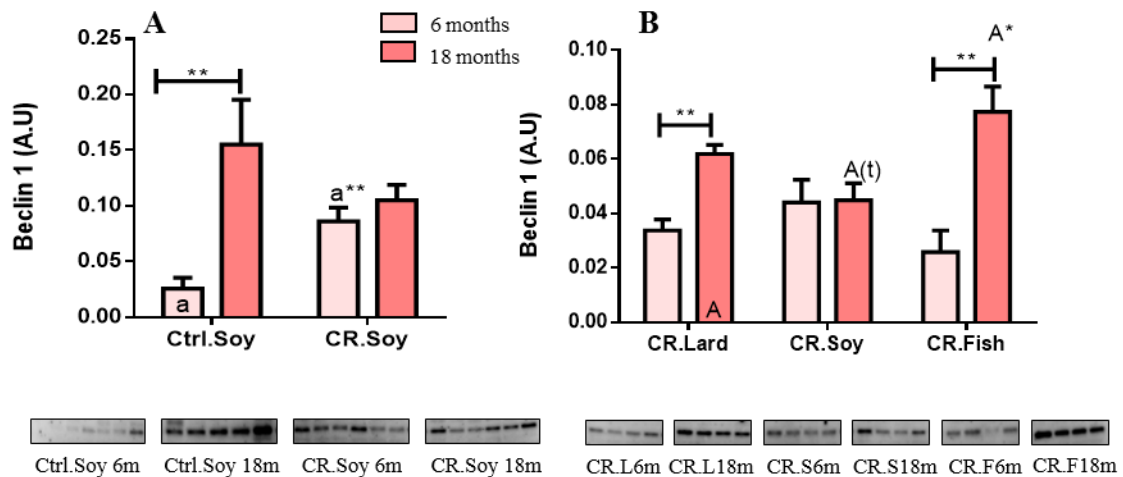


Figura Hi-5: Niveles de Beclina 1 en homogenado total de hígado de los distintos grupos dietéticos. Efecto de la restricción calórica (A) y del componente grasa de la dieta en condiciones de restricción calórica (B) sobre los niveles de Beclina 1 tras 6 y 18 meses de intervención. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4-6 individuos de cada condición experimental. Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta las diferencias se representan con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asteriscos (* ($p < 0.05$) y ** ($p < 0.01$)) o la letra t (($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola). Para simplificar la interpretación de los datos cuando se hallan diferencias entre grupos de la misma edad pero diferente intervención nutricional se asigna una letra minúscula (en el caso de 6 meses de intervención) o mayúscula (en el caso de 6 meses) a las diferentes dietas representándose dentro de la correspondiente columna. Dicha letra acompañada de su correspondiente significación estadística se sitúa sobre la condición con respecto a la que presenta cambios. En las figuras de los blots de tres dietas las letras L, S y F, se corresponden con las dietas Lard, Soy y Fish respectivamente.

En el resto de grupos experimentales se observó un aumento significativo de los niveles de Beclina 1 en animales viejos con respecto a su grupo homólogo de dieta de 6 meses (CR.Lard 6m vs. CR.Lard 18m y CR.Fish 6m vs. CR.Fish 18m) siendo, además, mayor el incremento alcanzado cuando la grasa de la dieta fue aceite de pescado (CR.Lard 18m vs. CR.Fish 18m). En este caso se observó la misma respuesta que la encontrada como consecuencia del envejecimiento en el grupo control, siendo no obstante la dieta con aceite de soja la única que no experimentó esta respuesta (figura Hi-5B).

Otro de los marcadores analizados en homogenado total de hígado fue p62. Como observamos en la figura Hi-6A los niveles de p62 permanecieron invariables en condiciones control con independencia del tiempo de intervención. No obstante, en condiciones de RC observamos una disminución de los niveles de este marcador en animales viejos en comparación con los jóvenes.

4. Resultados

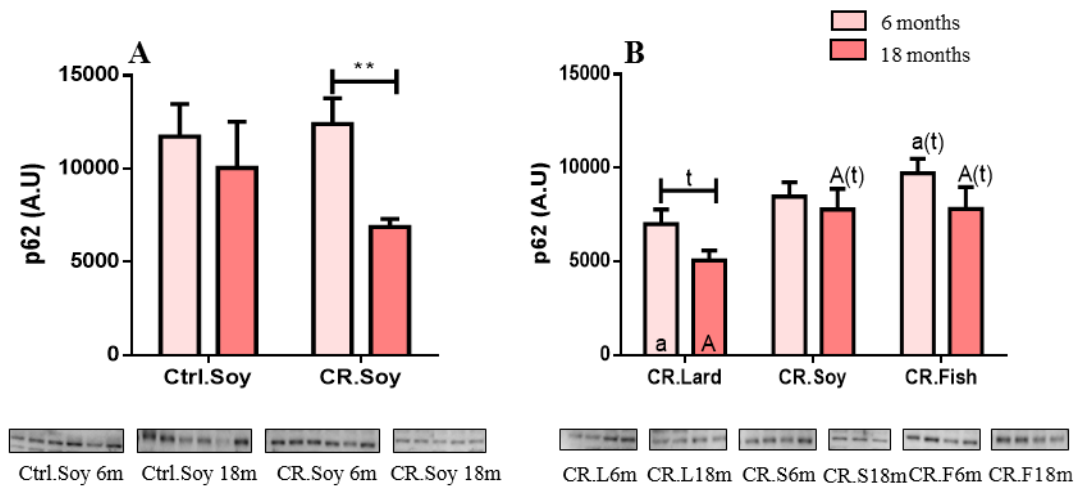


Figura Hi-6: Niveles de p62 en homogenado total de hígado de los diferentes grupos dietéticos. Efecto de la restricción calórica (A) y del componente graso de la dieta en condiciones de restricción calórica (B) sobre los niveles de p62 tras 6 y 18 meses de intervención. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4-6 individuos de cada condición experimental. Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta las diferencias se representaron con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asteriscos (** ($p < 0.01$)) o la letra t ($p < 0.05$ utilizando un test estadístico de una cola). Para simplificar la interpretación de los datos cuando se hallan diferencias entre grupos de la misma edad pero diferente intervención nutricional se asignó una letra minúscula (en el caso de 6 meses de intervención) o mayúscula (en el caso de 18 meses) a las diferentes dietas representándose dentro de la correspondiente columna. Dicha letra acompañada de su correspondiente significación estadística se sitúa sobre la condición con respecto a la que presenta cambios. En las figuras de los blots de tres dietas las letras L, S y F, se corresponden con las dietas Lard, Soy y Fish respectivamente.

La figura Hi-6B muestra los niveles de expresión de p62 en los animales sometidos a las dietas con diferentes fuentes grasas en condiciones de RC. Se observó, que en el caso de los animales sometidos a RC y aporte de grasa de manteca los niveles de p62 tendieron a disminuir en individuos jóvenes frente a los viejos (CR.Lard 6m vs. CR.Lard 18m). En animales alimentados con el resto de dietas no se observaron alteraciones significativas de esta proteína en función de la edad (CR.Soy 6m vs. CR.Soy 18m y CR.Fish 6m vs. CR.Fish 18m). No obstante, en individuos de 6 meses alimentados con la dieta CR.Fish, p62 tendió a aumentar con respecto a los niveles alcanzados en el grupo homólogo de edad de animales alimentados con la dieta CR.Lard (CR.Lard 6m vs. CR.Fish 6m).

Cabe mencionar que en este caso, la disminución en los niveles de p62 como consecuencia del envejecimiento, en el grupo alimentado en la dieta CR.Soy, no alcanzó la significación estadística en el análisis del gel de tres dietas frente al de dos dietas. Esta diferencia puede deberse a que en los gels de electroforesis en los que se estudian

animales sometidos a las tres dietas que varían en el componente graso se reduce el número de individuos de cada intervención nutricional que puede cargarse, debido a las limitaciones impuestas por el número de pocillos disponibles en los geles. Por tanto, la selección al azar de un menor número de individuos en estas condiciones puede resultar en variaciones al comparar los niveles de expresión con los encontrados en geles con muestras procedentes de un mayor número de individuos (como aquéllos donde se compara el efecto de dos dietas: control frente a RC).

Otro marcador importante en la ruta de autofagia es la proteína LC3, concretamente sus formas procesadas LC3I y LC3II. En las figuras Hi-7A y B se representan los niveles de LC3I en animales sometidos a las diferentes intervenciones nutricionales. En primer lugar, observamos que en condiciones control no se produjo ningún tipo de alteración a nivel de esta proteína como consecuencia del envejecimiento. No obstante, en los animales sometidos a RC observamos un incremento significativo de estos niveles en animales sometidos a 6 meses de intervención frente a los sometidos a 18 (CR.Soy 6m vs. CR.Soy 18m) (figura Hi-7A). Por su parte, cuando analizamos los niveles de LC3I en animales alimentados con dietas que contenían distintas fuentes grasas en condiciones de RC, pudimos comprobar cómo en aquellos individuos cuyo suplemento fue la manteca no se produjo alteración alguna a nivel de esta proteína. Sin embargo, cuando la grasa aportada fue aceite de soja o aceite de pescado se produjo un aumento significativo dependiente del envejecimiento (CR.Soy 6m vs. CR.Soy 18m y CR.Fish 6m vs. CR.Fish 18m). Cabe destacar asimismo que con las dos dietas ricas en PUFA los niveles de expresión de LC3I a los 18 meses de intervención se incrementaron de manera significativa frente a la dieta rica en SFA y MUFA (CR.Lard). Además, a medio plazo (6 meses) se produjo un incremento notable de LC3I con la dieta de aceite de pescado frente a las otras dos utilizadas en nuestro modelo de estudio (CR.Lard 6m vs. CR.Fish 6m y CR.Soy 6m vs. CR.Fish 6m) (figura Hi-7B).

4. Resultados

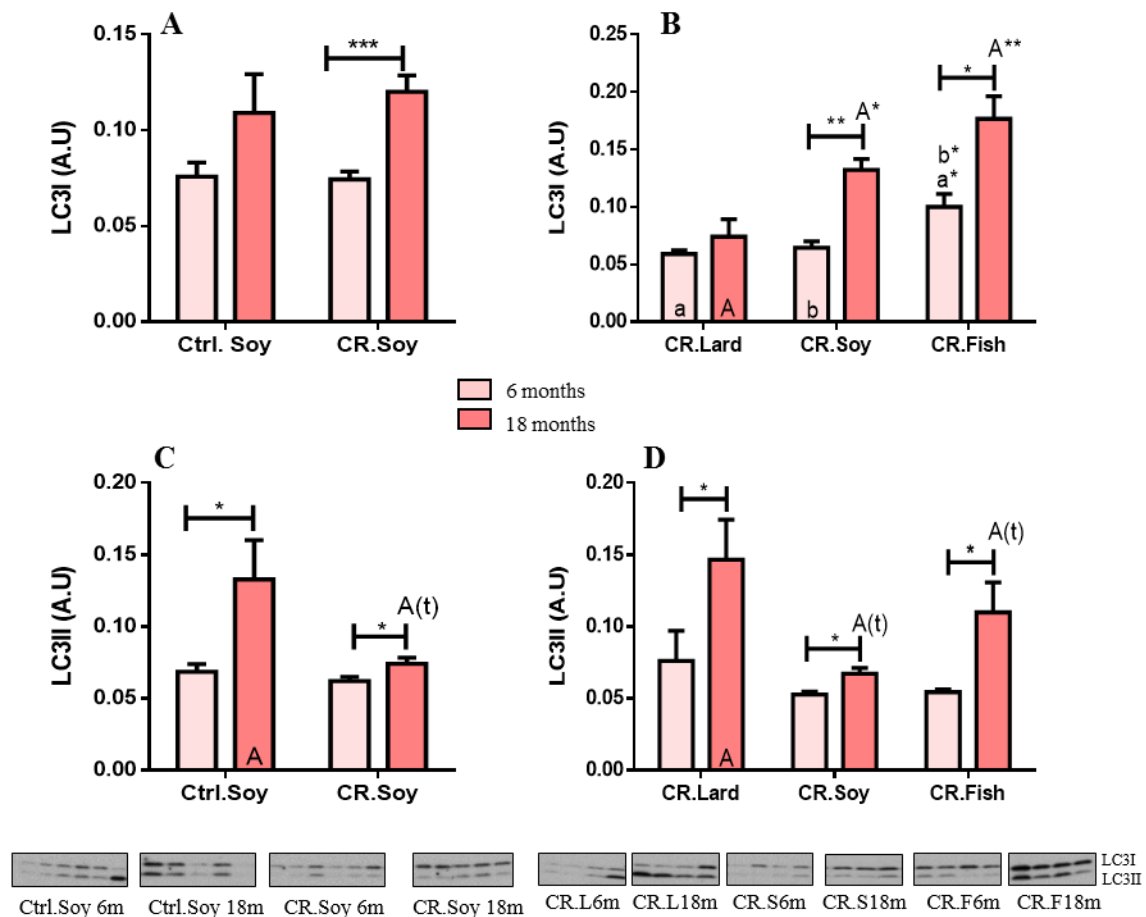


Figura Hi-7: Niveles de LC3I y LC3II en homogenado total de hígado de los diferentes grupos dietéticos. Efecto de la restricción calórica (A, C) y del componente grasa de la dieta en condiciones de restricción calórica (B, D) sobre los niveles de LC3I y LC3II tras 6 y 18 meses de intervención. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4-6 individuos de cada condición experimental. Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta las diferencias se representaron con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asteriscos (* ($p < 0.05$) y ** ($p < 0.01$)) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola. Para simplificar la interpretación de los datos cuando se hallan diferencias entre grupos de la misma edad pero diferente intervención nutricional se asigna una letra minúscula (en el caso de 6 meses de intervención) o mayúscula (en el caso de 18 meses) a las diferentes dietas representándose dentro de la correspondiente columna. Dicha letra acompañada de su correspondiente significación estadística se sitúa sobre la condición con respecto a la que presenta cambios. En las figuras de los blots de tres dietas las letras L, S y F, se corresponden con las dietas Lard, Soy y Fish respectivamente.

Por su parte, los niveles de LC3II se representan en las figuras Hi-7C y Hi-7D. En este caso, pudimos observar cómo en los animales control los niveles de expresión de esta proteína se incrementaron significativamente en animales viejos frente a jóvenes (Ctrl.Soy 6m vs. Ctrl.Soy 18m), ocurriendo lo mismo en animales sometidos a RC aunque de una manera más atenuada (CR.Soy 6m vs. CR.Soy 18m), ya que los niveles de LC3II obtenidos a los 18 meses de intervención en el grupo CR.Soy tendieron a ser

4. Resultados

significativamente menores que los observados en el grupo control homólogo en edad (Ctrl.Soy 18m vs. CR.Soy 18m) (figura Hi-7C). Al analizar el efecto de la edad en los animales sometidos a los tres grupos de RC con distintas fuentes grasas observamos que en todos los casos se produjo un incremento significativo de los niveles de expresión de LC3II a los 18 meses de intervención frente a los 6 meses de la misma. No obstante, fue el grupo de animales alimentados con aporte graso de manteca el que alcanzó la máxima expresión de LC3II con el envejecimiento en comparación con los grupos de la misma edad alimentados con grasa procedente de aceite de pescado o aceite de soja (CR.Lard 18m vs. CR.Soy 18m y CR.Lard 18m y CR.Fish 18m) (figura Hi-7D).

Por último, se determinó la ratio de las dos formas de LC3, que se representa en las figuras Hi-8A y Hi-8B. Esta relación es tomada frecuentemente como indicador del flujo autofágico [307]. Como puede observarse, no se produjo alteración alguna en la ratio $LC3II / (LC3I + LC3II)$ en función de la edad dentro del grupo de animales control. Sin embargo, encontramos un descenso significativo de esta ratio con la edad en animales sometidos a RC (CR.Soy 6m vs. CR.Soy 18m). Además, a los 6 meses de intervención este parámetro tendió a disminuir animales alimentados con la dieta CR.Soy frente a individuos del grupo control (Ctrl.Soy 6m vs. CR.Soy6m), ocurriendo de igual manera a los 18 meses (Ctrl.Soy 18m vs. CR.Soy 18m) (figura Hi-8A). Por su parte, la ratio tendió a incrementarse con el envejecimiento cuando la grasa aportada fue manteca (CR.Lard 6m vs. CR.Lard 18m), mientras que ocurrió justo lo opuesto cuando la grasa suministrada fue aceite de soja (CR.Soy 6m vs. CR.Soy 18m), permaneciendo invariable con el suplemento de aceite de pescado (CR.Fish 6m vs. CR.Fish 18m). Cuando comparamos el efecto del componente graso dentro de un determinado grupo de edad encontramos que a los 6 meses de intervención se produjo una disminución de la ratio de LC3 cuando la grasa proporcionada fue aceite de pescado en comparación con los grupos correspondientes alimentados con dietas que contenían manteca o aceite de soja (CR.Lard 6m vs. CR.Fish 6m y CR.Soy 6m vs. CR.Fish 6m). Ocurrió lo mismo en los animales sometidos a la intervención de 18 meses, siendo esta ratio en el grupo alimentado con la dieta que contenía aceite de pescado significativamente inferior a la observada para el grupo de animales viejos alimentados con una dieta que contenía manteca (CR.Lard 18m vs. CR.Fish 18m) (figura Hi-8B).

4. Resultados

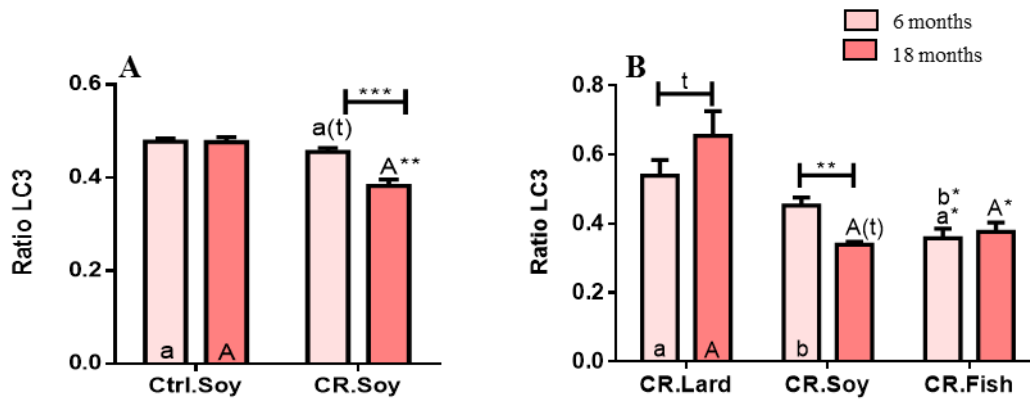


Figura Hi-8: Ratio de LC3. Efecto de la restricción calórica (A) y del componente graso de la dieta en condiciones de restricción calórica (B) sobre la ratio de LC3 (LC3II/LC3I+LC3II) tras 6 y 18 meses de intervención. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4-6 individuos de cada condición experimental. Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta las diferencias se representan con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asteriscos (* ($p < 0.05$) y ** ($p < 0.01$)) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola). Para simplificar la interpretación de los datos cuando se hallan diferencias entre grupos de la misma edad pero diferente intervención nutricional se asignó una letra minúscula (en el caso de 6 meses de intervención) o mayúscula (en el caso de 18 meses) a las diferentes dietas representándose dentro de la correspondiente columna. Dicha letra acompañada de su correspondiente significación estadística se sitúa sobre la condición con respecto a la que presentó cambios.

Por último, se determinaron los niveles de la proteína PINK1, que es un efector fundamental en la ruta de mitofagia [2, 53]. Como podemos observar en la figura Hi-9A, los niveles de expresión de PINK1 permanecieron sin alteraciones como consecuencia del envejecimiento en el grupo control (Ctrl.Soy 6m vs. Ctrl.Soy 18m), ocurriendo de la misma manera en animales sometidos a RC (CR.Soy 6m vs. CR. Soy 18m). No obstante, cabe destacar la gran variabilidad interindividual en los niveles de esta proteína entre individuos del grupo control.

4. Resultados

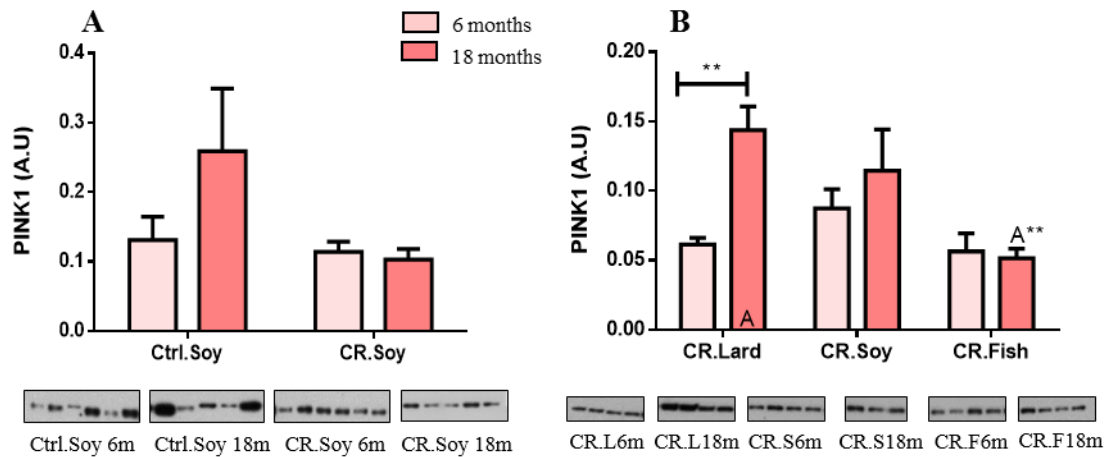


Figura Hi-9: Niveles de PINK1 en homogenado total de hígado de los diferentes grupos dietéticos. Efecto de la restricción calórica (A) y del componente grasa de la dieta en condiciones de restricción calórica (B) sobre los niveles de PINK1 tras 6 y 18 meses de intervención. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4-6 individuos de cada condición experimental. Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta las diferencias se representaron con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asteriscos (** ($p < 0.01$)). Para simplificar la interpretación de la estadística se asigna la letra mayúscula “A” a la dieta CR.Lard 18m. Dicha letra acompañada de su correspondiente significación estadística se sitúa sobre la condición con respecto a la que presenta cambios. En las figuras de los blots de tres dietas las letras L, S y F, se corresponden con las dietas Lard, Soy y Fish respectivamente.

Por otro lado, en la figura Hi-9B se representa la expresión de PINK1 en los tres grupos de RC estudiados. En individuos alimentados con la dieta CR.Lard se observó un aumento muy significativo en los niveles de PINK1 con el envejecimiento (CR.Lard 6m vs. CR.Lard 18m), hecho que no ocurrió con las otras dos dietas suministradas, CR.Soy y CR.Fish. Además, para esta última dieta cabe destacar que a los 18 meses de intervención los niveles de esta proteína fueron significativamente menores que los alcanzados en su grupo homólogo de edad alimentado con la dieta CR.Lard (CR.Lard 18m vs. CR.Fish 18 m).

Aunque se realizaron varios inmunoblots para analizar los niveles de la proteína Parkin, lamentablemente en ninguno de ellos se detectó una señal cuantificable para la obtención de este dato en homogenado total de hígado.

4.4.3. Daño oxidativo en proteínas, envejecimiento y restricción calórica

Con el fin de determinar si la RC y la grasa de la dieta inducen alguna modificación en el daño oxidativo sufrido a nivel de proteínas, se determinaron los grupos carbonilos de las mismas mediante el kit OxyblotTM. Como se muestra en la figura Hi-10A, el grado de oxidación en proteínas permaneció invariable en función de la edad en individuos control (Ctrl.Soy 6m vs. Ctrl.Soy 18m). Además se observó una tendencia al incremento en este parámetro en animales sometidos a RC a los 6 meses de intervención (Ctrl.Soy 6m vs. CR.Soy 6m), el cual disminuyó de forma significativa en intervenciones más largas (CR.Soy 6m vs. CR.Soy 18m). En la figura Hi-10B se muestra el efecto sobre el “oxi-proteoma” de animales alimentados con las distintas fuentes grasas en condiciones de RC. En este caso, observamos cómo se produjo un incremento paulatino del daño oxidativo en los animales sometidos a intervención durante 6 meses con dietas cuya fuente grasa aportada fuera rica en PUFA, frente a aquellos alimentados con una aporte graso rico en SFA y MUFA. Cabe destacar que el mayor daño oxidativo se produjo en aquellos animales alimentados con la dieta CR.Fish. No obstante, este efecto fue revertido a los 18 meses de intervención (CR.Soy 6m vs. CR.Soy 18m y CR.Fish 6m vs. CR.Fish 18).

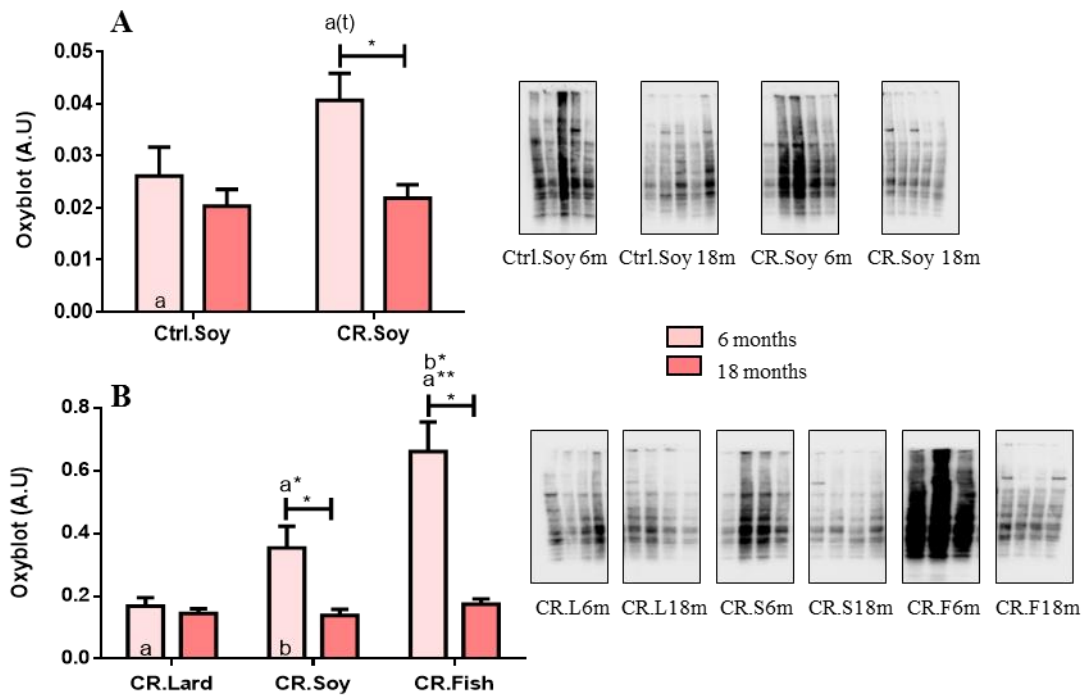


Figura Hi-10: Daño oxidativo en proteínas en homogenado total de hígado de los diferentes grupos dietéticos. Efecto de la restricción calórica (A) y del componente graso de la dieta en condiciones de restricción calórica (B) sobre los niveles de carbonilación de proteínas tras 6 y 18 meses de intervención. La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 3-5 individuos de cada condición experimental. Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta las diferencias se representan con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asteriscos (* ($p < 0.05$) y ** ($p < 0.01$)) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola. Para simplificar la interpretación de los datos cuando se hallan diferencias entre grupos de la misma edad pero diferente intervención nutricional se asigna una letra minúscula (6 meses) a las diferentes dietas representándose dentro de la correspondiente columna. Dicha letra acompañada de su correspondiente significación estadística se sitúa sobre la condición con respecto a la que presenta cambios. En las figuras de los blots de tres dietas las letras L, S y F, se corresponden con las dietas Lard, Soy y Fish respectivamente.

4.4.4. Cambios en la cadena de transporte electrónico en respuesta al envejecimiento y a la dieta

Con el fin de observar si se producían cambios en los componentes de la cadena de transporte electrónico (CTE) que pudieran traducirse en modificaciones funcionales de la misma, se determinaron mediante western blot los niveles de subunidades marcadoras de la abundancia de los complejos multiproteicos que la forman.

En la figura Hi-11y figura Hi-12 se representan los niveles de expresión de estas subunidades marcadoras para cada uno de los complejos de la CTE, determinados en

animales control y alimentados con la dieta CR.Soy en 6 y 18 m. por un lado, y los tres grupos de RC por otro.

En primer lugar, se observó un incremento en el complejo I en respuesta al envejecimiento en animales control. Por su parte, en animales sometidos a la dieta CR.Soy se observó un incremento en los niveles del mismo a los 6 meses de intervención con respecto al grupo control homólogo de edad (Ctrl.Soy 6m vs. CR.Soy 6m), quedando por tanto la subida en los niveles de esta subunidad atenuada con el envejecimiento (figura Hi-11A).

En cuanto a los niveles de complejo II, éstos permanecieron sin alteraciones en condiciones control, mientras que se experimentó un incremento asociado a la edad en el grupo alimentado con CR.Soy (figura Hi-11B). La expresión del complejo III, por su parte, experimentó una tendencia a disminuir como consecuencia del envejecimiento en animales sometidos a la dieta control, mientras que en condiciones de RC se produjo un incremento notable en la expresión de este complejo al comparar individuos jóvenes y viejos. Además, a los 6 meses de intervención se produjo una disminución en la expresión de esta proteína con respecto a su grupo homólogo de edad alimentado con dieta control; mientras que a los 18 meses fue el grupo de CR.Soy el que alcanzó los niveles más elevados (Ctrl.Soy 18m vs. CR.Soy 18m) (Figura Hi-11C).

La expresión del complejo IV permaneció sin cambios asociados al envejecimiento en el grupo control, mientras que sí se produjo una tendencia al aumento en el caso de los animales de 18 meses sometidos a la dieta CR.Soy frente al grupo homólogo de 6 meses. Además, los niveles de esta proteína se vieron disminuidos a los 6 meses de intervención en comparación con el grupo control de la misma edad (figura Hi-11D).

Por último, en el grupo control los niveles del complejo V permanecieron sin cambios con independencia del tiempo de intervención (figura Hi-11E). Por el contrario en animales sometidos a RC se produjo un aumento de los niveles de este complejo en animales viejos frente a jóvenes (CR.Soy 6m vs. CR.Soy 18m). La RC provocó además una disminución del complejo V a 6 meses de intervención, y un aumento significativo de los mismos a 18 meses, comparando éstos con sus grupos control de la misma edad.

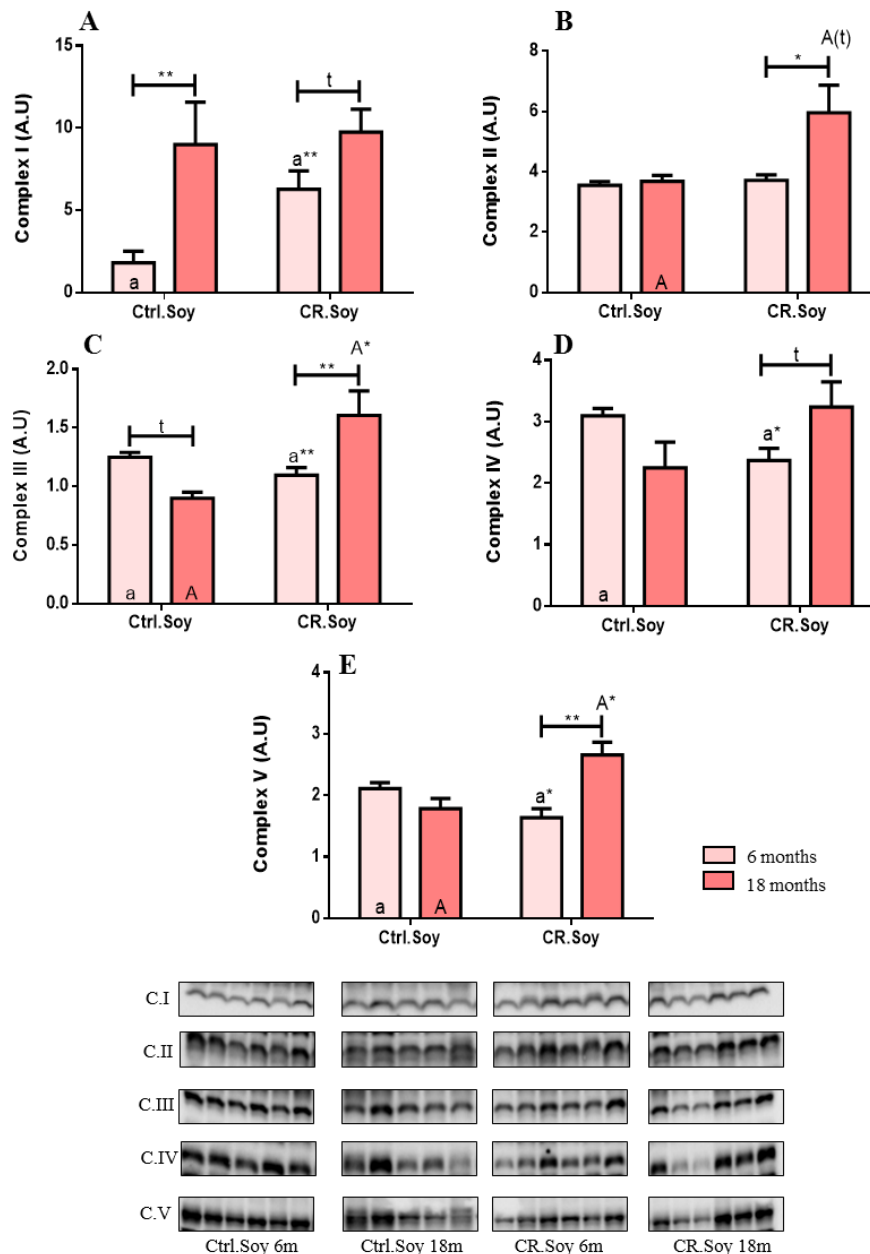


Figura Hi-11: Niveles de subunidades marcadoras de complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en homogenado total de hígado de los diferentes grupos dietéticos. Efecto de la restricción calórica sobre los niveles de expresión de subunidades de la CTE tras 6 y 18 meses de intervención. Complejo I (A), II (B), III (C), IV (D) y V (E). La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 6 individuos de cada condición experimental. Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta las diferencias se representan con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asteriscos (* ($p < 0.05$) y ** ($p < 0.01$)) o la letra t ($p < 0.05$ utilizando un test estadístico de una cola). Para simplificar la interpretación de los datos cuando se hallan diferencias entre grupos de la misma edad pero diferente intervención nutricional se asigna una letra minúscula (en el caso de 6 meses de intervención) o mayúscula (en el caso de 18 meses) a las diferentes dietas representándose dentro de la correspondiente columna. Dicha letra acompañada de su correspondiente significación estadística se sitúa sobre la condición con respecto a la que presenta cambios.

4. Resultados

Atendiendo ahora al origen de la grasa de la dieta en condiciones de RC, se observó que el complejo I permaneció sin cambios en animales alimentados con la dieta CR.Lard, mientras que tendió a incrementarse nuevamente en animales viejos (CR.Soy18m) con respecto a jóvenes, siendo en esta dieta donde los niveles de expresión de complejo I alcanzaron su valor máximo (CR.Lard 18m vs. CR.Soy 18m vs. CR.Fish 18m) (figura Hi-12A). Respecto a la expresión del complejo II, tampoco se observaron cambios asociados a las distintas fuentes grasas dentro de los grupos sometidos a RC, exceptuando una disminución de sus niveles en animales viejos alimentados con la dieta CR.Fish frente a los alimentados con la dieta CR.Soy (figura Hi-12B).

La expresión del complejo III, por su parte, disminuyó de manera significativa en animales alimentados con la dieta CR.Lard en respuesta al envejecimiento, efecto que no se reprodujo cuando la grasa fue rica en PUFA. En el caso de los animales sometidos a 18 meses de intervención, aquellos cuyo aporte graso fue rico en PUFA mostraron unos niveles mayores de complejo III (CR.Lard 18m vs. CR.Soy 18m y CR.Lard 18m vs. CR.Fish 18m) (Figura Hi-12C). Los niveles de expresión del complejo IV no mostraron cambios significativos en función de la grasa de la dieta suministrada (figura Hi-12D). Por último, analizando la expresión del complejo V, los animales alimentados con la dieta CR.Lard no experimentaron ningún tipo de alteración a nivel de este complejo, mientras que los animales que fueron sometidos a las dietas CR.Soy y CR.Fish incrementaron los niveles de esta proteína tras 18 meses de intervención (CR.Soy 6m vs. CR.Soy 18 m y CR.Fish 6 vs. CR.Fish 18m) (figura Hi-12E).

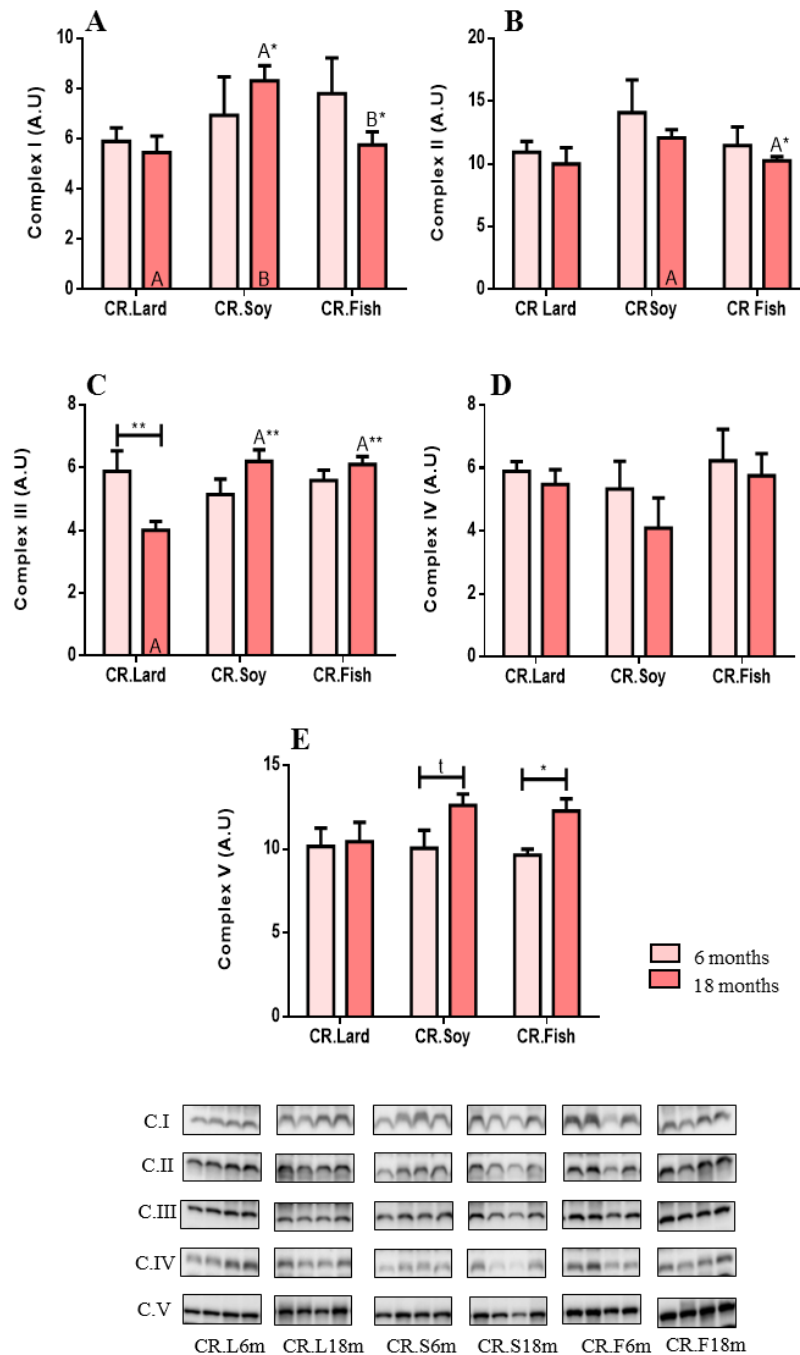


Figura Hi-12: Niveles de subunidades marcadoras de complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en homogenado total de hígado de los diferentes grupos dietéticos. Efecto del componente graso de la dieta en condiciones de restricción calórica sobre los niveles de subunidades de la CTE tras 6 y 18 meses de intervención. Complejo I (A), II (B), III (C), IV (D) y V (E). La intensidad de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada carril. Los datos representados son los valores medios \pm SEM de 4 individuos de cada condición experimental. Entre grupos de animales alimentados con la misma dieta las diferencias se representan con barras y la correspondiente significación estadística en forma de asteriscos (* ($p < 0.05$) y ** ($p < 0.01$)) o la letra t ($p < 0.05$) utilizando un test estadístico de una cola. Para simplificar la interpretación de los datos cuando se hallan diferencias entre grupos de la misma edad pero diferente intervención nutricional se asigna una letra mayúscula (18 meses) a las diferentes dietas representándose dentro de la correspondiente columna. Dicha letra acompañada de su correspondiente significación estadística se sitúa sobre la condición con respecto a la que presenta cambios. En las figuras de los blots de tres dietas las letras L, S y F, se corresponden con las dietas Lard, Soy y Fish respectivamente.

5. Discusión

5.1. El coenzima Q como regulador de la fisiología mitocondrial y la ruta de autofagia en la línea celular Tkpts

5.1.1. Efecto de los sustratos biosintéticos y el aporte exógeno de coenzima Q sobre los niveles de complejos de la cadena de transporte electrónico

Habiendo observado que el aporte de precursores de la síntesis de Q [134] así como el tratamiento con Q₁₀ exógeno fue capaz de incrementar significativamente los niveles celulares de Q en la línea Tkpts, y dada la relación existente entre esta molécula y los componentes de la cadena de transporte electrónico (CTE) [117], se analizaron los niveles de distintas subunidades de los complejos que la conforman.

En general, podemos indicar que los parámetros analizados se vieron alterados por los distintos tratamientos, aunque los cambios observados no estuvieron relacionados en todos los casos con el aumento en los niveles de Q producidos por estas sustancias. Siendo así, el incremento observado en los niveles de complejo I en presencia de los sustratos biosintéticos kaempferol (K) y pHB no parece tener relación con el aumento en los niveles de Q que estos compuestos producen, puesto que se observó esta misma tendencia con el tratamiento con PABA, inhibidor de la ruta biosintética que disminuye los niveles celulares de Q [119, 261]. La similitud de efectos de los tres compuestos estudiados es consistente con la hipótesis de que la regulación de los niveles de complejo I producida por K, pHB y PABA puede estar más relacionada con la existencia de homología estructural de estas moléculas que por sus efectos regulando al alza (K y pHB) o a la baja (PABA) los niveles de Q. En este sentido, la estructura del PABA difiere de la del pHB en un único sustituyente del anillo benzoico, donde aparece un grupo amino (NH₂) en lugar de un grupo hidroxilo (OH) [308].

En cuanto a la expresión del complejo II se observó un incremento en presencia de K y pHB, efecto que se vio revertido con los tratamientos combinados con PABA, mientras que el tratamiento simple con esta última sustancia no produjo cambio alguno en los niveles de este complejo con respecto a las condiciones control. Un hecho similar observamos en los niveles del complejo IV que, aunque en este caso no se alteraron en presencia de ningún tratamiento simple, sí que disminuyeron cuando los tratamientos

eran combinados con PABA. Estos resultados nos indican que el tratamiento con PABA podría estar actuando como inhibidor negativo de la expresión de este complejo únicamente en presencia del estímulo positivo que promueven sus análogos estructurales, K y pHB.

La respuesta observada en el complejo III, sin embargo, sí parece estar relacionada directamente con la modulación en los niveles de Q que producen estas sustancias, pues se observó un fuerte incremento en los niveles del marcador de este complejo cuando las células se trataron con los precursores de su síntesis, K y pHB, mientras que resultaron disminuidos en el tratamiento combinado. Además, el tratamiento simple con PABA fue suficiente para disminuir los niveles de complejo III con respecto a los observados en las condiciones control, por lo que podemos concluir que la abundancia de este complejo está fuertemente regulada por los niveles celulares de Q. Estos resultados están en sintonía con estudios previos llevados a cabo levaduras, que determinaron la importancia de los niveles de Q para mantener la estabilidad de este complejo. Concretamente, se demostró que en levaduras mutantes para el gen *coq7*, cuya síntesis de Q está interrumpida, el complejo III es inestable. Algunas de estas cepas mutantes fueron capaces de revertir este efecto mediante el aporte exógeno de Q₆, pues dicho suplemento fue capaz de dirigirse a la mitocondria estabilizando al complejo III y manteniendo su productividad [296].

Finalmente, los niveles de complejo V se caracterizan por su estabilidad en todas las condiciones experimentales ensayadas.

Cuando analizamos los efectos del aporte exógeno de Q₁₀ a distintas concentraciones (2 y 10 μM) observamos que existe una ventana farmacológica en la cual este aporte ejerce su efecto a nivel de las proteínas de la CTE, pues observamos un aumento en todas las subunidades marcadoras de los complejos mitocondriales en presencia de altas concentraciones del suplemento (10 μM) mientras que a concentraciones más bajas (2 μM) no encontramos alteraciones con respecto a las condiciones control. Estas dos concentraciones fueron elegidas a partir de estudios realizados en pacientes con síndrome antifosfolípido (APS), a los que se proporcionó un suplemento oral con 200mg/día de Q₁₀ reducido, que incrementó los niveles de Q₁₀ en plasma desde $1,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$ antes de la intervención, a $3,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$ finalizada la misma, pudiendo llegar en algunos pacientes incluso hasta 12 μM [260]. Cabe destacarse, por tanto, que el rango de concentraciones de Q₁₀ exógeno en el cual hemos observado

regulación de los niveles de complejos mitocondriales puede conseguirse de manera farmacológica mediante suplementación oral con esta sustancia. No obstante, es importante tener también en cuenta que mientras que el incremento fisiológico de la síntesis endógena de Q con sustratos biosintéticos como K o PHB fue suficiente para aumentar los niveles de algunos complejos mitocondriales, no se encontró respuesta cuando el suplemento con Q₁₀ exógeno se realizó a 2 μ M, una concentración que, no obstante, aumenta sustancialmente (hasta 3 órdenes de magnitud) los niveles total de Q en la célula. Ello podría indicar que la incorporación de Q₁₀ exógeno hasta los compartimentos celulares donde lleva a cabo su función metabólica o señalizadora es un proceso muy poco eficiente, quedando la mayoría del Q₁₀ exógeno secuestrado en un compartimento no relevante para estas funciones. En este sentido, se ha demostrado que la mayor parte del Q₁₀ procedente de suplementación exógena queda acumulado en el compartimento lisosomal [309] pudiendo ser la cantidad de Q que llegue al compartimento que regula la expresión de las subunidades insuficiente para mantener la respuesta.

Es posible que el PABA ejerza sus efectos a nivel de regulación de la expresión de complejos de las subunidades mitocondriales, de manera independiente de su acción sobre la biosíntesis de Q. De acuerdo con ello, incluso en células tratadas con concentraciones elevadas de Q los efectos son revertidos cuando la síntesis de Q endógeno se interrumpe por PABA.

5.1.2. Modificaciones en el consumo de oxígeno y la capacidad glucolítica en respuesta a las modificaciones en los niveles de Q

Nuestros resultados indican que el tratamiento con PABA es capaz de disminuir la ratio de consumo de oxígeno (OCR), indicativo de la capacidad respiratoria mitocondrial. Dado que el coenzima Q es el único compuesto capaz de transferir electrones desde el complejo I y II, recibéndolos bien del NADH o del succinato respectivamente, hasta el complejo III, no es difícil imaginar que las deficiencias en esta molécula sean capaces de producir alteraciones en la función mitocondrial [121]. Existen evidencias de que los complejos I, III y IV, pero nunca el II, y los dos transportadores “móviles” de electrones, Q y citocromo *c*, pueden organizarse dando lugar a distintas combinaciones de supercomplejos en la membrana mitocondrial interna

[70]. El coenzima Q parece ser un componente esencial en el ensamblado de estos supercomplejos, concretamente en el conocido como “respirasoma” compuesto por los complejos I+III+IV [117], habiéndose descrito que defectos en los componentes de los complejos así como en factores que facilitan su ensamblado producen la desorganización de estas estructuras y la generación de un exceso de ROS [26,55,59,60]. Estas evidencias unidas al hecho de que, como explicamos anteriormente, el Q es capaz, de promover la estabilización y eficiencia del complejo III [296], parecen explicar que en la línea celular Tkpts se produzca una disminución en el consumo de oxígeno en respuesta al inhibidor de la síntesis de Q, PABA. Además, este parámetro se recupera en presencia de un suplemento exógeno con Q₁₀, por lo que estos resultados parecen indicar que a 10μM la cantidad de Q que alcanza la mitocondria favorece la recuperación de la ratio de consumo de O₂.

A pesar de los efectos observados para el PABA, el tratamiento con pHB no produjo cambio alguno sobre el OCR y el ECAR, ni en condiciones basales ni de estrés. No obstante, se observó la caída en la ratio de consumo de oxígeno en presencia de PABA, niveles que no fueron revertidos en el caso del tratamiento combinado con pHB+PABA. Estos resultados apoyan la teoría de que los niveles de Q son un factor clave en el control de la respiración mitocondrial, pues en presencia del inhibidor de su síntesis este parámetro cae bruscamente, pero cuando añadimos el precursor de la misma no se observa una recuperación de los niveles, como sí ocurrió en presencia de un aporte exógeno directo. En este caso prevalecerá la inhibición competitiva del PABA sobre COQ2, frente al aporte de pHB que promovería su biosíntesis, pues su concentración es mucho más elevada (1mM de PABA vs. 1 μM de pHB).

Es importante notar, no obstante, que la respuesta al K es completamente diferente a la obtenida con el resto de los tratamientos, pues se observa un marcado descenso en el OCR en células tratadas con K tanto en condiciones basales como estresantes. Estos resultados están de acuerdo, en parte, con estudios llevados a cabo por Filomeni y colaboradores, dónde observaron que el tratamiento con altas concentraciones de K (200μM durante 12 horas) en células HeLa era capaz también de producir una disminución en el consumo de O₂, afectando principalmente al complejo I [101]. No obstante, estos mismos investigadores documentaron después que en células SH-SY5Y el K utilizado a una dosis más baja (30 μM), tenía un efecto muy leve *per se* sobre el consumo de oxígeno mientras que era capaz de prevenir la caída en este parámetro

inducida por el tratamiento con rotenona (inhibidor del complejo I) [104]. Nuestros resultados indican que a unas concentraciones relativamente bajas, el tratamiento con este polifenol disminuye el consumo de oxígeno de la misma manera que lo hace el tratamiento con PABA, cuando ambos tienen efectos completamente opuestos sobre los niveles de Q celulares. Por lo tanto, es posible que los efectos reguladores del K sobre la respiración mitocondrial, sean independientes del incremento en los niveles de Q que éste produce en células Tkpts. Además, con este tratamiento también observamos una tendencia a la disminución en el parámetro ECAR, lo que podría indicar que se produce una tendencia a la disminución en las concentraciones de ácido láctico en el medio celular, tanto en condiciones basales como de estrés, las cuales se acentúan aún más en presencia del tratamiento combinado con K+PABA, por lo que esta ruta de obtención de energía vía glucolítica podría verse disminuida en presencia de estos tratamientos. Este mismo fenómeno se observó en células HeLa tratadas con K a altas dosis, donde la concentración de lactato disminuyó de forma significativa a las 6 horas de tratamiento de manera dependiente de la concentración de K y de la cantidad de glucosa en el medio de cultivo, siendo más acusada cuando ésta se encontraba a concentraciones bajas (5.6 mM). Además, en este mismo modelo, la captación de glucosa determinada en presencia de un análogo de la glucosa fluorescente no metabolizable (2-NBDG) se vio disminuida en células tratadas con 200 μ M de K a los 30 minutos de tratamiento, observándose una captación de glucosa un $61 \pm 4\%$ menor que en células control [101].

5.1.3. Efecto de los precursores biosintéticos del Q sobre la producción de ROS y daño oxidativo en células Tkpts

En células Tkpts los niveles de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) mitocondrial disminuyeron de forma significativa en presencia de K, mientras que permanecieron invariables con el tratamiento con pHB. Numerosos estudios han evidenciado el papel del K como inhibidor de la producción de ROS en distintos modelos celulares [95-97].

Por su parte, el tratamiento con PABA incrementó la producción de ROS con respecto al control, sucediendo lo mismo cuando se suministró de forma combinada con K y pHB. Este aumento en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial concuerda con el hecho de que esta sustancia, al ser inhibidora de la síntesis de Q disminuyendo por tanto sus niveles, podría provocar la desestabilización del complejo III [296], uno de los principales productores de ROS a nivel mitocondrial [75], lo que a su vez puede influir

en el ensamblado del “respirasoma”, hecho que podría incrementar la producción de ROS [117, 310, 311]. El potencial de membrana por su parte no experimentó cambios significativos en presencia de los tratamientos suministrados.

Según los resultados obtenidos en este trabajo el K parece ser más eficiente en su respuesta sobre la generación de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial que el tratamiento con pHB, aunque ambos son capaces de incrementar los niveles de Q en esta línea celular. Esta respuesta parece estar mediada por el incremento en los niveles de Q, pues se revierte en presencia de PABA. No obstante, y dado que el K posee múltiples dianas celulares, es posible que también se encuentren otras respuestas implicadas en la disminución de esta especie reactiva, ya que no se observó alteración alguna en presencia del tratamiento con pHB.

Una de estas posibles respuestas podría venir mediada por la actividad de la sirtuina mitocondrial 3 (Sirt3). Ya que el tratamiento con K es capaz de incrementar la expresión de esta proteína en esta misma línea celular, lo que ha sido constatado en otros modelos [107, 134, 298], decidimos investigar si parte de la respuesta observada a nivel de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial podría estar mediada por el incremento en la actividad de esta proteína, cuya actividad ha sido relacionada con una mejora en los procesos redox [299], la regulación metabólica y la generación de ROS, correlacionándose además su expresión con una mayor longevidad en humanos.

Para ello, se llevaron a cabo determinaciones de la producción de ROS a nivel mitocondrial e intracelular en presencia de K y en presencia del tratamiento combinado con nicotinamida (NAM), sustancia capaz de inhibir la acción desacetilasa de las sirtuínas [109] tal y como se puso de manifiesto también en el presente trabajo, con el fin de discernir entre los posibles efectos mediados por la acción de Sirt3. Nuevamente, el K fue capaz de disminuir la producción de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial, mientras que se observó una leve tendencia al aumento de estos niveles en presencia del tratamiento combinado. Por su parte, no se observó alteración alguna de los niveles de ROS intracelulares en respuesta a ninguno de los tratamientos. Estos resultados apoyan que el tratamiento con K, pero no con pHB, puede generar un ambiente menos oxidante, al menos a nivel de la mitocondria, principalmente a través del incremento de los niveles de Q que produce en estas células, quedando descartado un posible efecto de Sirt3 en dicha respuesta.

Ya que los tratamientos con K y PABA produjeron modificaciones en la producción de O_2^- mitocondrial, se analizó el daño oxidativo a proteínas determinando los grupos carbonilos presentes en ellas. Nuestros resultados mostraron que ninguno de los tratamientos provocó alteraciones en el patrón de oxidación de proteínas procedentes de extractos totales de células Tkpts.

Puesto que la creación de un ambiente menos “oxidante” por parte del tratamiento con K se produjo a nivel mitocondrial, y dado que algunos estudios indicaron falta de cambios en la carbonilación de proteínas citosólicas tras la inducción de daño oxidativo [104], se llevaron a cabo determinaciones del “oxi-proteoma” en fracciones mitocondriales de células tratadas con K y pHB. La falta de cambios en este parámetro nos lleva a pensar que ni el tratamiento con K ni el tratamiento con pHB son capaces de producir modificaciones a nivel del daño oxidativo en proteínas, a pesar de las mejoras “antioxidantes” que provocan en esta línea celular.

Además, el hecho de que el tratamiento con PABA no esté produciendo daños en este componente celular, podría estar indicando que alguna respuesta antioxidante, diferente al aumento en los niveles de Q, debe de estar actuando para paliar estos posibles daños. En este sentido, se ha descrito que el PABA es capaz de actuar como “scavenger” del radical hidroxilo y oxígeno singlete, lo que podría estar relacionado con la protección del PABA frente a fotocarcinogénesis y toxicidad frente a algunas drogas [312].

5.1.4. Alteraciones en la masa mitocondrial mediadas por kaempferol

Puesto que el tratamiento con K incrementó los niveles de la proteína Sirt3 en la línea celular Tkpts [134], nos propusimos analizar el posible efecto de este tratamiento en la masa mitocondrial de las células, dada la relación entre esta proteína y la proteína PGC1- α [313]. PGC1- α desempeña un papel fundamental en la biogénesis mitocondrial, tal y como demuestra el hecho de que ratones carentes de esta proteína presentaron un metabolismo oxidativo y una capacidad termogénica reducidos [314]. La inhibición de PGC1- α por la eliminación de Sirt3 dio lugar a una disminución en la expresión de genes mitocondriales y una consecuente disminución en la biogénesis mitocondrial y viceversa: la pérdida de PGC1- α produjo una disminución en la expresión del gen que

codifica Sirt3 identificando a esta primera como un regulador aguas arriba de su expresión [315].

Siendo así, los niveles de un marcador de membrana externa mitocondrial (VDAC) mostraron una tendencia al aumento en presencia del tratamiento con K, no observándose variaciones de estos niveles en presencia del tratamiento combinado (K+NAM). Los niveles de una subunidad del complejo V, marcador de membrana interna, no mostraron alteraciones en presencia de ninguno de los tratamientos. Igualmente, la determinación de masa mitocondrial mediante citometría de flujo mostró una falta de cambios para todos los tratamientos ensayados, con independencia de si eran simples (K) o combinados (K+NAM). Podemos por tanto concluir que el tratamiento con K no produce modificación alguna de la masa mitocondrial de estas células ni a través de la elevación de los niveles de Q, ni por el incremento en los niveles de Sirt3 que promueve este compuesto.

5.1.5. Alteraciones en la dinámica mitocondrial por precursores biosintéticos del coenzima Q

La estructura de la mitocondria es altamente dinámica, pudiendo adaptarse a los requerimientos celulares de demanda energética, biogénesis de lípidos, síntesis de ácidos grasos, etc. Para ello, estos orgánulos están sujetos a modulación de sus propiedades dinámicas, sometándose a procesos de fusión y fisión cuyo balance determinará el proceso que se favorezca en cada momento. Las principales proteínas implicadas en el proceso de fisión son Drp1 y proteínas adaptadoras como Fis1, mientras que la fusión está favorecida por la función de las mitofusinas Mfn1 y Mfn2 y la proteína OPA1[251, 252].

El tratamiento con K, pHB y PABA incrementó notablemente los niveles de la proteína Drp1, mientras que los niveles de la proteína adaptadora Fis1 sólo tendieron a aumentar en presencia del tratamiento con pHB, tendiendo a disminuir en presencia del tratamiento combinado. Estos resultados indican que los marcadores de fisión mitocondrial, más concretamente Drp1, se ven incrementados en presencia de todos los tratamientos simples con independencia del efecto que ejercen sobre los niveles celulares de Q, pudiendo esto ser indicativo de que la regulación de la expresión de esta

proteína se debe a la homología estructural entre estas moléculas, ya que recordemos que el pHB y el PABA únicamente difieren en un sustituyente del anillo benzoico [308].

En cuanto a los marcadores de fusión los niveles de Mfn1 disminuyeron de manera muy significativa en respuesta al tratamiento con K y pHB, no observándose alteración alguna en respuesta al tratamiento con PABA, pero sí un incremento de dichos niveles cuando los tratamientos fueron combinados. La falta de cambios en los niveles de esta proteína por el tratamiento con PABA indican que este marcador de fusión mitocondrial no se altera por la disminución en la cantidad celular de Q mediada por este compuesto, aunque el aumento sustancial en los niveles de Q que tiene lugar como consecuencia del tratamiento con precursores biosintéticos sí podría tener un efecto sobre el marcador, que resulta prevenido por PABA. Por su parte, Mfn2 disminuyó significativamente en respuesta al tratamiento con K, disminución que también revirtió por el tratamiento combinado (K+PABA). No obstante, la respuesta contraria observada cuando las células fueron tratadas con pHB+PABA parecen descartar los niveles de Q como reguladores de la expresión de esta proteína. En contraste con este resultado, estudios llevados a cabo por Mourier y colaboradores establecieron una estrecha relación entre los niveles de Q y la proteína Mfn2. En dicho trabajo, llevado a cabo en corazón de animales carentes de Mfn2 así como en MEFs que presentaban ausencia de esta proteína, se evidenciaron deficiencias en la CTE a pesar de presentar niveles normales de enzimas y de los complejos que la componen y su actividad, que podrían estar motivadas por una deficiencia en el Q. Estos autores concluyeron que la falta de Mfn2 era capaz de afectar a la ruta biosintética de los terpenoides, que es determinante para el mantenimiento de unos niveles óptimos de Q mitocondrial. Además, las deficiencias en los niveles de Q y las de la cadena de transporte se “rescataban” parcialmente con la suplementación con Q₁₀ exógeno [316].

Por último, la proteína OPA1 aumentó sus niveles en respuesta a todos los tratamientos suministrados, por lo que parece que los niveles de Q tampoco están implicados en la regulación de este marcador, que podría estar siendo regulado positivamente por estas moléculas que comparten una homología estructural. Cabe destacar que en mamíferos OPA1 sufre distintos procesamientos proteolíticos, por lo que ésta puede aparecer tanto en su forma larga (L-OPA1), como corta (S-OPA1). Aunque estudios recientes han determinado que la forma larga es suficiente para promover la fusión mitocondrial, la forma corta ha sido relacionada con procesos de

fisión y fragmentación mitocondrial, por lo que un balance entre ambas será la que favorezca el proceso en uno u otro sentido [253]. Lamentablemente, el anticuerpo utilizado en el presente estudio únicamente reconoce a la forma larga del péptido, por lo que no podemos determinar que está sucediendo con la forma procesada, lo que ofrecería información sobre cuál de los dos procesos prevalece en nuestras condiciones experimentales.

En su conjunto, nuestros resultados son indicativos de que el tratamiento con K podría estar favoreciendo el proceso de fisión mitocondrial en detrimento del proceso de fusión en esta línea celular, no pareciendo estar implicados los niveles de coenzima Q en esta respuesta. En este sentido, estudios previos llevados a cabo en la línea celular SH-SY5Y determinaron que el tratamiento con 30 μM de K era capaz de producir cambios en la red mitocondrial, favoreciendo la pérdida de uniones con el retículo endoplásmico y mostrando una morfología redondeada conocida como “donut”, hechos que se exacerbaban en presencia del tratamiento con rotenona [104]. Este conjunto de acontecimientos suele ser predictivo de procesos de fisión mitocondrial, lo que podría constituir un paso previo a su eliminación por mitofagia [317, 318]. Futuros estudios serán necesarios para determinar si la morfología mitocondrial se ve afectada por el tratamiento con K y si la mitofagia se ve incrementada en estas condiciones.

5.1.6. Alteraciones en la ruta de autofagia y su posible regulación a través de modificaciones en los niveles de Q

La relación entre los niveles de Q celulares y la ruta de autofagia, ha sido poco estudiada. A este respecto, un estudio llevado a cabo por Rodríguez-Hernández et al. en el año 2009 estableció por primera vez el papel de la autofagia en la patofisiología de la deficiencia de Q, observando que en fibroblastos procedentes de pacientes con deficiencias en esta molécula, la ruta autofágica se veía incrementada como un mecanismo para favorecer la supervivencia celular [300]. En estas células deficientes en Q se observaron alteraciones en la función de la CTE, concretamente en las actividades en las que están implicadas el Q (I+III y II+III) y el complejo III, dada la estrecha relación existente entre esta molécula y la funcionalidad y estabilidad de este complejo [296], como también hemos comprobado en nuestro modelo experimental. También se observó una disminución significativa en el potencial de membrana mitocondrial,

incremento en la producción de peróxidos intracelulares así como una activación del poro de transición de permeabilidad (PTPm), efectos todos ellos paliados por el suplemento con Q₁₀ exógeno a concentraciones, no obstante, muy elevadas y fuera del rango fisiológico (100 µM). Además, bajo condiciones de deficiencia de Q todas estas alteraciones mitocondriales dieron lugar a un incremento en la autofagia, aumentándose la expresión de genes relacionados con este proceso (Atg 12, Beclina 1 y LC3) y también de los niveles de las proteínas ATG12 y la forma lipídada de LC3, LC3II. Esta activación de la autofagia está claramente dirigida al recambio de orgánulos no funcionales, tal y como se demostró mediante técnicas de co-inmunoprecipitación con marcadores específicos de lisosomas y mitocondrias, y por el incremento en la actividad β-galactosidasa (marcadora de la actividad lisosomal). Más aún, bajo condiciones de deficiencia de Q, un bloqueo de la autofagia con inhibidores farmacológicos dio lugar a una significativa disminución en la viabilidad celular así como un incremento en los marcadores apoptóticos, por lo que dichos resultados indican que la activación de la mitofagia tiene un papel protector en las células deficientes en Q. Este efecto fue demostrado además en MEFs *wild type* (wt) en los que se indujo deficiencia de Q mediante el tratamiento con PABA, así como en MEFs mutantes para un gen implicado en autofagia (ATG5), de modo que en los MEFs mutantes la depleción de Q inducida por tratamiento con PABA incrementó notablemente la apoptosis en estas células, mientras que el aporte exógeno de Q fue capaz de revertir dicho evento. Otros estudios más recientes llevados a cabo en levaduras, han determinado la importancia de la proteína Coq7 y más concretamente de la fosfatasa encargada de su activación, Ptc7, en el balance de biosíntesis de Q₆ (forma del Q predominante en levaduras) para el mantenimiento de la longevidad cronológica y la mitofagia [319].

Dada por tanto la relación existente entre Q y la ruta autofágica, en el presente estudio nos centramos en los efectos del Q sobre este proceso en un modelo no deficiente para esta molécula al que se le ofrece un aporte de precursores de su síntesis endógena (K y pHB) o un aporte exógeno directo de Q₁₀, estudiando además qué sucede en condiciones de déficit de Q inducidas por el tratamiento con PABA.

La variabilidad observada en los resultados referidos a mTOR y fosfo mTOR, tal y como explicamos previamente en el apartado 4.1.8 de Resultados, parece indicar que los niveles de Q no juegan un papel fundamental en la regulación de estas

proteínas localizadas aguas arriba de la ruta autofágica, dada la gran variedad de factores que actúan sobre este regulador maestro de la ruta [29, 30]. En lo que respecta a Beclina 1 obtuvimos unos resultados muy llamativos. Si consideramos de manera conjunta los efectos de los precursores, el inhibidor biosintético, así como el suplemento exógeno con Q₁₀, podemos observar que ninguno de los precursores *per se* afectó los niveles de Beclina 1 pero el Q₁₀ exógeno sí produjo un incremento, lo cual sería consistente con la explicación de que el aumento del Q endógeno no afecta a los niveles de Beclina 1, pero esta proteína sí se acumula en las condiciones en que aumenta el Q₁₀ en un compartimento distinto, posiblemente lisosomal [309]. Por su parte, si analizamos los efectos del PABA *per se* y en tratamiento conjunto con Q₁₀, observamos que en todos los casos produce una disminución de Beclina 1. Por tanto, dicha disminución es un efecto directo del PABA que no está relacionado con su acción como inhibidor competitivo de la proteína COQ2. Más difícil de explicar es el aumento sustancial de Beclina 1 que tiene lugar en los tratamientos combinados, particularmente con K+PABA. En este caso, ya que, a la concentración utilizada (1 mM), el PABA anula por completo la síntesis de Q estimulada por el suplemento con los precursores biosintéticos, que se utilizan a una concentración mucho menor (pHB 1 μM o K 10 μM), el aumento de Beclina 1 por pHB, y sobre todo por K, podría estar relacionado con una acción de estos compuestos que sólo se pone de manifiesto ante una situación de inhibición de la síntesis de Q. En todo caso, los resultados obtenidos en presencia de Q y PABA contrastan con los obtenidos por otros autores en fibroblastos deficientes de Q, dónde los niveles de mensajero de esta proteína se encontraban incrementados con respecto a sus respectivos controles [300], mientras que en nuestro estudio son las condiciones deficientes de Q, recreadas de forma farmacológica, las que disminuyen los niveles de esta proteína. Ello apunta a la existencia de mecanismos de regulación de la autofagia por el Q que son dependientes del tipo celular.

Continuando con la caracterización de la ruta de señalización autofágica en células tratadas con efectores que modulan los niveles de Q, no se produjo ninguna alteración a nivel de la proteína p62 en presencia de ninguno de los tratamientos simples evaluados, al menos no en su forma “nativa”. Esta proteína es capaz de reconocer componentes ubiquitinilados mediante unos dominios específicos (UBA), favoreciendo por tanto la incorporación de éstos al fagóforo en formación. Para poder exponer estos dominios p62 debe, a su vez, ser también ubiquitinilada y fosforilada [46]. En el caso del

experimento con suplemento con Q_{10} exógeno pudimos detectar las formas ubiquitiniladas de esta proteína y, aunque no tuvo lugar cambio alguno en la forma no modificada de la misma, se observó que el patrón en escalera característico de las estas formas ubiquitiniladas se incrementó en todas las condiciones experimentales dónde el Q_{10} estaba presente. Estos resultados podrían indicar dos hechos: o bien que el Q_{10} exógeno podría estar favoreciendo la incorporación de proteínas ubiquitiniladas al fagóforo, o bien que estas formas se están degradando de manera menos eficiente por la ruta de autofagia lo que podría suponer un ligero bloqueo en dicha ruta que fuera capaz de afectar a los niveles de estas formas y no a la forma de la proteína sin modificar.

Para concluir con el estudio de los marcadores principales de la ruta de autofagia, se analizaron los niveles de LC3I y de su forma lipidada LC3II, ambas fundamentales en las últimas etapas de este proceso, concretamente en la formación del autofagosoma y su posterior maduración [8]. En este caso, se observó que los tratamientos con K y pHB incrementaron de forma muy significativa los niveles de ambas formas de la proteína, mientras que los tratamientos combinados con el inhibidor PABA disminuyeron dichos niveles frente a sus respectivos tratamientos simples. Por su parte, el tratamiento con Q_{10} exógeno mostró este mismo efecto incrementando los niveles de ambas formas de la proteína, mientras que en este caso el tratamiento combinado con PABA no supuso cambios con respecto a las células tratadas sólo con el suplemento de Q.

Estos resultados parecen indicar que el incremento de ambas formas de la proteína LC3 está regulado por los niveles de Q, puesto que el tratamiento con precursores no fue capaz de reproducir dicho aumento en presencia de PABA, mientras que cuando la ubiquinona se suministró de manera exógena, ambas proteínas se encontraban aumentadas sin que en este caso el PABA mostrara efecto alguno. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Rodríguez-Hernández y colaboradores, donde la deficiencia de Q en fibroblastos produjo un incremento de la forma lipidada de LC3 (LCII) no cambiando los niveles de LC3I [300].

Los resultados obtenidos en nuestro estudio pueden ser indicativos de dos hechos opuestos: por un lado, podrían indicar un aumento en el flujo autofágico en presencia de tratamientos que favorecen el aumento de los niveles de Q, el cual se bloquea en presencia de PABA, tal y como observamos en los tratamientos combinados. Por otro lado, estas mismas observaciones podrían indicar que, aunque un aumento en los

niveles de Q puede producir un incremento en el procesamiento de la forma primitiva de LC3 a LC3I y en la conversión de ésta a la forma lipidada, podría existir un bloqueo parcial en la formación de autofagosomas o en la degradación de éstos por parte de los lisosomas, lo que daría también lugar al aumento de los niveles de ambas proteínas.

Con el fin de discernir entre ambos procesos, se llevaron a cabo determinaciones del flujo autofágico mediante citometría de flujo en ausencia y presencia de cloroquina (Cq), sustancia que inhibe la unión de los autofagosomas con los lisosomas produciendo la acumulación de éstos [264, 265], lo que nos permitirá hacer una estimación de los autofagosomas que están formándose. Los resultados indicaron que tanto el tratamiento con pHB como con Q₁₀ disminuyó significativamente el flujo autofágico, mientras que las células tratadas con PABA lo incrementaron notablemente con respecto al control. Una hipótesis que puede explicar estos resultados, es que el aumento en los niveles de Q estaría favoreciendo el procesamiento de la forma primitiva de LC3 (pro-LC3) a LC3I y de ésta a su forma lipidada (LC3II) y, simultáneamente, estaría provocando un bloqueo parcial en los pasos subsiguientes que dan lugar a la formación de autofagosomas.

Estos resultados podrían coincidir parcialmente con el estudio de referencia en el que basamos nuestra hipótesis de trabajo, dónde la autofagia se activa como un método de supervivencia ante el déficit de Q [300]. Siendo así, en la línea celular Tkpts se observó un marcado incremento del flujo autofágico cuando las células se trataban con PABA, lo que indicaría que estas células intentan paliar los posibles defectos provocados por la deficiencia de Q, como el incremento en la producción de O₂⁻ mitocondrial, mejorando la eficiencia de este proceso. De esta manera, bajo las condiciones experimentales que promueven un incremento de Q en estas células, ya sea el tratamiento con pHB o con Q₁₀ 10µM, se produce un bloqueo de dicho flujo, pues en estas condiciones probablemente no sea necesaria que esta ruta se vea incrementada para promover el intercambio de mitocondrias dañadas que pudieran promover procesos apoptóticos.

Cabe destacar asimismo que en esta línea celular los tratamientos que aumentan el Q producen también un incremento en la forma LC3I, la cual es citoplasmática, por lo que estas intervenciones parecen estar favoreciendo su procesamiento con respecto a las condiciones control. Para comprobar si estos tratamientos estaban produciendo modificaciones a nivel de expresión génica o si las alteraciones en los marcadores se

debían exclusivamente a un mayor procesamiento proteico, se llevaron a cabo determinaciones de niveles de ARNm de tres genes implicados en la ruta de autofagia, *Sqstm1*, que codifica para p62, y los dos genes que codifican para la proteína LC3 (*Maplc31a* y *Maplc31b*). A este respecto, no se produjo cambio alguno en los niveles de ninguno de estos mensajeros en respuesta a los tratamientos suministrados a las células (K, Q₁₀ 10µM, PABA y K+PABA), por lo que podemos concluir que los cambios observados en la proteína p62, pero más especialmente en las formas de LC3, LC3I y LC3II, en respuesta a los niveles de Q, son debidos a un mayor procesamiento proteico. Estos datos contrastan en parte con las observaciones llevadas a cabo por Rodríguez-Hernández y colaboradores, donde se encontró aumento en la expresión del mensajero de LC3 en fibroblastos deficientes de Q [300]. Por el contrario, en nuestro estudio no encontramos cambios a este nivel cuando las células fueron tratadas con PABA, condiciones que intentan recrear la deficiencia de Q. No obstante, en el anterior trabajo no se llevaron a cabo determinaciones de los niveles de mensajero de este gen en MEFs *wt* tratados con PABA, por lo que no es posible conocer si en ese modelo la intervención farmacológica afecta de igual manera a la expresión de este mensajero que las condiciones patofisiológicas de deficiencia de Q observadas en los fibroblastos de pacientes.

5.1.7. Papel de la tiorredoxina 1 (Trx 1) y de la proteasa ATG4 en el control de la autofagia mediado por Q

Estudios recientes llevados a cabo en levaduras (*S. cerevisie*) han determinado que la acción de la tiorredoxina modula la actividad de la proteína Atg4 [302]. Concretamente, los resultados de estos estudios indican que en estos organismos Atg4 se encuentra activo en su forma reducida e inactivo en su forma oxidada, siendo reversible dicha regulación, por lo que se sugiere la existencia de modificaciones post-traduccionales de tipo rédox en la misma, efectos que han sido encontrados también en homólogos de Atg4 en humanos [320] y *Arabidopsis thaliana* [321]. En este mismo estudio se identifica a Trx como el posible donador electrónico encargado de la activación de Atg4 en *S. cerevisie* reduciendo los grupos sulfidrilo presentes entre ciertos residuos de cisteína localizados en el sitio activo de esta proteína.[302].

Por ello, se llevaron a cabo determinaciones de los niveles de la tiorredoxina 1 (Trx-1) en células sometidas a los distintos tratamientos, y se observó un incremento notable

en los niveles de la misma en presencia de los tratamientos con K y pHB, mientras que disminuyeron cuando los tratamientos eran combinados con PABA. De la misma manera, el aporte exógeno de Q₁₀ tendió a aumentar dichos niveles con respecto a las condiciones control, no observándose disminución posterior cuando el tratamiento era combinado con PABA.

Estas evidencias parecen indicar que la regulación de Trx 1 viene mediada, al menos en parte, por un incremento en los niveles de Q resultantes tanto de síntesis endógena como de suplementación directa, aunque estos efectos parecen producirse de manera más eficiente cuando esta molécula es sintetizada por la propia célula. Además, el análisis de los niveles de mensajero codificante para esta proteína (gen *Txn-1*) determinó que esta regulación está relacionada con el procesamiento proteico y no con la inducción de la expresión de dicho gen.

Dada la relación existente entre Trx 1 y la proteína ATG4, y teniendo en cuenta que los tratamientos que incrementaban los niveles de Q también aumentaban los niveles de LC3I y de LC3II pero no la formación de autofagosomas (tal y como se demuestra en los estudios de flujo autofágico determinados por citometría), decidimos investigar más a fondo el posible procesamiento de la forma primitiva de LC3 (pro-LC3) a LC3I mediado por la proteína ATG4. En levaduras, Atg4 es una cisteína proteasa requerida para la iniciación de la conjugación de Atg8 con la fosfatidiletanolamina (PE) y para la desconjugación de ésta (Atg8-II) de las membranas de los autofagosomas para facilitar la autofagia [15, 322]. En el genoma humano existen 4 genes que codifican para proteínas ATG4 (ATG4A, ATG4B, ATG4C y ATG4D) y siete genes que codifican para proteínas ATG8 (dos isoformas de LC3A, LC3B/C, GABARAP, GABARAPL1 y GABARAPL2) [16]. ATG4B es la que presenta una actividad proteolítica más activa: concretamente procesa a LC3 de una manera 1500 veces más eficiente que el resto de homólogos de ATG4 [323], que exhiben su capacidad proteolítica sobre ciertos sustratos de la subfamilia de proteínas GABARAP [16].

La importancia que suscita ATG4 en mamíferos es que es la única encima capaz de reconocer a los residuos de arginina que presentan las proteínas de la familia ATG8, como LC3, en su extremo carboxilo terminal, eliminándolo proteolíticamente y dando lugar entonces a la proteína LC3I. Posteriormente, mediante la actividad de las enzimas ATG7, ATG3 y el sistema de conjugación ATG12/5/16L, esta proteína se unirá a PE

dando lugar a la forma LC3II unida tanto interna como externamente a los autofagosomas [11]. Finalmente, la misma ATG4 mediará la delipidación de LC3II a su forma citosólica LC3I [16].

Estudios muy recientes llevados a cabo tanto *in silico* como *in vitro*, han demostrado que la droga antifúngica tioconazol (Tc) inhibe ATG4A/B ocupando su sitio activo e interfiriendo en su unión con LC3 y, por tanto, disminuyendo el flujo autofágico en distintas líneas tumorales [16]. En este estudio, el silenciamiento de ATG4 así como el tratamiento con Tc produjo una acumulación de LC3II y un incremento en la cantidad de autofagosomas con respecto a las células control, observándose también una disminución en la co-localización de ésta con marcadores lisosomales como LAMP-1. El tratamiento con Cq permitió observar que no se producía aumento en la acumulación de LC3II, sugiriendo que lo que se favorece con el silenciamiento de ATG4 y el tratamiento con Tc es la degradación del mismo y no su formación, y que la acumulación de autofagosomas se debe a la presencia de LC3II en la membrana de los mismos, que imposibilita la fusión de éstos con los lisosomas disminuyéndose así el flujo autofágico [16].

En nuestro estudio, se observó que concentraciones crecientes de Tc (5-40 μM) disminuían la viabilidad del cultivo, tal y como mostró el ensayo MTT. No obstante, en una posterior comprobación mediante inmunoblot se observó que a concentraciones más bajas de este límite inferior (0,5 y 1 μM), no se producían cambios en ambas formas de LC3 y aunque la viabilidad celular se viera parcialmente comprometida, se continuaron los ensayos con Tc a 5 μM . La comprobación de los niveles de Trx 1 en células tratadas con Tc reveló que la expresión de esta proteína se veía disminuida de forma importante. Este resultado dificulta la interpretación del posible papel de ATG4 como única diana del efecto de los niveles de Q sobre la ruta de autofagia, ya que al afectarse de igual manera la expresión de Trx 1 ante el tratamiento con el inhibidor de la actividad de ATG4, no se podrá discernir qué papel concreto está jugando cada una de ellas.

Una vez determinada la concentración capaz de inhibir la actividad de la proteína ATG4 en la línea celular de estudio, analizamos el posible papel del Q sobre esta proteasa. Nuestros resultados confirmaron nuevamente que el tratamiento con Q₁₀ exógeno incrementó los niveles de ambas formas de la proteína LC3, observándose que,

en presencia del tratamiento con Tc, dichos niveles disminuyeron de forma muy significativa, siendo casi imperceptible la señal del blot en el caso de LC3I. El tratamiento combinado no reestableció los niveles de ninguna de las formas de la proteína, lo que indica la imposibilidad del Q de actuar en presencia del inhibidor de ATG4. Cómo puede observarse, la ratio de LC3 tendió a incrementarse en presencia de Q, haciéndolo de forma significativa en presencia de los tratamientos con Tc. Este resultado pone de manifiesto que la interpretación única de este parámetro en cuanto a determinaciones de flujo autofágico se refiere puede ser en ocasiones equívoca, pues en este caso este resultado estaría indicando que existe un flujo autofágico incrementado en unas condiciones en las cuales dicho flujo disminuye [16]. La posterior determinación de los niveles de Trx 1 en presencia de Tc y el tratamiento combinado con Q+Tc, donde esta proteína se encontraba muy disminuida con respecto a las condiciones control, podría estar poniendo de manifiesto que un decaimiento en la viabilidad provocado por el tratamiento con esta droga, puede influir en la menor expresión de Trx 1. Aunque a la luz de los resultados obtenidos queda claro que los niveles de Q incrementan el procesamiento de la forma pro-LC3 a LC3I, no podemos diferenciar cuál es el regulador directo que responde a las alteraciones en los niveles de Q, si Trx1 o ATG4, ya que en presencia del inhibidor de esta última también se observó un fuerte descenso de los niveles de la tiorredoxina. No obstante, los resultados obtenidos son compatibles con la hipótesis de que la alteración de los niveles de Trx1 en respuesta a niveles incrementados de Q, podría actuar sobre ATG4 llevando a cabo un procesamiento más eficaz de pro-LC3 a LC3I.

5.2. Ácidos grasos como moduladores de la función mitocondrial y ruta autofágica en la línea celular Hepa 1.6

5.2.1. Efecto de las emulsiones lipídicas sobre la acumulación de depósitos grasos. Relación entre las gotas lipídicas y otros orgánulos celulares

La relación entre la acumulación de gotas lipídicas y los aportes grasos ha sido ampliamente estudiada en distintos *modelos in-vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, estudios llevados a cabo en hepatocitos humanos han determinado que el tratamiento con ácido oleico (OA) es capaz de incrementar la cantidad de lípidos neutros incorporando éstos a nuevas gotas lipídicas [324], mientras que estudios llevados a cabo en ratones alimentados con dietas ricas altas en grasa (HFD) también reportaron la acumulación de estos almacenes grasos en hígado [325].

En el presente trabajo se observó que la adición de las emulsiones Lipoplus y ClinOleic incrementaron en gran medida la cantidad de gotas lipídicas acumuladas en las células con respecto a las condiciones control, siendo más acusada esta acumulación en el caso de la emulsión ClinOleic.

Se ha descrito que los estados de hiperlipidemia en tejidos no adiposos, pueden provocar una disfunción celular que puede desencadenar incluso muerte celular, un fenómeno conocido como lipotoxicidad [326]. Estudios llevados a cabo en distintas líneas celulares han sugerido que la lipotoxicidad asociada a la acumulación de ácidos grasos de cadena larga es específica de los ácidos grasos saturados (SFA) [326-329], proponiéndose que esta mayor toxicidad puede estar relacionada con la baja eficiencia que poseen éstos para convertirse a triglicéridos (TG), como sucede en el caso del palmitato [326]. No obstante, la co-suplementación con ácidos grasos insaturados es capaz de “rescatar” a las células de la lipoapoptosis inducida por los SFA [327-329]. De acuerdo con esto, en un estudio llevado a cabo por Listenberger y colaboradores en células CHO (células de ovario de hámster chino), el tratamiento con oleato (ácido graso monoinsaturado) fue capaz de “rescatar” a estas células de la apoptosis mediada por palmitato, promoviendo la incorporación de éste a los TG [326].

Las emulsiones utilizadas en el presente trabajo están compuestas por ácidos grasos insaturados; monoinsaturados (MUFA) n-9 principalmente en ClinOleic (62% de ácido

oleico) y poliinsaturados (PUFA) n-3 en Lipoplus, pero además presentan en su composición un cierto porcentaje de ácido palmítico (PA) (SFA), siendo de un 12% en el caso de ClinOleic, y un 6% en el caso de Lipoplus [330].

El mayor incremento en la acumulación de las gotas lipídicas en presencia del ClinOleic con respecto a la otra emulsión puede estar indicando una respuesta adaptativa de estas células frente a la lipotoxicidad que puede inducir el porcentaje de PA presente en la emulsión, el cual en presencia de OA (MUFA) sería capaz de incorporarse de forma eficiente a las gotas lipídicas para ofrecer esta “protección a la célula”. La acumulación de una menor cantidad de gotas lipídicas en presencia de la emulsión Lipoplus, podría estar indicando que el porcentaje de SFA presente en su composición no es tan elevado como para disparar una respuesta frente a la lipotoxicidad tan llamativa como la observada en presencia de ClinOleic. A parte de esta posible hipótesis, se ha descrito que los PUFA n-3 previenen la formación de reservas grasas, disminuyendo por ejemplo depósitos grasos concretos en animales alimentados con una dieta HFD, así como la concentración de TG en plasma [331], siendo capaz también de reducir el volumen de los adipocitos presente en dichos depósitos [332]. Además, otros trabajos han apuntado que el tratamiento con PUFA n-3 (ácido eicosapentaenoico, EPA) disminuye la expresión de genes relacionados con la adipogénesis mientras que modula el metabolismo lipídico incrementando la expresión de genes relacionados con la lipólisis en adipocitos 3T3-L1 [333]. Futuras investigaciones serán necesarias para determinar el papel que desempeña la emulsión Lipoplus, y los PUFA que la componen, en el metabolismo graso de las células Hepa 1.6.

Dado el incremento en la producción de gotas lipídicas en esta línea celular en respuesta a las distintas emulsiones lipídicas, nos planteamos el papel de la proteína Mfn2 en las posibles interacciones entre las mitocondrias y distintos orgánulos celulares que podrían estar relacionadas con el metabolismo de dichos lípidos. De esta manera una expresión alta de Mfn2 ha sido encontrada en tejidos con gran cantidad de mitocondrias, como corazón o tejido adiposo pardo (BAT), jugando esta proteína un papel importante en las interacciones de las mitocondrias con orgánulos como el retículo endoplásmico (RE) [303] y las gotas lipídicas [304]. Como ya indicamos anteriormente, Mfn2 es una GTPasa presente en la membrana mitocondrial externa con un papel destacado en la fusión mitocondrial [252]. En el presente trabajo se observa

que el tratamiento con ambas emulsiones lipídicas incrementó muy significativamente los niveles de la proteína Mfn2, hecho que podría estar indicando que, en estas condiciones, se favorece la interacción de las mitocondrias con estos acúmulos grasos para una mejor metabolización de los mismos. Estudios llevados a cabo en grasa parda de ratones *knockout* específicos de tejido adiposo para la proteína Mfn2 (Mfn2-adKO) revelaron que estos animales presentaban un aumento en la cantidad de gotas lipídicas en acúmulos grasos interescapulares, una disminución de la actividad lipogénica y en genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos, así como una disminución en la ratio de lipólisis en BAT del 80% con respecto a animales control [304]. Además, en los animales control de este estudio se observó que las mitocondrias se localizaban en las proximidades de las gotas lipídicas, encontrándose aproximadamente el 60% de ellas en contacto directo con dichas gotas. En animales deficientes para Mfn2 esta interacción se encontraba reducida hasta en un 50%. Fue significativa también la disminución de la presencia de proteínas asociadas a las gotas lipídicas en fracciones mitocondriales de estos animales como las perilipinas 1 y 3 (PLIN1 y PLIN3). Concretamente fue la proteína PLIN1 la que interaccionaba de manera directa con Mfn2 favoreciendo el contacto gota-mitocondria [304].

Tal y como demuestra este estudio, y dada la importancia de la proteína Mfn2 en la interacción de las mitocondrias con las gotas lipídicas, nuestros resultados podrían indicar que se produce un incremento en los niveles de esta proteína en la línea celular Hepa 1.6 en respuesta al tratamiento con las distintas emulsiones lipídicas, y en especial con Lipoplus, para favorecer la interacción mitocondria-gota lipídica y, por tanto, favorecer la metabolización de dichos acúmulos grasos.

La proteína Mfn2 también parece jugar un importante papel en la interacción de las mitocondrias con el RE, estando dicho contacto también relacionado con el procesamiento de los acúmulos lipídicos. Se piensa que la formación de la gota lipídica comienza con la generación de TG en el RE. Éstos comienzan a acumularse entre las bicapas lipídicas formando pequeñas yemas que, al aumentar su tamaño, se escinden del retículo y quedan acumuladas en el citoplasma. Bajo ciertas condiciones de demanda bioenergética por parte de la célula, estos TG se rompen formando glicerol y ácidos grasos que pasarán a la mitocondria para formar ATP mediante la β -oxidación de los mismos [334].

Numerosas enzimas encargadas de la biosíntesis de triglicéridos, como por ejemplo DGTA2, se localiza en zonas especializadas del RE denominadas “membranas de asociación a mitocondrias” (MAM), las cuales pueden interaccionar de forma reversible con estos orgánulos [335]. Distintas proteínas pueden localizarse de forma permanente o transitoria en estas membranas [336]. Es el caso de Mfn2 que también se encuentra de forma abundante en las MAM, habiéndose propuesto por tanto como facilitadora de la interacción entre RE y mitocondria [303]. No obstante, recientes estudios apuntan a que esta proteína no es esencial para el mantenimiento de la unión entre ambos orgánulos[337].

Se ha propuesto que la proteína Mfn2 presente en el RE interacciona con la presente en la mitocondria permitiendo, por tanto, la interacción entre ambos orgánulos y favoreciendo el transporte de fosfolípidos para su posterior procesamiento mitocondrial [338]. Aunque algunos estudios demuestran que Mfn2 no es necesaria para la biosíntesis de TG, ni para la diferenciación adipocitaria, sí que interviene en la morfología de las gotas lipídicas y facilita el diálogo entre RE y mitocondria [334]. De esta forma el aumento en los niveles de Mfn2 observado en nuestra línea celular de estudio en respuesta al tratamiento con las emulsiones lipídicas, podría estar relacionado con la facilitación de contactos entre RE y mitocondrias, lo que resultaría en una mejora en el procesamiento de los de los acúmulos grasos.

5.2.2. Alteraciones de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y efecto del suplemento graso

Aunque en el presente estudio la adición de emulsiones lipídicas no indujo cambios significativos a nivel de actividad de los complejos de la cadena de transporte electrónico (CTE), sí que se observó una tendencia al incremento en la actividad del complejo IV en presencia de Lipofundina, y esta misma tendencia en las actividades de los complejos I, III y IV, así como en el caso de las actividades combinadas I+II y II+III en presencia del tratamiento con Lipoplus, aunque éstas últimas no alcanzan la significación estadística. La tendencia al incremento en el complejo III y las actividades combinadas, puede estar relacionada con el hecho de que el Q, cuyos niveles aumentan de manera significativa en presencia de este tratamiento, es capaz de regular la actuación y estabilidad de este complejo, tal y como se describe en el trabajo de Santos-Ocaña *et al* [296]. En este estudio se determinó que en levaduras mutantes para el gen

coq7, cuya síntesis de Q estaba interrumpida, el complejo III era inestable. En algunas de estas cepas mutantes el aporte exógeno de Q₆ fue capaz de revertir este efecto pues dicho suplemento fue capaz de dirigirse a la mitocondria estabilizando al complejo III y manteniendo su productividad [296].

En el contexto de la determinación de masa mitocondrial se analizaron también los niveles de distintas subunidades de los complejos. Estos resultados podrían estar parcialmente relacionados con los observados en el presente trabajo en la línea celular Tkpts, en la que el tratamiento con precursores de la síntesis de Q, así como un suplemento exógeno ésta, fue capaz de producir un incremento en los niveles de complejo III, entre otros.

Un incremento en la β -oxidación de los ácidos grasos en respuesta a al aporte graso, también puede influir en la actividad y cantidad de subunidades de complejos de la CTE. Ejemplo de ello se recoge en el estudio realizado por Turner y colaboradores, que determinó que una dieta HFD, además de inducir resistencia a insulina, era capaz de producir un incremento en la capacidad de oxidación de ácidos grasos y un aumento en los niveles de expresión de todas las subunidades de la CTE en músculo esquelético [339]. Otros estudios apuntan la importancia de la relación entre la β -oxidación de los ácidos grasos y la CTE, jugando un papel fundamental en dicha relación la actuación de enzimas que participan en este proceso como la MCAD (de las siglas en inglés “*medium-chain acil-Coenzyme A dehydrogenase*”) envuelta en los pasos iniciales de la misma. Se ha descrito que en pacientes deficientes en esta enzima se produce una desestabilización de los complejos I, III y IV, dificultándose también la formación de supercomplejos por ellos, siendo los complejos I y IV los más afectados [340].

Estos resultados junto con los referentes a consumo de oxígeno y metabolismo celular (OCR y ECAR) llevados a cabo también en el presente estudio, parecen indicar que, a pesar de producir un incremento significativo en los niveles Q, el cual desempeña un importante papel como transportador de electrones entre complejos de la CTE [108], los tratamientos con emulsiones lipídicas no alteran la respiración mitocondrial ni la capacidad metabólica en la línea celular Hepa 1.6.

5.2.3. Cambios en la masa mitocondrial en respuesta a los tratamientos con emulsiones lipídicas

Dada la estrecha relación entre el Q y la mitocondria, se determinaron los niveles de masa mitocondrial de células tratadas con las diferentes emulsiones utilizando distintas aproximaciones experimentales.

Los ensayos de citometría de flujo con la sonda MitoTracker[®]Green FM mostraron un incremento en la cantidad de mitocondrias en células tratadas con Lipoplus pero no con ClinOleic, resultado que concuerda con observaciones previas llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación mediante el análisis de micrografías de microscopía electrónica llevadas a cabo en esta línea celular y con la misma emulsión [108]. En estos análisis se observó que el tratamiento con Lipoplus produjo un incremento en el número de mitocondrias por célula, así como un aumento en el volumen tanto de las células como de las mitocondrias. Este resultado pone de manifiesto, nuevamente, el hecho de que la célula responde de manera diferencial al aporte de distintas fuentes lipídicas, ya que los cambios a este nivel únicamente se observaron cuando las células fueron tratadas con una fuente rica en PUFA n-3 (Lipoplus) y no cuando la fuente suministrada fue rica en MUFA n-9 (ClinOleic).

El incremento en la masa mitocondrial puede deberse fundamentalmente a dos motivos: i) a un aumento en la biogénesis mitocondrial inducido por los PUFA n-3, ii) o a una conservación de las mitocondrias existentes por disminución en la eliminación selectiva de mitocondrias mediante autofagia (ruta de mitofagia). Ha sido ampliamente descrito que el tratamiento con PUFA n-3 es capaz de inducir la biogénesis mitocondrial a través de la activación de PGC1- α [341, 342]. Concretamente el tratamiento con EPA en adipocitos subcutáneos de mujeres con sobrepeso promovió cambios en estos adipocitos, apareciendo en ellos características propias del tejido “beige”, el cual es más eficiente en el metabolismo de las grasas debido a un incremento en la función mitocondrial, a una mayor expresión de proteínas desacoplantes como UCP1, y a una disminución en las rutas que inhiben la lipogénesis y, por tanto, la acumulación de grasa. Se observó asimismo un incremento en la masa mitocondrial de estos adipocitos, de entorno a un 20% con respecto a los controles, incrementándose la expresión de proteínas como Sirt1 y AMPK, las cuales median la expresión de PGC-1 α [342].

Dado que el papel de los PUFA en la inducción de la biogénesis mitocondrial es bien conocido, decidimos centrarnos en las alteraciones de la ruta de mitofagia, que han sido estudiadas en menor detalle. En este sentido, el tratamiento con Lipoplus indujo una disminución de los niveles de PINK1 con respecto al control acompañada de un leve incremento en los niveles de Parkin. Estos resultados sugieren que el tratamiento con Lipoplus podría favorecer la conservación de las mitocondrias existentes mediante una reducción de su balance de recambio. Por su parte, el suplemento con MUFA n-9 podría favorecer el proceso contrario, ya que se observan niveles muy elevados de Parkin con respecto a las condiciones control y al tratamiento con PUFA n-3. Aunque estos resultados parecen indicar la existencia entre un balance entre biogénesis y reciclado mitocondrial en estas células en respuesta al tratamiento con emulsiones, los elementos que intervienen así como los detalles de su regulación, tendrán que ser estudiados en futuras investigaciones.

En cuanto al análisis de subunidades de los complejos de la CTE, los resultados más llamativos indicaron que el tratamiento con Lipoplus produjo un incremento significativo en los niveles de complejo I y tendió a incrementar el complejo III con respecto a las condiciones control. Por su parte, el tratamiento con ClinOleic disminuyó los niveles de complejo I y II con respecto a células no tratadas y tratadas con Lipoplus. Ha sido descrito que en mitocondrias que oxidan sustratos dependientes de NAD^+ , aunque la producción de ROS no es demasiado elevada, ésta se incrementa de manera significativa en presencia de ácidos grasos libres (FFA) que ejercen una inhibición parcial de los complejos I y III, siendo los PUFAs más eficientes en la formación de superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) mitocondrial que los SFA y los MUFA. Éste parece ser uno de los principales efectos de los FFA en la producción de ROS en células no fagocíticas [343]. Es posible que el incremento en los niveles de ambos complejos por Lipoplus esté relacionado con la necesidad de paliar esta falta de funcionalidad. Además, en cuanto al complejo III es posible que el incremento en los niveles de Q inducidos por la emulsión Lipoplus esté estabilizando la estructura de dicho complejo, como ha sido observado en levaduras [296] y hemos corroborado en este estudio para el caso de células animales.

Estos resultados una vez más ponen de manifiesto que la naturaleza de la fuente grasa suplementada actúa de manera diferencial a nivel de la mitocondria ya que, aunque no se produzcan cambios en la actividad de los CTE, se produce un aumento

de la masa mitocondrial en respuesta al aporte de n-3, así como otras variaciones en proteínas de la membrana interna mitocondrial que son completamente opuestas a los resultados obtenidos con un suplemento de MUFA n-9.

El incremento observado en los niveles de complejo I y III en presencia de Lipoplus, concuerda con los efectos observados en la línea celular Tkpts, en la que el tratamiento con precursores de la síntesis de Q (kaempferol y pHB) así como el aporte exógeno directo del antioxidante fueron capaces de incrementar los niveles de estos mismos complejos, siendo además estos efectos sensibles a la adición de PABA, inhibidor de la síntesis de Q.

5.2.4. Alteraciones en la generación de ROS y daño oxidativo de componentes celulares en respuesta al tratamiento con emulsiones lipídicas

El tratamiento con ambas emulsiones lipídicas induce la producción de ROS con respecto a las condiciones control. Siendo así, se observó un aumento en los niveles de $O_2^{\cdot -}$ mitocondrial así como intracelular, tendiendo a ser significativamente mayores en el caso del tratamiento con Lipoplus, al menos a nivel de la mitocondria. Este hecho ha sido recogido en numerosas publicaciones que demuestran que los PUFA son inductores de la generación de $O_2^{\cdot -}$ mitocondrial más potentes que los SFA y los MUFA, hecho que está correlacionado con una inactivación parcial de los complejos I y III [343-345].

No obstante, el incremento más significativo se produjo a nivel de peróxidos, los cuales se incrementaron en las células tratadas con ClinOleic de manera muy significativa con respecto a células no tratadas y a células tratadas con Lipoplus. Este incremento tan significativo de los peróxidos puede deberse a la lipotoxicidad inducida por los SFA presentes en su composición. Como comentamos anteriormente, este fenómeno hace referencia a la toxicidad celular en presencia de una cantidad excesiva de ácidos grasos libres, que en función de su naturaleza, (si son saturados o insaturados) presentan diferente toxicidad, habiéndose descrito los SFA como los más tóxicos por su menor eficiencia para ser transformados en TG [326, 346]. De acuerdo con esta idea el PA se convierte de forma poco eficiente a TG presentando una mayor toxicidad, mientras que el OA se convierte de forma rápida a TG siendo por tanto menos tóxico

[326]. Ya que la composición de estas emulsiones difiere entre otros compuestos en la cantidad de PA que presentan, siendo el doble en ClinOleic que en Lipoplus [330], era de esperar que esta emulsión presentase una mayor lipotoxicidad, de ahí el incremento tan acusado que se observa a nivel de peróxidos intracelulares. Aunque, como observamos en la formación de gotas lipídicas, la presencia de un 62% de OA en la emulsión favorece la incorporación del palmítico a TG, disminuyendo potencialmente sus efectos lipotóxicos, esta transformación parece no ser suficiente para mitigar los efectos en la producción de ROS. El incremento tan acusado en la concentración de peróxidos en presencia de ClinOleic podría explicarse también por la actuación de la superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2). Esta enzima se localiza en la matriz mitocondrial y es la encargada de llevar a cabo la dismutación de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , que será posteriormente eliminado por enzimas como la catalasa u otras de la familia de la glutatión peroxidasa usando glutatión reducido [62, 343]. Ya que en presencia de ambas emulsiones se produce un incremento en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial con respecto a las condiciones control, aunque menores al comparar el tratamiento ClinOleic con Lipoplus, es posible que la SOD2 esté actuando de manera muy eficiente para paliar la lipotoxicidad inducida por ClinOleic, observándose por ello unos niveles muy incrementados de esta especie reactiva, la cual en comparación con otras ROS, presenta una vida media más larga (1ms) [343]. Serán necesarias determinaciones de los niveles de SOD2 en células tratadas con las diferentes emulsiones para poder confirmar esta hipótesis.

A la vista de estos resultados en los que ambas emulsiones lipídicas provocaron un incremento en la producción de ROS, podría pensarse que el aumento en los niveles de Q observado en presencia de ambas emulsiones en esta línea celular podría ser consecuencia de una respuesta antioxidante estimulada por la mayor cantidad de ROS producidas. No obstante, esta posibilidad queda descartada por experimentos llevados a cabo en paralelo por nuestro grupo de investigación. En ellos se determinaron los niveles Q en respuesta al tratamiento combinado con Lipoplus, rico en PUFA n-3 y por tanto más susceptible de sufrir daño oxidativo, y distintos antioxidantes como Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) e hidroxitolueno butilado (BHT). Los resultados mostraron un incremento en los niveles de Q tanto en presencia como en ausencia de las sustancias antioxidantes, lo que demuestra que la mayor

acumulación de esta molécula en presencia de las emulsiones es independiente del incremento en las ROS que éstas producen [108].

Al analizar el daño oxidativo de distintos componentes celulares, observamos que las emulsiones lipídicas no incrementan los grupos carbonilos asociados a proteínas bajo ninguna de las condiciones experimentales. No obstante, al determinar la peroxidación lipídica se produjo una disminución significativa de este parámetro en presencia del tratamiento con Lipoplus con respecto a las condiciones control y una tendencia en este mismo sentido en presencia del tratamiento con Lipofundina. Por su parte el ClinOleic no produjo cambios en la peroxidación lipídica basal, pero sí incrementó dicho parámetro con respecto a las emulsiones ricas en PUFA. Estos resultados indican que el incremento que produce esta emulsión en los niveles de peróxidos, presuntamente como consecuencia de la lipotoxicidad que inducen los SFA, no es capaz de producir daño oxidativo a nivel de ninguno de componentes celulares analizados con respecto a los niveles basales, siendo no obstante mayor que el inducido por las otras emulsiones. Estos resultados contrastan aparentemente con los obtenidos en nuestro grupo de investigación donde la grasa rica en MUFA, en condiciones de restricción calórica (RC) fue la que presentó una mayor ventaja con respecto a la peroxidación lipídica en hígado de animales viejos [266]. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos experimentos fueron desarrollados en condiciones de RC que favorece una mayor metabolización de las grasas e impide su acumulación lo que, sin duda, es determinante a la hora de establecer sus efectos.

Por otra parte, la falta de daño oxidativo en células tratadas con emulsiones lipídicas puede estar relacionada con el incremento en los niveles de Q endógeno inducido por las emulsiones en la línea celular Hepa 1.6 y que puede estar actuando como antioxidante impidiendo que el incremento en las ROS, que a su vez producen, quede paliado por la presencia de los altos niveles de la quinona. Esta hipótesis parece estar apoyada por el hecho de que el tratamiento con Lipoplus fue capaz de disminuir la peroxidación lipídica intracelular, siendo ésta la condición experimental donde se indujo un mayor incremento en los niveles de Q en estas células [108].

5.2.5. Alteraciones en la ruta de autofagia en respuesta a la naturaleza del componente graso

Tal y como se desarrolló en el apartado 1.6.4 de la Introducción, los ácidos grasos son capaces de modular la ruta autofágica, jugando un papel determinante la naturaleza de los mismos, pudiendo éstos actuar de forma diferencial, bien induciendo la ruta como respuesta a algún tipo de estrés o bien inhibiéndola para favorecer procesos apoptóticos, entre otros [151, 152].

Muy recientemente, se ha descrito la relación existente entre la lipotoxicidad inducida por ácidos grasos saturados y la actuación de la sirtuina mitocondrial 3, Sirt3. En este estudio llevado a cabo por Li y colaboradores se determinó que el tratamiento con SFA, en concreto PA, incrementó la expresión de Sirt3 en modelos *in-vitro* e *in vivo* lo que exacerbó la hepatotoxicidad de estos ácidos grasos regulando de forma negativa la ruta de autofagia. Concretamente, se propone que el aumento en la expresión de Sirt3 actúa regulando positivamente a SOD2, haciendo que ésta disminuya los niveles de radical O_2^- y se incremente la concentración de H_2O_2 , esta disminución del O_2^- hace que se regule de manera negativa AMPK, quinasa que en condiciones normales actúa inhibiendo al complejo mTORC1, favoreciéndose por tanto el bloqueo de la autofagia [347].

Nuestros resultados revelan que el tratamiento con ClinOleic produce un incremento tanto en la forma total como fosforilada de mTOR, un incremento en Beclina 1 y una tendencia al aumento en p62 e incremento también en las formas ubiquitiniladas de la misma. Así mismo el tratamiento con esta emulsión resultó en un incremento tanto de LC3I como de LC3II (en presencia de Cq), siendo todos estos cambios incapaces de modificar el flujo autofágico, tal y como se determinó mediante ensayos de citometría. Estos resultados podrían indicar que pese a encontrarse incrementados algunos marcadores de la ruta en presencia de este tratamiento, la concentración de PA presente en esta emulsión (un 12% del total de ácidos grasos presentes en la emulsión, frente al 6% presente en Lipoplus [330]) podría estar provocando una detención en la ruta autofágica, posiblemente por acción de Sirt3. Ésta, como dijimos anteriormente, es capaz de actuar favoreciendo la actividad de SOD2, desacetilándola, disminuyendo los niveles de O_2^- e incrementando los de H_2O_2 . Esta posibilidad es compatible con los resultados

obtenidos en las determinaciones de peróxidos intracelulares realizadas en el presente estudio, dónde el tratamiento con ClinOleic fue capaz de incrementar de manera notable dichos niveles con respecto a las células no tratadas o incluso a las tratadas con Lipoplus. La disminución en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ y el consecuente aumento de H_2O_2 , podría estar actuando de forma negativa sobre AMPK, favoreciéndose así el bloqueo del flujo autofágico por la señalización directa del complejo mTORC1. Según lo expuesto hasta ahora, existe la posibilidad de que en esta línea celular se produzca un equilibrio en el flujo autofágico debido a la cantidad de OA, el cual es capaz de activar a AMPK, y el PA que a través de la respuesta de Sirt3 es capaz de inhibir su actividad.

A la vista de estos resultados, serían necesarios estudios futuros donde se determinen los niveles de Sirt3 en respuesta a esta emulsión, de la forma activa de AMPK y determinaciones de la desacetilación de SOD2, con el fin de determinar si este bloqueo en la ruta autofágica se debe a la señalización mediada por la sobreexpresión de Sirt3 y sus dianas.

Una vez más, se pone de manifiesto el comportamiento diferencial de esta línea celular a los suplementos con ácidos grasos de distintas características, ya que la respuesta de estas células al suplemento con Lipoplus fue diferente. En este caso, el tratamiento con esta emulsión rica en PUFA n-3 parece actuar de manera fundamental sobre los últimos pasos del proceso autofágico, es decir, en la formación del autofagosoma maduro y la posterior degradación del mismo, actuando a nivel de la proteína LC3, pero sobre todo incrementando los niveles LC3II, que es la forma que finalmente quedará anclada a los autofagosomas. Esta afirmación se sustenta en la falta de cambios en el resto de marcadores proteicos de la ruta analizados que actúan aguas arriba de LC3 (mTOR, Fosfo-mTOR, Beclina 1 y p62). La regulación de los últimos pasos del proceso de señalización autofágica por Lipoplus fue suficiente para incrementar de manera significativa el flujo autofágico. Estos resultados están sintonía con estudios realizados en ratones Fat-1, los cuales indicaron que la autofagia se encontraba incrementada en respuesta al incremento de PUFA n-3 presente en estos individuos [348].

5.2.6. Papel del coenzima Q en la regulación de la autofagia por emulsiones lipídicas

La relación entre los niveles de Q celulares y la ruta de autofagia ha sido poco estudiada. A este respecto, un estudio llevado a cabo por Rodríguez-Hernández *et al.* en el año 2009 estableció por primera vez el papel de la autofagia en la patofisiología de la deficiencia de Q, observando que en fibroblastos procedentes de individuos con deficiencias en esta molécula, la ruta autofágica se veía incrementada cómo mecanismo de supervivencia celular [300].

Ya que, como se ha expuesto anteriormente, el tratamiento con las distintas emulsiones lipídicas, en especial Lipoplus, incrementa los niveles de Q en la línea celular Hepa 1.6 [108] y habiendo observado que el tratamiento con la misma es capaz de actuar a nivel de las últimas etapas de la ruta de autofagia, quisimos estudiar si estos cambios podían estar mediados, al menos en parte, por el incremento en los niveles de Q.

Para ello, se trataron las células con Lipoplus en combinación con el inhibidor de la síntesis de Q, PABA, así como en presencia de Cq, tratamiento que inhibe la fusión de los autofagosomas con los lisosomas. Los resultados mostraron que los niveles de p62 se incrementaron de manera significativa en presencia del tratamiento combinado con Lipoplus+Cq con respecto a las células tratadas sólo con Cq, mientras que con el tratamiento Lipoplus+Cq+PABA no se observó dicho aumento. La dinámica de esta proteína se incrementó en aquellas células tratadas con Lipoplus, mientras que este parámetro disminuyó de forma significativa en células sometidas al tratamiento combinado con Lipoplus+PABA. Estos resultados parecen indicar que se produce un aumento en la producción de autofagosomas en respuesta al tratamiento con Lipoplus, el cual es prevenido al inhibirse la síntesis de Q.

Analizando los niveles de LC3, se observó un acusado incremento en la forma LC3I por el tratamiento combinado Lipoplus+Cq, frente a células tratadas sólo con Cq, mientras que estos niveles fueron significativamente menores en células sometidas al tratamiento combinado Lipoplus+Cq+PABA. La forma LC3II volvió a incrementarse en respuesta al tratamiento con Lipoplus+Cq, no observándose cambios significativos por la adición ulterior de PABA. Las dinámicas de ambas

proteínas determinaron que el incremento producido por Lipoplus era revertido por el PABA. Estas observaciones podrían indicar que el incremento en la síntesis de Q que se produce como respuesta al tratamiento con Lipoplus podría estar jugando un papel importante a nivel del procesamiento de pro-LC3 a LC3I, ya que es a este nivel dónde observamos una caída más drástica de los niveles en presencia de PABA.

Ya que estos resultados parecen demostrar que los niveles de Q endógeno son capaces de regular la ruta de autofagia en un paso muy concreto de la misma, nos planteamos si esta respuesta se producía de igual manera cuando el Q provenía de un aporte exógeno. Estas determinaciones se llevaron a cabo también en presencia de Cq, para diferenciar el efecto en la formación de autofagosomas. Como se pudo observar, no se produjo ninguna alteración en los niveles p62 en respuesta al suplemento con Q₁₀, ni en ausencia ni en presencia Cq, frente a sus respectivos controles, y tampoco en la dinámica de esta proteína, cambios que sí se observaron en respuesta al tratamiento con Lipoplus+Cq frente al tratamiento sólo con Cq. En cuanto a la expresión de LC3, el suplemento de Q₁₀ aportado de manera simple o combinado con Cq, fue capaz de incrementar los niveles de LC3I. Los niveles de LC3II, por su parte, se incrementaron en respuesta al Q₁₀ exógeno, no observándose cambios en presencia de Cq. La ratio de ambas formas de la proteína tendió a disminuir de manera significativa tanto en presencia del tratamiento simple como combinado. Las dinámicas de LC3 determinaron que el aporte de Q₁₀ a 5µM fue capaz de incrementar este parámetro muy significativamente en el caso de LC3I, mientras que sólo se observó una tendencia cuando se consideró LC3II. En su conjunto, estos datos apoyan que la suplementación con Q₁₀ exógeno en la línea celular Hepa 1.6 es capaz de recrear parte de los resultados obtenidos con Lipoplus a nivel de LC3I, mientras que ocurre de manera algo más atenuada con LC3II. Esto podría indicar que el aporte de un suplemento rico en n-3 estaría actuando a nivel de LC3II de forma parcialmente independiente al incremento en los niveles de Q que éste produce, ya que no se observan los mismos efectos en presencia del suplemento de Q₁₀ que en presencia de la emulsión lipídica. Otra posible hipótesis para explicar este hecho podría ser que el Q sintetizado de manera endógena regulara el procesamiento de LC3II de manera más eficiente que el Q aportado de manera exógena. Esto podría deberse a la diferente localización de esta molécula dependiendo de la procedencia de la misma. A este respecto, estudios llevados a cabo en fracciones subcelulares de hígado de rata indicaron que la mayor parte del Q endógeno

estaba presente en la fracción mitocondrial mientras que, tras una suplementación dietética, la mayor parte del Q exógeno se localizaba en las fracciones extra-mitocondriales, probablemente en los lisosomas y las vesículas del aparato de Golgi. Es, por tanto, bastante probable que la suplementación de esta molécula, bajo unas condiciones no deficientes en Q, afecte al pool de quinona luminal cuya función es desconocida [309].

Más aún, el hecho de que es posible observar cambios en los niveles de LC3I y LC3II sin necesidad de utilizar una sustancia que bloquee la finalización de la ruta como la Cq, podría indicar que la progresión del flujo y, por tanto, el balance entre síntesis y degradación de estas proteínas no es tan eficiente en presencia de un aporte exógeno de Q en comparación con un incremento endógeno que es lo que se consigue con el tratamiento con Lipoplus. Ya que, como hemos comentado anteriormente, la mayor parte del Q exógeno aportado se acumula en compartimentos extra-mitocondriales como lisosomas [309], y dada la importancia de estos orgánulos en la eliminación de los autofagosomas, es posible que la acumulación de grandes cantidades de Q en los lisosomas pueda alterar la capacidad de éstos para unirse a los autofagosomas, tendiendo entonces a acumularse la forma LC3II, que es la que está unida al autofagosoma.

Para la confirmación de estas hipótesis serán necesarios estudios de flujo autofágico mediante citometría de flujo que determinen si realmente se produce un aumento o un bloqueo parcial en el mismo. No obstante, estudios de este tipo llevados a cabo en la línea celular Tkpts en presencia de precursores (pHB) e inhibidores de la síntesis de Q (PABA), así como en presencia de aporte exógeno de Q₁₀, determinaron que los tratamientos que incrementaban los niveles de Q, tanto de manera endógena como exógena, producían una disminución del flujo autofágico, mientras que éste se veía incrementado significativamente en presencia de PABA. Aun teniendo en cuenta que provienen de tipos celulares diferentes, estos resultados podrían predecir que los datos observados en esta línea celular en presencia de un aporte de Q₁₀ exógeno indicarían un bloqueo parcial en la ruta de autofagia posterior al procesamiento de pro-LC3 a LC3I que sí se ve favorecido por el tratamiento. Además, esto podría indicar que la mejora en el flujo autofágico observada en presencia de Lipoplus es mediada sólo en parte por el aumento de Q endógeno que produce.

5.3. Alteraciones morfológicas y funcionales en la ruta autofágica, daño oxidativo y marcadores de masa mitocondrial mediadas por intervenciones nutricionales en músculo esquelético

5.3.1. Autofagia, mitofagia, envejecimiento y restricción calórica en músculo esquelético

Como se indicó en el apartado 1.7.2.1 de la Introducción una de las enfermedades musculares que más se asocian al envejecimiento es la sarcopenia, que se define como la pérdida progresiva de fuerza y masa muscular producida como consecuencia del mismo [241]. Además, la pérdida de masa muscular está presente también en una gran cantidad de afecciones que se desarrollan también en individuos jóvenes, como el cáncer, fallo renal, o malnutrición. La atrofia muscular es resultado de una disminución en la síntesis de proteínas y un incremento en la degradación de las proteínas existentes a través, bien de la vía autofágica o bien de una inducción del proteasoma [349]. En músculo de animales jóvenes la inducción de la autofagia provoca atrofia de las miofibrillas, pérdida de masa muscular, así como pérdida proporcional de fuerza [349], por lo que se ha contemplado la hipótesis de que un incremento en la ruta de autofagia podría contribuir a la aparición de la sarcopenia. No obstante, actualmente numerosas líneas de investigación han desechado esta hipótesis. En este sentido, estudios llevados a cabo en *D. melanogaster* han determinado que la sobreexpresión de factores de transcripción como FoxO y el factor de traducción 4E-BP, es capaz de preservar el nivel basal de autofagia y la función del músculo durante el envejecimiento favoreciendo la expresión de genes y proteínas relacionadas con la autofagia los cuales se ven disminuidos como consecuencia de la edad [350]. De manera similar, la activación de la vía de señalización FoxO/4E-BP en ratones transgénicos fue capaz de mejorar la ruta de autofágica, previniéndose así el envejecimiento del músculo esquelético [351].

La disfunción progresiva de la autofagia en músculo esquelético en respuesta al envejecimiento, puede favorecer la aparición de la sarcopenia. Por ejemplo, se han hallado depósitos de lipofucsina en músculo esquelético de ratones y humanos en edades avanzadas, lo que es indicativo de una disfunción lisosomal [349]. Además, también se han documentado niveles elevados de chaperonas y proteínas

poliubiquitiniladas en músculo de individuos ancianos (tanto en ratones como en humanos), lo que sugiere un mal funcionamiento de la maquinaria de reciclado celular [349]. Tanto es así que la atrofia muscular observada en ratones viejos, de 24 meses, viene acompañada de la acumulación de p62, proteína relacionada con la eliminación de cargas selectivas como los agregados proteicos, entre otros [306, 352]. Además, en estos mismos estudios se ha determinado cómo las miofibrillas positivas para p62 presentaban un menor tamaño que aquellas que presentaban niveles más bajos p62 lo que, una vez más, sugiere que la pérdida de músculo esquelético asociada a la edad viene acompañada de un mal funcionamiento de la autofagia [306].

Numerosos mecanismos parecen estar implicados en la progresión de este declive en la ruta de autofagia, siendo los más destacados la disminución en la expresión de genes ATG, niveles disminuidos de proteínas que colaboran en el proceso de autofagia y mitofagia [349], y la expresión “sostenida” de la señalización mediada por el complejo mTORC1, que ha sido descrita en músculo de ratones viejos [352].

Otros indicios que apoyan el papel protector de la autofagia en el mantenimiento del músculo esquelético provienen de estudios realizados en animales *knockout* para genes cruciales en este proceso, como ATG7 [218]. Los músculos de estos animales presentaban un alto contenido de agregados de p62 con proteínas ubiquitiniladas, mitocondrias anormales y defectos en las sarcómeras, lo que contribuía a la pérdida de fuerza observada en éstos [218]. Por su parte, en músculos de animales defectivos para AMPK (inductor de autofagia) se observan cambios prematuros relacionados con el envejecimiento como debilidad muscular y disfunción mitocondrial [353], procesos relacionados con la aparición de sarcopenia. Un fenotipo similar fue observado en ratones cuyo músculo presentaba deficiencias para Mfn2, en el cual se observó una inhibición de la mitofagia y, por tanto, acumulación de mitocondrias disfuncionales [354].

Dada la importancia de la desregulación de la ruta de autofagia y su implicación en numerosas patologías musculares asociadas al envejecimiento, como la sarcopenia, se llevaron a cabo determinaciones de parámetros relacionados con esta ruta en respuesta al envejecimiento, la restricción calórica (RC) y el componente graso de la dieta. Además, y ya que estas intervenciones nutricionales alteran el lipidoma de las membranas celulares, como ya comentamos anteriormente, y muy especialmente las

mitocondriales [169], no es de extrañar que estos cambios puedan inducir alteraciones a nivel de la ruta autofágica.

5.3.2. Efectos de las distintas intervenciones dietéticas sobre parámetros morfológicos y cuantitativos de las figuras de autofagia

En el estudio ultraestructural llevado a cabo en el presente trabajo, centrado en el análisis de fibra roja, encontramos autofagosomas típicos y un número relativamente elevado de mitocondrias alteradas en función de la edad e intervención dietética. Mientras que los autofagosomas propiamente dichos tienden a acumularse en las zonas subsarcolémicas, lo que en este trabajo identificamos como mitocondrias alteradas se ubican repartidas a través de todo el citoplasma de la fibra. Normalmente estas mitocondrias se caracterizan por presentar un tamaño mayor que los orgánulos no alterados, presentando asimismo una menor densidad electrónica y crestas mitocondriales más desorganizadas. El mayor tamaño que estas mitocondrias presentan puede hacer que sean eliminadas de forma menos eficiente por la maquinaria autofágica celular. lo que puede dar lugar a su acumulación dentro de las fibras [355].

No obstante, es importante recalcar que la gran mayoría de mitocondrias observadas en el análisis mediante microscopía electrónica, tal y como se recoge en la publicación derivada de este trabajo [356] son mitocondrias sanas, con independencia de la duración de la intervención, por lo que se considera que todos ellos presentan una masa y fisiología mitocondrial aceptable a todo lo largo de la misma.

Analizando las micrografías de microscopía electrónica observamos modificaciones significativas en el tamaño y abundancia de las figuras de autofagia, comportándose éstas de manera diferencial en función de la parte del músculo que se analice, así como de la grasa de la dieta suministrada. Atendiendo a los parámetros de área de las figuras de autofagia, la densidad numérica (“Na”) y densidad de volumen (“Vv), los cambios más significativos de los animales sometidos a RC entre ambas intervenciones son los siguientes:

- Grupo Control: en este grupo, en respuesta al envejecimiento se observó el mismo número de figuras de autofagia pero éstas presentaban un tamaño mayor

y ocupaban un mayor volumen en zonas subsarcolémicas, mientras que en las zonas intermiofibrilares se observó una disminución significativa del área de las figuras mientras que el volumen relativo ocupado por éstas aumentó ligeramente.

- Grupo CR.Lard: este grupo experimental presentó un menor número de figuras, éstas fueron más pequeñas, y además ocuparon un menor volumen relativo en la zona intermiofibrilar en respuesta al envejecimiento, mientras que en la zona subsarcolémica éstas eran menos numerosas y presentaban un tamaño y volumen similar en los dos periodos de intervención.
- Grupo CR.Soy: estos animales presentaron un menor número de figuras de autofagia, siendo éstas además más pequeñas y ocupando un menor volumen con el envejecimiento en las zonas intermiofibrilares, mientras que en las zonas subsarcolémicas, aun apareciendo una menor cantidad de figuras a los 18 meses de intervención, éstas presentaron un tamaño y un volumen similar al observado a los 6 meses.
- Grupo CR.Fish: Por último en este grupo, en respuesta al envejecimiento se produjo un aumento en el número de figuras de las zonas intermiofibrilares aumentando también el volumen de éstas; no obstante estos cambios, aunque significativos, no representaron un aumento de tamaño en dichas figuras. En zonas subsarcolémicas se encontraron una misma cantidad de figuras aunque éstas fueron más grandes y ocuparon un mayor volumen relativo en la fibra.

Por su parte, el perímetro de las figuras de autofagia observadas también se vio alterado en respuesta al envejecimiento y a las intervenciones nutricionales. En el grupo control se observó un descenso de este parámetro con el envejecimiento en las figuras de las zonas intermiofibrilares, tendencia que fue compartida también por los grupos alimentados con las dietas CR.Lard y CR.Soy, mientras que no se observaron cambios cuando la dieta suministrada fue CR.Fish. Podría decirse, por tanto, que la RC no parece ejercer ningún efecto sustancial a nivel del perímetro de las figuras de autofagia de esta zona considerada. En la zona subsarcolémica no se observaron cambios asociados al envejecimiento en el grupo control, ni en el alimentado con CR.Lard. Sólo cabe destacar que fue la dieta CR.Soy a los 6 meses de intervención la que favoreció la formación de figuras más irregulares.

5.3.3. Envejecimiento, restricción calórica y grasa de la dieta como moduladores de la ruta de autofagia

Hemos de ser cautelosos a la hora de intentar interpretar los datos derivados de la microscopía electrónica con el análisis de marcadores de la ruta de autofagia mediante western blot, ya que los análisis de micrografías se llevaron a cabo únicamente en fibra roja muscular, mientras que el análisis de proteína se llevó a cabo utilizando homogenado total de músculo que incluye tanto fibra blanca como roja, por lo que es posible que los datos derivados de una técnica no se correspondan exactamente con los hallados en otra.

Hecha esta consideración, y atendiendo a los parámetros de autofagia analizados mediante western blot, observamos que se produjo un incremento de los niveles de Beclina 1 en respuesta a la edad en el grupo control, lo que podría estar indicando una respuesta en los individuos maduros hacia el incremento en la formación de autofagosomas ya que, recordemos, esta proteína participa formando parte del complejo multiproteico que promueve la formación de los mismos. En condiciones de RC, por su parte, no se produjo alteración alguna en los niveles de esta proteína. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Wohlgemuth y colaboradores [357] que determinaron que en músculo esquelético de ratas viejas se producía también un incremento en los niveles de esta proteína, no observándose cambios cuando los animales fueron sometidos a una RC suave (8%). Sin embargo, estos hallazgos contrastan con otros estudios llevados a cabo por Joshep et al. en músculo esquelético de ratones donde se observó una disminución en los niveles de Beclina 1 en respuesta a la edad [305].

El aumento en Beclina 1, encaminado a un mejor funcionamiento de la ruta de autofagia, contrasta con los cambios observados en los niveles de p62, que se incrementó de forma notable en animales maduros con respecto a animales jóvenes, lo cual podría estar poniendo de manifiesto un bloqueo importante de la ruta de autofagia asociado al envejecimiento. La acumulación de p62 en músculo de animales de avanzada edad ha sido señalada en numerosas ocasiones, como la descrita en fibras musculares de ratones viejos (24 meses) frente a jóvenes (3 meses) [306], o su acumulación en músculo de ratones *knockout* para genes relacionados con la autofagia, como ATG7, donde se encontró gran cantidad de agregados proteicos y defectos en las sarcómeras que resultaban en la pérdida de fuerza en los animales [218]. Todas estas

evidencias demuestran que el envejecimiento compromete el buen funcionamiento de la ruta autofágica, probablemente favoreciendo la acumulación de p62 [305].

En condiciones de RC los niveles de p62 experimentaron un aumento en los animales sometidos a 6 meses de intervención, lo que podría estar indicando que a esta edad, y bajo unas condiciones reducidas de ingesta, no es necesario un flujo autofágico muy elevado para cumplir con los requerimientos del tejido en animales jóvenes. Por su parte, a los 18 meses de intervención los niveles de esta proteína permanecen invariables incluso tienden a disminuir (aunque de manera estadísticamente no significativa) con respecto al grupo de 6 meses, mostrando no obstante un marcado descenso con respecto a los niveles alcanzados en el grupo control homólogo en edad. Estos resultados son consistentes con la idea de que la RC es capaz de desbloquear el flujo autofágico en intervenciones largas, revirtiendo la acumulación de esta proteína observada en el grupo control de la misma edad. A este respecto, y con excepción del aumento significativo en los niveles de la misma entre animales de 6 y 18 meses alimentados con la dieta CR.Lard, el tipo de grasa de la dieta no influyó en la expresión de esta proteína.

Por su parte, en el grupo control, aunque se produce un aumento significativo de LC3II en respuesta a la edad en animales de 18 meses, éste no se traduce en cambios en la ratio entre ambas formas, por lo que se puede asumir que no se producen alteraciones a nivel de estas etapas de la ruta asociados a la edad, tal y como ha sido determinado también en otros estudios con roedores [305, 357]. En condiciones de RC a los 6 meses de intervención, sin embargo, se observó una disminución significativa de la ratio de LC3 en comparación con los niveles alcanzados en el grupo control homólogo en edad. Estos resultados contrastan con el hecho de que a esta edad en el grupo de animales sometidos RC se observó un aumento de la proteína p62, por lo que este parámetro podrían estar también indicando, como se ha señalado anteriormente, que bajo esta intervención nutricional no es necesario un flujo autofágico muy elevado para cumplir con los requerimientos del tejido en animales jóvenes. Además, se observó una disminución en los niveles de ambas proteínas al comparar los animales sometidos a 6 meses de intervención frente a los de 18, mientras que la ratio LC3 se incrementó sustancialmente a los 18 meses con respecto a intervenciones más cortas, lo que podría ser indicativo de una mejora del flujo autofágico en los animales de edad más avanzada sometidos a RC. No obstante, y ya que no se produjeron modificaciones en la ratio LC3

entre animales control y sometidos a RC a los 18 meses de intervención, no parece que la reducción en la ingesta esté favoreciendo un incremento significativo del flujo autofágico, al menos a nivel de las últimas etapas de la ruta.

En cuanto al papel que juega la grasa de la dieta en la expresión de estas proteínas, el resultado más destacable se encontró en animales alimentados con la dieta rica en n-3 (CR.Fish) donde se observó un aumento significativo del ratio de LC3 en respuesta al envejecimiento. Estos resultados contrastan con un incremento en el tamaño de las figuras de autofagia hallado en las zonas subsarcolémicas y un incremento en la densidad de volumen de estas figuras asociadas con el envejecimiento en estas mismas zonas, además de en las zonas intermiofibrilares. Es posible que, con la edad, estas alteraciones representen una adaptación conducente hacia un incremento en el flujo autofágico con el fin de eliminar la acumulación de vesículas autofágicas acumuladas en el tejido. Una vez más se pone de manifiesto la posibilidad de un tamaño umbral por encima del cual la eliminación por autofagia se vea limitada [355, 358]. Además existen estudios que relacionan una mayor concentración de ácidos grasos n-3 con un incremento en la ruta autofágica, como por ejemplo un trabajo llevado a cabo en ratones Fat-1, donde se observó un aumento en la expresión de proteínas relacionadas con la autofagia, entre ellas LC3, lo que confirió a los animales una mejor capacidad de recuperación ante el daño renal producido por isquemia/reperfusión (IRI) [152].

Por su parte, los marcadores de mitofagia no parecen verse afectados en el grupo control en función de la edad, resultados que están en consonancia con los obtenidos por otros grupos de investigación que determinaron que PINK1 y Parkin no variaban en respuesta al envejecimiento en ratones viejos y monos [355]. El sistema PINK1/Parkin está directamente relacionado con la autofagia selectiva de mitocondrias. Recientemente ha sido descrito que la proteína PINK1 es importada a la mitocondria dirigiéndose a la membrana mitocondrial interna en mitocondrias “sanas” (por ejemplo, aquellas que presentan un potencial de membrana adecuado) regulando la bioenergética mitocondrial y las uniones entre crestas mitocondriales [52]. Por el contrario, cuando la mitocondria se encuentra despolarizada, PINK1 es retenida en la membrana externa mitocondrial, y es ahí donde esta proteína interacciona con Parkin disparando la mitofagia [52].

En nuestras muestras, 6 meses de RC indujo una disminución significativa de los niveles de Parkin, mientras que los de PINK1 permanecieron sin cambios. En relación a

la grasa de la dieta fueron los animales alimentados con la dieta CR.Lard, a los 6 meses de intervención, los que presentaron niveles más elevados PINK1 y más bajos de Parkin con respecto al resto de grupos de RC. Estos animales además, fueron los que presentaron una mayor acumulación de mitocondrias alteradas en las zonas intermiofibrilares a los 6 meses de intervención, tal y como indica el incremento de los parámetros “Na” y “Vv” de las figuras de autofagia de esta zona muscular. A los 18 meses los niveles más elevados de PINK1 fueron hallados en este mismo grupo experimental (CR.Lard 18m), mientras que Parkin también presentó unos niveles incrementados con respecto a animales jóvenes. En animales alimentados con esta misma dieta en periodos largos de intervención se produjo un incremento en el tamaño de las mitocondrias no alteradas (recogido en el artículo derivado del presente trabajo, [356]) y una disminución significativa de la cantidad de figuras de autofagia con respecto al grupo homólogo de dieta en 6 meses. El incremento de p62 observado en animales sometidos a esta misma intervención podría estar indicando que, debido al incremento en el tamaño de las figuras de autofagia producido en edades más tempranas, podría existir cierta dificultad en la eliminación de dichas vesículas, de ahí la acumulación de p62 en edades más avanzadas. No obstante, parece claro que el sistema tiene la capacidad de eliminar estas vesículas autofágicas con éxito, ya que a tiempo final de la intervención la cantidad de figuras observadas se equipara en todos los grupos experimentales.

Los resultados observados en los marcadores de mitofagia, parecen indicar que un desequilibrio en la expresión de ambas proteínas puede determinar la función de PINK1. Por tanto, niveles incrementados de esta proteína acompañados de bajos niveles de Parkin (como ocurre en el grupo alimentado con la dieta CR.Lard a los 6 meses de intervención) produce una disminución de la mitofagia y consecuentemente una acumulación de mitocondrias alteradas. Por otro lado, altos niveles de ambas proteínas (como se observó en el grupo CR.Lard a los 18 meses) puede indicar un incremento en la ruta de mitofagia favoreciendo la degradación de orgánulos despolarizados y, simultáneamente, una preservación de la función mitocondrial en aquellas mitocondrias que presentan una morfología normal. No obstante, serán necesarios nuevos experimentos para confirmar esta hipótesis.

5.3.4. Efectos de la restricción calórica, grasa de la dieta y envejecimiento en el daño oxidativo a proteínas

Ya que una de las teorías más aceptadas que explican el porqué del envejecimiento es la “Teoría de los Radicales Libres”, la cual postula que un incremento en la producción ROS daña progresivamente biomoléculas celulares como las proteínas, ácidos nucleicos y lípidos de membrana [161, 162], se llevaron a cabo determinaciones del grado de carbonilación de proteínas, con el fin de observar si el envejecimiento y las distintas dietas afectaban este parámetro en músculo esquelético.

De manera sorprendente, en el grupo control se observó una tendencia a la disminución de los niveles del daño oxidativo en proteínas a los 18 meses de edad con respecto a animales jóvenes. Estos resultados parecen contradecir la teoría de partida de que el estrés oxidativo acumulado durante el envejecimiento tiende a dañar componentes celulares como las proteínas. Este resultado está en contraposición con los obtenidos por Mercken y colaboradores en distintas especies a lo largo de tres periodos temporales, juventud, madurez, ancianidad, que determinaron que en ratones se producía un incremento en la carbonilación de proteínas y aductos del 4-hidroxinonenal (4-HNE, marcador de la peroxidación lipídica) tanto a 17 como a 28 meses de edad con respecto a animales jóvenes, no observándose este incremento asociado a la edad en humanos [355]. Otros estudios han reportado, sin embargo, una falta de cambios en el “oxi-proteoma” del músculo esquelético de humanos entre individuos jóvenes y viejos [359]. Es posible que esta tendencia a la disminución en el grado de carbonilación de proteínas en los individuos del grupo control a los 18 meses pueda deberse a que estos animales se encuentran en un periodo de madurez, más que de vejez, en el cual esta forma de daño oxidativo aún no se haya manifestado. Además, nuestras determinaciones se llevaron a cabo en homogenado total de músculo por lo que es posible que podamos estar perdiendo información de lo que sucede a nivel de fracciones celulares más concretas como por ejemplo las mitocondrias. Estudios realizados en mitocondrias aisladas de músculo esquelético de ratones C57BL/6 han determinado que se produce un mayor incremento en el porcentaje de proteínas carboniladas a nivel mitocondrial con respecto al observado en homogenado total de músculo, concluyéndose que las proteínas mitocondriales son más susceptibles de sufrir daño oxidativo con el envejecimiento. Además, dicho daño fue observado en edades más

avanzadas (en torno a los 30 meses) que las analizadas en el presente estudio, y pudo ser prevenido en parte cuando los animales fueron sometidos a un 40% de RC [360]. Estos efectos protectores de la RC sí se confirman en nuestro estudio, pues observamos una disminución significativa en la carbonilación de proteínas a los 18 meses de intervención con respecto a animales jóvenes, efecto que se reproduce también con las diferentes fuentes grasas, también en condiciones de RC.

La introducción de grupos carbonilos en las proteínas puede producirse a través de la reacción de ciertos residuos aminoacídicos de éstas con grupos aldehídos derivados de las reacciones de peroxidación lipídica [359]. Estas reacciones de peroxidación, a su vez, se ven favorecidas por el grado de insaturación de los lípidos de membrana, por lo que un incremento en la concentración de PUFA, cómo el que se produce con algunas de las intervenciones utilizadas en nuestro estudio, hace a estas más susceptibles de sufrir daño oxidativo. En este sentido, encontramos que, aunque todas las grasas aportadas en la dieta producen unos niveles relativamente altos de oxidación de proteínas a los 6 meses de intervención éstos son revertidos en periodos más largos de la misma. Además comparada con el resto de dietas, fue la grasa rica en PUFA de la serie n-6 la que indujo un mayor nivel de daño proteico en músculo esquelético a tiempo final de la intervención.

5.3.5. Expresión de los complejos de la cadena de transporte electrónico en respuesta a las intervenciones nutricionales, envejecimiento y aporte graso de la dieta

En el presente estudio la determinación de los niveles de subunidades marcadoras de los complejos mitocondriales que forman la cadena de transporte electrónico (CTE) se llevó a cabo como una medida que contribuye a determinar la masa mitocondrial presente en el músculo de los animales sometidos a las distintas intervenciones nutricionales. El dato más significativo fue la disminución en la expresión del complejo I en el grupo control como respuesta al envejecimiento, lo cual ya ha sido recogido en otras publicaciones [361, 362]. Esta disminución se observó también en animales sometidos a RC durante 6 meses de intervención, sin que existieran modificaciones tras periodos más largos de RC. Ello podría estar indicando una posible respuesta adaptativa de los animales del grupo control de más avanzada edad conducente a paliar la mayor

producción de ROS por parte de este complejo disminuyendo la expresión del mismo. Ya que estudios topológicos llevados a cabo por Barja y colaboradores han determinado que es a nivel de este complejo y del III dónde se produce una mayor producción de ROS a nivel mitocondrial [363], la disminución en la expresión de este complejo podría ir encaminada en el sentido expuesto anteriormente. La RC por su parte, estaría haciendo que esta respuesta adaptativa se produjera antes, ya que es capaz de disminuir la expresión del complejo I a los 6 meses de intervención.

El otro cambio significativo producido en los animales sometidos a RC fue la disminución en la expresión del complejo III producida a los 18 meses de intervención en comparación con la alcanzada en el grupo control. Este dato podría estar poniendo de manifiesto, nuevamente, la respuesta del músculo esquelético a reducir la expresión de uno de los principales productores de ROS a nivel mitocondrial, como ya hiciera con el complejo I, pero en este caso en intervenciones más largas. Una disminución en la expresión del complejo III también fue observada en hígado de ratones sometidos a RC en periodos cortos (2 meses) [196].

En cuanto al efecto de la fuente grasa de la dieta, aunque 6 meses de RC dio lugar a cambios significativos en la expresión de algunos complejos, incrementando los niveles del II, III y IV en dietas enriquecidas en PUFA con respecto a la dieta rica en SFA y MUFA, periodos más largos de intervención revirtieron dichos cambios, obteniéndose niveles equivalentes de estas proteínas en todos ellos a los 18 meses.

La determinación de los niveles de subunidades de los complejos de la CTE sería indicativa de la disponibilidad de subunidades proteicas, que podrían ser susceptibles de asociarse con otros componentes de la maquinaria mitocondrial produciendo una mejora en la función de las mismas. No obstante, con los resultados presentados en este trabajo no podemos extraer conclusiones sobre el estado fisiológico de las mitocondrias, su funcionalidad o las alteraciones en la generación de ROS derivadas del envejecimiento y las intervenciones dietéticas. Por tanto, son necesarios futuros estudios en los que se determine la producción de ROS por parte de este orgánulo, alteraciones en la fuga de protones (proceso por el cual se mueven electrones a través de la IMM de forma independiente a la generación de ATP), así como medidas del consumo de oxígeno mitocondrial.

Por ejemplo, ha sido reportado que mitocondrias de músculo esquelético de ratones sometidos a RC presentaban una menor actividad de los complejos I, III y IV comparado con animales control a los 10 meses de edad. No obstante, estos cambios fueron revertidos en periodos más largos de intervención (20 meses), siendo las actividades de estos complejos sustancialmente iguales entre animales control y sometidos a RC [364]. Otros estudios realizados en ratas adultas (8-10 meses de edad) sometidas a RC durante periodos de 4,5-6,5 meses mostraron una menor actividad del complejo IV en mitocondrias de músculo esquelético con respecto a sus homólogos de edad alimentados *ad libitum* [365].

En cuanto a las determinaciones de fuga de protones, se ha descrito que en mitocondrias aisladas de músculo esquelético de hembras sometidas a un 30% de RC se produjo una disminución en la fuga de protones en comparación con el grupo control tanto a 8 como a 26 meses. Además, en estos animales sometidos a una reducción de la ingesta, junto a este parámetro también disminuyeron los marcadores de peroxidación lipídica [366].

En cohortes de animales hermanas a la utilizada en el presente trabajo pero sometidas a RC durante 1 o 8 meses, se observó una disminución en la fuga de protones en animales sometidos a la dieta CR.Lard frente al resto de dietas utilizadas en intervenciones cortas (1 mes) [367]; no obstante estos cambios desaparecieron tras 8 meses de RC [368]. Además, se estudió también la producción de ROS mitocondriales en estos mismos modelos encontrándose que, aunque la producción de H₂O₂ no se alteró en ratones sometidos a 1 mes de RC con respecto a los controles en ausencia de inhibidores de la CTE (antimicina A y rotenona), cuando éstos se administraron se observó una disminución en la producción de ROS en los complejos I y III en los tres grupos sometidos a RC frente al control, con independencia de la grasa de la dieta [367]. Por su parte, 8 meses de intervención no produjeron cambios en la producción de ROS por parte de estos complejos mitocondriales comparando ratones control con los sometidos a RC. No obstante, la grasa de la dieta sí que desempeñó un papel diferencial a este nivel, ya que fue la dieta CR.Lard la que fue capaz de disminuir la producción de ROS a nivel del complejo III [368]. Este último hallazgo podría estar relacionado con uno de los resultados obtenidos en el presente estudio, pues fueron los individuos alimentados con esta dieta los que presentaron unos niveles más bajos de expresión del

complejo III con respecto a los niveles alcanzados en las dietas ricas en PUFA a los 6 meses de intervención.

5.4. Alteraciones morfológicas y funcionales en la ruta autofágica, daño oxidativo y marcadores de masa mitocondrial mediadas por intervenciones nutricionales en hígado

5.4.1. Efectos de las distintas intervenciones dietéticas sobre parámetros morfológicos y cuantitativos de las figuras de autofagia

Dado que las intervenciones nutricionales (como la RC) y la composición lipídica de la dieta pueden alterar el lipidoma de las membranas celulares y, en definitiva, modular diversos procesos como la autofagia, nos centramos en el estudio de un tejido mitótico, hígado, para comprobar posibles cambios en la modulación de la ruta autofágica en función de la naturaleza del tejido y en respuesta a distintas intervenciones dietéticas.

Las deficiencias en el flujo autofágico asociadas al envejecimiento, que comprometen principalmente la correcta proteólisis en este órgano, han sido ampliamente estudiadas en modelos *in vivo* de roedores a distintas edades así como en hepatocitos aislados de estos animales [369, 370], de ahí la importancia de la elección de este órgano como modelo de intervención nutricional.

En este tejido, tal y como se describe en el capítulo 4.4 de Resultados, se produjo un aumento muy significativo en el tamaño de las figuras de autofagia en respuesta al envejecimiento en todos los grupos experimentales se encontraran o no sometidos a restricción calórica (RC). No obstante, en los grupos cuya ingesta calórica fue reducida, se observó una atenuación de esta respuesta, ya que a los 18 meses de intervención estas figuras de autofagia presentaron un área menor, siendo el grupo CR.Soy 18 el que presentó unas figuras más pequeñas entre los homólogos de edad de las otras dietas. Podría entonces considerarse la posibilidad de que la RC puede prevenir el incremento de tamaño de las figura de autofagia que se produce como consecuencia del envejecimiento.

Algo similar ocurre con el perímetro de estas figuras, si bien en animales control se produjo un incremento en este parámetro con el envejecimiento, lo que podría estar

indicando que éstas presentan una superficie más irregular, en animales sometidos a RC esta respuesta se atenúa, observándose una disminución en el perímetro de las mismas a los 18 meses de intervención. Concretamente, parece que la dieta rica en ácidos grasos saturados (SFA) y monoinsaturados (MUFA) (CR.Lard), es la que previene la formación de figuras más irregulares y sinuosas a los 18 meses de intervención. Aunque a los 6 meses no se producen grandes cambios, en este caso es la dieta rica en PUFA n-3 la que favorece que las figuras de autofagia sean más regulares.

Aunque el número de figuras de autofagia permaneció invariable en el grupo control en respuesta al envejecimiento, se observó una tendencia a la disminución en este parámetro en función de la edad que no llegó a ser estadísticamente significativa. En cambio, en los grupos de animales sometidos a RC se produjo una disminución generalizada de este parámetro en todas las dietas suministradas durante 18 meses con excepción de la suplementada con aceite de pescado (CR.Fish). Nuevamente, esta intervención parece promover cambios en las figuras de autofagia a los 6 meses de aplicación, ya que como ocurría previamente en los parámetros de área y perímetro, es a esta edad cuando la grasa rica en PUFA n-3 fue capaz de disminuir el número de figuras halladas en el citoplasma de los hepatocitos, perdiéndose dicho efecto en intervenciones más largas.

Por su parte, la densidad de volumen (“Vv”), aumentó muy significativamente en el grupo control tras 18 meses de intervención, observándose una atenuación de esta respuesta en los grupos sometidos a RC. Estos cambios no se observaron en el grupo alimentado con la dieta CR.Fish a los 18 meses, donde “Vv” alcanzó prácticamente los altos niveles alcanzados en los animales de más edad del grupo control.

Estos resultados parecen indicar que con el envejecimiento se produce un incremento en el tamaño y en la complejidad de las figuras de autofagia. Además, éstas tienden a ser menos numerosas, pero a ocupar un mayor volumen en la célula, por lo que cabe la posibilidad de que a la maquinaria celular le resulte más complejo eliminar dichas vesículas autofágicas, aumentando así la probabilidad de que queden acumuladas en el citoplasma.

La RC es capaz de producir una disminución del tamaño y complejidad de dichas figuras, así como de su número y del volumen que ocupan en la célula. De manera

global, este efecto se observa en intervenciones a largo plazo (18 meses) y, aunque todas las grasas parecen actuar de manera similar con pequeñas variaciones, es la grasa rica en PUFA de la serie n-3 la que parece ser menos eficiente en la modulación de estos parámetros a tiempo final del estudio, presentando no obstante algunas mejoras en periodos de intervención más cortos.

En conjunto, los resultados obtenidos parecen indicar que la RC puede atenuar los efectos adversos del envejecimiento en cuanto a parámetros morfológicos y cuantitativos de las figuras de autofagia se refiere, favoreciendo en última instancia el flujo autofágico.

5.4.2. Envejecimiento, restricción calórica y grasa de la dieta como moduladores de la ruta de autofagia

Analizando ahora los efectores proteicos que median la progresión de la ruta de autofagia, observamos cómo en el caso de la proteína Beclina 1, implicada en las fases de iniciación de formación del autofagosoma, se produjo un incremento significativo en sus niveles asociado al envejecimiento en animales control, mientras que en condiciones de RC este incremento se produjo a los 6 meses de intervención, no observándose cambios en periodos más largos. Estos resultados podrían indicar que en los animales de mayor edad alimentados con la dieta control, se produce una respuesta tendente a acelerar la ruta de autofagia en estadios tempranos de la misma a través de la expresión de Beclina 1. Esto no ocurre en el caso de los animales viejos sometidos a RC, en los que dichos niveles aumentan ya desde edades más tempranas.

Por otra parte, los niveles de esta proteína se ven afectados de manera diferencial por la grasa de la dieta, ya que tanto los individuos alimentados con la dieta CR.Lard, como los alimentados con CR.Fish fueron capaces de incrementar los niveles de Beclina 1 durante envejecimiento, respuesta que se vio atenuada en los individuos alimentados con CR.Soy. Cabe destacar que fue el grupo alimentado con CR.Fish a los 18 meses de intervención el que mostró unos niveles más elevados en la expresión de esta proteína, lo que puede suponer una adaptación de este grupo experimental en respuesta al incremento observado en la densidad numérica y de volumen de las figuras de autofagia en edades más avanzadas.

En este tejido, los niveles de p62 permanecieron sin cambios en el grupo control en respuesta a la edad, hecho que contrasta de forma llamativa con el acusado aumento que experimenta esta proteína bajo las mismas condiciones experimentales en músculo esquelético, tal y como se discutió previamente. No obstante, la RC fue capaz nuevamente de disminuir los niveles de esta proteína a los 18 meses de intervención, mientras que intervenciones más cortas no produjeron cambios a nivel de esta proteína. La no alteración en la expresión de p62 en periodos cortos de restricción calórica (2 meses) ya había sido detectada en otros estudios llevados a cabo también en hígado de ratón [196]. Estos resultados podrían indicar un mejor funcionamiento del flujo autofágico mediado por la RC, ya que niveles bajos de p62 se asocian habitualmente a un aumento del flujo autofágico [358].

Las respuestas tejido-dependiente en el proceso de autofagia, han sido recogidas en numerosos estudios, como por ejemplo el llevado a cabo por Wohlgemuth *et.al* [371], donde se determinó que la respuesta autofágica en músculo cardíaco fue mayor que la observada en hígado, lo que puede sugerir que el corazón, tejido post-mitótico, requiere de una mayor demanda de mantenimiento celular que el hígado, ya que éste al ser mitótico presenta una mayor capacidad de regeneración que permite remplazar las células muertas o dañadas mediante la división de las células vecinas, paliando en cierta medida el daño asociado al envejecimiento. Además, sus experimentos llevados a cabo en hígado destacaron que en este órgano no se produce una pérdida importante de funcionalidad en el proceso autofágico en respuesta al envejecimiento, no observándose por tanto mejoras en el mismo en condiciones de RC [4].

Estos resultados contrastan con los hallazgos de Del Roso y colaboradores [372], que apuntaron que no se producía una disminución en el ratio basal de proteólisis en hígado en respuesta a la edad, aunque sí observaron que la degradación de proteínas estimulada por el tratamiento con 3,5 dimetilpirazol (DMP), droga antilipolítica que favorece la formación de vesículas autofágicas, disminuyó en hígado de animales envejecidos, si bien fue mejorada en condiciones de RC [5].

La grasa de la dieta no parece suponer cambios sustanciales en la regulación de los niveles de p62. No obstante, sí que se observaron niveles más elevados de esta proteína en los dos periodos de intervención de la dieta CR.Fish, lo que podría correlacionarse con el aumento en los parámetros “Na” y “Vv” de las figuras de autofagia del grupo de

18 meses sometido a esta dieta. Esto podría estar indicando que al ser estas figuras más numerosas y ocupar un mayor volumen en el hepatocito, son eliminadas de manera menos eficiente por la maquinaria de degradación lisosomal. Esta idea se basa en la posibilidad de que exista una correlación entre el tamaño de las figuras ultraestructuralmente anómalas y la capacidad de formación de autofagosomas que las incluya [358].

En cuanto a la proteína LC3 encontramos que, aunque se produjo un incremento en la expresión de LC3II a los 18 meses de intervención en el grupo control, no se produjo un cambio en la ratio de ambas formas, lo que parece indicar que no se produce una disminución en el flujo autofágico en respuesta al envejecimiento, hecho que también se pone de manifiesto en otros trabajos [371]. No obstante, este resultado contrasta con el incremento en el área de las figuras de autofagia y en el volumen de hepatocito ocupado por ellas, observado en nuestro estudio ultraestructural. Aunque en condiciones de RC se produjo un incremento en los niveles de LC3I y LC3II, la ratio entre ambas indica una disminución del flujo autofágico en estas condiciones. A pesar de ello, es difícil extraer una conclusión inequívoca al respecto ya que esta disminución puede también deberse a un flujo mejorado, como se podría deducir del incremento en la expresión de las dos formas en respuesta a la RC, o incluso a un bloqueo en el mismo en las últimas fases del proceso autofágico que haga que se acumulen ambas formas de la proteína. A este respecto, estudios llevados a cabo en hígado de ratones sometidos a un 30% de RC durante 2 meses mostraron una disminución en ambas formas de la proteína LC3 (I y II) así como en la ratio con respecto al grupo control, argumentando un aumento en el flujo autofágico por un mayor recambio de estas proteínas debido al flujo incrementado. Ese resultado, junto a la menor concentración de agregados proteicos ubiquitinilados encontrada, parece apoyar dicha idea [196].

En cualquier caso, la respuesta en la expresión de LC3 a la RC parece ser diferente en función de la grasa de la dieta suministrada. Así, cuando ésta era rica en SFA y MUFA, se produce un fuerte incremento de la forma LC3II, lo que está relacionado de manera directa con la formación de los autofagosomas [8]. Aunque no se produzca un incremento significativo en la ratio de ambas formas de la proteína, existe la posibilidad de que en presencia de la dieta CR.Lard se produzca una leve mejora del flujo autofágico a nivel de los últimos pasos de la ruta.

Por su parte, los resultados obtenidos con la dieta CR.Fish podrían poner de manifiesto un bloqueo del proceso en los últimos estadios del mismo, lo que daría lugar a una acumulación de ambas formas de la proteína LC3, aunque esto no suponga alteraciones en la ratio de ambas proteínas. Esto encaja parcialmente con el hecho de que a los 18 meses de intervención, esta dieta fuera la que presentara un mayor número de vesículas de autofagia y un mayor volumen celular ocupado por las mismas.

Aunque los resultados obtenidos en este trabajo denotan cambios en el flujo autofágico en función de la grasa de la dieta en condiciones de RC, serían necesarios análisis de proteínas relacionadas con la actividad lisosomal para poder confirmarlos. Por ejemplo, las determinaciones de los niveles de la proteína LAMP-1, marcador lisosomal asociado a la maduración de los autofagosomas y autofagolisosomas, podrían aportar información relevante sobre la dinámica del proceso autofágico en sus últimas etapas. De la misma forma, determinaciones de los niveles de proteasas lisosomales, como la catepsina D, podrían ser indicativas de la capacidad proteolítica lisosomal [371].

También sería interesante determinar los niveles de expresión de LAMP-2A, proteína lisosomal implicada en la autofagia mediada por chaperonas (CMA). Aunque este tipo de autofagia supone un porcentaje relativamente pequeño del total de la autofagia producida a nivel celular, es la única modalidad de este proceso capaz de eliminar proteínas solubles y no orgánulos. En este sentido, se ha descrito que este tipo de autofagia también disminuye su eficiencia como consecuencia de la edad [204]. De hecho, estudios llevados a cabo por Zhan y Cuervo en 2008, determinaron que la disminución en los niveles de LAMP-2A en hígado de ratones viejos favorecía la acumulación de agregados proteicos que comprometían la función del órgano en estos individuos. El re-establecimiento en los niveles de esta proteína mediante un modelo doble transgénico específico de hígado mejoró los defectos observados en la CMA y autofagia, disminuyendo la abundancia de proteínas oxidadas y agregados proteicos ubiquitinilados asociados al envejecimiento [373]. Estas determinaciones constituyen un reto para futuras investigaciones en las alteraciones de la CMA en el presente modelo de estudio.

Nuestro estudio en hígado sobre las alteraciones de la ruta autofágica en relación con la dieta y el envejecimiento, culmina con el análisis de la proteína PINK1,

relacionada estrechamente con la eliminación selectiva de las mitocondrias y otras funciones como el remodelado de las crestas mitocondriales [52]. En nuestro caso, no observamos cambios consistentes en el grupo experimental control en respuesta al envejecimiento, observándose también una ausencia de cambios en el grupo de RC en ambos periodos de intervención.

Llama la atención, no obstante, que en condiciones de RC la grasa rica en SFA y MUFA incrementó en gran medida los niveles de esta proteína a los 18 meses de intervención, como ya ocurriera en músculo esquelético. Aunque como se comentó con anterioridad, lamentablemente, no pudimos detectar una señal cuantificable en este tejido de la proteína Parkin, podríamos contemplar la posibilidad de que la manteca en condiciones de RC estuviera favoreciendo una eliminación de mitocondrias dañadas de una manera más efectiva. No obstante, para poder determinar con certeza si PINK1 está actuando como impulsor de la respuesta autofágica o, por el contrario, está favoreciendo el remodelado de las crestas mitocondriales [52] serían necesarias las determinaciones de los niveles de la proteína Parkin.

5.4.3. Alteraciones en el daño oxidativo a proteínas en respuesta al envejecimiento y a las diferentes intervenciones nutricionales

Una de las teorías más aceptadas que explican el porqué del envejecimiento es la “Teoría de los Radicales Libres”, que postula que el incremento en la producción ROS daña progresivamente biomoléculas celulares como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos de membrana [161, 162]. Por tanto, se llevaron a cabo determinaciones del grado de carbonilación de proteínas para comprobar si el envejecimiento y las distintas dietas afectaban este parámetro en hígado. No se detectaron alteraciones en este parámetro en respuesta a la edad, hecho aparentemente sorprendente, ya que ha sido descrito cómo el envejecimiento produce un mayor daño oxidativo en distintos componentes celulares, entre ellos las proteínas [355]. Nuestros resultados, no obstante, parecen ir en la línea de observaciones previas llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación, que determinaron que en estos mismos animales control no se produjo un incremento en los niveles de hidroperóxidos hallados en hígado en respuesta a la edad [266], por lo que podría asumirse que en el periodo temporal que comprende nuestras intervenciones nutricionales, el hígado de los ratones de más edad no se ve afectado de manera

significativa por el daño oxidativo de las biomoléculas determinadas. Esta afirmación se ve apoyada por el hecho de que numerosos estudios han determinado que las diferencias en el daño oxidativo entre animales control y sometidos a RC, sólo se observaron cuando los individuos de estudio, en este caso ratas, alcanzaban los 30 meses de edad [374]. De la misma manera, en otros estudios realizados por Tian y colaboradores en hígado de rata [375] se determinó que el incremento en el contenido de proteínas carboniladas no se produjo hasta que los animales alcanzaron una edad más avanzada que la considerada en el presente estudio, observándose por tanto un incremento en este parámetro a partir de los 24 meses [375].

En cuanto al efecto de la grasa de la dieta, sí que se observaron cambios en el nivel de grupos carbonilos de animales sometidos a RC, siendo patente un incremento de este marcador en animales alimentados con ambas dietas ricas en PUFA a los 6 meses de intervención (CR.Soy y CR.Fish) con respecto a los alimentados con grasa rica en ácidos SFA y MUFA (CR.Lard). El incremento más llamativo fue el hallado en el grupo alimentado con grasa rica en aceite de pescado; dato que es consistente con el hecho de que esta dieta fue la que produjo un mayor incremento en los niveles de hidroperóxidos en hígado a este mismo tiempo de intervención [266]. Estos cambios observados en intervenciones cortas fueron, no obstante, revertidos en periodos más largos (18 meses) donde la RC disminuyó de manera eficiente la carbonilación de proteínas.

El incremento en el daño oxidativo hepático observado para las dietas ricas en ricas en PUFA, coincide con el hecho de que estos ácidos grasos son los más susceptible de sufrir oxidación, habiendo sido además establecida una relación entre los grupos aldehído procedentes de reacciones de peroxidación lipídica y el incremento en la formación de grupos carbonilo asociados a aminoácidos proteicos [359].

Es posible que en intervenciones cortas, el incremento en el daño oxidativo observado en animales alimentados en una dieta rica en PUFA, sea capaz de promover un incremento en la respuesta antioxidante celular a los 6 meses, ya que se ha descrito que niveles moderados de ROS pueden regular el estado redox celular sin producir daños adicionales [56]. De esta forma, a los 18 meses el daño es similar en todas las condiciones experimentales. Una de las posibles respuestas adaptativas inducidas por la grasa de la dieta, puede venir dada por la disminución en la generación de las propias

ROS, tal y como se recoge en el estudio de Hagopian et al.[174] dónde se observó que en ratones transgénicos Fat-1, que son capaces de sintetizar ácidos grasos de la serie n-3 (presentes entre otros en el aceite de pescado) por la expresión de una desaturasa de *C. elegans*, se produjo una disminución en el ratio de peróxido de hidrógeno producido a nivel de la mitocondria, concretamente en el complejo I mitocondrial [174].

5.4.4. Expresión de los complejos de la cadena de transporte electrónico en respuesta a las intervenciones nutricionales y al envejecimiento

Ha sido ampliamente descrito que la función mitocondrial se ve comprometida con el envejecimiento, siendo normal la aparición de alteraciones morfológicas y disminución en su masa, tal y como ha sido reportado en hígado de ratones, ratas y humanos, produciéndose una disminución en las copias de ADN mitocondrial (ADNmt) y, por tanto del nivel de proteínas mitocondriales [266, 376, 377]. El ADNmt codifica para 13 proteínas que formarán parte de la cadena de transporte electrónico, mientras que el resto de subunidades proteicas están codificadas por genes nucleares [313, 378]. Por tanto, las alteraciones en la integridad del ADNmt como consecuencia del envejecimiento compromete el correcto funcionamiento de la cadena de la CTE.

Se ha descrito también que la capacidad de la CTE se reduce hasta en un 40% en hígado de ratas viejas (24 meses) en comparación con individuos juveniles (3-4 meses) [376] hecho que ha sido constatado en humanos a nivel de distintos órganos como el hígado, el músculo esquelético y el corazón [378]. Además, y de forma más específica, ciertos estudios han determinado que la actividad de los complejos I y IV disminuye con el envejecimiento en hígado, cerebro, corazón y riñón, mientras que la actividad de los complejos II, III y V no experimenta alteraciones [378].

En el presente trabajo, los resultados más significativos relacionados con la disponibilidad de subunidades de complejos de la CTE, mostraron un incremento en la expresión del complejo I con el envejecimiento y una tendencia a la disminución en la expresión del III, ambos en condiciones control. Ya que estudios topológicos llevados a cabo por Barja y colaboradores han determinado que es a nivel de estos complejos dónde se produce la mayor producción de ROS a nivel mitocondrial [363], es significativo el hecho de que sea en la expresión de subunidades de ambos complejos

dónde encontramos cambios en relación al envejecimiento. Sin embargo el impacto de estos cambios en la fisiología mitocondrial y en la producción de ROS y su posible efecto sobre el envejecimiento tendría que ser evaluado en futuras investigaciones.

En condiciones de RC, por su parte, se produjo una disminución en la expresión de los complejos III, IV y V a los 6 meses de intervención con respecto a su grupo control homólogo en edad. De manera opuesta se observó un incremento en la expresión del complejo I también en intervenciones a medio plazo bajo las mismas condiciones nutricionales. Estos resultados concuerdan en parte con estudios llevados a cabo por Jové y colaboradores [196], que determinaron que dos meses de RC (30%) fueron capaces disminuir la expresión del complejo III, al igual que sucede en el presente trabajo, permaneciendo no obstante invariables los niveles de expresión del complejo I y IV e incrementándose los del II. Por otro lado, determinaciones llevadas a cabo en hígado de ratas sometidas a RC (25%) durante un periodo de 7 semanas, determinaron que se produjo una disminución en la expresión del complejo IV y I, incrementándose la del complejo II y III [379]. En nuestro estudio, el hecho de que a los 6 meses de intervención se produzca un descenso significativo de los niveles de expresión del complejo III, podría estar representando una adaptación a la RC en este grupo nutricional, mediante la que disminuye la expresión de uno de los complejos que produce mayor cantidad de ROS a nivel mitocondrial, lo que puede contribuir a una disminución en la producción de las mismas [196]. Este efecto, sin embargo, no se aplicaría al complejo I, cuya expresión aumenta de manera significativa en las mismas condiciones experimentales.

La heterogeneidad en los resultados referentes a los cambios de expresión de los complejos mitocondriales encontrada en éste y en los trabajos citados, puede deberse a dos circunstancias: i) la intervención nutricional no duró el mismo tiempo en los estudios que se comparan y ii) es posible que exista una respuesta diferencial a la RC específica de especie, pues los estudios mencionados fueron realizados en ratas.

Por otro lado, en intervenciones largas (18 meses) se produjo un aumento en la expresión del complejo III y V en animales sometidos a RC frente a los del grupo control de la misma edad, observándose esta misma tendencia en el complejo II. La tendencia al incremento en la expresión de este último, podría ser indicativa del cambio metabólico que se produce en los organismos como respuesta a la RC. Está descrito que

bajo esta intervención nutricional, se produce un cambio en el metabolismo celular encaminado a la obtención de energía a partir del metabolismo de las grasas más que a partir del metabolismo de los carbohidratos [380]. Además, el poder reductor derivado de la oxidación de los ácidos grasos entra en la CTE a través del complejo II, en lugar de a través del complejo I [184], de manera que esta tendencia al incremento en la expresión de este complejo podría ser indicativo de este cambio metabólico producido, en nuestro caso, a los 18 meses de intervención.

La grasa de la dieta parece ejercer cambios muy sutiles en los niveles de las subunidades marcadoras de los complejos determinadas en nuestro estudio. El más destacable se produjo cuando la dieta suministrada fue rica en SFA y MUFA (CR.Lard), en la que se observó un descenso significativo en los niveles de expresión del complejo III, disminución que no se observó en el resto de grupos experimentales (CR.Soy y CR.Fish). Este resultado, como ya comentamos con anterioridad, puede suponer una adaptación de los animales alimentados con esta dieta a disminuir la expresión de los niveles de uno de los complejos mitocondriales que más ROS produce, pudiendo suponer como consecuencia una menor producción de moléculas oxidantes en este grupo dietético.

Aunque la determinación de los niveles de subunidades de los complejos de la CTE llevada a cabo en este trabajo puede ser útil en la estimación de la disponibilidad de subunidades proteicas, son necesarias más investigaciones que profundicen en el estado fisiológico de estas mitocondrias para determinar si realmente los cambios descritos se traducen en alteraciones en la generación de ROS por parte de este orgánulo, en alteraciones en la fuga de protones y en el consumo de oxígeno por parte de las mismas en los distintos grupos dietéticos.

A este respecto, estudios llevados a cabo en hígado de rata, han mostrado que periodos largos de RC (18 meses) son capaces de producir una disminución en la fuga de protones. Este proceso supone un 20% de la pérdida de energía en estado de reposo [191] y está relacionado con el estrés oxidativo. Asimismo, esta intervención también disminuyó los niveles de H₂O₂ generados actuando sobre la función del complejo I e influyendo en menor medida sobre el complejo III, dos de las principales fuentes de generación de ROS a nivel de la mitocondria [381].

Otras investigaciones encaminadas a profundizar en las alteraciones de la función mitocondrial en respuesta a la RC y la grasa de la dieta, fueron llevadas a cabo en una cohorte hermana a la utilizada en el presente estudio, siendo en este caso el periodo de intervención más corto (1 mes). Los resultados mostraron que no se produjeron cambios en la fuga de protones de animales sometidos a RC con respecto a los controles. No obstante, fue la grasa rica en ácidos grasos SFA y MUFA (CR.Lard) la que produjo unos niveles más bajos de este parámetro mientras que la dieta enriquecida en PUFA n-3 (CR.Fish) fue la que más los incrementó [187]. En este mismo estudio se observó que la dieta rica en aceite de pescado resultó en una disminución en la producción de ROS por parte de los complejos I y III con respecto al resto de intervenciones. Por su parte, las actividades de los complejos mitocondriales no experimentaron alteraciones entre el grupo control y el sometido a RC. No obstante, los grupos alimentados con CR.Lard y CR.Fish redujeron la actividad del complejo I, siendo esta última también capaz de disminuir la del complejo II con respecto al resto de grupos experimentales[187].

6. Conclusiones Generales

6. Conclusiones Generales

1. En la línea celular Tkpts, las subunidades de la cadena de transporte electrónico se regulan de manera diferencial en función de la procedencia endógena o exógena del coenzima Q, siendo el complejo III el que más se afecta por los niveles de esta molécula. La función mitocondrial, determinada mediante el análisis de la ratio de consumo de oxígeno (OCR) y la ratio de acidificación del medio extracelular (ECAR), se ve afectada también por los niveles de coenzima Q, actuando el kaempferol de manera independiente a su acción como precursor biosintético de esta molécula.
2. La acción de compuestos fenólicos disminuyendo la producción de especies reactivas mitocondriales requiere su acción como precursores biosintéticos del coenzima Q. Sin embargo, esta acción no es suficiente para producir dichos efectos.
3. La dinámica mitocondrial no se ve afectada por las alteraciones en los niveles de coenzima Q promovidas por los tratamientos. No obstante, el kaempferol favorece los procesos de fisión mitocondrial de forma independiente de su actividad como precursor biosintético del coenzima Q.
4. El procesamiento de LC3 a LC3I, uno de los últimos pasos del proceso autofágico, está modulado por la disponibilidad de coenzima Q tanto de origen exógeno como derivado de síntesis endógena. Además, los tratamientos que incrementan los niveles de coenzima Q en esta línea celular también producen una disminución en la acumulación de autofagosomas.
5. La regulación de la actividad de ATG4 mediada por Trx 1 es un proceso clave en la modulación de la autofagia mediada por coenzima Q.
6. La acumulación de gotas lipídicas, los niveles de subunidades de la cadena de transporte electrónico, la generación de especies reactivas y el daño oxidativo, son procesos modulados por el tipo de ácido graso predominante en el medio de cultivo en células Hepa 1.6.

6. Conclusiones Generales

7. El incremento de los niveles de coenzima Q producido por los ácidos grasos n-3 participa en la regulación de la autofagia que estas sustancias llevan a cabo, favoreciendo el procesamiento de LC3
8. En músculo esquelético de animales sometidos a restricción calórica, la máxima preservación de la autofagia con el envejecimiento se observó en animales alimentados con la dieta de manteca frente a los alimentados con las otras dietas enriquecidas en acetite de soja o de pescado.
9. El impacto de la restricción calórica sobre la abundancia de los complejos mitocondriales en músculo esquelético es pequeño, limitándose a la reducción del complejo I en animales jóvenes y el III en animales viejos. Respecto al componente graso en condiciones de RC, el principal efecto es la alteración en la expresión de algunos complejos mitocondriales mediada por los ácidos grasos poli-insaturados en animales jóvenes, atenuándose dicha respuesta con el envejecimiento.
10. En hígado, la restricción calórica disminuye el tamaño y abundancia de las figuras de autofagia. De manera global, este efecto se observa en intervenciones a largo plazo actuando el componente graso de la dieta de manera similar. Sin embargo, la dieta rica en PUFA de la serie n-3 es la menos eficiente en la modulación de estos parámetros, presentando no obstante algunas mejoras en periodos de intervención más cortos.
11. En tejido hepático, la grasa de la dieta modula el daño oxidativo según la predicción de su índice de dobles enlaces aunque sólo en animales jóvenes, mientras que estas alteraciones se atenúan de nuevo por la edad.
12. La restricción calórica produce un incremento generalizado sobre la abundancia de los complejos mitocondriales con el envejecimiento, sin que la grasa de la dieta produzca alteraciones ulteriores.
13. El efecto de las intervenciones nutricionales en autofagia, estrés oxidativo y abundancia de los complejos mitocondriales es específico de tejido (músculo vs. hígado) y su impacto es distinto en función de la edad.

7. General Conclusions

7. General Conclusions

1. In the Tkpts cell line, the subunits of the electron transport chain are differentially regulated depending on the endogenous or exogenous origin of coenzyme Q, being complex III the most affected by the levels of this molecule. The mitochondrial function, determined by oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR), is also affected by coenzyme Q levels, with kaempferol acting independently of its action as a biosynthetic precursor of this molecule.
2. The role of phenolic compounds decreasing the production of mitochondrial reactive species requires their action as biosynthetic precursors of coenzyme Q. However, this action is not sufficient to produce such effects.
3. Mitochondrial dynamics is not affected by alterations in coenzyme Q levels produced by the treatments. However, kaempferol promotes mitochondrial fission processes independently of its role as a biosynthetic precursor of coenzyme Q.
4. LC3 to LC3I processing, one of the last steps of the autophagic process, is modulated by the availability of coenzyme Q either from exogenous or endogenous origin. In addition, treatments that increase coenzyme Q levels in these cells also produce a decrease in the autophagosomes accumulation.
5. The regulation of ATG4 activity mediated by Trx 1 is a key process in the modulation of autophagy mediated by coenzyme Q.
6. The accumulation of lipid droplets, the levels of the electron transport chain subunits, generation of reactive species and oxidative damage, are processes modulated by the type of fatty acid predominant in the culture medium in Hepa 1.6 cells.
7. The increase in coenzyme Q levels produced by n-3 fatty acids is involved in the regulation of autophagy exerted by these compounds, promoting the processing of LC3.

7. General Conclusions

8. In skeletal muscle from animals submitted to caloric restriction, the maximum preservation of autophagy with aging was observed in animals fed with a lard-enriched diet compared to those fed with the other diets enriched with either soybean or fish oil
9. The impact of caloric restriction on the abundance of mitochondrial complexes in skeletal muscle is mild, being limited to a decrease of complex I in young and of complex III in old animals. Regarding the fat component of the diet under caloric restriction conditions, the main effect is the modulation of some mitochondrial complexes mediated by polyunsaturated fatty acids in young animals, whereas aging attenuates this response.
10. In liver, caloric restriction reduces the size and abundance of autophagy figures. Overall, this effect is observed in long-term interventions with all dietary fats acting in a similar way. However, the PUFA n-3 enriched diet is the least efficient modulating these parameters, although results in some improvements in shorter intervention periods.
11. In hepatic tissue, dietary fat modulates oxidative damage in young animals according to the prediction of its double bonds index, whereas these alterations are attenuated again by aging.
12. In liver, caloric restriction produces a generalized increase in the abundance of mitochondrial complexes with aging, without any further alterations produced by changes of dietary fat.
13. The effect of dietary interventions on autophagy, oxidative stress and abundance of mitochondrial complexes is tissue-dependent (muscle vs. liver) and its impact is different depending on the age.

8. Bibliografía

8. Bibliografia

1. Saftig P, B.W., Eskelinen EL., *LAMP-2*. Autophagy, 2008. **4**: p. 510-512.
2. Parzych, K.R. and D.J. Klionsky, *An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation*. Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(3): p. 460-73.
3. Nakatogawa, H., et al., *Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(7): p. 458-67.
4. Levine, B. and G. Kroemer, *Autophagy in the pathogenesis of disease*. Cell, 2008. **132**(1): p. 27-42.
5. Mizushima, N., *Autophagy: process and function*. Genes Dev, 2007. **21**(22): p. 2861-73.
6. Xie, Z. and D.J. Klionsky, *Autophagosome formation: core machinery and adaptations*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(10): p. 1102-9.
7. Klionsky, D.J., *Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(11): p. 931-7.
8. Bento, C.F., et al., *Mammalian Autophagy: How Does It Work?* Annu Rev Biochem, 2016. **85**: p. 685-713.
9. Axe, E.L., et al., *Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum*. J Cell Biol, 2008. **182**(4): p. 685-701.
10. Simonsen, A. and S.A. Tooze, *Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes*. J Cell Biol, 2009. **186**(6): p. 773-82.
11. Tanida, I., *Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy*. Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(11): p. 2201-14.
12. Weidberg, H., et al., *LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis*. Embo j, 2010. **29**(11): p. 1792-802.
13. Velikkakath, A.K., et al., *Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(5): p. 896-909.
14. Nair, U., et al., *A role for Atg8-PE deconjugation in autophagosome biogenesis*. Autophagy, 2012. **8**(5): p. 780-93.
15. Yu, Z.Q., et al., *Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy*. Autophagy, 2012. **8**(6): p. 883-92.
16. Liu, P.F., et al., *Drug Repurposing Screening Identifies Tioconazole as an ATG4 Inhibitor that Suppresses Autophagy and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapy*. Theranostics, 2018. **8**(3): p. 830-845.
17. Yang, Z. and D.J. Klionsky, *Eaten alive: a history of macroautophagy*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(9): p. 814-22.
18. Monastyrska, I., et al., *Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2009. **84**(3): p. 431-48.
19. Hunt, S.D. and D.J. Stephens, *The role of motor proteins in endosomal sorting*. Biochem Soc Trans, 2011. **39**(5): p. 1179-84.

8. Bibliografia

20. Fass, E., et al., *Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes*. J Biol Chem, 2006. **281**(47): p. 36303-16.
21. Jahreiss, L., F.M. Menzies, and D.C. Rubinsztein, *The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes*. Traffic, 2008. **9**(4): p. 574-87.
22. Ravikumar, B., et al., *Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins*. Nat Genet, 2005. **37**(7): p. 771-6.
23. Cardoso, C.M.P., et al., *Depletion of Kinesin 5B Affects Lysosomal Distribution and Stability and Induces Peri-Nuclear Accumulation of Autophagosomes in Cancer Cells*. PLoS ONE, 2009. **4**(2): p. e4424.
24. Korolchuk, V.I., et al., *Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(4): p. 453-60.
25. Jordens, I., et al., *The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors*. Curr Biol, 2001. **11**(21): p. 1680-5.
26. Fader, C.M., et al., *TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(12): p. 1901-16.
27. He, C. and D.J. Klionsky, *Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy*. Annu Rev Genet, 2009. **43**: p. 67-93.
28. Dunlop, E.A. and A.R. Tee, *mTOR and autophagy: A dynamic relationship governed by nutrients and energy*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2014. **36**: p. 121-129.
29. Kim, J., et al., *AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(2): p. 132-41.
30. Rubinsztein, D.C., G. Marino, and G. Kroemer, *Autophagy and aging*. Cell, 2011. **146**(5): p. 682-95.
31. Settembre, C., et al., *TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis*. Science, 2011. **332**(6036): p. 1429-33.
32. Settembre, C., et al., *A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB*. Embo j, 2012. **31**(5): p. 1095-108.
33. Inoki, K., T. Zhu, and K.L. Guan, *TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival*. Cell, 2003. **115**(5): p. 577-90.
34. Egan, D.F., et al., *Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy*. Science, 2011. **331**(6016): p. 456-61.
35. Lee, J.W., et al., *The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e15394.
36. Gwinn, D.M., et al., *AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint*. Mol Cell, 2008. **30**(2): p. 214-26.
37. Yang, Z. and D.J. Klionsky, *Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation*. Curr Opin Cell Biol, 2010. **22**(2): p. 124-31.

8. Bibliografía

38. Bach, M., et al., *The serine/threonine kinase ULK1 is a target of multiple phosphorylation events*. *Biochem J*, 2011. **440**(2): p. 283-91.
39. Zhong, Y., et al., *Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex*. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(4): p. 468-76.
40. Fimia, G.M., et al., *Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system*. *Nature*, 2007. **447**(7148): p. 1121-5.
41. Wei, Y., et al., *JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy*. *Mol Cell*, 2008. **30**(6): p. 678-88.
42. Russell, R.C., et al., *ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase*. *Nat Cell Biol*, 2013. **15**(7): p. 741-50.
43. Di Bartolomeo, S., et al., *The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy*. *J Cell Biol*, 2010. **191**(1): p. 155-68.
44. Hoyer-Hansen, M., et al., *Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2*. *Mol Cell*, 2007. **25**(2): p. 193-205.
45. Ding, W.X., et al., *Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(7): p. 4702-10.
46. Peng, H., et al., *Ubiquitylation of p62/sequestosome1 activates its autophagy receptor function and controls selective autophagy upon ubiquitin stress*. *Cell Res*, 2017. **27**(5): p. 657-674.
47. Zheng, Y.T., et al., *The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway*. *J Immunol*, 2009. **183**(9): p. 5909-16.
48. Kim, I., S. Rodriguez-Enriquez, and J.J. Lemasters, *Selective degradation of mitochondria by mitophagy*. *Arch Biochem Biophys*, 2007. **462**(2): p. 245-53.
49. Kundu, M., et al., *Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation*. *Blood*, 2008. **112**(4): p. 1493-502.
50. Youle, R.J. and D.P. Narendra, *Mechanisms of mitophagy*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011. **12**(1): p. 9-14.
51. Meissner, C., et al., *The mitochondrial intramembrane protease PARL cleaves human Pink1 to regulate Pink1 trafficking*. *J Neurochem*, 2011. **117**(5): p. 856-67.
52. Tsai, P.I., et al., *PINK1 Phosphorylates MIC60/Mitofilin to Control Structural Plasticity of Mitochondrial Crista Junctions*. *Mol Cell*, 2018. **69**(5): p. 744-756.e6.
53. Matsuda, N., *Phospho-ubiquitin: upending the PINK–Parkin–ubiquitin cascade*. *Journal of Biochemistry*, 2016. **159**(4): p. 379-385.
54. Halliwell, B.a.G.J.M., *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, 1999.
55. González-Aragón, D., *Alteración del crecimiento celular por la inhibición de la quinona reductasa*. Doctoral Thesis. University of Cordoba, 2011.
56. Bartosz, G., *Reactive oxygen species: destroyers or messengers?* *Biochem Pharmacol*, 2009. **77**(8): p. 1303-15.

8. Bibliografia

57. Stadtman, E.R., *Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences*. Free Radic Biol Med, 1990. **9**(4): p. 315-25.
58. Cabiscol, E., J. Tamarit, and J. Ros, *Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species*. Int Microbiol, 2000. **3**(1): p. 3-8.
59. Cheeseman, K.H. and T.F. Slater, *An introduction to free radical biochemistry*. Br Med Bull, 1993. **49**(3): p. 481-93.
60. Smeitink, J., L. van den Heuvel, and S. DiMauro, *The genetics and pathology of oxidative phosphorylation*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(5): p. 342-52.
61. Kühlbrandt, W., *Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes*. BMC Biology, 2015. **13**: p. 89.
62. Andreyev, A.Y., Y.E. Kushnareva, and A.A. Starkov, *Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species*. Biochemistry (Mosc), 2005. **70**(2): p. 200-14.
63. Turrens, J.F., *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. J Physiol, 2003. **552**(Pt 2): p. 335-44.
64. Raha, S. and B.H. Robinson, *Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(10): p. 502-8.
65. Balaban, R.S., S. Nemoto, and T. Finkel, *Mitochondria, oxidants, and aging*. Cell, 2005. **120**(4): p. 483-95.
66. Jensen, P.K., *Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles. I. pH dependency and hydrogen peroxide formation*. Biochim Biophys Acta, 1966. **122**(2): p. 157-66.
67. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiol Rev, 1979. **59**(3): p. 527-605.
68. Loschen, G., L. Flohe, and B. Chance, *Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria*. FEBS Lett, 1971. **18**(2): p. 261-264.
69. Weisiger, R.A. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase. Organelle specificity*. J Biol Chem, 1973. **248**(10): p. 3582-92.
70. Schagger, H. and K. Pfeiffer, *Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria*. Embo j, 2000. **19**(8): p. 1777-83.
71. Murphy, Michael P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. Biochemical Journal, 2009. **417**(Pt 1): p. 1-13.
72. Klinman, J.P., *How do enzymes activate oxygen without inactivating themselves?* Acc Chem Res, 2007. **40**(5): p. 325-33.
73. Marcus, R.A. and N. Sutin, *Electron transfers in chemistry and biology*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics, 1985. **811**(3): p. 265-322.
74. Skulachev, V.P., *Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants*. Q Rev Biophys, 1996. **29**(2): p. 169-202.
75. Barja, G., *Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies*. Rejuvenation Res, 2007. **10**(2): p. 215-24.

8. Bibliografia

76. Pamplona, R. and G. Barja, *Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: two key traits of longevity*. Ageing Res Rev, 2007. **6**(3): p. 189-210.
77. Lopez-Torres, M. and G. Barja, *[Calorie restriction, oxidative stress and longevity]*. Rev Esp Geriatr Gerontol, 2008. **43**(4): p. 252-60.
78. Barja, G., *Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity*. J Bioenerg Biomembr, 1999. **31**(4): p. 347-66.
79. Muller, F.L., Y. Liu, and H. Van Remmen, *Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 49064-73.
80. Jezek, P. and L. Hlavata, *Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(12): p. 2478-503.
81. Kushnareva, Y., A.N. Murphy, and A. Andreyev, *Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state*. Biochem J, 2002. **368**(Pt 2): p. 545-53.
82. Barros, M.H., et al., *Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2004. **279**(48): p. 49883-8.
83. Guarente, L., *Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins?* Cell, 2008. **132**(2): p. 171-6.
84. Tsao, R., *Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols*. Nutrients, 2010. **2**(12): p. 1231-46.
85. Hatia, S., et al., *Evaluation of antioxidant properties of major dietary polyphenols and their protective effect on 3T3-L1 preadipocytes and red blood cells exposed to oxidative stress*. Free Radic Res, 2014. **48**(4): p. 387-401.
86. Hanasaki, Y., S. Ogawa, and S. Fukui, *The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids*. Free Radic Biol Med, 1994. **16**(6): p. 845-50.
87. Cao, G., E. Sofic, and R.L. Prior, *Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships*. Free Radic Biol Med, 1997. **22**(5): p. 749-60.
88. Geleijnse, J.M., et al., *Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study*. Am J Clin Nutr, 2002. **75**(5): p. 880-6.
89. Duthie, G.G., S.J. Duthie, and J.A. Kyle, *Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants*. Nutr Res Rev, 2000. **13**(1): p. 79-106.
90. de Groot, H. and U. Rauen, *Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids*. Fundam Clin Pharmacol, 1998. **12**(3): p. 249-55.
91. Rafat Husain, S., J. Cillard, and P. Cillard, *Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids*. Phytochemistry, 1987. **26**(9): p. 2489-2491.

8. Bibliografia

92. Filomeni, G., et al., *trans-Resveratrol induces apoptosis in human breast cancer cells MCF-7 by the activation of MAP kinases pathways*. Genes & Nutrition, 2007. **2**(3): p. 295-305.
93. Sexton, É., et al., *Resveratrol interferes with AKT activity and triggers apoptosis in human uterine cancer cells*. Molecular Cancer, 2006. **5**(1): p. 45.
94. Huang, W.W., et al., *Kaempferol induces autophagy through AMPK and AKT signaling molecules and causes G2/M arrest via downregulation of CDK1/cyclin B in SK-HEP-1 human hepatic cancer cells*. Int J Oncol, 2013. **42**(6): p. 2069-77.
95. Bestwick, C.S., et al., *The effect of short-term kaempferol exposure on reactive oxygen levels and integrity of human (HL-60) leukaemic cells*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1740**(3): p. 340-9.
96. Xiao, H.B., et al., *Kaempferol inhibits the production of ROS to modulate OPN-alpha v beta 3 integrin pathway in HUVECs*. J Physiol Biochem, 2016. **72**(2): p. 303-13.
97. Ishige, K., D. Schubert, and Y. Sagara, *Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms*. Free Radic Biol Med, 2001. **30**(4): p. 433-46.
98. Tsai, M.S., et al., *Kaempferol protects against propacetamol-induced acute liver injury through CYP2E1 inactivation, UGT1A1 activation, and attenuation of oxidative stress, inflammation and apoptosis in mice*. Toxicol Lett, 2018. **290**: p. 97-109.
99. Kim, H.Y., O.H. Kim, and M.K. Sung, *Effects of phenol-depleted and phenol-rich diets on blood markers of oxidative stress, and urinary excretion of quercetin and kaempferol in healthy volunteers*. J Am Coll Nutr, 2003. **22**(3): p. 217-23.
100. Young, J.F., et al., *Green tea extract only affects markers of oxidative status postprandially: lasting antioxidant effect of flavonoid-free diet*. Br J Nutr, 2002. **87**(4): p. 343-55.
101. Filomeni, G., et al., *Carcinoma cells activate AMP-activated protein kinase-dependent autophagy as survival response to kaempferol-mediated energetic impairment*. Autophagy, 2010. **6**(2): p. 202-216.
102. Sharma, V., et al., *Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(9): p. 2544-53.
103. Han, B., et al., *Kaempferol induces autophagic cell death of hepatocellular carcinoma cells via activating AMPK signaling*. Oncotarget, 2017. **8**(49): p. 86227-86239.
104. Filomeni, G., et al., *Neuroprotection of kaempferol by autophagy in models of rotenone-mediated acute toxicity: possible implications for Parkinson's disease*. Neurobiology of Aging, 2012. **33**(4): p. 767-785.
105. Kim, I.R., et al., *The role of kaempferol-induced autophagy on differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells*. BMC Complement Altern Med, 2016. **16**(1): p. 333.

8. Bibliografía

106. Villalba, J.M. and F.J. Alcaín, *Sirtuin activators and inhibitors*. BioFactors (Oxford, England), 2012. **38**(5): p. 349-359.
107. Marfe, G., et al., *Kaempferol induces apoptosis in two different cell lines via Akt inactivation, Bax and SIRT3 activation, and mitochondrial dysfunction*. J Cell Biochem, 2009. **106**(4): p. 643-50.
108. Fernandez-Del Rio, L., *Regulation of coenzyme Q biosynthesis through nutritional and pharmacological interventions*. Doctoral Thesis. University of Cordoba, 2017.
109. Guan, X., et al., *Mechanism of Inhibition of the Human Sirtuin Enzyme SIRT3 by Nicotinamide: Computational and Experimental Studies*. PLoS ONE, 2014. **9**(9): p. e107729.
110. Imai, S.-i., *A possibility of nutraceuticals as an anti-aging intervention: Activation of sirtuins by promoting mammalian NAD biosynthesis*. Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society, 2010. **62**(1): p. 42-47.
111. Wolf, D.E., et al., *COENZYME Q. I. STRUCTURE STUDIES ON THE COENZYME Q GROUP*. Journal of the American Chemical Society, 1958. **80**(17): p. 4752-4752.
112. Kawamukai, M., *Biosynthesis and bioproduction of coenzyme Q10 by yeasts and other organisms*. Biotechnol Appl Biochem, 2009. **53**(Pt 4): p. 217-26.
113. Hayashi, K., et al., *Functional conservation of coenzyme Q biosynthetic genes among yeasts, plants, and humans*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e99038.
114. Kawamukai, M., *Biosynthesis of coenzyme Q in eukaryotes*. Biosci Biotechnol Biochem, 2016. **80**(1): p. 23-33.
115. Basselin, M., et al., *Ubiquinone synthesis in mitochondrial and microsomal subcellular fractions of Pneumocystis spp.: differential sensitivities to atovaquone*. Eukaryot Cell, 2005. **4**(8): p. 1483-92.
116. Wang, Y.a.S.H., *Understanding Ubiquinone*. Trends Cell Biol, 2016. **26**(5): p. 367-78.
117. Alcazar-Fabra, M., P. Navas, and G. Brea-Calvo, *Coenzyme Q biosynthesis and its role in the respiratory chain structure*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1857**(8): p. 1073-1078.
118. Bentinger, M., K. Brismar, and G. Dallner, *The antioxidant role of coenzyme Q*. Mitochondrion, 2007. **7 Suppl**: p. S41-50.
119. Turunen, M., J. Olsson, and G. Dallner, *Metabolism and function of coenzyme Q*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1660**(1-2): p. 171-99.
120. Mitchell, P., *Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle*. FEBS Lett, 1975. **56**(1): p. 1-6.
121. Bentinger, M., M. Tekle, and G. Dallner, *Coenzyme Q--biosynthesis and functions*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(1): p. 74-9.
122. Nagy, M., F. Lacroute, and D. Thomas, *Divergent evolution of pyrimidine biosynthesis between anaerobic and aerobic yeasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(19): p. 8966-70.

8. Bibliografia

123. Arias-Mayenco, I., et al., *Acute O₂ Sensing: Role of Coenzyme QH₂/Q Ratio and Mitochondrial ROS Compartmentalization*. Cell Metab, 2018. **28**(1): p. 145-158.e4.
124. Crane, F.L., et al., *Transplasma-membrane redox systems in growth and development*. Biochim Biophys Acta, 1985. **811**(3): p. 233-64.
125. Tomasetti, M., et al., *In vivo supplementation with coenzyme Q10 enhances the recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage*. Faseb j, 2001. **15**(8): p. 1425-7.
126. Ernster, L. and G. Dallner, *Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1271**(1): p. 195-204.
127. Acosta, M.J., et al., *Coenzyme Q biosynthesis in health and disease*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1857**(8): p. 1079-1085.
128. Henneman, L., et al., *Inhibition of the isoprenoid biosynthesis pathway; detection of intermediates by UPLC-MS/MS*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1811**(4): p. 227-33.
129. Ericsson, J. and G. Dallner, *Distribution, biosynthesis, and function of mevalonate pathway lipids*. Subcell Biochem, 1993. **21**: p. 229-72.
130. Block, A., et al., *The Origin and Biosynthesis of the Benzenoid Moiety of Ubiquinone (Coenzyme Q) in Arabidopsis*. Plant Cell, 2014. **26**(5): p. 1938-1948.
131. Marbois, B., et al., *para-Aminobenzoic acid is a precursor in coenzyme Q6 biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2010. **285**(36): p. 27827-38.
132. Pierrel, F., et al., *Involvement of mitochondrial ferredoxin and para-aminobenzoic acid in yeast coenzyme Q biosynthesis*. Chem Biol, 2010. **17**(5): p. 449-59.
133. Xie, L.X., et al., *Resveratrol and para-coumarate serve as ring precursors for coenzyme Q biosynthesis*. Journal of Lipid Research, 2015. **56**(4): p. 909-919.
134. Fernandez-Del-Rio, L., et al., *Kaempferol increases levels of coenzyme Q in kidney cells and serves as a biosynthetic ring precursor*. Free Radic Biol Med, 2017. **110**: p. 176-187.
135. Hargreaves, I.P., *Coenzyme Q10: From fact to fiction*. Pharmacology - Research, Safety Testing and Regulation., ed. I.P. Hargreaves and A.K. Hargreaves. 2015: Nova Science Publishers.
136. Marbois, B., et al., *The yeast Coq4 polypeptide organizes a mitochondrial protein complex essential for coenzyme Q biosynthesis*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(1): p. 69-75.
137. Allan, C.M., et al., *Identification of Coq11, a new coenzyme Q biosynthetic protein in the CoQ-synthome in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2015. **290**(12): p. 7517-34.
138. Moyad, M.A., *An introduction to dietary/supplemental omega-3 fatty acids for general health and prevention: part II*. Urol Oncol, 2005. **23**(1): p. 36-48.
139. Innis, S.M., *Essential fatty acids in growth and development*. Prog Lipid Res, 1991. **30**(1): p. 39-103.

8. Bibliografía

140. Barr, L.H., G.D. Dunn, and M.F. Brennan, *Essential fatty acid deficiency during total parenteral nutrition*. *Ann Surg*, 1981. **193**(3): p. 304-11.
141. Logan, A.C., *Omega-3 fatty acids and major depression: a primer for the mental health professional*. *Lipids Health Dis*, 2004. **3**: p. 25.
142. Hooper, L., et al., *Risks and benefits of omega 3 fats for mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review*. *Bmj*, 2006. **332**(7544): p. 752-60.
143. Sacks, F.M. and H. Campos, *Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and cardiovascular disease: time to widen our view of the mechanisms*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(2): p. 398-400.
144. Huertas, J.R., et al., *Changes in mitochondrial and microsomal rat liver coenzyme Q9 and Q10 content induced by dietary fat and endogenous lipid peroxidation*. *FEBS Lett*, 1991. **287**(1-2): p. 89-92.
145. Ochoa-Herrera, J.J., et al., *Dietary oils high in oleic acid, but with different non-glyceride contents, have different effects on lipid profiles and peroxidation in rabbit hepatic mitochondria*. *J Nutr Biochem*, 2001. **12**(6): p. 357-364.
146. Lopez-Dominguez, J.A., *Efecto de la restricción calórica, el envejecimiento y el componente graso de la dieta sobre la señalización apoptótica en tejidos mitóticos y postmitóticos de ratón*. Doctoral Thesis. University of Cordoba, 2013.
147. Ramsey, J.J., et al., *Influence of mitochondrial membrane fatty acid composition on proton leak and H2O2 production in liver*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2005. **140**(1): p. 99-108.
148. Mataix, J., et al., *Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation*. *Free Radic Biol Med*, 1998. **24**(4): p. 511-21.
149. Choi, S.E., et al., *Protective role of autophagy in palmitate-induced INS-1 beta-cell death*. *Endocrinology*, 2009. **150**(1): p. 126-34.
150. Komiya, K., et al., *Free fatty acids stimulate autophagy in pancreatic beta-cells via JNK pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **401**(4): p. 561-7.
151. Mei, S., et al., *Differential roles of unsaturated and saturated fatty acids on autophagy and apoptosis in hepatocytes*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011. **339**(2): p. 487-98.
152. Wang , J.a.D., N., *Modulation of Autophagy by Free Fatty Acids*. *Cell Death Tobias Ntuli, IntechOpen*, , 2015.
153. Kim, S., et al., *omega3-polyunsaturated fatty acids induce cell death through apoptosis and autophagy in glioblastoma cells: In vitro and in vivo*. *Oncol Rep*, 2018. **39**(1): p. 239-246.
154. O'Rourke, E.J., et al., *omega-6 Polyunsaturated fatty acids extend life span through the activation of autophagy*. *Genes Dev*, 2013. **27**(4): p. 429-40.
155. Kirkwood, T.B., *Understanding the odd science of aging*. *Cell*, 2005. **120**(4): p. 437-47.
156. López-Otín, C., et al., *The Hallmarks of Aging*. *Cell*, 2013. **153**(6): p. 1194-1217.

8. Bibliografia

157. Kennedy, B.K., et al., *Geroscience: linking aging to chronic disease*. Cell, 2014. **159**(4): p. 709-13.
158. Finkel, T., *The metabolic regulation of aging*. Nat Med, 2015. **21**(12): p. 1416-23.
159. Franceschi, C. and J. Campisi, *Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2014. **69 Suppl 1**: p. S4-9.
160. 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.
161. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J Gerontol, 1956. **11**(3): p. 298-300.
162. Harman, D., *The biologic clock: the mitochondria?* J Am Geriatr Soc, 1972. **20**(4): p. 145-7.
163. 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.
164. 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.
165. Portero-Otin, M., et al., *Correlation of fatty acid unsaturation of the major liver mitochondrial phospholipid classes in mammals to their maximum life span potential*. Lipids, 2001. **36**(5): p. 491-8.
166. Pamplona, R., et al., *Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals*. Mech Ageing Dev, 2000. **112**(3): p. 169-83.
167. 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.
168. Herrero, A., et al., *Effect of the degree of fatty acid unsaturation of rat heart mitochondria on their rates of H₂O₂ production and lipid and protein oxidative damage*. Mech Ageing Dev, 2001. **122**(4): p. 427-43.
169. 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.
170. Dowhan, W., E. Mileykovskaya, and M. Bogdanov, *Diversity and versatility of lipid-protein interactions revealed by molecular genetic approaches*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1666**(1-2): p. 19-39.
171. Marsh, D., *Protein modulation of lipids, and vice-versa, in membranes*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(7-8): p. 1545-75.
172. Brand, M.D., P. Couture, and A.J. Hulbert, *Liposomes from mammalian liver mitochondria are more polyunsaturated and leakier to protons than those from reptiles*. Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol, 1994. **108**(2): p. 181-8.
173. Brookes, P.S., et al., *The proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria from ectothermic and endothermic vertebrates and from obese*

8. Bibliografia

- rats: correlations with standard metabolic rate and phospholipid fatty acid composition.* Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1998. **119**(2): p. 325-34.
174. 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.
175. Burch, J.B., et al., *Advances in geroscience: impact on healthspan and chronic disease.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2014. **69 Suppl 1**: p. S1-3.
176. 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.
177. Anderson, R.M. and R. Weindruch, *The caloric restriction paradigm: implications for healthy human aging.* Am J Hum Biol, 2012. **24**(2): p. 101-6.
178. Fabrizio, P. and V.D. Longo, *The chronological life span of Saccharomyces cerevisiae.* Aging Cell, 2003. **2**(2): p. 73-81.
179. Braeckman, B.P., L. Demetrius, and J.R. Vanfleteren, *The dietary restriction effect in C. elegans and humans: is the worm a one-millimeter human?* Biogerontology, 2006. **7**(3): p. 127-33.
180. Bross, T.G., B. Rogina, and S.L. Helfand, *Behavioral, physical, and demographic changes in Drosophila populations through dietary restriction.* Aging Cell, 2005. **4**(6): p. 309-17.
181. Weindruch, R., *Effect of caloric restriction on age-associated cancers.* Exp Gerontol, 1992. **27**(5-6): p. 575-81.
182. Balasubramanian, P., P.R. Howell, and R.M. Anderson, *Aging and Caloric Restriction Research: A Biological Perspective With Translational Potential.* EBioMedicine, 2017. **21**: p. 37-44.
183. 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.
184. Speakman, J.R. and S.E. Mitchell, *Caloric restriction.* Mol Aspects Med, 2011. **32**(3): p. 159-221.
185. Gredilla, R. and G. Barja, *Minireview: the role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity.* Endocrinology, 2005. **146**(9): p. 3713-7.
186. Sohal, R.S. and R. Weindruch, *Oxidative stress, caloric restriction, and aging.* Science, 1996. **273**(5271): p. 59-63.
187. 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.
188. Ash, C.E. and B.J. Merry, *The molecular basis by which dietary restricted feeding reduces mitochondrial reactive oxygen species generation.* Mech Ageing Dev, 2011. **132**(1-2): p. 43-54.
189. Merry, B.J., *Calorie restriction and age-related oxidative stress.* Ann N Y Acad Sci, 2000. **908**: p. 180-98.

8. Bibliografia

190. Merry, B.J., *Oxidative stress and mitochondrial function with aging--the effects of calorie restriction*. Aging Cell, 2004. **3**(1): p. 7-12.
191. Ramsey, J.J., M.E. Harper, and R. Weindruch, *Restriction of energy intake, energy expenditure, and aging*. Free Radic Biol Med, 2000. **29**(10): p. 946-68.
192. Bevilacqua, L., et al., *Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **286**(5): p. E852-61.
193. Chen, J.J. and B.P. Yu, *Detoxification of reactive aldehydes in mitochondria: effects of age and dietary restriction*. Aging (Milano), 1996. **8**(5): p. 334-40.
194. Kisby, G.E., et al., *EFFECT OF CALORIC RESTRICTION ON BASE EXCISION REPAIR (BER) IN THE AGING RAT BRAIN*. Experimental gerontology, 2010. **45**(3): p. 208-216.
195. Cabelof, D.C., et al., *Caloric restriction promotes genomic stability by induction of base excision repair and reversal of its age-related decline*. DNA Repair (Amst), 2003. **2**(3): p. 295-307.
196. 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.
197. Laganier, S. and B.P. Yu, *Effect of chronic food restriction in aging rats. I. Liver subcellular membranes*. Mech Ageing Dev, 1989. **48**(3): p. 207-19.
198. 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.
199. Merry, B.J., *Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(11): p. 1340-54.
200. Sanchez-Roman, I., et al., *The beta-blocker atenolol lowers the longevity-related degree of fatty acid unsaturation, decreases protein oxidative damage, and increases extracellular signal-regulated kinase signaling in the heart of C57BL/6 mice*. Rejuvenation Res, 2010. **13**(6): p. 683-93.
201. Gomez, A., et al., *Lifelong treatment with atenolol decreases membrane fatty acid unsaturation and oxidative stress in heart and skeletal muscle mitochondria and improves immunity and behavior, without changing mice longevity*. Aging Cell, 2014. **13**(3): p. 551-60.
202. Ward, W.F., *Protein degradation in the aging organism*. Prog Mol Subcell Biol, 2002. **29**: p. 35-42.
203. Martinez-Vicente, M., G. Sovak, and A.M. Cuervo, *Protein degradation and aging*. Exp Gerontol, 2005. **40**(8-9): p. 622-33.
204. Cuervo, A.M., et al., *Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells*. Autophagy, 2005. **1**(3): p. 131-40.
205. Stroikin, Y., et al., *Testing the "garbage" accumulation theory of ageing: mitotic activity protects cells from death induced by inhibition of autophagy*. Biogerontology, 2005. **6**(1): p. 39-47.
206. Navratil, M., A. Terman, and E.A. Arriaga, *Giant mitochondria do not fuse and exchange their contents with normal mitochondria*. Exp Cell Res, 2008. **314**(1): p. 164-72.

8. Bibliografia

207. Vittorini, S., et al., *The age-related accumulation of protein carbonyl in rat liver correlates with the age-related decline in liver proteolytic activities*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 1999. **54**(8): p. B318-23.
208. Brunk, U.T. and A. Terman, *Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(5): p. 611-9.
209. Donati, A., et al., *Age-related changes in the regulation of autophagic proteolysis in rat isolated hepatocytes*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2001. **56**(7): p. B288-93.
210. Donati, A., et al., *Effect of aging and anti-aging caloric restriction on the endocrine regulation of rat liver autophagy*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2008. **63**(6): p. 550-5.
211. Melendez, A., et al., *Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in C. elegans*. Science, 2003. **301**(5638): p. 1387-91.
212. Maticic, M., et al., *A microarray-based genetic screen for yeast chronological aging factors*. PLoS Genet, 2010. **6**(4): p. e1000921.
213. Toth, M.L., et al., *Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in Caenorhabditis elegans*. Autophagy, 2008. **4**(3): p. 330-8.
214. Lee, J.H., et al., *Sestrin as a feedback inhibitor of TOR that prevents age-related pathologies*. Science, 2010. **327**(5970): p. 1223-8.
215. Simonsen, A., et al., *Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult Drosophila*. Autophagy, 2008. **4**(2): p. 176-84.
216. Liang, C.C., et al., *Neural-specific deletion of FIP200 leads to cerebellar degeneration caused by increased neuronal death and axon degeneration*. J Biol Chem, 2010. **285**(5): p. 3499-509.
217. Komatsu, M., et al., *The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(3): p. 213-23.
218. Masiero, E., et al., *Autophagy is required to maintain muscle mass*. Cell Metab, 2009. **10**(6): p. 507-15.
219. Yang, L., et al., *Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance*. Cell Metab, 2010. **11**(6): p. 467-78.
220. Cavallini, G., et al., *The protection of rat liver autophagic proteolysis from the age-related decline co-varies with the duration of anti-ageing food restriction*. Exp Gerontol, 2001. **36**(3): p. 497-506.
221. Cuervo, A.M., *Autophagy and aging: keeping that old broom working*. Trends Genet, 2008. **24**(12): p. 604-12.
222. Canto, C., et al., *Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle*. Cell Metab, 2010. **11**(3): p. 213-9.
223. Bjedov, I., et al., *Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly Drosophila melanogaster*. Cell Metab, 2010. **11**(1): p. 35-46.
224. Harrison, D.E., et al., *Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice*. Nature, 2009. **460**(7253): p. 392-5.

8. Bibliografia

225. Selman, C., et al., *Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span*. Science, 2009. **326**(5949): p. 140-4.
226. Syntichaki, P., K. Troulinaki, and N. Tavernarakis, *eIF4E function in somatic cells modulates ageing in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 922-6.
227. Jin, S., *Autophagy, mitochondrial quality control, and oncogenesis*. Autophagy, 2006. **2**(2): p. 80-4.
228. Lemasters, J.J., *Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging*. Rejuvenation Res, 2005. **8**(1): p. 3-5.
229. Vijg, J. and J. Campisi, *Puzzles, promises and a cure for ageing*. Nature, 2008. **454**(7208): p. 1065-71.
230. Wu, J.J., et al., *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress mediate the physiological impairment induced by the disruption of autophagy*. Aging (Albany NY), 2009. **1**(4): p. 425-37.
231. Gautier, C.A., T. Kitada, and J. Shen, *Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(32): p. 11364-9.
232. Cui, J., et al., *Mitochondrial autophagy involving renal injury and aging is modulated by caloric intake in aged rat kidneys*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e69720.
233. Marino, G., et al., *Premature aging in mice activates a systemic metabolic response involving autophagy induction*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(14): p. 2196-211.
234. Martinez-Vicente, M. and A.M. Cuervo, *Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike*. Lancet Neurol, 2007. **6**(4): p. 352-61.
235. Barnett, A. and G.J. Brewer, *Autophagy in aging and Alzheimer's disease: pathologic or protective?* J Alzheimers Dis, 2011. **25**(3): p. 385-94.
236. Mizushima, N., et al., *Autophagy fights disease through cellular self-digestion*. Nature, 2008. **451**(7182): p. 1069-1075.
237. Mathew, R., V. Karantza-Wadsworth, and E. White, *Role of autophagy in cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(12): p. 961-7.
238. Cuervo, A.M. and F. Macian, *Autophagy and the immune function in aging*. Current opinion in immunology, 2014. **0**: p. 97-104.
239. Cuervo, A.M., *Autophagy: in sickness and in health*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(2): p. 70-7.
240. Masiero, E. and M. Sandri, *Autophagy inhibition induces atrophy and myopathy in adult skeletal muscles*. Autophagy, 2010. **6**(2): p. 307-9.
241. Demontis, F., et al., *Mechanisms of skeletal muscle aging: insights from Drosophila and mammalian models*. Dis Model Mech, 2013. **6**(6): p. 1339-52.
242. Sakuma, K. and A. Yamaguchi, *Sarcopenia and cachexia: the adaptations of negative regulators of skeletal muscle mass*. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle, 2012. **3**(2): p. 77-94.

8. Bibliografia

243. Fan, J., et al., *Autophagy as a Potential Target for Sarcopenia*. J Cell Physiol, 2016. **231**(7): p. 1450-9.
244. Scherbakov, N., et al., *Stroke induced Sarcopenia: muscle wasting and disability after stroke*. Int J Cardiol, 2013. **170**(2): p. 89-94.
245. Carnio, S., et al., *Autophagy impairment in muscle induces neuromuscular junction degeneration and precocious aging*. Cell Rep, 2014. **8**(5): p. 1509-21.
246. McMullen, C.A., et al., *Age-related changes of cell death pathways in rat extraocular muscle*. Experimental gerontology, 2009. **44**(6-7): p. 420-425.
247. Mavalli, M.D., et al., *Distinct growth hormone receptor signaling modes regulate skeletal muscle development and insulin sensitivity in mice*. J Clin Invest, 2010. **120**(11): p. 4007-20.
248. Sanchez, A.M., et al., *AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1*. J Cell Biochem, 2012. **113**(2): p. 695-710.
249. Sanchez, A.M., et al., *Autophagy is essential to support skeletal muscle plasticity in response to endurance exercise*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2014. **307**(8): p. R956-69.
250. Mammucari, C., et al., *FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo*. Cell Metab, 2007. **6**(6): p. 458-71.
251. Hoppins, S., *The regulation of mitochondrial dynamics*. Curr Opin Cell Biol, 2014. **29**: p. 46-52.
252. Wai, T. and T. Langer, *Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation*. Trends Endocrinol Metab, 2016. **27**(2): p. 105-117.
253. Anand, R., et al., *The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission*. The Journal of Cell Biology, 2014. **204**(6): p. 919-929.
254. Chen, L., et al., *OPA1 mutation and late-onset cardiomyopathy: mitochondrial dysfunction and mtDNA instability*. J Am Heart Assoc, 2012. **1**(5): p. e003012.
255. Burte, F., et al., *Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders*. Nat Rev Neurol, 2015. **11**(1): p. 11-24.
256. Waterham, H.R., et al., *A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission*. N Engl J Med, 2007. **356**(17): p. 1736-41.
257. Wang, L., et al., *Disruption of mitochondrial fission in the liver protects mice from diet-induced obesity and metabolic deterioration*. Diabetologia, 2015. **58**(10): p. 2371-80.
258. Strober, W., *Trypan blue exclusion test of cell viability*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Appendix 3**: p. Appendix 3B.
259. Riss, T.L., et al., *Cell Viability Assays*, in *Assay Guidance Manual*, G.S. Sittampalam, et al., Editors. 2004, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda (MD).
260. Perez-Sanchez, C., et al., *Ubiquinol Effects on Antiphospholipid Syndrome Prothrombotic Profile: A Randomized, Placebo-Controlled Trial*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017. **37**(10): p. 1923-1932.

8. Bibliografia

261. Gonzalez-Aragon, D., et al., *Coenzyme Q and the regulation of intracellular steady-state levels of superoxide in HL-60 cells*. *Biofactors*, 2005. **25**(1-4): p. 31-41.
262. Katz, S.J. and A.S. Russell, *Re-evaluation of antimalarials in treating rheumatic diseases: re-appreciation and insights into new mechanisms of action*. *Curr Opin Rheumatol*, 2011. **23**(3): p. 278-81.
263. Solomon, V.R. and H. Lee, *Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies*. *Eur J Pharmacol*, 2009. **625**(1-3): p. 220-33.
264. Klionsky, D.J., et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes*. *Autophagy*, 2008. **4**(2): p. 151-75.
265. Morgan, M.J., et al., *Regulation of autophagy and chloroquine sensitivity by oncogenic RAS in vitro is context-dependent*. *Autophagy*, 2014. **10**(10): p. 1814-1826.
266. 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**: p. 77-88.
267. 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.
268. 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.
269. Stoscheck, C.M., *Quantitation of protein*. *Methods Enzymol*, 1990. **182**: p. 50-68.
270. 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.
271. Eigentler A, D.A., Wiethüchter A, Kuznetsov AV, Lassnig B, Gnaiger E., *Laboratory protocol: citrate synthase, a mitochondrial marker enzyme*. *Mitochondrial Physiology Network*, 2012. **17**(04): p. 1-11.
272. Janssen, A.J., et al., *Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts*. *Clin Chem*, 2007. **53**(4): p. 729-34.
273. Birch-Machin, M., et al., *4 - Study of Skeletal Muscle Mitochondrial Dysfunction A2 - Lash, Lawrence H*, in *Mitochondrial Dysfunction*, D.P. Jones, Editor 1993, Academic Press. p. 51-69.
274. Birch-Machin, M.A., et al., *An evaluation of the measurement of the activities of complexes I-IV in the respiratory chain of human skeletal muscle mitochondria*. *Biochem Med Metab Biol*, 1994. **51**(1): p. 35-42.
275. Fisher, N., et al., *Modeling the Qo site of crop pathogens in Saccharomyces cerevisiae cytochrome b*. *Eur J Biochem*, 2004. **271**(11): p. 2264-71.

8. Bibliografia

276. Birch-Machin, M.A. and D.M. Turnbull, *Assaying mitochondrial respiratory complex activity in mitochondria isolated from human cells and tissues*. *Methods Cell Biol*, 2001. **65**: p. 97-117.
277. Storrie, B. and E.A. Madden, *Isolation of subcellular organelles*. *Methods Enzymol*, 1990. **182**: p. 203-25.
278. Trounce, I.A., et al., *Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmitochondrial cell lines*. *Methods Enzymol*, 1996. **264**: p. 484-509.
279. Kwong, L.K. and R.S. Sohal, *Age-related changes in activities of mitochondrial electron transport complexes in various tissues of the mouse*. *Arch Biochem Biophys*, 2000. **373**(1): p. 16-22.
280. King, T.E., [40] *Preparations of succinate—cytochrome c reductase and the cytochrome b-c1 particle, and reconstitution of succinate-cytochrome c reductase*, in *Methods in Enzymology* 1967, Academic Press. p. 216-225.
281. Ramirez-Zacarias, J.L., F. Castro-Munozledo, and W. Kuri-Harcuch, *Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O*. *Histochemistry*, 1992. **97**(6): p. 493-7.
282. Jiang, Z.Y., A.C. Woollard, and S.P. Wolff, *Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method*. *Lipids*, 1991. **26**(10): p. 853-6.
283. Shacter, E., et al., *Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay*. *Free Radic Biol Med*, 1994. **17**(5): p. 429-37.
284. Stankowski, J.N., et al., *Analysis of Protein Targets by Oxidative Stress Using the OxyBlot and Biotin–Avidin-Capture Methodology*, in *Cell Culture Techniques* 2011. p. 365-381.
285. Zhao, H., et al., *Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide*. *Free Radic Biol Med*, 2003. **34**(11): p. 1359-68.
286. Oyama, Y., et al., *Characterization of 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide*. *Brain Res*, 1994. **635**(1-2): p. 113-7.
287. Cossarizza, A., et al., *A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1)*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. **197**(1): p. 40-5.
288. Sarmiento-Cabral, A., et al., *Metformin Reduces Prostate Tumor Growth, in a Diet-Dependent Manner, by Modulating Multiple Signaling Pathways*. *Mol Cancer Res*, 2017. **15**(7): p. 862-874.
289. Sahani, M.H., E. Itakura, and N. Mizushima, *Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids*. *Autophagy*, 2014. **10**(3): p. 431-41.

8. Bibliografía

290. 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.
291. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
292. Sato, T., *A modified method for lead staining of thin sections*. J Electron Microsc (Tokyo), 1968. **17**(2): p. 158-9.
293. Martinet, W., J.P. Timmermans, and G.R. De Meyer, *Methods to assess autophagy in situ--transmission electron microscopy versus immunohistochemistry*. Methods Enzymol, 2014. **543**: p. 89-114.
294. Weibel, E.R., *Stereological methods*. Vol.1. Practical Methods for Biological Morphometry. Academic Press, 1979. 1: p. 26-46.
295. Sohal, R.S. and M.J. Forster, *Coenzyme Q, oxidative stress and aging*. Mitochondrion, 2007. **7**(Suppl): p. S103-S111.
296. Santos-Ocana, C., et al., *Uptake of exogenous coenzyme Q and transport to mitochondria is required for bcl complex stability in yeast coq mutants*. J Biol Chem, 2002. **277**(13): p. 10973-81.
297. Divakaruni, A.S., et al., *Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data*. Methods Enzymol, 2014. **547**: p. 309-54.
298. Cimen, H., et al., *Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria*. Biochemistry, 2010. **49**(2): p. 304-11.
299. Weir, H.J., J.D. Lane, and N. Balthasar, *SIRT3: A Central Regulator of Mitochondrial Adaptation in Health and Disease*. Genes Cancer, 2013. **4**(3-4): p. 118-24.
300. Rodriguez-Hernandez, A., et al., *Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy*. Autophagy, 2009. **5**(1): p. 19-32.
301. Mizushima, N., T. Yoshimori, and B. Levine, *Methods in mammalian autophagy research*. Cell, 2010. **140**(3): p. 313-26.
302. Perez-Perez, M.E., et al., *The yeast autophagy protease Atg4 is regulated by thioredoxin*. Autophagy, 2014. **10**(11): p. 1953-64.
303. de Brito, O.M. and L. Scorrano, *Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria*. Nature, 2008. **456**(7222): p. 605-10.
304. Boutant, M., et al., *Mfn2 is critical for brown adipose tissue thermogenic function*. 2017. **36**(11): p. 1543-1558.
305. 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.
306. Sakuma, K., et al., *p62/SQSTM1 but not LC3 is accumulated in sarcopenic muscle of mice*. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle, 2016. **7**(2): p. 204-212.
307. Mizushima, N. and T. Yoshimori, *How to interpret LC3 immunoblotting*. Autophagy, 2007. **3**(6): p. 542-5.

8. Bibliografia

308. Wang, Y. and S. Hekimi, *Molecular genetics of ubiquinone biosynthesis in animals*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2013. **48**(1): p. 69-88.
309. Dallner, G. and P.J. Sindelar, *Regulation of ubiquinone metabolism*. Free Radic Biol Med, 2000. **29**(3-4): p. 285-94.
310. Genova, M.L. and G. Lenaz, *The Interplay Between Respiratory Supercomplexes and ROS in Aging*. Antioxid Redox Signal, 2015. **23**(3): p. 208-38.
311. Chen, Y.C., et al., *Identification of a protein mediating respiratory supercomplex stability*. Cell Metab, 2012. **15**(3): p. 348-60.
312. Hu, M.-L., et al., *Para-aminobenzoic acid scavenges reactive oxygen species and protects DNA against UV and free radical damage*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 1995. **6**(9): p. 504-508.
313. Brenmoehl, J. and A. Hoeflich, *Dual control of mitochondrial biogenesis by sirtuin 1 and sirtuin 3*. Mitochondrion, 2013. **13**(6): p. 755-61.
314. Lin, J., et al., *Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice*. Cell, 2004. **119**(1): p. 121-35.
315. 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.
316. Mourier, A., et al., *Mitofusin 2 is required to maintain mitochondrial coenzyme Q levels*. J Cell Biol, 2015. **208**(4): p. 429-42.
317. Gomes, L.C. and L. Scorrano, *High levels of Fis1, a pro-fission mitochondrial protein, trigger autophagy*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1777**(7-8): p. 860-6.
318. Chen, H. and D.C. Chan, *Mitochondrial dynamics—fusion, fission, movement, and mitophagy—in neurodegenerative diseases*. Human Molecular Genetics, 2009. **18**(R2): p. R169-R176.
319. Gonzalez-Mariscal, I., et al., *Balanced CoQ6 biosynthesis is required for lifespan and mitophagy in yeast*. Microb Cell, 2017. **4**(2): p. 38-51.
320. Scherz-Shouval, R., et al., *Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4*. Embo j, 2007. **26**(7): p. 1749-60.
321. Woo, J., E. Park, and S.P. Dinesh-Kumar, *Differential processing of Arabidopsis ubiquitin-like Atg8 autophagy proteins by Atg4 cysteine proteases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(2): p. 863-8.
322. Nakatogawa, H., et al., *Atg4 recycles inappropriately lipidated Atg8 to promote autophagosome biogenesis*. Autophagy, 2012. **8**(2): p. 177-86.
323. Maruyama, T. and N.N. Noda, *Autophagy-regulating protease Atg4: structure, function, regulation and inhibition*. J Antibiot (Tokyo), 2017.
324. Fujimoto, Y., et al., *Long-chain fatty acids induce lipid droplet formation in a cultured human hepatocyte in a manner dependent of Acyl-CoA synthetase*. Biol Pharm Bull, 2006. **29**(11): p. 2174-80.
325. Lai, Y.S., et al., *Ginger Essential Oil Ameliorates Hepatic Injury and Lipid Accumulation in High Fat Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. J Agric Food Chem, 2016. **64**(10): p. 2062-71.

8. Bibliografia

326. Listenberger, L.L., et al., *Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(6): p. 3077-82.
327. de Vries, J.E., et al., *Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes*. J Lipid Res, 1997. **38**(7): p. 1384-94.
328. Maedler, K., et al., *Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function*. Diabetes, 2001. **50**(1): p. 69-76.
329. Hardy, S., Y. Langelier, and M. Prentki, *Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects*. Cancer Res, 2000. **60**(22): p. 6353-8.
330. Calder, P.C., et al., *Lipid emulsions in parenteral nutrition of intensive care patients: current thinking and future directions*. Intensive Care Med, 2010. **36**(5): p. 735-49.
331. Belzung, F., T. Raclot, and R. Groscolas, *Fish oil n-3 fatty acids selectively limit the hypertrophy of abdominal fat depots in growing rats fed high-fat diets*. Am J Physiol, 1993. **264**(6 Pt 2): p. R1111-8.
332. Parrish, C.C., D.A. Pathy, and A. Angel, *Dietary fish oils limit adipose tissue hypertrophy in rats*. Metabolism, 1990. **39**(3): p. 217-9.
333. Lee, M.-S., I.-S. Kwun, and Y. Kim, *Eicosapentaenoic acid increases lipolysis through up-regulation of the lipolytic gene expression and down-regulation of the adipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes*. Genes & Nutrition, 2008. **2**(4): p. 327-330.
334. McFie, P.J., et al., *Endoplasmic reticulum-mitochondrial interaction mediated by mitofusin-1 or mitofusin-2 is not required for lipid droplet formation or adipocyte differentiation*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **478**(1): p. 392-397.
335. Stone, S.J., et al., *The endoplasmic reticulum enzyme DGAT2 is found in mitochondria-associated membranes and has a mitochondrial targeting signal that promotes its association with mitochondria*. J Biol Chem, 2009. **284**(8): p. 5352-61.
336. Vance, J.E., *MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(4): p. 595-609.
337. Filadi, R., D. Pendin, and P. Pizzo, *Mitofusin 2: from functions to disease*. Cell Death Dis, 2018. **9**(3): p. 330.
338. de Brito, O.M. and L. Scorrano, *An intimate liaison: spatial organization of the endoplasmic reticulum-mitochondria relationship*. The EMBO Journal, 2010. **29**(16): p. 2715-2723.
339. Turner, N., et al., *Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents*. Diabetes, 2007. **56**(8): p. 2085-92.

8. Bibliografia

340. Lim, S.C., et al., *Loss of the Mitochondrial Fatty Acid beta-Oxidation Protein Medium-Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Disrupts Oxidative Phosphorylation Protein Complex Stability and Function*. 2018. **8**(1): p. 153.
341. 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.
342. Laiglesia, L.M., et al., *Eicosapentaenoic acid promotes mitochondrial biogenesis and beige-like features in subcutaneous adipocytes from overweight subjects*. *J Nutr Biochem*, 2016. **37**: p. 76-82.
343. Schonfeld, P. and L. Wojtczak, *Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species*. *Free Radic Biol Med*, 2008. **45**(3): p. 231-41.
344. Schonfeld, P. and L. Wojtczak, *Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse electron transport but increase it at the forward transport*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1767**(8): p. 1032-40.
345. Takeuchi, Y., et al., *A possible mechanism of mitochondrial dysfunction during cerebral ischemia: inhibition of mitochondrial respiration activity by arachidonic acid*. *Arch Biochem Biophys*, 1991. **289**(1): p. 33-8.
346. Ricchi, M., et al., *Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009. **24**(5): p. 830-40.
347. Li, S., et al., *Sirtuin 3 acts as a negative regulator of autophagy dictating hepatocyte susceptibility to lipotoxicity*. *Hepatology*, 2017. **66**(3): p. 936-952.
348. Gwon, D.H., et al., *High Endogenous Accumulation of omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Protect against Ischemia-Reperfusion Renal Injury through AMPK-Mediated Autophagy in Fat-1 Mice*. 2017. **18**(10).
349. Jiao, J. and F. Demontis, *Skeletal muscle autophagy and its role in sarcopenia and organismal aging*. *Curr Opin Pharmacol*, 2017. **34**: p. 1-6.
350. Demontis, F. and N. Perrimon, *FOXO/4E-BP signaling in Drosophila muscles regulates organism-wide proteostasis during aging*. *Cell*, 2010. **143**(5): p. 813-25.
351. Tsai, S., et al., *Muscle-specific 4E-BP1 signaling activation improves metabolic parameters during aging and obesity*. *J Clin Invest*, 2015. **125**(8): p. 2952-64.
352. White, Z., et al., *High mTORC1 signaling is maintained, while protein degradation pathways are perturbed in old murine skeletal muscles in the fasted state*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016. **78**: p. 10-21.
353. Bujak, A.L., et al., *AMPK activation of muscle autophagy prevents fasting-induced hypoglycemia and myopathy during aging*. *Cell Metab*, 2015. **21**(6): p. 883-90.
354. Sebastian, D., et al., *Mfn2 deficiency links age-related sarcopenia and impaired autophagy to activation of an adaptive mitophagy pathway*. 2016. **35**(15): p. 1677-93.

8. Bibliografia

355. Mercken, E.M., et al., *Conserved and species-specific molecular denominators in mammalian skeletal muscle aging*. NPJ Aging and Mechanisms of Disease, 2017. **3**: p. 8.
356. 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, 2018. **(Epub ahead of print)**.
357. 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.
358. Klionsky, D.J., et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)*. Autophagy, 2016. **12**(1): p. 1-222.
359. Lourenco dos Santos, S., et al., *Oxidative proteome alterations during skeletal muscle ageing*. Redox Biol, 2015. **5**: p. 267-74.
360. Lass, A., et al., *CALORIC RESTRICTION PREVENTS AGE-ASSOCIATED ACCRUAL OF OXIDATIVE DAMAGE TO MOUSE SKELETAL MUSCLE MITOCHONDRIA*. Free radical biology & medicine, 1998. **25**(9): p. 1089-1097.
361. Leduc-Gaudet, J.P., et al., *Mitochondrial morphology is altered in atrophied skeletal muscle of aged mice*. Oncotarget, 2015. **6**(20): p. 17923-37.
362. Glancy, B., et al., *Mitochondrial reticulum for cellular energy distribution in muscle*. Nature, 2015. **523**(7562): p. 617-20.
363. Barja, G., *Updating the Mitochondrial Free Radical Theory of Aging: An Integrated View, Key Aspects, and Confounding Concepts*. Antioxidants & Redox Signaling, 2013. **19**(12): p. 1420-1445.
364. Desai, V.G., et al., *Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice*. Arch Biochem Biophys, 1996. **333**(1): p. 145-51.
365. Hepple, R.T., et al., *Caloric restriction protects mitochondrial function with aging in skeletal and cardiac muscles*. Rejuvenation Res, 2006. **9**(2): p. 219-22.
366. Asami, D.K., et al., *Effect of aging, caloric restriction, and uncoupling protein 3 (UCP3) on mitochondrial proton leak in mice*. Exp Gerontol, 2008. **43**(12): p. 1069-76.
367. 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.
368. Chen, Y., et al., *The Influence of dietary lipid composition on skeletal muscle mitochondria from mice following eight months of calorie restriction*. Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca, 2014. **63**(1): p. 57-71.
369. Bergamini, E., et al., *A new method for the investigation of endocrine-regulated autophagy and protein degradation in rat liver*. Exp Mol Pathol, 1993. **59**(1): p. 13-26.

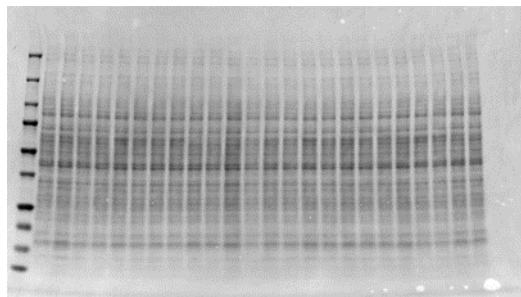
8. Bibliografia

370. Donati, A., et al., *Age-related changes in the autophagic proteolysis of rat isolated liver cells: effects of antiaging dietary restrictions*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2001. **56**(9): p. B375-83.
371. Wohlgemuth, S.E., et al., *Autophagy in the heart and liver during normal aging and calorie restriction*. Rejuvenation Res, 2007. **10**(3): p. 281-92.
372. Del Roso, A., et al., *Ageing-related changes in the in vivo function of rat liver macroautophagy and proteolysis*. Exp Gerontol, 2003. **38**(5): p. 519-27.
373. Zhang, C. and A.M. Cuervo, *Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function*. Nat Med, 2008. **14**(9): p. 959-65.
374. Gomi, F. and M. Matsuo, *Effects of aging and food restriction on the antioxidant enzyme activity of rat livers*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 1998. **53**(3): p. B161-7.
375. Tian, L., Q. Cai, and H. Wei, *Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging*. Free Radic Biol Med, 1998. **24**(9): p. 1477-84.
376. Stocco, D.M., J. Cascarano, and M.A. Wilson, *Quantitation of mitochondrial DNA, RNA, and protein in starved and starved-refed rat liver*. J Cell Physiol, 1977. **90**(2): p. 295-306.
377. 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**(9): p. 1023-34.
378. Bratic, A. and N.-G. Larsson, *The role of mitochondria in aging*. The Journal of Clinical Investigation, 2013. **123**(3): p. 951-957.
379. Gomez, J., et al., *Effect of 8.5% and 25% caloric restriction on mitochondrial free radical production and oxidative stress in rat liver*. Biogerontology, 2007. **8**(5): p. 555-66.
380. Selman, C., *Dietary restriction and the pursuit of effective mimetics*. Proc Nutr Soc, 2014. **73**(2): p. 260-70.
381. Hagopian, K., et al., *Long-term calorie restriction reduces proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(4): p. E674-84.

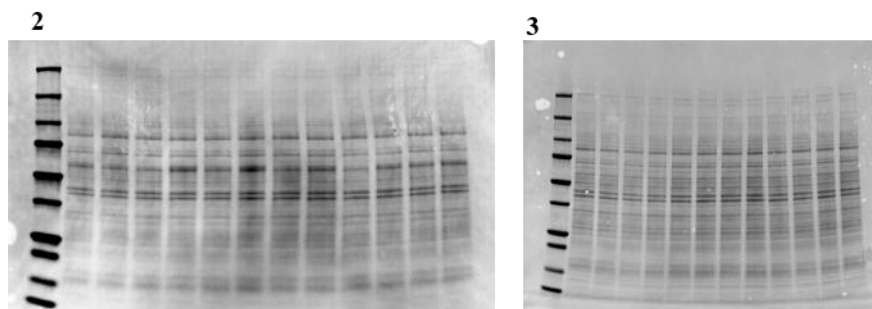
Anexo I

Controles de carga para western blot

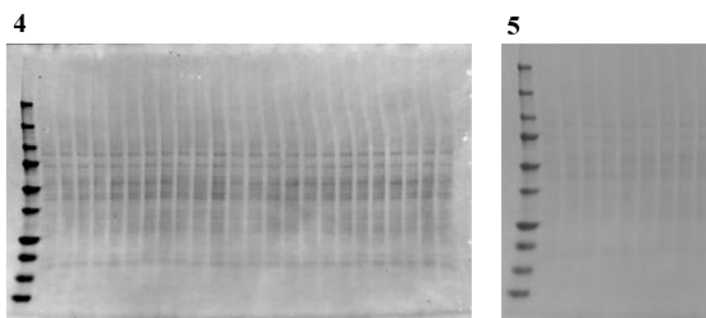
Las siguientes imágenes se corresponden con los controles de carga (membranas teñidas con la tinción de rojo Ponceau S) para los western blot realizados en muestras de extractos totales de células Tkpts recogidos en el capítulo 4.1 de resultados.



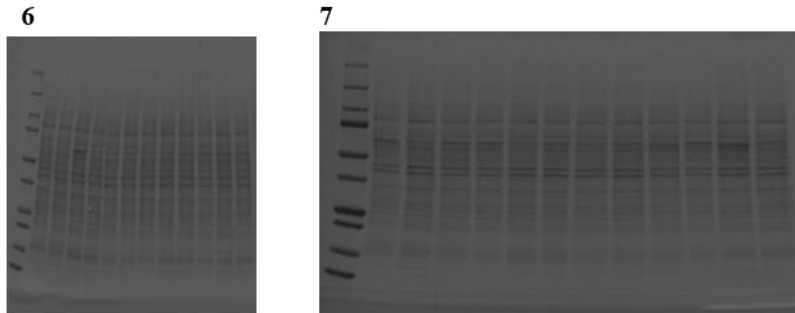
Control de carga correspondientes a las figuras Tk-2 (1) que representan los niveles de subunidades marcadoras de los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en muestras de extractos totales de células Tkpts.



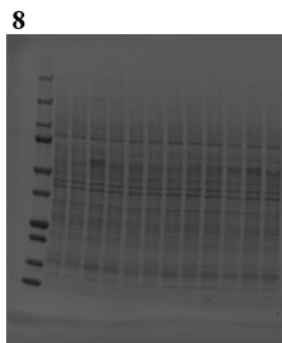
Controles de carga correspondientes a las figuras Tk-3 (2) y Tk-4 (3) que representan los niveles de subunidades marcadoras de los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en muestras de extractos totales de células Tkpts.



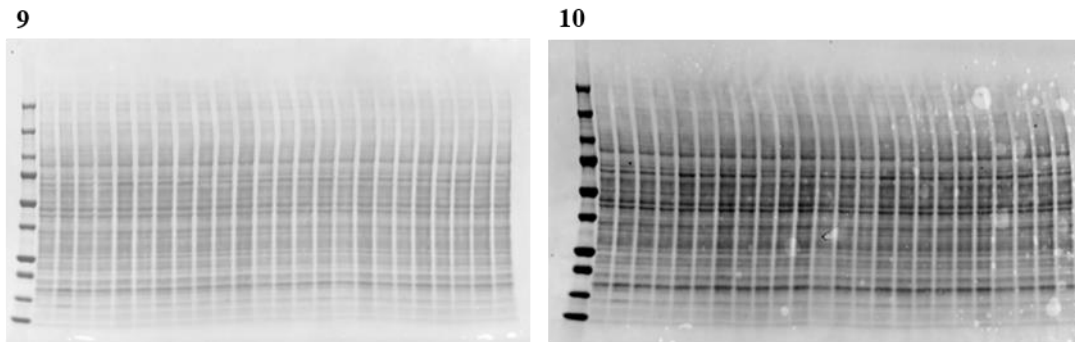
Control de carga correspondiente a la figura Tk-9 (4) que representa el grado de carbonilación de proteínas en extractos totales de células Tkpts. Control de carga correspondiente a la figura Tk-10 (5) que representa el grado de carbonilación de proteínas en extractos mitocondriales de células Tkpts.



Control de carga correspondiente a la figura Tk-11 (6) que representa el patrón de acetilación en extractos totales de células Tkpts. Control de carga correspondiente a la figura Tk-14A (7) que representa los niveles de VDAC en extractos totales de células Tkpts.

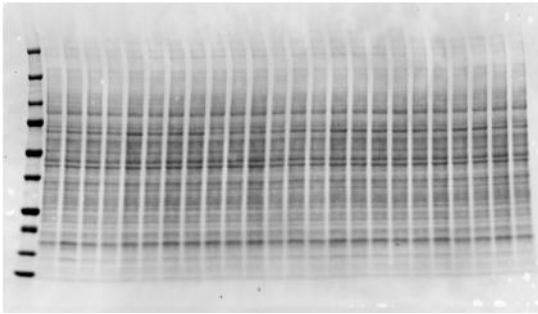


Control de carga correspondiente a la figura Tk-14B (8) que representa los niveles de la subunidad marcadora del complejo V en extractos totales de células Tkpts.



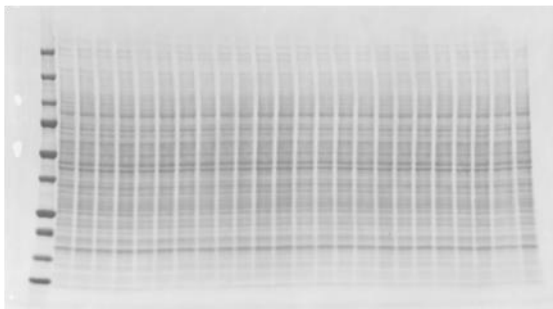
Control de carga correspondiente a la figura Tk-16 (9) que representa los niveles Drp1 en extractos totales de células Tkpts. Control de carga correspondiente a las figuras Tk-17 (10) y Tk-19 (10) que representan los niveles Fis1 y Mfn2 respectivamente en extractos totales de células Tkpts.

11

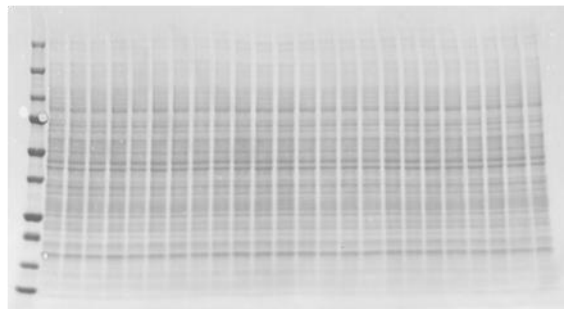


Control de carga correspondiente a las figuras Tk-18 (11) y Tk-20 (11) que representan los niveles Mfn1 y OPA1 respectivamente en extractos totales de células Tkpts.

12

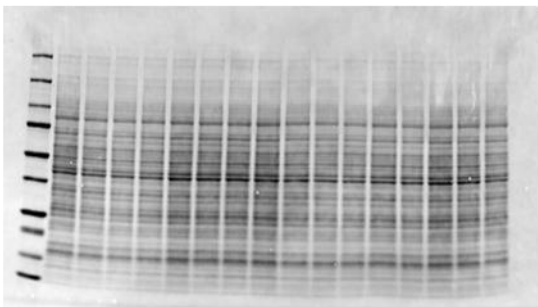


13

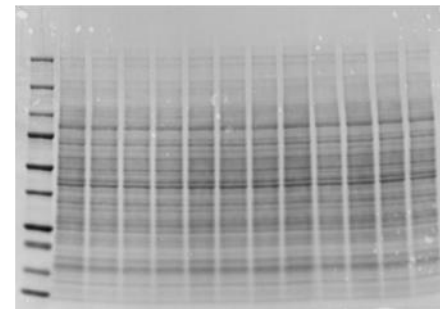


Control de carga correspondiente a las figuras Tk-21A (12) y Tk-22 (12) que representan los niveles de mTOR y Beclina respectivamente. Control de carga correspondiente a las figuras Tk-21B (13) y Tk-24A (13) que representa los niveles de fosfo mTOR y p62 en extractos totales de células Tkpts.

14

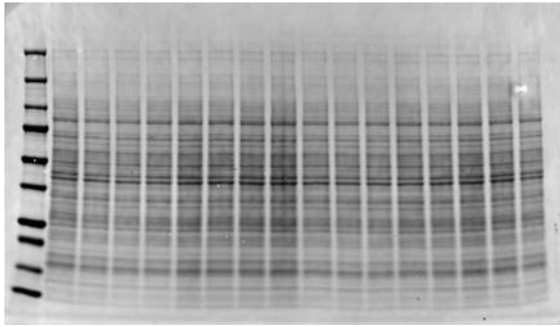


15



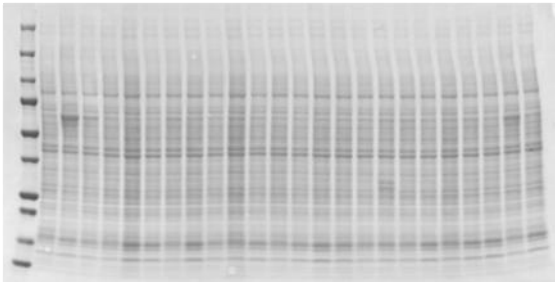
Control de carga correspondiente a las figuras Tk-21D y E (14) que representan los niveles de mTOR y fosfo mTOR en extractos totales de células Tkpts. Control de carga correspondiente a la figura Tk-23 (15) que representa los niveles Beclina 1 en extractos totales de células Tkpts.

16

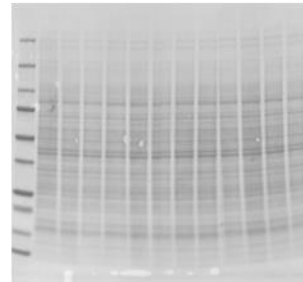


Control de carga correspondiente a las figuras Tk-24B y C (16) que representan los niveles p62 y sus formas ubiquitiniladas en extractos totales de células Tkpts.

17

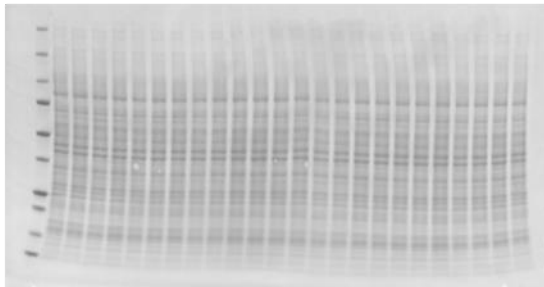


18

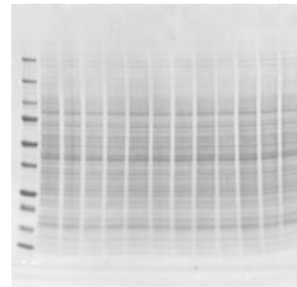


Control de carga correspondiente a la figura Tk-25 (17) que representa los niveles de LC3 en extractos totales de células Tkpts. Control de carga correspondiente a las figura Tk-26 (18) que representa los niveles de LC3 en extractos totales de células Tkpts.

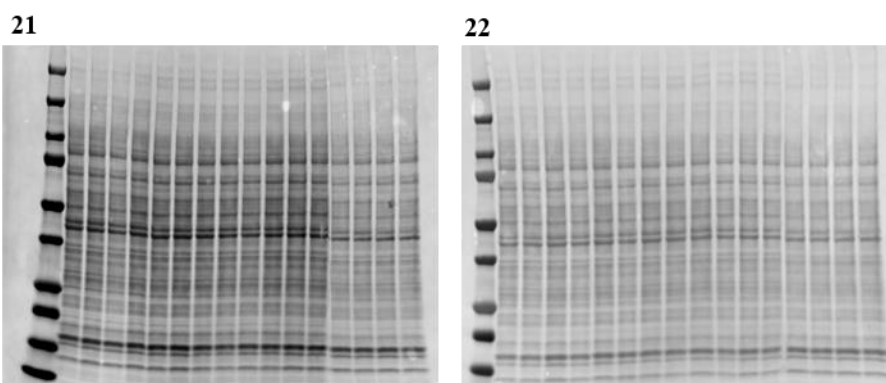
19



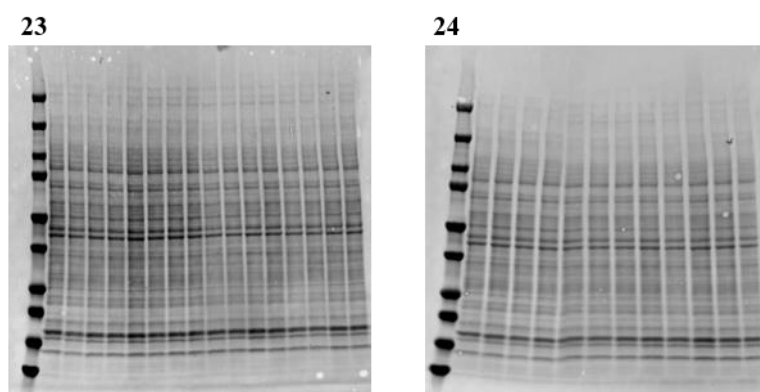
20



Control de carga correspondiente a la figura Tk-29 (19) y Tk-30 (20) que representa los niveles de Trx 1 en extractos totales de células Tkpts.

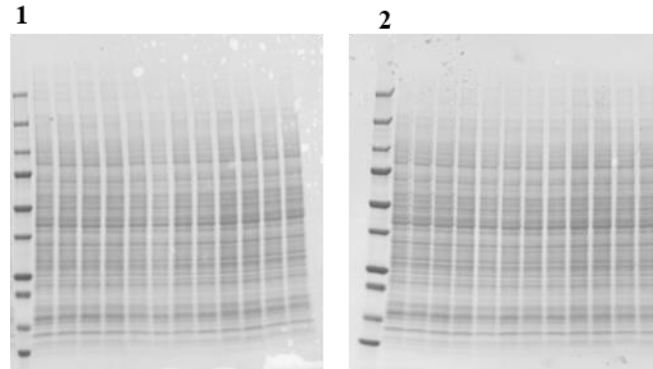


Control de carga correspondiente a la figura Tk-33 (21) que representa los niveles de LC3 y Tk-34 (22) que representa los niveles de Trx 1 en extractos totales de células Tkpts.



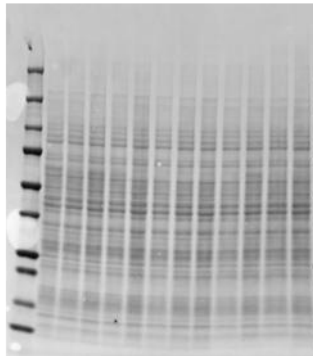
Control de carga correspondiente a la figura Tk-35 (23) que representa los niveles de LC3 y Tk-36 (24) que representa los niveles de Trx 1 en extractos totales de células Tkpts.

Las siguientes imágenes se corresponden con los controles de carga (membranas teñidas con la tinción de rojo Ponceau S) para los western blot realizados en muestras de extractos totales de células Hepa 1.6 recogidos en el capítulo 4.2 de resultados.

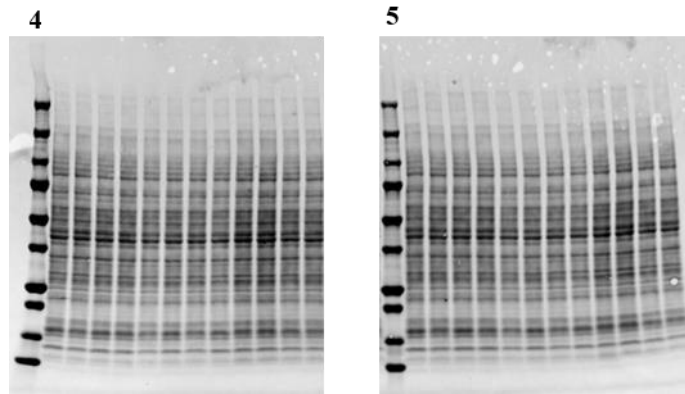


Control de carga correspondiente a las figuras He-3 (1) y He-7B (1) que representan los niveles de Mfn2 y Parkin respectivamente. Control de carga correspondiente a la figura He-7A (2) y He-13B (2) que representa los niveles de PINK1 y fosfo mTOR respectivamente en extractos totales de células Hepa 1.6.

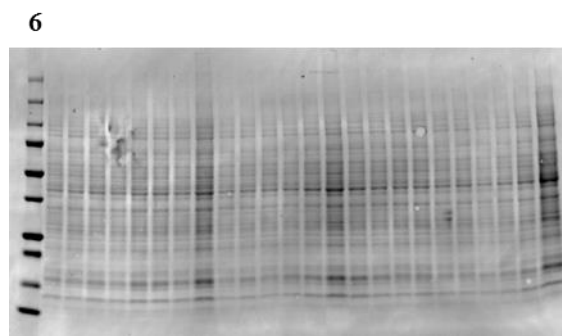
3



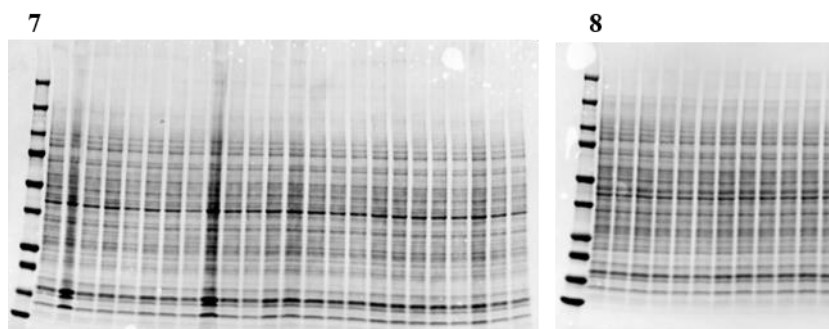
Control de carga correspondiente a las figura He-8A-E (3) que representan los niveles de subunidades marcadoras de los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en extractos de células Hepa 1.6



Control de carga correspondiente a las figura He-13A (4) y He-14 (4) que representan los niveles de mTOR y Beclina 1. Control de carga correspondiente a la figura y He-15A y B (5) que representa los niveles de p62 y sus formas ubiquitinaladas.

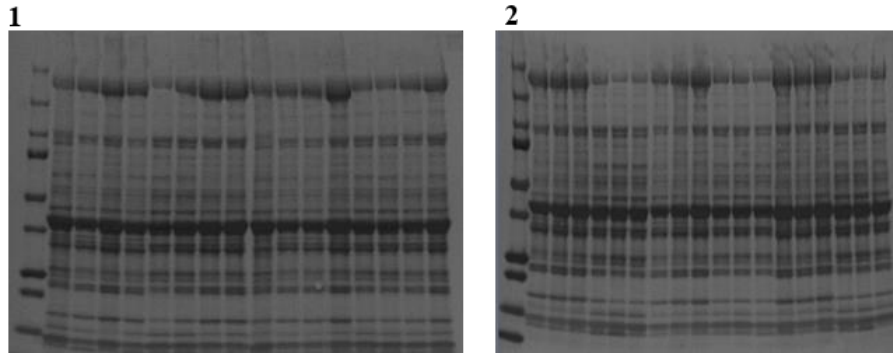


Control de carga correspondiente a la figura He-16 que representa los niveles de LC3 en extractos totales de células Hepa 1.6.

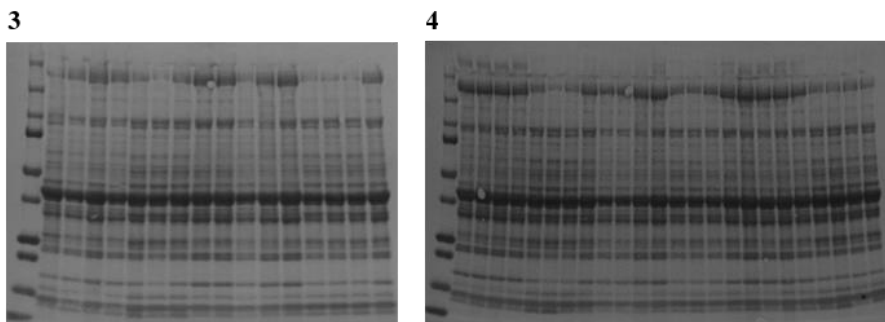


Control de carga correspondiente a las figuras He-19 (7) y He-20 (7) que representan los niveles de p62 y LC3 respectivamente. Control de carga correspondiente a las figuras He-22 (8) y He-23 (8) que representan los niveles de p62 y LC3 respectivamente en extractos totales de células Hepa 1.6.

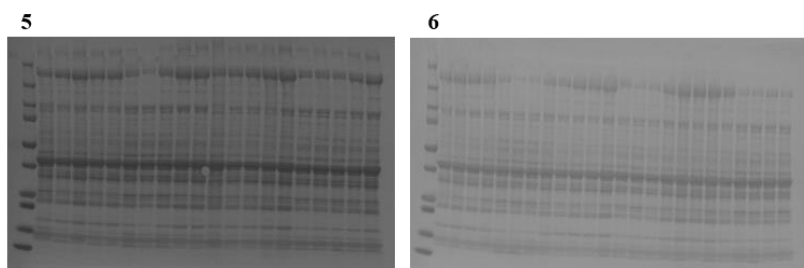
Las siguientes imágenes se corresponden con los controles de carga (membranas teñidas con la tinción de rojo Ponceau S) para los western blot realizados en muestras de homogenado total de músculo esquelético recogidos en el capítulo 4.3 de resultados.



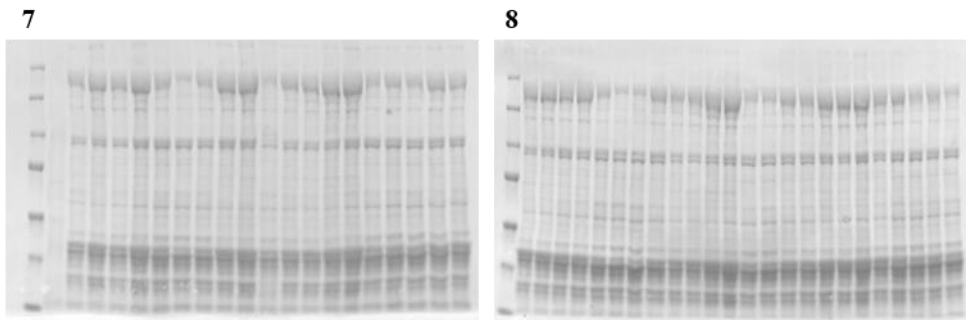
Controles de carga correspondientes a las figuras Mu-7A (1) y B (2), que representan los niveles de Beclina 1 en muestras de homogenado total de músculo esquelético.



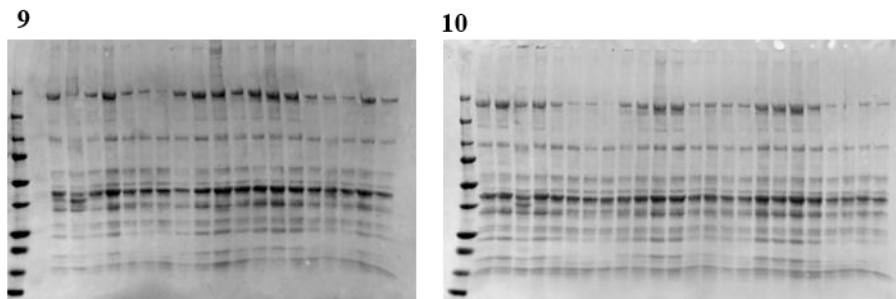
Controles de carga correspondientes a las figuras Mu-8A (3) y B (4) y Mu-9A (3) y B (4), que representan los niveles de p62 y LC3 en muestras de homogenado total de músculo esquelético.



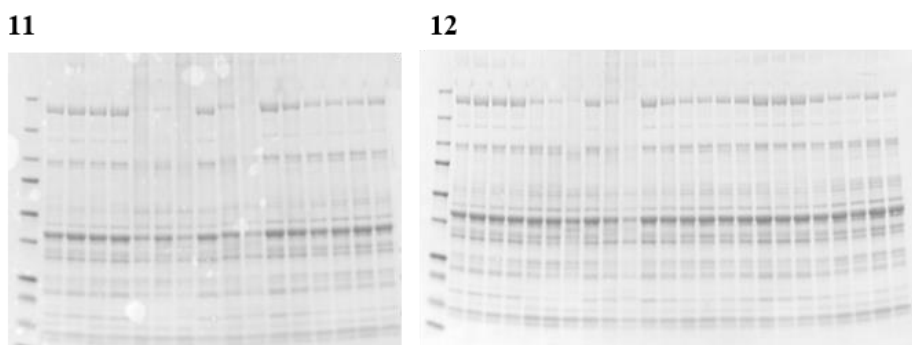
Controles de carga correspondientes a las figuras Mu-11A (5) y B (6), que representan los niveles de PINK1 en muestras de homogenado total de músculo esquelético.



Controles de carga correspondientes a las figuras Mu-12A (7) y B (8), que representan los niveles de Parkin en muestras de homogenado total de músculo esquelético.

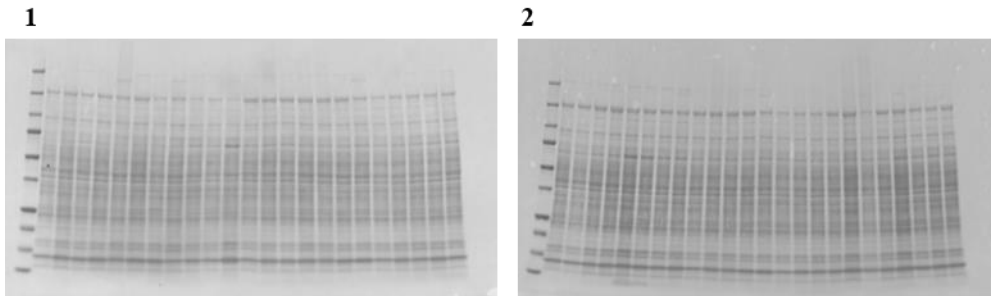


Controles de carga correspondientes a las figuras Mu-13A (9) y B (10) que representan el grado de carbonilación de proteínas en muestras de homogenado total de músculo esquelético.

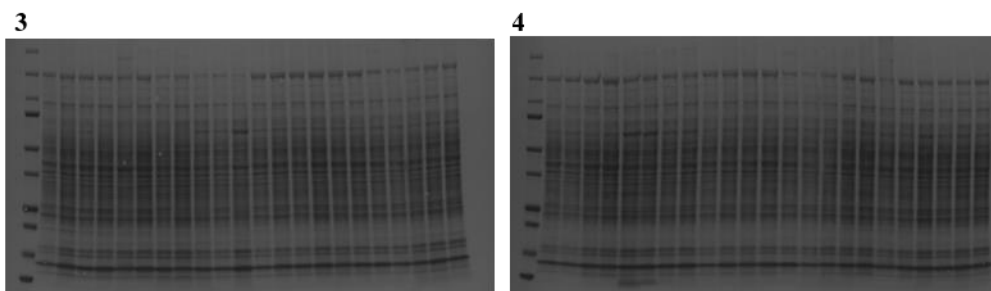


Controles de carga correspondientes a las figuras Mu-14A-E (11) y Mu-15A-E (12) que representan los niveles de subunidades marcadoras de los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en muestras de homogenado total de músculo esquelético.

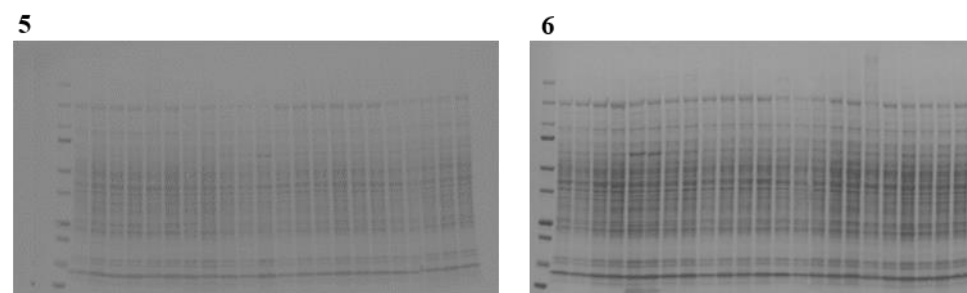
Las siguientes imágenes se corresponden con los controles de carga (membranas teñidas con la tinción de rojo Ponceau S) para los western blot realizados en muestras de homogenado total de hígado recogidos en el capítulo 4.4 de resultados.



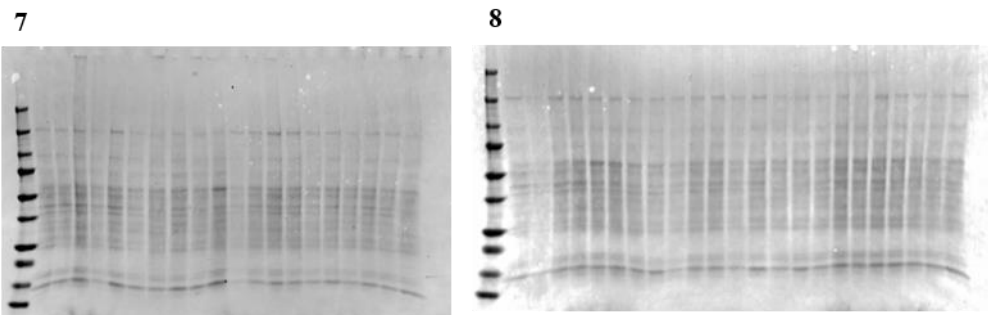
Controles de carga correspondientes a las figuras Hi-5A (1) y B (2), que representan los niveles de Beclina 1 en muestras de homogenado total de hígado.



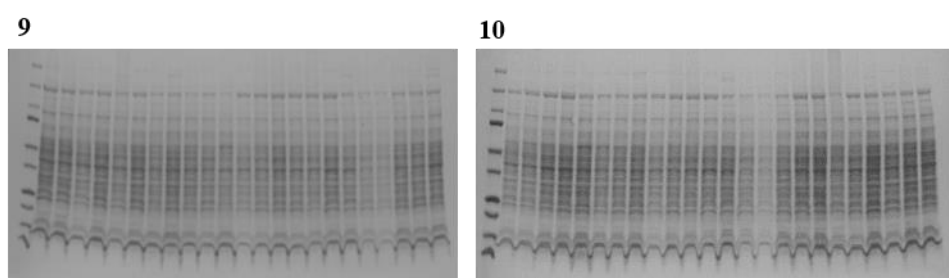
Controles de carga correspondientes a las figuras Hi-6A (3) y B (4), que representan los niveles de p62 en muestras de homogenado total de hígado.



Controles de carga correspondientes a las figuras Hi-7A (5) y B (6), y Hi-9A (5) y B (6) que representan los niveles de LC3 y PINK1 respectivamente en muestras de homogenado total de hígado.



Controles de carga correspondientes a las figuras Hi-10A (7) y B (8) que representan el grado de carbonilación de proteínas en muestras de homogenado total de hígado.



Controles de carga correspondientes a las figuras Hi-11A-E (9) y Hi-12A-E (10) que representan los niveles de subunidades marcadoras de los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en muestras de homogenado total de hígado.

Anexo II

Artículo publicado

Original Article

The Impact of Aging, Calorie Restriction, and Dietary Fat on Mitochondrial Ultrastructure, Dynamics, and Autophagy Markers in Mouse Skeletal Muscle

Elena Gutiérrez-Casado,^{1,†} Husam Khraiweh, PhD,^{2,†} José A. López-Domínguez, PhD,^{1,3} Jesús Montero-Guisado,^{1,4} Guillermo López-Lluch, PhD,⁵ Plácido Navas, PhD,⁵ Rafael de Cabo, PhD,⁶ Jon J. Ramsey, PhD,⁷ José A. González-Reyes, PhD,^{1,*} and José M. Villalba, PhD^{1,*}

¹Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario, ceiA3, Spain. ²Department of Nutrition and Food Processing, Faculty of Agricultural Technology, Al-Balqa Applied University, Al-Salt, Jordan. ³Present address: Buck Institute for Research on Aging, Novato, California. ⁴Present address: Departamento de Biología Molecular, Instituto de Biomoléculas (INBIO), Universidad de Cádiz, Spain. ⁵Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide-CSIC, CIBERER, Instituto de Salud Carlos III, Sevilla, Spain. ⁶Laboratory of Experimental Gerontology, National Institute of Aging, National Institutes of Health, Baltimore, Maryland. ⁷VM Molecular Biosciences, University of California, Davis.

*These authors shared last authorship.

†These authors contributed equally to this work.

Address correspondence to: José A. González-Reyes, PhD, Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 3ª planta, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario, ceiA3, 14014 Córdoba, Spain. E-mail: bc1gorej@uco.es

Received: March 9, 2018; Editorial Decision Date: July 6, 2018

Decision Editor: Rozalyn Anderson, PhD

Abstract

Loss of skeletal muscle mass and function is a hallmark of aging. This phenomenon has been related to a dysregulation of mitochondrial function and proteostasis. Calorie restriction (CR) has been demonstrated to delay aging and preserve function until late in life, particularly in muscle. Recently, we reported the type of dietary fat plays an important role in determining life-span extension with 40% CR in male mice. In these conditions, lard fed mice showed an increased longevity compared to mice fed soybean or fish oils. In this article, we analyze the effect of 40% CR on muscle mitochondrial mass, autophagy, and mitochondrial dynamics markers in mice fed these diets. In CR fed animals, lard preserved muscle fibers structure, mitochondrial ultrastructure, and fission/fusion dynamics and autophagy, not only compared to control animals, but also compared with CR mice fed soybean and fish oils as dietary fat. We focus our discussion on dietary fatty acid saturation degree as an essential predictor of life-span extension in CR mice.

Keywords: Caloric restriction, Dietary fat, Mitochondria, Mice, Muscles

Aging affects all organs and tissues by inducing a functional decline. In skeletal muscle, sarcopenia (a loss of mass and functionality) is a well-recognized hallmark of aging (1). In humans, a decline in muscle mass of 3%–10% per decade after the age of 25 has been described (2). Decreased mitochondrial content and function has been considered to play an essential role in sarcopenia, however the exact

mechanism by which aging affects mitochondria and vice-versa in skeletal muscle, is still a matter of debate.

Calorie restriction (CR; ie, a reduction in calorie intake without malnutrition) is considered the most robust nutritional intervention to delay aging and its deleterious consequences (3). Thus, a reduction in calorie intake of 20%–40% of ad libitum fed animals not only

prevents several diseases related to aging in a wide range of animals and humans, but also increases life span and/or health span in several species (4,5). CR has been shown to exert a protective effect against sarcopenia in both rodents (6) and nonhuman primates (7). Despite these results, the mechanisms by which CR operates are not completely clear.

Most mammalian muscles are basically composed of two different types of fibers: slow- and fast-twitch (8). Slow-twitch (red or type I) muscle fibers contract more slowly and rely on aerobic metabolism. They contain large amounts of mitochondria and myoglobin. Fast-twitch (white or type II) contract more rapidly due to the presence of a faster myosin. In general, type II fibers contain fewer mitochondria and myoglobin than type I and rely on glycolysis to generate energy. Aging can differentially affect both types of fibers. For example, Proctor et al. (9) reported a decrease in size and oxidative capacity of white fibers without changes in the red ones. More recently, Nilwik et al. (10) observed that the decline in muscle mass during aging was due to the reduction in white fibers size, and Sayed et al. (11) have shown differential changes in several structural and ultrastructural parameters in both type of fibers from gastrocnemius muscle in aged mice.

Mitochondrial morphology and location also varies in the different fiber types. In white fibers, mitochondria are found mainly between the myofibrils. These are referred to as intermyofibrillar mitochondria (IMM). In addition, red fibers contain a high number of mitochondria located in the subsarcolemmal space (ie, the portion of sarcoplasm located between the plasmalemma and the more external myofibrils) and are called subsarcolemmal mitochondria (SSM). Both populations show differences concerning their physiology and ultrastructure and respond differentially to aging (11,12).

Sarcopenia has been associated with a decline in mitochondrial content and/or function resulting from unbalanced processes of fission and fusion and autophagy in aged animals. These processes are mediated by different proteins whose precise mechanisms of action are now beginning to be understood. Mitochondrial constriction and division (fission) is largely mediated by Drp1, while Mfn1, and Mfn2 conjoin the outer membranes and OPA1 facilitates the fusion of the inner membrane and cristae formation (13). Autophagy depends on many proteins. Among them, Beclin1 is involved in the control of autophagosome formation, while p62 and LC3 are necessary for cargo selection and autophagosome maturation (14). The specific form of selective mitochondrial autophagy (mitophagy) is mediated to a great extent by Pink1 and Parkin proteins (15). Most of these processes are decreased or modified in skeletal muscle with aging (12,14–17). However, the possible effects of CR and dietary fat on these mechanisms have not been extensively studied.

We have shown that dietary fat influences the fatty acid composition of the mitochondrial membranes from skeletal muscle in C57BL/6 mice following one month of 40% CR, which resulted in changes in several mitochondrial features (18). Using the same experimental design with longer periods of CR, lard as dietary fat exerted an optimal effect on several parameters related to mitochondrial physiology and apoptotic signaling in skeletal muscle (19). More recently, it has been demonstrated that the composition of dietary fat modulates longevity of mice fed CR diets (20). Thus, animals fed a 40% CR diet with lard (high in saturated and monounsaturated fatty acids) as the primary dietary fat exhibited extended life span compared with CR animals consuming diets containing either soybean oil (high in n-6 polyunsaturated fatty acids, PUFA) or fish oil (high in n-3 PUFAs) as the primary lipid sources (20).

The aim of this work is to ascertain whether aging influences structural and ultrastructural parameters of red fibers from mouse *gastrocnemius* with special attention to mitochondria and autophagy. We also analyzed the impact of aging, CR and dietary fat on the expression pattern of several proteins related to mitochondrial physiology (mitochondrial complexes), fission and fusion markers (Drp1, Mfn1, Mfn2, and OPA1), and auto- and mitophagy-related proteins (Beclin1, p62, LC3, Pink1, and Parkin) in hind limb skeletal muscle to determine their possible effect on sarcopenia and therefore in life and health span in rodents.

Material and Methods

Animals and Diets

We used the same cohort of male 10-week-old C57BL/6 mice (Charles River Laboratories, Spain) as in our previous publications (19–22). Animals were separated in four dietary groups: one control and three CR dietary groups that differed in lipid sources: lard, soybean oil (also for control group), and fish oil. At the end of the corresponding intervention period, the animals were euthanized by cervical dislocation after an 18-hour fast to ensure that all animals were studied in a similar metabolic state (fasted). Muscle from the hind limb was dissected, washed, and trimmed of connective tissue and fat, frozen by immersion in liquid nitrogen in a buffered medium containing 10% DMSO as cryoprotectant, and then stored at –80°C for later analysis. Handling of animals and all experimental procedures were in accordance with the Pablo de Olavide University ethical committee rules, and the 86/609/EEC directive on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. In this work, we have used the characters C, L, S, and F to identify Control-Soybean oil, CR-Lard, CR-Soybean oil, and CR-Fish oil-fed animals, respectively, followed by 6 or 18 to denote the duration of dietary intervention (in months). Detailed procedures regarding animal experimentation and diets are described in [Supplementary Methods](#).

Isolation of Total Homogenate Fraction from Skeletal Muscle

Hind limb skeletal muscles from four to seven animals per group were homogenized at 4°C in ice-cold buffer containing 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 40 mM KCl, 0.2 M sucrose, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM EDTA, and 20 µg/µL each chymostatin, leupeptin, antipain, and pepstatin A in a Teflon glass tissue homogenizer. A second homogenization step was carried out using an electric tissue disrupter (Ultra-Turrax T25, IKA, Staufen, Germany) for 30 seconds. The resultant lysate, total homogenate, was used for determinations of protein levels.

Structural and Ultrastructural Analysis of Skeletal Muscle Fibers, Mitochondria, and Autophagic Figures

Samples from deep zones of the gastrocnemius (red gastrocnemius) from four to seven animals per diet and CR period were fixed and processed for electron microscopy. Semithick (0.5–1 µm width) and thin (40–60 nm width) sections were obtained and photographed in a light (Leica) and electron microscope (Jeol Jem 1400), respectively, at the Servicio Centralizado de Ayuda a la Investigación (SCAI; Univ. Córdoba, Spain). From this material we measured white and red fiber cross-sectional areas (CSA) and different parameters

2.5

2.10

2.15

2.20

2.25

2.30

2.35

2.40

2.45

2.50

2.52

2.55

2.60

2.65

2.70

2.75

AQ5

2.80

2.85

2.90

AQ6

2.95

2.100

2.104

- including mitochondrial content, SSM spreading below sarcolemma and morphometric characteristics of mitochondria and autophagic figures in cross-sectioned red fibers using Image J software (NIH; USA). Detailed descriptions of these methods are included in the [Supplementary Methods](#) section and [Supplementary Table 1](#). 3.5
- Measurement of Mitochondrial Mass and Dynamics, Autophagy, and Mitophagy Markers**
- Detailed procedures are described in the [Supplementary Methods](#). As mitochondrial mass and function markers, we used monoclonal sera raised against different subunits of mitochondrial complexes. For detection of autophagy and mitophagy markers, we used monoclonal and polyclonal sera raised against p62, LC3-III, Beclin1, Pink1, and Parkin at optimized concentrations (see [Supplementary Table 2](#)). Mitochondrial fusion and fission proteins were immunodetected using Mfn1, Mfn2, OPA1, and Drp1 primary antibodies at the indicated concentrations (see [Supplementary Table 2](#)). The corresponding secondary IgG antibodies coupled to horseradish peroxidase were used to reveal binding sites by enhanced chemiluminescence (Clarity TM ECL, Bio-Rad). Images obtained were analyzed using the Image Lab TM Software (Bio-Rad) and normalized to Ponceau's staining as previously validated by our group (23). To obtain an accurate estimation of changes produced by CR per se and by alterations of dietary fat in CR animals, the effects of these two dietary manipulations were assessed in separate electrophoresis gels and blots carried out under optimized conditions for each case. Thus, these results were also represented in separate plots for CR effects (C vs S) and for dietary fat effects in CR animals (L, S, and F). 3.10 3.15 3.20 3.25 3.30
- Statistical Analysis**
- All values are expressed as mean \pm SEM. Variables were tested for normality by using D'Agostino–Pearson test. Differences between control and CR groups within a given age were assessed by two-tailed Student's *t* test. In case data did not pass the normality test, the nonparametric two-tailed Mann–Whitney test was used. The effects of dietary fat in calorie restricted animals of a given age (6 or 18 months of intervention) were assessed by one-way analysis of variance followed by post hoc analysis of significant differences with Tukey's test for multiple comparisons. Post hoc analysis of linear trend was also performed to investigate putative alterations of tested parameters among CR diets ordered as L \rightarrow S \rightarrow F, representative of a progressive decrease of n-6/n-3 ratio in high unsaturated fatty acids (18). In case data did not pass the normality test, the nonparametric Kruskal–Wallis test was performed followed by post hoc Dunn's multiple comparison test. For all dietary groups, possible differences as a function of age were also assessed by either parametric two-tailed Student's *t* test or nonparametric two-tailed Mann–Whitney test as required. Means were considered statistically different when $p < .05$. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). 3.35 3.40 3.45 3.50
- Results**
- Skeletal Muscle Fiber Size**
- To assess the effect of aging and CR on morphological features of gastrocnemius muscle, we determined possible changes in fiber size after dietary interventions. In cross-sections, red and white fibers appear as polygonal structures and can be distinguished after staining of semi thick sections with toluidine blue or *p*-phenylene-diamine. Using either of these techniques, presence of SSM in red fibers is revealed by large blue or dark-brown spots detected in peripheral regions of the cells confirmed by electron microscopy (see below). More discrete dots were also found scattered in internal zones of the fibers and reveal the presence of IMM (see [Supplementary Figure 1](#)). For the present work, we have considered red fibers as those showing large numbers of colored spots below the plasmalemma, and white fibers as those lacking these stain deposits. 3.55
- The analysis of both fiber types indicated a smaller size of red fibers compared to white regardless of the dietary intervention or animal age. In red fibers, aging did not alter CSA in controls, but a significant decrease was found in CR (S group) mice ([Figure 1A](#)). In white fibers, aging resulted in a significant reduction of CSA in both controls (C) and CR groups ([Figure 1B](#)). 3.60
- Dietary fat differentially affected CSA of both fiber types in CR mice. In F groups (ie, CR mice with fish oil as dietary fat) a similar pattern of decreased CSA with aging was found in both fibers ([Figure 1A and B](#)), whereas this parameter remained unaltered in red fibers in L groups (CR mice with lard as fat source). Although CSA of white fibers decreased with aging in all dietary groups, the reduction in L was not as pronounced as in the other CR groups. As a result, old mice of L group exhibited significantly higher CSA compared to S (CR animals fed soybean oil as dietary fat) and F groups ([Figure 1B](#)). 3.65 3.70
- Estimation of Mitochondrial Mass by Transmission Electron Microscopy**
- In cross-sections, SSM appear as clusters of mitochondria showing circular or elliptical shape, an electron-dense matrix and a high number of cristae. On the other hand, IMM appear smaller than SSM but display a more complex and branched morphology (see [Figure 2A–H](#)). Also, it is worth noting the presence of SSM and IMM with altered structure (swollen appearance with a low number of mitochondrial cristae and very low electron-dense matrix) in all the dietary groups regardless of age ([Figure 2A–H](#)). 3.75 3.80
- In control animals, aging did not induce volume density (Vv) changes in SSM. However, long-term CR (S18 group) resulted in a significant decrease of this parameter. When comparing the different dietary groups, S18 mice showed significantly less SSM Vv compared with L18 ([Figure 1C](#)). Volume density of IMM increased significantly from 6 to 18 months in control mice, and this effect was also found in the S group (see [Figure 1D](#)). When comparing CR groups, Vv also increased with aging in L, but no change was observed in the F group ([Figure 1D](#)). 3.85 3.90
- Aging, CR, Dietary Fat, and Skeletal Muscle Mitochondrial Morphology**
- In control animals, aging decreased SSM area ([Figure 1E](#)). Six months of CR also induced a decreased SSM area in the S group, although a recovery was observed after 18 months. Thus, no differences were found in this parameter after 18 months of intervention when comparing the C versus S groups ([Figure 1E](#)). When analyzing the effects of different dietary fats in CR mice, we found a marked increase for this parameter in L (lard) group in comparison to age-matched S and F animals. Furthermore, a decreasing linear trend for SSM area was found in both 6 and 18 months of CR ordered as L > S > F ([Figure 1E](#)). 3.95 3.100 3.104
- IMM area did not change with aging in control mice but substantially increased in the S group ([Figure 1F](#)). When we compared the effect of dietary fat within a given age, the most remarkable effect was the increase of IMM area in the L group, with a significant decreasing linear trend after 18 months ordered as L18 > S18 > F18 ([Figure 1F](#)).

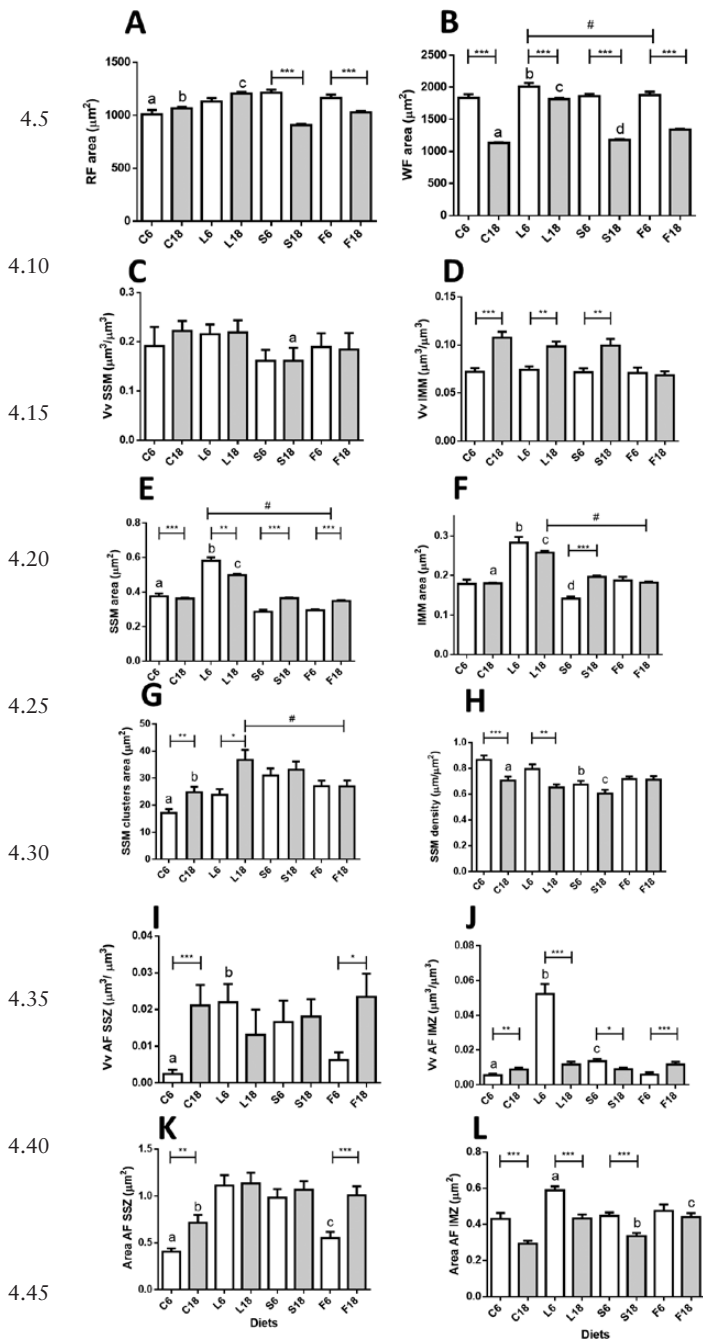


Figure 1. Morphometric characteristics of muscle fibers, mitochondria and autophagic figures from gastrocnemius muscle in control and calorie restriction (CR) mice after 6 and 18 months of intervention with different dietary fats. Panels **A** and **B** show cross-sectional area (CSA) of red and white fibers, respectively. In Panel **B**, # denotes a decreased linear trend area ordered as L6 > S6 > F6. Panels **C** and **D** show Volume density (Vv) of subsarcolemmal (SSM) and intermyofibrillar mitochondria (IMM) per cell volume unit. Panels **E** and **F** show SSM and IMM areas. In Panel **E**, # denotes a significant decreasing linear trend ordered as L > S > F in CR mice after 6 and 18 months of intervention. In Panel **F**, # represents a decreasing linear trend (L > S > F) at 18 months of CR. Panels **G** and **H** show mean area of SSM clusters and SSM cluster size in relation to plasmalemmal length (SSM density), respectively. In panel **G**, # represents a decreasing linear trend in 18-month CR-mice (L > S > F). Panels **I** and **J** show Vv of autophagic figures (AF) in subsarcolemmal (SSZ) and in intermyofibrillar zones (IMZ). Mean area of AF in both zones are depicted in panels **K** and **L**, respectively. In all

We also studied parameters relevant to mitochondrial subpopulations to investigate possible changes in their distribution in red fibers. As depicted in **Figure 1G**, the size of SSM clusters significantly increased during aging in control mice. Although 6 months of CR (S group) also resulted in a significant increase in this parameter, no further increase was induced by aging in S group. When studying the effect of aging in the different CR groups, the most noticeable effect was the age-dependent increase of SSM clusters area in L18 compared to the L6 group (**Figure 1G**). A decreasing linear trend for SSM clusters area was found as L18 > S18 > F18 (**Figure 1G**).

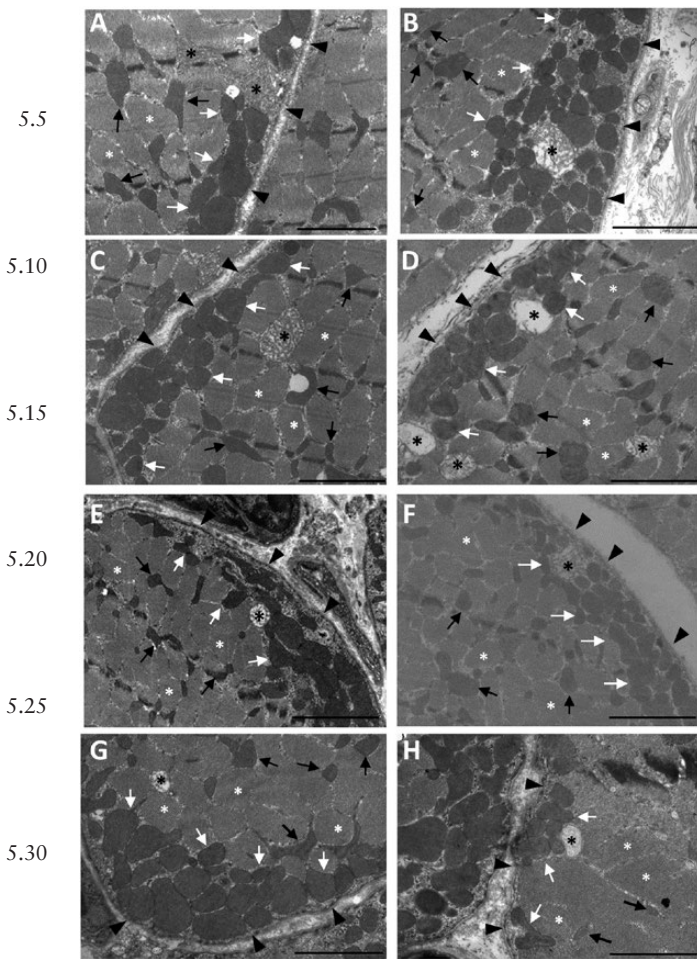
When analyzing the relationship between SSM clusters size and the length of sarcolemma associated with them (SSM density), we found significant decreased values during aging in controls whereas no change was observed in the S group (**Figure 1H**). When comparing the groups fed CR diets, no changes were observed in F mice, but a significant decrease was found in L18 versus L6 mice (**Figure 1H**).

Ultrastructural Analysis of Autophagy in Skeletal Muscle Fibers

Autophagic figures and altered mitochondria were observed in all the experimental groups (see **Supplementary Figure 2**). Volume density (Vv) of these figures in the subsarcolemmal space is shown in **Figure 1I**. This parameter was dramatically increased with aging in control, but not in CR animals (S group). When comparing CR groups, a decreased Vv was found in F6 compared to L6, and a marked increase of Vv with aging was observed in CR-mice with fish oil as fat source (F18 group; see **Figure 1I**). No significant change in Vv was observed with aging in the L group. In the intermyofibrillar spaces, Vv of autophagic figures and altered mitochondria increased with aging in controls (**Figure 1J**) and 6 months of CR (S group) also induced an increase in this parameter, although Vv of autophagic figures was again decreased after 18 months in such a way that no difference was observed between C18 and S18 groups. When comparing the different CR-groups, we observed a drastically increased volume density (Vv) of autophagy figures in L6 followed by a significant drop in L18. In CR animals, the only group that showed age-dependent increase of autophagic figures abundance was F, which exhibited a nearly identical pattern to that observed for controls (**Figure 1J**).

Mean size of autophagic figures varied depending on their position within the cell (**Figure 1K** and **L**). In subsarcolemmal zones from control mice, this parameter increased with age. In 6-month calorie-restricted animals (S6 group), autophagic figure size increased when compared to controls, but no further change was detected with aging. When comparing the different dietary fats in CR-mice, soybean and lard groups (S and L) showed no age-related changes, while changes in CR-fish oil group (F) were like those observed in controls (**Figure 1K**). In the intermyofibrillar zones, we observed a uniform pattern of decreasing size of autophagic figures with age in both C and S groups (**Figure 1L**). In CR groups, autophagic figures decreased with age in L and S groups while no age-related change

graphs, * = $p < .05$; ** = $p < .01$, and *** = $p < .001$. Panel **A**: a = *** vs S6; b = *** vs S18; c = *** vs S18 and F18. Panel **B**: a = * vs S18; b = * vs S6; c = *** vs S18 and F18; d = *** vs F18. Panel **C**: a = * vs C18 and L18. Panel **E**: a = * vs S6; b = * vs S6 and F6; c = * vs S18 and F18. Panel **F**: a = *** vs S18; b = *** vs S6 and ** vs F6; c = *** vs S18 and F18; d = *** vs F6. Panel **G**: a = *** vs S6; b = * vs S18. Panel **H**: a = * vs S18; b = *** vs C6 and * vs L6; c = * vs F18. Panel **I**: a = * vs S6; b = * vs F6. Panel **J**: a = *** vs S6; b = *** vs S6 and F6; c = *** vs F6. Panel **K**: a = *** vs S6; b = *** vs S18; c = ** vs L6 and *** vs S6. Panel **L**: a = *** vs S6 and * vs F6; b = ** vs L18 and * vs C18; c = ** vs S18.



5.35 **Figure 2.** Examples of red fibers from mouse gastrocnemius muscle in cross-section as observed by electron microscopy. Subsarcolemmal mitochondria (SSM, white arrows) are located between the plasmalemma (black arrowheads) and myofibrils (white asterisks), while intermyofibrillar mitochondria (IMM; black arrows) are found in the sarcoplasm between the myofibrils. (A) C6; (B) L6; (C) S6; (D) F6; (E) C18; (F) L18; (G) S18, and (H) F18. Mitochondria with altered morphology are marked with black asterisks. The bars are equal to 2 μ m.

was observed in F mice. Of note, the mean size of autophagic figures was significantly higher than that of mitochondria with unaltered structure, regardless of their position within the cell (compare values depicted in [Figure 1E](#) and [F](#) with those in [Figure 1K](#) and [L](#)).

Mitochondrial Complexes

5.50 In [Figure 3A–J](#), we show the expression levels of mitochondrial complexes. In controls, aging only affected the expression level of complex I, which decreased in old animals ([Figure 3A](#)). However, in S groups, aging resulted in decreased expression of complex III ([Figure 3E](#)). Some changes among CR groups were noted after 6 months of intervention, with a general trend towards an increase of some mitochondrial complexes in animals fed PUFA-containing diets (S and F groups). Accordingly, complex II increased in F6 in comparison with L6 ([Figure 3D](#)), complex III increased in both S6 and F6 compared to L6 ([Figure 3F](#)), and complex IV increased in F6 compared to S6 ([Figure 3H](#)). However, 18 months of intervention abated these changes and no significant differences were found in these CR mice (see [Figure 3B,D,F,H,J](#)).

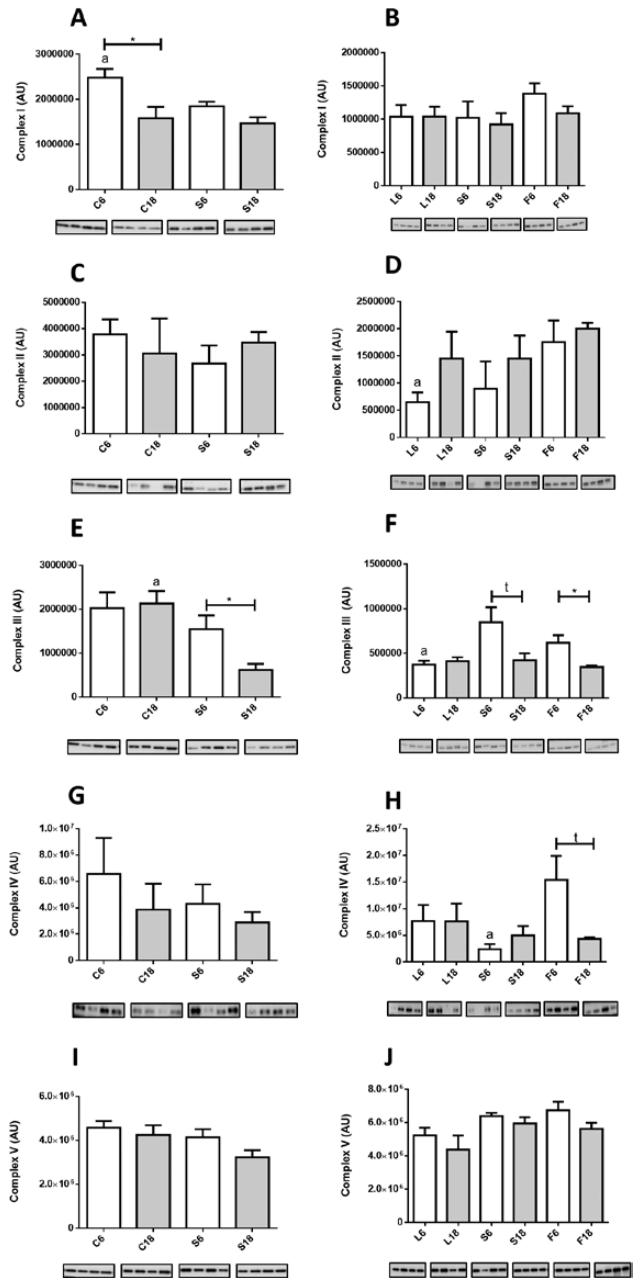


Figure 3. Expression levels of mitochondrial complexes measured by western blots from hind limb homogenates. **A** and **B**, Complex I; **C** and **D**, Complex II; **E** and **F**, Complex III; **G** and **H**, Complex IV; and **I** and **J**, Complex V. Panel **A**: a = * vs S6. Panel **D**: a = * vs F6. Panel **E**: a = *** vs S18. Panel **F**: a = * vs S6 and F6. Panel **H**: a = * vs F6.

Autophagy and Mitophagy Markers

5.104 Aging resulted in increased levels of Beclin1 in control mice ([Figure 4A](#)). The level of this protein was not significantly altered in S6 compared with C6 and no further changes were noted in S18 ([Figure 4A](#)) nor among the three CR groups fed diets with different dietary fat ([Figure 4B](#)), suggesting the existence of sustained levels of Beclin1 with aging in CR mice. For LC3-II/LC3-II+I ratio, a marker of autophagic flux, a general increased trend with age was found in all dietary groups, although statistical significance was only obtained in the case of S and F groups ([Figure 4C](#) and [D](#)). Finally, p62 dramatically increased in controls after 18 months of

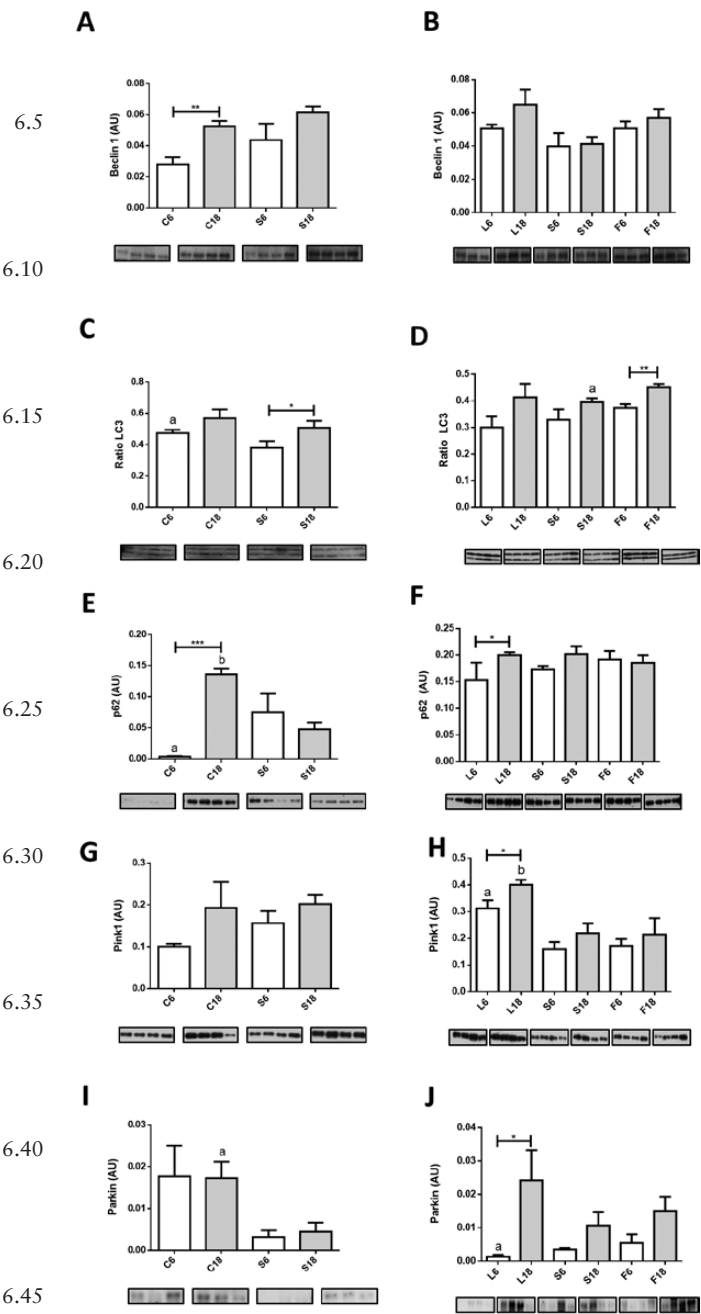


Figure 4. Expression levels of protein related to autophagy in control and calorie restriction (CR)-mice after 6 or 18 months of intervention. **A** and **B**, Beclin1; **C** and **D**, LC3-II/LC3-I+LC3-II ratio; and **E** and **F**, p62. Protein expression levels of mitophagy markers are depicted in panels **G** and **H** (Pink1) and in **I** and **J** (Parkin). Panel **C**: a = * vs S6. Panel **D**: a = * vs F18. Panel **E**: a = * vs S6; b = *** vs S18. Panel **H**: a = ** vs S6 and * vs F6; b = ** vs S18 and * vs F18. Panel **I**: a = * vs S18. Panel **J**: a = * vs S6.

intervention (Figure 4E). However, we also found an increase of p62 levels when comparing S6 with C6, without any further change in S18 (Figure 4E). The levels of p62 were mostly unchanged when comparing the groups fed CR diets containing different dietary fats, either after 6 or 18 months of intervention, with the sole exception being an increase in L18 in comparison with L6 (Figure 4F).

In relation to mitophagy, a trend towards increased Pink1 levels with aging was found in control animals, although differences did

not reach statistical significance (Figure 4G), and the same was found for S group (Figure 4H). However, when the three CR dietary groups were analyzed, it was found that levels of Pink1 increased in L18 compared to L6, whereas no change with age was observed in the F groups. Furthermore, when comparing the different CR groups at each duration of intervention, the highest levels of Pink1 were found in L6 and L18 (Figure 4H). In the case of Parkin, no effect of age was found in the control groups, but levels of this protein were significantly decreased both in S6 and S18 groups in comparison with their age-matched controls (Figure 4I). Interestingly, levels of Parkin were affected by dietary fat in CR mice, with CR-lard (L) group exhibiting significant age-dependent increase of this protein (Figure 4J).

Mitochondrial Dynamics Markers

Aging and dietary interventions affected several markers of mitochondrial fusion/fission. No changes in Mfn1 levels were observed in control and soybean oil CR mice (C and S groups, respectively) and modifying dietary fat in animals fed a CR diet did not alter the levels of this protein (Figure 5A and B). Nevertheless, Mfn2 levels increased significantly in C18 versus C6 and a similar trend was observed when comparing S6 and S18, although in this case differences did not reach statistical significance (Figure 5C). Mfn2 levels were also increased in S6 compared with C6, but no differences were observed between S18 and C18. Furthermore, no differences were found when comparing the different dietary fats in CR mice, either after 6 or 18 months of intervention (Figure 5D). OPA1 levels were not affected by aging in control mice, and CR significantly increased OPA1 levels in young (S6) but not in old (S18) mice (Figure 5E). Although OPA1 levels remained unaltered with aging in S groups, a significant increase after 18 months of CR was observed both in L and F groups (Figure 5F). A linear trend was also found in these groups when ordered as L18 > S18 > F18 (Figure 5F).

In control animals, aging had no effect on the expression levels of the fission-related protein Drp1 although an increase was found in S18 versus C18 groups (Figure 5G). However, no effect of age or dietary fat was found when comparing the CR groups (Figure 5H).

Discussion

Aging, CR, and Fiber Size

In different mammalian models, aging results in reduced CSA in white fibers without significant changes in red ones (24,25), a situation that is retarded by CR (6,25,26). In accordance with these reports, we found decreased CSA during aging in white fibers from control and CR mice regardless the dietary fat. However, in animals fed lard as dietary fat (L groups), the reduction in CSA with age was considerably less compared to the other CR groups. Aging did not result in decreased CSA of red fibers in controls, but markedly decreased CSA in soybean and fish oil fed CR mice (S and F groups), an effect that was not observed in CR-lard fed animals (L groups), which maintained this parameter at similar values after 6 or 18 months of intervention. These results point out lard as a dietary fat that preserves CSA of skeletal muscle with aging in CR mice, which agrees with our previous demonstration that lard also optimized several parameters related to apoptotic signaling in skeletal muscle (19).

Mitochondrial Mass in Red Fibers

Impaired mitochondrial energetics and increased mitochondria-mediated apoptosis have been found in aged skeletal muscle (1,27).

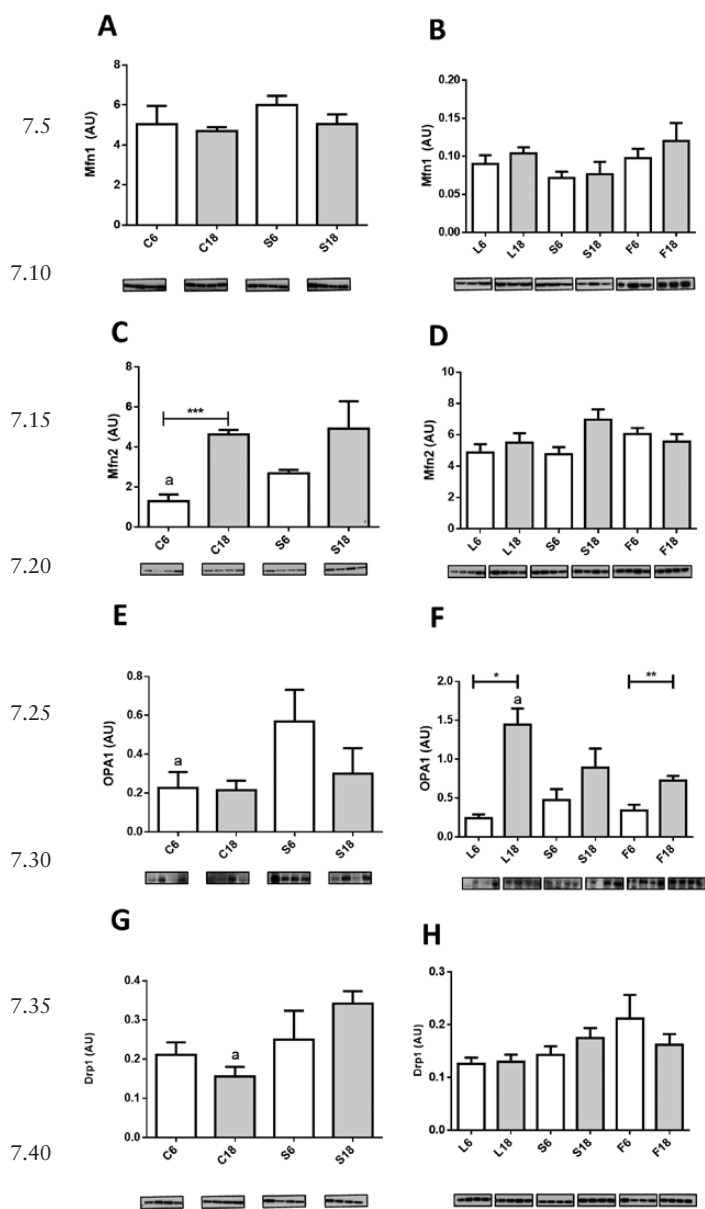


Figure 5. Expression levels of proteins related to mitochondrial fusion Mfn1 (A and B), Mfn2 (C and D), and OPA1 (E and F) and fission Drp1 (G and H) after 6 or 18 months of calorie restriction (CR) with the different fat sources. In Panel F, # denotes a linear trend in 18 month-CR mice ordered as L18 > S18 > F18. Panels C and E: a = * vs S6. Panel F: a = * vs F18. Panel G: a = ** vs S18.

Consequently, changes in mitochondrial content and/or ultrastructure should be expected to occur in this tissue during aging. Regarding mitochondrial mass some reported results have not been uniform. Whereas decreased mitochondrial content during aging has been reported in several species (13,28), other studies have shown that this parameter varies depending on the muscle being examined, as increased mass with aging has been found for some muscles, but decreased mass was also found for others (29,30). These differences between studies have been explained based on heterogeneity in the methods used to assess mitochondrial content (27). It is worth noting that most of the above-mentioned results were obtained by physiological and biochemical techniques using whole muscles, without reference to fiber type or to mitochondrial subpopulation. Nevertheless, in a previous analysis carried out in mice, Finley et al.

(31) found that CR induced decreased mitochondrial number in white fibers without changes in red fibers.

Using electron microscopy, we found an increase in the abundance of IMM from red fibers during aging in control mice, a result that is in contrast with those reported by Leduc-Gaudet et al. (12), who found no changes in mitochondrial content in aged mice, although without discrimination between fiber types. More recently, Sayed et al. (11) found increased IMM content with aging in females from the same strain of mice used in our work. Although these latter data are in accordance with ours, no mention to fiber type was made in that paper. Of note, our results have documented that 6 months of CR induced no changes in SMM or IMM content in the S group, but longer periods of CR affected mitochondrial content in different ways depending on dietary fat. In general, CR mice showed lower mitochondrial content than controls with L18 mice displaying the highest content. As we have shown here, mitochondria with altered structure may be found in subsarcolemmal areas and intermyofibrillar regions in all the experimental groups, but they were not included in our estimation of mitochondrial mass to focus our study towards structurally intact organelles. The significance of these altered structures will be discussed below.

Using mitochondrial complexes as markers of mitochondrial mass, an age-dependent decrease was only demonstrated for Complex I, which is basically in line with previous reports (12,15). When we analyzed the effects of CR (ie, comparing C vs S groups), the only change concerning mitochondrial complexes was a decrease in Complex III after 18 months of intervention. Moreover, although 6 months of CR resulted in several changes in the expression levels of mitochondrial complexes depending on the dietary fat, including the increase of complexes II, III, and IV in mice fed diets enriched in PUFA, a longer CR intervention (18 months) abolished these changes.

Mitochondrial Ultrastructure in Red Fibers

Aging also influences morphometric parameters of individual mitochondria. Leduc-Gaudet et al. (12) found increased size of SSM as well as longer and more branched IMM in gastrocnemius from aged mice. These results contrast with those reported here since we found a slight but statistically significant decrease of sizes in SSM and no changes in IMM in control conditions during aging. However, 6 months of CR induced changes depending on the dietary fat with significantly increased size in both types of mitochondria when lard was used as dietary fat. After 18 months of CR both S18 and especially L18 showed larger mitochondria than F18. These results seem to point out a specific role of dietary fat on development of mitochondrial size and shape in CR conditions.

In skeletal muscle, it has been proposed that paravascular mitochondria (which are equivalent to subsarcolemmal) are involved in the generation of proton-motive force near the capillaries and are directly connected to a specific type of IMM called I-band mitochondria, that use the proton-motive force to produce ATP (32). Here, we show that SSM regions from old control mice are larger than those from their CR counterparts. This may be an age-related adaptive change that produces the advantage of higher contact surface of SSM clusters with IMM, which facilitates the formation of contact between them. In CR mice, only those fed lard as dietary fat showed this possible advantage.

Autophagy, Mitophagy, Aging, and CR

Results showing impaired autophagy during aging in skeletal muscle have been reported (14,15,17). In our ultrastructural study in

red fibers, we found typical autophagosomes and a relatively high number of altered mitochondria depending on the age and dietary intervention. While autophagosomes were mainly located in subsarcolemmal areas, altered mitochondria were found throughout the sarcoplasm. In general, these structures displayed greater size than nonaltered mitochondria and the possibility exists that their increased size make them unsuitable to be removed by the autophagosome leading to their accumulation inside the fibers, a mechanism previously proposed to explain increased mitochondrial size without changes in mitophagy in muscle fibers from different mammals (15). The possibility of an upper size limit for individual autophagosomes has been previously suggested (33).

In rats, Wohlgeuth et al. (17) reported increased Beclin1 expression in older animals without changes in the LC3-II to LC3-I ratio, a marker of autophagic flux, consistent with the results reported here for control animals. However, other studies in mice (34) showed decreased levels of Beclin-1 with no changes in LC3 ratio during aging. Nevertheless, these authors also found significantly increased levels of p62 expression (which is associated with a blockade in autophagic activity), suggesting a decrease in autophagic flux during aging. Except for Beclin1 changes reported by Joseph et al. (34), the results taken together are in accordance with our finding for control animals.

In our samples, 6 or 18 months of CR induced no changes in Beclin1 expression levels as occurred in CR rats (17). Although some changes were detected after 6 months of CR for LC3 ratio compared to control mice, longer periods of intervention reverted this effect. On the other hand, 18 months of CR resulted in decreased levels of p62 when compared to control, suggesting a possible unblocking of the autophagy flux. When comparing the different dietary fats, the main detected change was an age-related increase of LC3 ratio in mice fed a diet containing fish oil. This result may be related to an improvement of the autophagic flux in later age in this dietary group.

Pink1 and Parkin are directly related to selective mitophagy. In our samples, we did not find changes in the levels of these proteins during aging in controls, which agrees with previous observations in aged mice and monkeys (15). Recently, it has been reported that Pink1 is imported to mitochondria and either targeted to inner mitochondrial membranes in "healthy" mitochondria (ie, those showing a polarized membrane potential) to regulate mitochondrial bioenergetics or retained on the outer membrane in depolarized organelles (35). In the latter case, Pink1 can interact with Parkin triggering mitophagy (35). In our samples, 6 months of CR resulted in decreased levels of Parkin with no changes in Pink1, especially in mice fed lard as dietary fat and these animals showed the highest accumulation of altered IMM at this time point. After 18 months of CR, the highest values of Pink1 and Parkin were found in lard group, in which we found increased size of unaltered mitochondrial. These results seem to indicate that the relative amounts of these proteins can determine the function of Pink1 and mitochondrial fate.

Mitochondrial Fusion/Fission Markers

The analysis of mitochondrial fusion regulation in relation to aging has yielded contrasting results with a downregulated pattern found in some cases (16) and no changes or even upregulation in others (34). In a recent study carried out on mice, it has been shown that aging does not alter the expression levels of proteins related to mitochondrial fission or fusion but an increased Mfn2/Drp1 ratio was found (12). The suggestion was made that these results are compatible with a fusion-fission imbalance in favor of enhanced mitochondrial fusion in aged skeletal muscle (12). Although we did

not find changes in Mfn1 and/or OPA1 expression levels in aged control mice, our results agree with this idea since increased Mfn2 levels were found in these animals. Furthermore, in a recent paper, increased levels of both Mfn1 and Mfn2 were reported in mice and monkeys (15).

Six months of CR induced increased levels of Mfn2 and OPA1, but no further changes were found after longer periods of CR, suggesting an early control of mitochondrial fusion in calorie restricted animals. This fact together with the higher expression level of at 18 months of CR is probably a part of the regulatory mechanisms of mitochondrial fission and fusion dynamics in CR-mice and seems to operate in a different way than in control animals.

Concerning dietary fat in CR-fed mice, the most prominent result was the significant increase of OPA1 during aging in lard group (L18). It is known that OPA1 can be found in long and short forms depending on its cleavage once imported to the mitochondria. The long form is inserted in the inner mitochondrial membrane facing Mfn1 and Mfn2 proteins and is involved in outer membrane fusion, while the short form contributes to crista junction formation and interacts with several inner membrane components (36). In the present study, only the long form was clearly detected and quantified and, therefore, our results should be interpreted based on its interaction with Mfn1 and Mfn2 to promote mitochondrial fusion.

Concluding Remarks

We show that in skeletal muscle from CR mice, dietary fat influences mitochondrial mass and ultrastructure and may play a role in processes such as auto- and mitophagy and mitochondrial dynamics during aging, with lard showing some advantages compared to soybean and fish oil. These results are in accordance with previous papers using the same animals as those included here, in which we showed that dietary fat in CR mice differentially improved ultrastructural and physiological parameters in liver and kidney (21,22), with lard showing an optimal effect.

The oldest animals used in this work were 21-month-old reflecting late middle age, and sarcopenia is more apparent in advanced ages (28–30 months). Although we would hypothesize that all mice would show a decrease in muscle mass and strength with very advanced age, a limitation of the present study is that we were not able to determine the impact of dietary fats on muscle changes in elderly mice. However, we have shown that 40% CR extended life span in male mice to different degree depending on the dietary fat, with lard having the strongest effect on life-span extension (20). Moreover, we also have recently reported that muscle strength and endurance is either not altered or improved in mice consuming mildly restricted high fat or ketogenic diets containing lard as the primary dietary fat when compared to a control group consuming a diet with soybean oil as the lipid source (37). These results strongly suggest an interplay between diet composition and CR in life-span outcomes in mice.

On the other hand, we have also shown that mitochondrial phospholipid fatty acid composition was altered in liver and skeletal muscle from CR mice in a manner that reflected the unsaturated fatty acid composition of the diet, with the consequent increase of n-3 and n-6 fatty acids in fish and soybean oil fed animals, respectively, potentially changing several properties of the membranes (18). Additionally, lard fed animals showed a significantly higher proportion of mitochondrial monounsaturated fatty acids (especially oleic acid), a result that was accompanied by improved mitochondrial functions and ultrastructure (38). Thus, it is very likely that an increase in monounsaturated fatty acids,

8.5

8.10

8.15

8.20

8.25

8.30

8.35

8.40

8.45

8.50

8.52

8.55

8.60

8.65

8.70

8.75

8.80

8.85

8.90

8.95

8.100

8.104

such as oleic acid, may be involved in the beneficial effect of lard as a dietary fat in CR fed animals. However, further studies will be required to identify the specific fatty acids which influence muscle mass and function and health and life span in calorie restricted mice at very advanced age.

9.5

Supplementary Material

Supplementary data is available at *The Journals of Gerontology, Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* online.

9.10

Funding

This study was supported by National Institutes of Health grant 1R01AG028125 (to J.J.R., P.N. and J.M.V.); Spanish Ministerio de Economía y Competitividad BFU2015-64630-R cofinanced with EU FEDER funds (to J.M.V.); Spanish Junta de Andalucía (Proyectos Internacionales grant and BIO-276 to J.M.V.; BIO-177 to P.N.); and Universidad de Córdoba. E.G.C. and J.A.L.D. were supported by FPU contracts from the Spanish Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. H.K. was funded by the Spanish Agencia Española de Cooperación Internacional al Desarrollo. R.d.C. is supported by the Intramural Research Program of the National Institute of Aging.

9.15

9.20

Acknowledgments

The authors are indebted to the personnel from the Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación (SCAI; University of Córdoba) for technical support.

9.25

Conflict of Interest

None reported.

AQ8

9.30

References

1. Johnson ML, Robinson MM, Nair KS. Skeletal muscle aging and the mitochondrion. *Trends Endocrinol Metab.* 2013;24:247–256. doi:10.1016/j.tem.2012.12.003
2. Nair KS. Aging muscle. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:953–963. doi:10.1093/ajcn/81.5.953
3. Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. *Mol Aspects Med.* 2011;32:159–221. doi:10.1016/j.mam.2011.07.001
4. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science.* 2009;325:201–204. doi:10.1126/science.1173635
5. Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, et al. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature.* 2012;489:318–321. doi:10.1038/nature11432
6. Aspnes LE, Lee CM, Weindruch R, et al. Caloric restriction reduces fiber loss and mitochondrial abnormalities in aged rat muscle. *FASEB J.* 1979;11:573–581. doi:10.1096/fasebj.11.7.9212081
7. Colman RJ, Beasley TM, Allison DB, Weindruch R. Attenuation of sarcopenia by dietary restriction in rhesus monkeys. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2008;63:556–559.
8. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* 2011;91:1447–1531. doi:10.1152/physrev.00031.2010
9. Proctor DN, Sinning WE, Walro JM, Sieck GC, Lemon PW. Oxidative capacity of human muscle fiber types: effects of age and training status. *J Appl Physiol (1985).* 1995;78:2033–2038. doi:10.1152/jappl.1995.78.6.2033
10. Nilwik R, Snijders T, Leenders M, et al. The decline in skeletal muscle mass with aging is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size. *Exp Gerontol.* 2013;48:492–498. doi:10.1016/j.exger.2013.02.012
11. Sayed RK, de Leonardis EC, Guerrero-Martínez JA, et al. Identification of morphological markers of sarcopenia at early stage of aging in skeletal muscle of mice. *Exp Gerontol.* 2016;83:22–30. doi:10.1016/j.exger.2016.07.007

9.35

9.40

9.45

9.50

9.52

12. Leduc-Gaudet JP, Picard M, St-Jean Pelletier F, et al. Mitochondrial morphology is altered in atrophied skeletal muscle of aged mice. *Oncotarget.* 2015;6:17923–17937. doi:10.18632/oncotarget.4235
13. Peterson CM, Johannsen DL, Ravussin E. Skeletal muscle mitochondria and aging: a review. *J Aging Res.* 2012;2012:194821. doi:10.1155/2012/194821
14. Rodney GG, Pal R, Abo-Zahrah R. Redox regulation of autophagy in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 2016;98:103–112. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.010
15. Mercken EM, Capri M, Carboneau BA, et al. Conserved and species-specific molecular denominators in mammalian skeletal muscle aging. *NPJ Aging Mech Dis.* 2017;3:8. doi:10.1038/s41514-017-0009-8
16. Sebastián D, Soriano E, Segalés J, et al. Mfn2 deficiency links age-related sarcopenia and impaired autophagy to activation of an adaptive mitophagy pathway. *EMBO J.* 2016;35:1677–1693. doi:10.15252/embj.201593084
17. Wohlgemuth SE, Seo AY, Marzetti E, Lees HA, Leeuwenburgh C. Skeletal muscle autophagy and apoptosis during aging: effects of calorie restriction and life-long exercise. *Exp Gerontol.* 2010;45:138–148. doi:10.1016/j.exger.2009.11.002
18. Chen Y, Hagopian K, McDonald RB, 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;67:1121–1131. doi:10.1093/gerona/gls113
19. López-Domínguez JA, Khraiweh H, González-Reyes JA, et al. Dietary fat modifies mitochondrial and plasma membrane apoptotic signaling in skeletal muscle of calorie-restricted mice. *Age (Dordr).* 2013;35:2027–2044. doi:10.1007/s11357-012-9492-9
20. López-Domínguez JA, Ramsey JJ, Tran D, et al. The influence of dietary fat source on life span in calorie restricted mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2015;70:1181–1188. doi:10.1093/gerona/glu177
21. Khraiweh H, López-Domínguez JA, López-Lluch G, 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;68:1023–1034. doi:10.1093/gerona/glt006
22. Calvo-Rubio M, Burón MI, López-Lluch G, et al. Dietary fat composition influences glomerular and proximal convoluted tubule cell structure and autophagic processes in kidneys from calorie-restricted mice. *Aging Cell.* 2016;15:477–487. doi:10.1111/acel.12451
23. Bello RI, Alcaín FJ, Gómez-Díaz C, López-Lluch G, Navas P, Villalba JM. Hydrogen peroxide- and cell-density-regulated expression of NADH-cytochrome b5 reductase in HeLa cells. *J Bioenerg Biomembr.* 2003;35:169–179.
24. Korhonen MT, Cristea A, Alén M, et al. Aging, muscle fiber type, and contractile function in sprint-trained athletes. *J Appl Physiol (1985).* 2006;101:906–917. doi:10.1152/jappphysiol.00299.2006
25. McKiernan SH, Colman RJ, Lopez M, et al. Caloric restriction delays aging-induced cellular phenotypes in rhesus monkey skeletal muscle. *Exp Gerontol.* 2011;46:23–29. doi:10.1016/j.exger.2010.09.011
26. McKiernan SH, Colman RJ, Aiken E, et al. Cellular adaptation contributes to calorie restriction-induced preservation of skeletal muscle in aged rhesus monkeys. *Exp Gerontol.* 2012;47:229–236. doi:10.1016/j.exger.2011.12.009
27. Cartee GD, Hepple RT, Bamman MM, Zierath JR. Exercise promotes healthy aging of skeletal muscle. *Cell Metab.* 2016;23:1034–1047. doi:10.1016/j.cmet.2016.05.007
28. Leeuwenburgh C, Gurley CM, Strotman BA, Dupont-Versteegden EE. Age-related differences in apoptosis with disuse atrophy in soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288:R1288–R1296. doi:10.1152/ajpregu.00576.2004
29. Lyons CN, Mathieu-Costello O, Moyes CD. Regulation of skeletal muscle mitochondrial content during aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2006;61:3–13.
30. Picard M, Ritchie D, Thomas MM, Wright KJ, Hepple RT. Alterations in intrinsic mitochondrial function with aging are fiber type-specific and do not explain differential atrophy between muscles. *Aging Cell.* 2011;10:1047–1055. doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00745.x

9.55
AQ9

9.60

9.65

9.70

9.75

9.80

9.85

9.90

9.95

9.100

9.104

AQ10

31. Finley LW, Lee J, Souza A, et al. Skeletal muscle transcriptional coactivator PGC-1 α mediates mitochondrial, but not metabolic, changes during calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:2931–2936. doi:10.1073/pnas.1115813109
- 10.5 32. Glancy B, Hartnell LM, Malide D, et al. Mitochondrial reticulum for cellular energy distribution in muscle. *Nature*. 2015;523:617–620. doi:10.1038/nature14614
33. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2016;12:1–222. doi:10.1080/15548627.2015.1100356
- 10.10 34. Joseph AM, Adihetty PJ, Wawrzyniak NR, et al. Dysregulation of mitochondrial quality control processes contribute to sarcopenia in a mouse model of premature aging. *PLoS One*. 2013;8:e69327. doi:10.1371/journal.pone.0069327
35. Tsai PI, Lin CH, Hsieh CH, et al. PINK1 phosphorylates MIC60/Mitofilin to control structural plasticity of mitochondrial Crista junctions. *Mol Cell*. 2018;69:744–756.e6. doi:10.1016/j.molcel.2018.01.026
36. Del Dotto V, Mishra P, Vidoni S, et al. OPA1 isoforms in the hierarchical organization of mitochondrial functions. *Cell Rep*. 2017;19:2557–2571. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.073 10.55
37. Roberts MN, Wallace MA, Tomilov AA, et al. A ketogenic diet extends longevity and healthspan in adult mice. *Cell Metab*. 2017;26:539–546.e5. doi:10.1016/j.cmet.2017.08.005
38. Villalba JM, López-Domínguez JA, Chen Y, et al. The influence of dietary fat source on liver and skeletal muscle mitochondrial modifications and lifespan changes in calorie-restricted mice. *Biogerontology*. 2015;16:655–670. doi:10.1007/s10522-015-9572-1 10.60
- 10.15 10.65
- 10.20 10.70
- 10.25 10.75
- 10.30 10.80
- 10.35 10.85
- 10.40 10.90
- 10.45 10.95
- 10.50 10.100
- 10.52 10.104