

VNIVERSITAT E VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Programa de Doctorado en Fisiología



**TRANSCRIPTÓMICA EN CENTENARIOS: UN
EJEMPLO DE ENVEJECIMIENTO SATISFACTORIO**

TESIS DOCTORAL presentada por

M^a DEL MAR DROMANT JARQUE

Dirigida por:

Dr. José Viña Ribes

Dra. Consuelo Borrás Blasco

Dra. Marta Inglés de la Torre

Valencia, 2021

La realización de la presente Tesis Doctoral ha sido llevada a cabo gracias a la financiación obtenida a través de las ayudas del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII2016-CIBER); del Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2016-75508-R) y del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (PCIN-2017-117).

***A TODOS LOS QUE HAN HECHO POSIBLE
QUE ESTE DÍA LLEGARA***

“Bienaventurados los que pueden dar sin recordar y recibir sin olvidar”

Madre Teresa de Calcuta

AGRADECIMIENTOS

En contra de lo que se pueda imaginar cuando se está inmerso en la vorágine de la tesis, la parte de los agradecimientos es una de las partes más complicadas. Y esto probablemente sea así porque esta es la parte que se escribe con el corazón, y en ella no hablamos ni de conocimientos ni de resultados, sino de personas y de sentimientos.

Han sido muchos años, muchos años juntos, a lo largo de los cuales he visto pasar a multitud de personas por el laboratorio. La mayoría de ellas personas luminosas que te alegran la vida y te acarician el alma, personas generosas que comparten sus conocimientos y te ayudan sin esperar nada a cambio. Estoy convencida de que la gente con la que te cruzas en el camino de la vida, todos sin excepción, en mayor o menor medida, te dejan huella.

A lo largo de estos años he visto muchas tesis en el laboratorio, y sé que ésta es una de las partes que se lee con más avidez. Pero el hacer una tesis a mi edad, me permite tomarme ciertas licencias así que, siento privaros de este pequeño placer, pero voy a hacer un agradecimiento general, porque han sido tantas las personas que han pasado, que me haría falta el equivalente a otra tesis para poder nombrarlas a todas.

Simplemente GRACIAS, creo que esta palabra es la mejor oración que alguien puede decir.

Gracias a todos los artífices de este pequeño milagro....

A los que me han animado a construir esta tesis día a día poniendo “grandes ladrillos” cuando yo sólo ponía adoquines.

A los que han aguantado mis “dramas doctorales” y han enjugado mis lágrimas en mis bajones y en los momentos difíciles.

A los que han soportados mis torpes comienzos en la escritura doctoral y se han tragado mis “infumables” comienzos.

A los que se han interesado y me han preguntado día a día por mis avances doctorales y me han animado a seguir adelante.

A los que han confiado en mí más que yo misma y me han demostrado un apoyo incondicional.

A los que me han ofrecido su ayuda y han resuelto mis infinitas dudas burocráticas mucho más allá de lo que el deber les exigía.

A todos mis chic@s.... a los que han pasado y a los que están, y a los que he reñido con el mismo cariño con el que una madre riñe a sus hijos.

En todo momento me he sentido arropada y querida, pero no sólo en la elaboración de esta tesis, sino en el transcurso de los años vividos juntos, donde me habéis apoyado y animado en las situaciones difíciles que me ha tocado sobrellevar en la vida. Sois “mi otra familia” y no creo que pueda haber otra palabra mejor y más sentida para expresar mi inmenso afecto hacia todos y cada uno de vosotros.

Pero me vais a permitir una excepción y voy a brindar un agradecimiento particular a mis directores y a mi familia.

Al Dr. José Viña a quien tengo en grandísima estima y a quien nunca agradeceré lo suficiente toda la confianza que ha depositado en mí. Además de ser

una eminencia científica, un caballero de los pies a la cabeza y un jefe excelente, para mí ha sido y es un gran amigo, a quien he podido recurrir siempre en los momentos difíciles tanto profesionales como personales.

A la Dra. Consuelo Borrás, mi queridísima Chelo. No sé por dónde empezar, tengo tanto y tanto que agradecerte... gracias por tu apoyo incondicional, por hacer fácil lo difícil, por ser mi ángel de la guarda, por estar siempre ahí cuando te he necesitado, por ser una jefa comprensiva y excepcional, por lo que aprendo de ti día a día, por hacer del trabajo un placer. Pero, lo más importante, gracias por regalarme tu cariño y tu amistad.

A la Dra. Marta Inglés. ¿Qué te puedo decir? Algunas personas vienen a nuestra vida como bendiciones y otras como lecciones, tú has venido a la mía de ambos modos y no puedo estar más agradecida. Muchas gracias por ser una trabajadora infatigable, por tu grandísima ayuda, por tus ladrillos, por tanto y tanto como me has regalado ... todos sabemos que, sin ti, esto no hubiera sido posible.

Y por último gracias a mi familia...

A mis hijas, Paloma y M.^a Henar, verdaderas impulsoras y motores de esta tesis, de las que estoy sumamente orgullosa y a las que quiero “hasta el infinito y más allá”.

A mis padres y a mi hermano y, aunque físicamente mi padre no esté, siempre estará en mi corazón... gracias por darme la mejor familia que nadie pudiera soñar, por guiar mis pasos hasta convertirme en la persona que soy, por transmitirme los valores en los que se ha cimentado toda mi vida. Gracias mamá por tu infinita paciencia, especialmente en el tiempo que ha durado esta tesis.

A mi querido mini-lab, Cris, Lucia, Esther y Marta... estáis donde corresponde, en el apartado de familia, porque así os siento. Gracias de todo corazón.

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 ENVEJECIMIENTO	5
1.1.1 CONCEPTO DE ENVEJECIMIENTO.....	5
1.1.2 ENVEJECIMIENTO POBLACIONAL.....	6
1.1.3 TIPOS DE ENVEJECIMIENTO	9
1.1.4 LOS CENTENARIOS COMO MODELO DE ENVEJECIMIENTO EXITOSO .	10
1.1.4.1 PARADIGMAS DEL ENVEJECIMIENTO EXITOSO EN CENTENARIOS	11
1.1.4.2 ENVEJECIMIENTO EXITOSO FRENTE A ENVEJECIMIENTO ORDINARIO	15
1.2 GENÉTICA.....	19
1.2.1 CONCEPTO DE mRNA	19
1.2.2 ESTUDIOS DE mRNA EN EL ENVEJECIMIENTO	20
1.2.3 CONCEPTO DE microRNAs. SÍNTESIS Y FUNCIÓN	23
1.2.4 RELACIÓN ENTRE mRNA, miRNA Y EXPRESIÓN GÉNICA.	25
1.2.5 TRANSCRIPTÓMICA FUNCIONAL Y REGULACIÓN	30
1.3 MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN EL ENVEJECIMIENTO EXITOSO.....	31
1.3.1 ESTRÉS OXIDATIVO.....	31
1.3.1.1 Concepto de radical libre	32

1.3.1.2	Génesis de radicales libres.....	34
1.3.1.3	Mecanismos de protección frente a los radicales libres: antioxidantes fisiológicos.....	35
1.3.1.4	Papel de los antioxidantes en el proceso de envejecimiento.....	36
1.3.1.5	Estrés oxidativo y daño a biomoléculas.....	37
1.3.1.5.1	Daño oxidativo a lípidos.....	37
1.3.1.5.2	Daño oxidativo a proteínas.....	38
1.3.1.5.3	Daño oxidativo a glúcidos.....	40
1.3.1.5.4	Daño oxidativo al DNA.....	40
1.3.1.6	Marcadores de estrés oxidativo.....	42
1.4	JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....	43
1.5	HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	44
1.6	OBJETIVOS.....	44
1.6.1	Objetivo general.....	44
1.6.2	Objetivos específicos.....	44
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
2.1	MUESTRA.....	49
2.2	DISEÑO DEL ESTUDIO Y CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	50
2.3	RECURSOS MATERIALES.....	51
2.3.1	RECURSOS MATERIALES CLÍNICOS.....	51

2.3.2	RECURSOS MATERIALES DE LABORATORIO	52
2.3.2.1	Aparatos.....	52
2.3.2.2	Reactivos.....	56
2.4	MÉTODOS	59
2.4.1	PROCESADO DE LA MUESTRA BIOLÓGICA	59
2.4.1.1	Procedimiento de la extracción sanguínea.....	59
2.4.1.2	Procedimiento de la obtención del plasma	60
2.4.1.3	Procedimiento de la obtención de células mononucleares de sangre periférica	60
2.4.1.4	Procedimiento de la obtención del RNA y miRNA.....	62
2.4.2	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN, PUREZA E INTEGRIDAD DEL RNA	63
2.4.2.1	Determinación de la concentración y pureza.....	64
2.4.2.2	Determinación de la integridad	66
2.4.3	DETERMINACIÓN DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE miRNA.....	68
2.4.4	DETERMINACIÓN DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE mRNA.....	70
2.4.5	ANÁLISIS DE LOS DATOS DE LOS MICROARRAYS	75
2.4.6	VALIDACIÓN DE LOS DATOS OBTENIDOS: RETROTRANSCRIPCIÓN-AMPLIFICACIÓN DEL RNA	76
2.4.6.1	Síntesis del DNA complementario (cDNA).....	76
2.4.6.2	Amplificación cuantitativa del RNA mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)	77

2.4.7	CUANTIFICACIÓN DE MDA EN PLASMA	81
2.4.8	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR LOWRY	88
2.4.9	DETERMINACIÓN DE CARBONILACIÓN PROTEICA EN PLASMA.....	91
2.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	94
2.6	TRATAMIENTO BIBLIOGRÁFICO	95
3.	RESULTADOS	97
3.1	IDENTIFICACIÓN DE LOS miRNA EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN CENTENARIOS	99
3.1.1	SELECCIÓN DE MUESTRAS PARA EL ESTUDIO DE miRNA.....	99
3.1.1.1	Control de calidad de las muestras.....	99
3.1.1.2	Control de calidad de los microarrays	101
3.1.2	ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS miRNA	104
3.1.3	ESTUDIO DE miRNAs CARACTERÍSTICOS DE CENTENARIOS.....	106
3.1.4	VALIDACIÓN DE miRNAs SOBREENSPRESADOS EN CENTENARIOS.....	108
3.2	IDENTIFICACIÓN DE LOS mRNA EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN CENTENARIOS	111
3.2.1	SELECCIÓN DE MUESTRAS PARA EL ESTUDIO DE mRNAs.....	111
3.2.2	ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS mRNA	112
3.2.3	ESTUDIO DE mRNAs CARACTERÍSTICOS DE CENTENARIOS	114
3.3	IDENTIFICACIÓN DE PROCESOS BIOLÓGICOS Y "SUBNETWORKS" CARACTERÍSTICOS DE LOS CENTENARIOS.	115

3.3.1	Procesos biológicos asociados a los genes característicos de centenarios.	116
3.3.2	Análisis de subnetworks.....	117
3.4	IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES MÁS RELEVANTES IMPLICADOS EN LA MAYOR LONGEVIDAD DE LOS CENTENARIOS.....	129
3.5	ESTUDIO DE PARÁMETROS MOLECULARES RELACIONADOS CON ESTRÉS OXIDATIVO IMPLICADOS EN LA LONGEVIDAD EXTREMA.....	133
4. DISCUSIÓN		135
4.1	ENVEJECIMIENTO ORDINARIO VERSUS EXITOSO	137
4.2	miRNA EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN CENTENARIOS	138
4.3	LA EXPRESIÓN DE LOS mRNAs EN INDIVIDUOS DE LONGEVIDAD EXTREMA DIFIERE SIGNIFICATIVAMENTE DE LA QUE PRESENTAN LOS INDIVIDUOS CON ENVEJECIMIENTO ORDINARIO	145
4.4	EL ANÁLISIS DE LOS GENES SOBREENSPRESADOS EN CENTENARIOS REVELA UN PATRÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA APOPTOSIS	148
4.5	PARÁMETROS ASOCIADOS A BCL-xL Y AL ENVEJECIMIENTO EXITOSO, ESTÁN PRESERVADOS EN CENTENARIOS	151
4.6	ESTRÉS OXIDATIVO Y LONGEVIDAD.....	153
5. CONCLUSIONES		159
5.1	CONCLUSIÓN GENERAL.....	161
5.2	CONCLUSIONES ESPECÍFICAS	161
6. BIBLIOGRAFÍA.....		163
7. ANEXOS.....		183

7.1 ANEXO 1: ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS.....	185
7.2 ANEXO 2: CONSENTIMIENTO INFORMADO	190
7.3 ANEXO 3: DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA.....	191

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

<i>Figura 1.1 Pirámides de población en España (años 2020, 2050)</i>	7
<i>Figura 1.2 Población centenaria en el mundo.</i>	8
<i>Figura 1.3 Teoría de la “compresión de la morbilidad”</i>	12
<i>Figura 1.4 Teoría de “la desaceleración del envejecimiento”</i>	14
<i>Figura 1.5 Síntesis del mRNA</i>	20
<i>Figura 1.6 Síntesis de un miRNA</i>	24

2. MATERIALES Y MÉTODOS

<i>Figura 2.1. Esquema del diseño del estudio</i>	50
<i>Figura 2..2. Material para electroforesis</i>	54
<i>Figura 2.3. Equipo de HPLC para la determinación de los niveles de MDA</i>	55
<i>Figura 2.4. Esquema de las capas formadas según el gradiente de densidad</i>	61
<i>Figura 2.5. Ejemplo de un electroferograma del RNA total extraído de las PBMC de una muestra del grupo de centenarios.</i>	68
<i>Figura 2.6. Esquema resumen del protocolo de WT Expression Kit de Ambion.</i>	74
<i>Figura 2.7. Curva de amplificación RT-PCR</i>	80
<i>Figura 2.8. Programación de la duración (minutos) de las Fases A y B, durante un cromatograma del análisis de Malondialdehído (MDA).</i>	87
<i>Figura 2.9. Cromatograma de una muestra problema</i>	88
<i>Figura 2.10. Ejemplo de recta patrón para la determinación de la concentración de proteínas en mg/mL en función de la absorbancia a $\lambda= 660$ nm.</i>	91
<i>Figura 2.11. Esquema electroforesis SDS-PAGE</i>	93

3. RESULTADOS

<i>Figura 3.1. Representación gráfica de la calidad de las muestras incluidas en el estudio de miRNAs.....</i>	<i>100</i>
<i>Figura 3.2. Análisis de componentes principales de los RNA no codificantes en PBMC de los tres grupos de estudio.</i>	<i>105</i>
<i>Figura 3.3. Número de RNA no codificantes cuya expresión está modificada significativamente al comparar los 3 grupos de estudio.....</i>	<i>107</i>
<i>Figura 3.4. Validación de los RNA no codificantes que únicamente se sobreexpresan en centenarios al compararlos con septuagenarios y jóvenes.....</i>	<i>109</i>
<i>Figura 3.5. Análisis de componentes principales de los mRNA en PBMC de los tres grupos de estudio.....</i>	<i>113</i>
<i>Figura 3.6. Procedimiento hasta la obtención del Diagrama de Venn.....</i>	<i>115</i>
<i>Figura 3.7. Genes característicos de centenarios, agrupados en términos de procesos biológicos.....</i>	<i>117</i>
<i>Figura 3.8. Análisis de subnetworks de genes específicamente regulados por centenarios o septuagenarios en comparación con jóvenes.....</i>	<i>121</i>
<i>Figura 3.9. Esquema de los genes con importancia regulatoria obtenidos en los análisis de sub-network.....</i>	<i>129</i>
<i>Figura 3.10. Expresión génica y niveles proteicos de Bcl-xL en PBMC de la población de Alzira.....</i>	<i>133</i>
<i>Figura 3.11. Medición de parámetros de estrés oxidativo en plasma de sujetos del estudio de Alzira.</i>	<i>134</i>

ÍNDICE DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1. Especies activadas del oxígeno y nitrógeno..... 33

Tabla 1.2. Sistemas más importantes que generan la oxidación de proteínas 39

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 2.1. Resumen de los aparatos y reactivos empleados para la extracción, aislamiento, y determinación de perfiles de expresión 57

Tabla 2.2. Determinación de la pureza en base a los valores obtenidos mediante el OD 260/280 65

Tabla 2.3. Condiciones de la RT-PCR..... 79

3. RESULTADOS

Tabla 3.1. Media de los parámetros de calidad establecidos para el RNA total obtenido de las muestras de PBMC para el estudio de miRNAs, por grupos de edad 99

Tabla 3.2. Media de los parámetros de calidad establecidos para el RNA total obtenido de las muestras de PBMC para el estudio de miRNA, por grupos de edad 112

RESUMEN

RESUMEN

Los centenarios son un modelo de envejecimiento satisfactorio. No solo disfrutan de una larga longevidad, sino que además muestran una envidiable compresión de la morbilidad.

El objetivo del estudio fue esclarecer si las personas centenarias tienen un perfil genético de expresión característico en comparación con personas septuagenarias y jóvenes, así como evaluar sus diferencias a nivel de estrés oxidativo.

Para ello se obtuvo muestras de células polimorfonucleares de todos los grupos de edad y se realizó un análisis de su miRNoma y transcriptoma. El análisis de componentes principales reveló un solapamiento entre el perfil de miRNoma de centenarios y el de jóvenes, ambos distintos de los septuagenarios. Su estudio detallado mostró que la regulación de los miRNAs en centenarios se encuentra aumentada, pues sobreexpresan 7 miRNAs frente a jóvenes y 102 miRNAs frente a septuagenarios. Esto sugiere que los centenarios presentan un mejor control de la expresión génica del RNA mensajero a través de la regulación de los miRNAs.

Posteriormente, se analizó el transcriptoma de los tres grupos de estudio, mostrando el análisis de componentes principales diferente direccionalidad entre el grupo de centenarios y el de septuagenarios. Se encontraron 1721 genes característicos de centenarios.

Agrupamos estos 1721 genes según su implicación en procesos biológicos. La **respuesta inmune** y la **señalización celular** encabezaron la lista de los que involucraban mayor número de ellos.

A continuación, se realizó un análisis de las conexiones funcionales o estructurales entre los 1721 genes que dio lugar a 6 genes: **IFNG**; **TCR**; **TNF**; **SP1**; **TGFβ1**; **IL-32**. Al comparar centenarios con jóvenes, y septuagenarios con jóvenes se obtuvieron imágenes casi especulares que mostraban que, genes sobreexpresados en centenarios estaban infraexpresados en septuagenarios cuando se comparaba su expresión con los jóvenes. Por tanto, la expresión de mRNA en el envejecimiento exitoso difiere de la del envejecimiento ordinario.

Un nuevo análisis de conexiones funcionales o estructurales entre los 6 genes anteriores identificó 4 genes comunes: **Bcl-xL**, **Fas**, **FasL** y **CCL5**, tres de los cuales están implicados en la regulación de la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis. Se destaca así el papel clave de la apoptosis en la centenariedad.

Nos centramos en el papel de Bcl-xL, especialmente por su implicación con la función mitocondrial, y confirmamos su sobreexpresión en centenarios por RT-PCR.

Asimismo, determinamos los niveles de MDA, como índice de peroxidación lipídica, y la carbonilación proteica y observamos que dichos niveles eran menores en centenarios comparado con septuagenarios. Así pues, los centenarios están protegidos frente al estrés oxidativo.

Por tanto, los centenarios tienen un perfil característico de expresión de miRNAs y de mRNAs relacionados con procesos asociados a la longevidad y están protegidos frente al estrés oxidativo, lo cual podría explicar en parte su envejecimiento satisfactorio.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ENVEJECIMIENTO

1.1.1 CONCEPTO DE ENVEJECIMIENTO

Actualmente no contamos con una definición aceptada de manera universal del concepto envejecimiento. El gerontólogo Denham Harman lo define como la “acumulación progresiva de cambios deletéreos en células y tejidos con el tiempo, que provocan el aumento de probabilidad de enfermedad y muerte del individuo” (Harman, 2001; Troen, 2003).

Por otro lado, Bernard Strehler (Strehler, 1985), lo define a través de cuatro postulados:

- El envejecimiento es **universal**, es decir, un fenómeno dado asociado al proceso de envejecimiento debe darse en menor o mayor medida en todos los individuos de una misma especie.
- El envejecimiento es **intrínseco**, por lo que las causas que lo provocan deben de ser de origen endógeno, no dependiendo de factores externos o de origen ambiental.
- El envejecimiento es **progresivo**, ya que los cambios que conducen a envejecer se dan de manera paulatina a lo largo de la vida.
- El envejecimiento es **deletéreo**, de tal manera que un determinado fenómeno sólo se considerará parte del proceso de envejecer si es dañino.

1.1.2 ENVEJECIMIENTO POBLACIONAL

Debido al aumento de la esperanza de vida y a la disminución de la tasa de fecundidad, la proporción de personas mayores de 60 años está aumentando más rápidamente que cualquier otro grupo de edad en los países desarrollados. Según la organización mundial de la salud (OMS), el envejecimiento de la población puede considerarse un éxito de las políticas de salud pública y del desarrollo socioeconómico, pero también constituye un reto para la sociedad, que debe adaptarse a ello para mejorar al máximo la salud y la capacidad funcional de las personas mayores, así como su participación social y seguridad. La esperanza de vida en países como Japón y Francia ya era superior a 80 años en 2005, y también está aumentando en los países en desarrollo, como Chile, Costa Rica, Jamaica, Líbano, Sri Lanka o Tailandia, donde alcanza los 70 años. No obstante, sigue habiendo grandes desigualdades, como demuestran las diferencias con respecto a la esperanza de vida al nacer; por ejemplo, mientras que en Japón, el país con mayor esperanza de vida, es de 82.2 años, en varios países africanos la cifra puede llegar a ser de 40 años menos. También existen importantes desigualdades dentro de un mismo país; por ejemplo, en los Estados Unidos de América los grupos socioeconómicos más favorecidos tienen una esperanza de vida hasta 20 años mayor que los menos favorecidos (OMS, 2011). Con respecto a España, según datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), la esperanza de vida al nacer ha ido aumentando progresivamente con los años. En el caso de los hombres, ésta ha pasado de los 76.3 años en el año 2002 a los 80.1 en el año 2020 y, en el caso de las mujeres, de los 83.2 años en 2002 a los 85.44 en el año 202. De hecho, las personas de más de 65 años actualmente representan el 19.6% de la población española, y se prevé que esta proporción alcance el 31.4% en 2050 (debido a un envejecimiento de la pirámide poblacional), tal y como muestra la Figura 1.1.

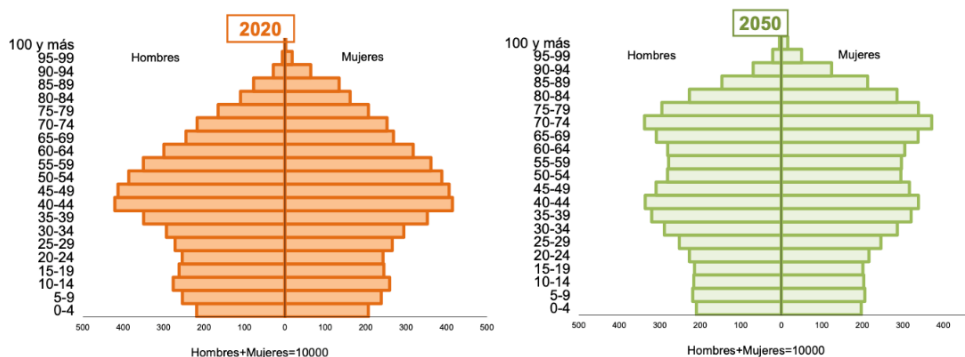


Figura 1.1 Pirámides de población en España (años 2020, 2050) que muestran la proyección poblacional española. (INE, 2020)

Paralelamente, la población centenaria también ha aumentado notablemente en las últimas décadas (Collaborators, 2018). De hecho, en los años noventa, la tasa de prevalencia de los centenarios en Europa era de aproximadamente 1 por cada 10.000 (Teixeira *et al.*, 2017), y hoy en día es de alrededor de 1 por cada 5.000, según datos del INE del 2020. Esto convierte a los centenarios en uno de los grupos de población de más rápido crecimiento, aunque la evolución de esta transición demográfica para las mujeres es incierta. En este sentido, aunque las mujeres centenarias superan en número a los hombres centenarios en todos los países, se prevé que la proporción de sexo disminuya en los próximos años, pasando de 3,7 mujeres centenarias por cada hombre centenario en 2015 a 1,9 mujeres por cada hombre en 2100 (Robine & Cubaynes, 2017). Las Figuras 1.2a y 1.2b muestran la distribución mundial de los centenarios y el porcentaje de población centenaria por país, respectivamente.

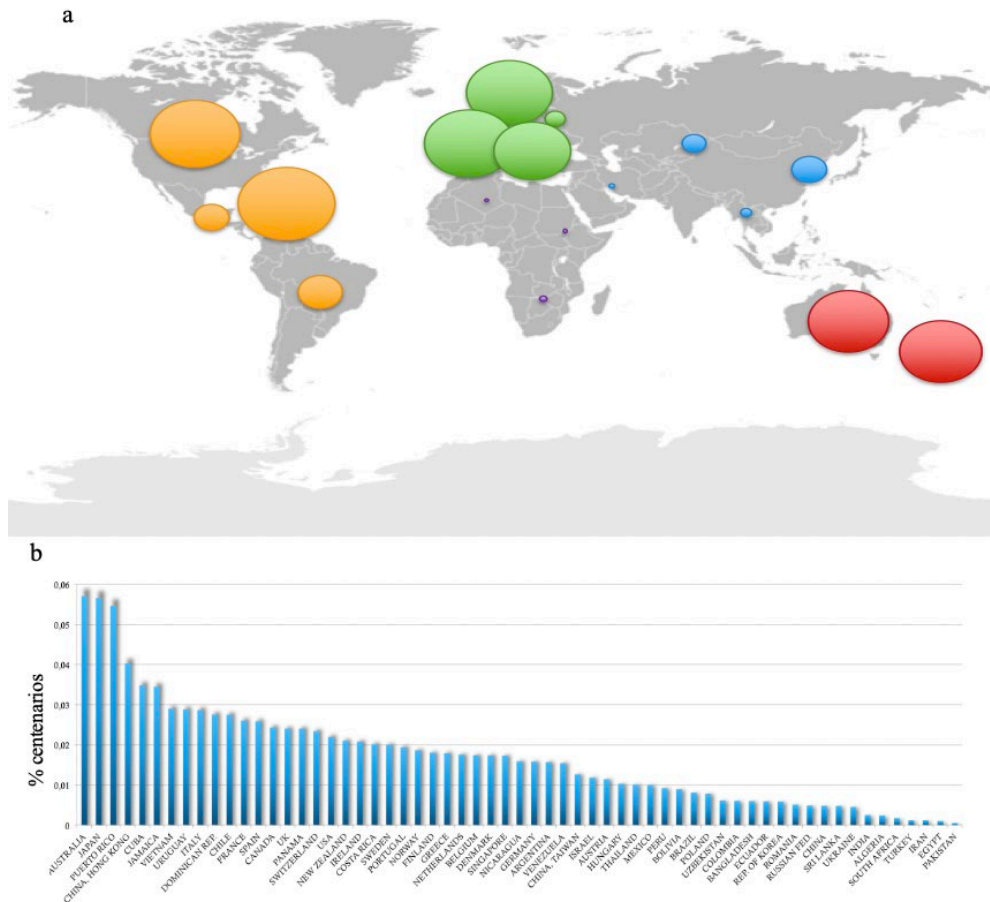


Figura 1.2 Población centenaria en el mundo. a) Distribución de centenarios en el mundo; b) porcentaje de centenarios por país. (Borras et al., 2020)

El crecimiento tan rápido de la población centenaria se debe principalmente a la mejora de la expectativa de vida entre los mayores de 65 años (Brown, 2015) debida, fundamentalmente, a la mejora de la atención médica, la higiene, el creciente desarrollo de la ciencia y la técnica y los estilos de vida más saludables.

Ante esto, la tendencia actual considera que, si lo importante es vivir más años, es esencial que estos transcurran con la mejor calidad de vida posible. Esta problemática ha adquirido primordial importancia y se ha convertido en un factor decisivo en las investigaciones médicas y sociales (Mussol, 2002).

1.1.3 TIPOS DE ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento humano es el resultado de la suma de dos subtipos de envejecimiento: el envejecimiento primario o *per se* y el envejecimiento secundario (Mañas, 2001).

- **Envejecimiento primario:** proceso o conjunto de procesos responsables de una serie de cambios graduales observados con la edad en los individuos, los cuales son inevitables y no están relacionados con la presencia de enfermedad. La investigación se centra en los mecanismos genéticos, moleculares y celulares que intervienen en el envejecimiento como proceso (Finch & Tanzi., 1997; Halliwell, 2000).
- **Envejecimiento secundario:** es aquel que se produce en los seres vivos cuando estos se ven sometidos a diferentes fenómenos externos, que ocurren a lo largo de la vida y que interaccionan con los mecanismos y cambios propios del envejecimiento primario para producir el llamado “envejecimiento habitual”. Los principales representantes de este envejecimiento secundario son los problemas crónicos de salud y los cambios adaptativos para mantener la homeostasis del medio interno. Dado que estos fenómenos no se correlacionan con la edad, es difícil establecer su curso normal. Su investigación abarca tanto la causa,

prevención, desarrollo, manifestación, pronóstico y tratamiento de la enfermedad y de sus consecuencias, como lo relacionado con hábitos y estilos saludables de vida , 2001).

La característica fundamental que puede derivarse de cualquiera de estos dos tipos de envejecimiento es la pérdida de la reserva funcional del individuo, lo cual condiciona una mayor susceptibilidad ante agresiones externas, al disminuir los mecanismos de respuesta y su eficacia para mantener la homeostasia del medio interno (Hayflick, 2000). Según se pierde la reserva funcional la susceptibilidad es mayor, aumentando la posibilidad de que cualquier causa desencadene en una pérdida de función y, en última instancia, en discapacidad y dependencia (Buchner *et al.*, 1992).

Por eso, a lo largo de los últimos años, ha existido un interés creciente por perseguir el llamado “**envejecimiento exitoso**” (del inglés, *successful aging*), que se caracteriza por (Rowe & Kahn, 1997):

- Ausencia o baja probabilidad de enfermedad y discapacidad asociada a la misma.
- Mantenimiento de una alta capacidad cognitiva y funcional.

1.1.4 LOS CENTENARIOS COMO MODELO DE ENVEJECIMIENTO EXITOSO

En la población general, el aumento de la esperanza de vida no ha ido acompañado de un aumento de la calidad de vida, sino que ha aumentado el riesgo de enfermedad, fragilidad, discapacidad y demencia antes de la muerte (Brown, 2015).

Por el contrario, los centenarios exhiben historias médicas con tasas de incidencia notablemente bajas de trastornos comunes relacionados con la edad, como enfermedades relacionadas con la edad, diabetes mellitus, enfermedad de Parkinson y cáncer (Andersen *et al.*, 2012) y la mayoría permanecen independientes en las actividades de la vida diaria hasta los 90 años (Arai *et al.*, 2017). Aunque, como en todos los segmentos de población, existe una heterogeneidad en el estado físico y cognitivo de los centenarios, dependiendo de su estatus socioeconómico, o de su origen cultural/histórico (Franceschi *et al.*, 2017b), éstos son un ejemplo de cómo vivir más y mejor, y se han propuesto como un modelo de envejecimiento exitoso (Franceschi *et al.*, 1995).

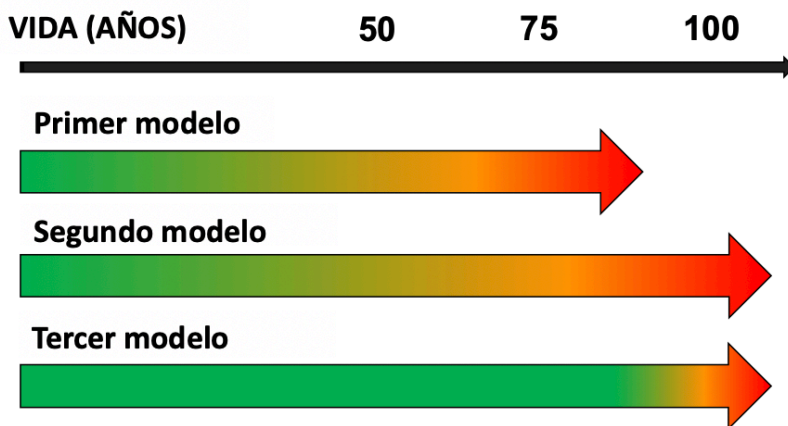
1.1.4.1 PARADIGMAS DEL ENVEJECIMIENTO EXITOSO EN CENTENARIOS

La razón por la cual los centenarios constituyen un ejemplo de envejecimiento exitoso ha sido una cuestión de intenso debate, y han surgido dos grandes paradigmas.

El más conservador fue descrito como "compresión de la morbilidad". En este modelo, la tasa de discapacidad disminuye cuando la morbilidad se comprime en un período corto comprendido entre la edad avanzada en el que se inicie la discapacidad y la muerte (Fries, 1980). Por lo tanto, el retraso en la aparición de las enfermedades crónicas da lugar a la rectangularización tanto de la curva de mortalidad como la de morbilidad (Fries, 1980). En este sentido, un estudio sobre los centenarios de Massachussets indicó que su cohorte de centenarios realmente se ajustaba a la curva de morbilidad rectangularizada de Fries, donde las personas vivían el 96% o más de sus vidas funcionalmente independientes y con buen estado de salud. Esto es, dada su edad extrema, el período de tiempo en el que experimentan morbilidad, se comprime en un pequeño período al final de sus vidas

(Perls, 1997). Según la teoría de la “compresión de la morbilidad”, hay varios modelos de morbilidad pronosticada propuestos sobre la base de la longevidad extrema (Figura 1.3).

- En el primer modelo, la edad en el que se inicia la morbilidad es constante y la ganancia en años de vida van acompañados de una mayor morbilidad.
- En un segundo modelo, tanto el inicio de la morbilidad como los años de vida acumulados se desplazan a la derecha, sin ganancias ni pérdidas de morbilidad.
- En un tercer modelo, la aparición de la morbilidad se retrasa y se acompaña de años de vida acumulados, lo que resulta en una compresión de la morbilidad.



*Figura 1.3 Teoría de la “compresión de la morbilidad”
(Fries, 1980)*

La hipótesis de Fries sostenía la posibilidad de que la morbilidad crónica comenzara en los últimos años de vida, e incluso que el retraso de la aparición de morbilidad

superara el aumento de la esperanza de vida. En esencia, para estas personas longevas, la duración de las enfermedades crónicas y de la discapacidad asociada disminuye, con la consiguiente reducción de la morbilidad acumulada. La evidencia de que se produce una reducción anual de alrededor del 2% de la discapacidad, acompañada de una disminución anual del 1% de la mortalidad durante el mismo período de tiempo, apoya esta hipótesis (Pignolo, 2019).

Un paradigma más ambicioso es "la desaceleración del envejecimiento" (Figura 1.4). Según esta teoría, existe un continuo entre el envejecimiento saludable y el no saludable, de tal manera que se pueden representar diferentes trayectorias de edad: acelerada, normal y desacelerada, dependiendo de la edad a la que aparezcan las enfermedades relacionadas con la edad o los síndromes geriátricos (Franceschi *et al.*, 2018a). Dado que los centenarios evitan o posponen en gran medida la aparición de enfermedades relacionadas con la edad o síndromes geriátricos, muestran una trayectoria desacelerada del envejecimiento, en la que los procesos naturales del envejecimiento se ralentizan (Franceschi *et al.*, 2018a). Recientemente, se ha propuesto que esta "desaceleración del envejecimiento" podría deberse, al menos en parte, a su mayor resiliencia/capacidad intrínseca, que contribuye a superar la inflamación crónica de bajo grado (*inflammaging*) (Franceschi *et al.*, 2018b) y la acumulación de desechos moleculares (*garb-ageing*) (Franceschi *et al.*, 2017a) que acompañan al envejecimiento (Borras *et al.*, 2016). En otras palabras, los centenarios resilientes serían capaces de desarrollar mecanismos *anti-inflammaging* para luchar contra el daño molecular relacionado con la edad (Borras *et al.*, 2020).

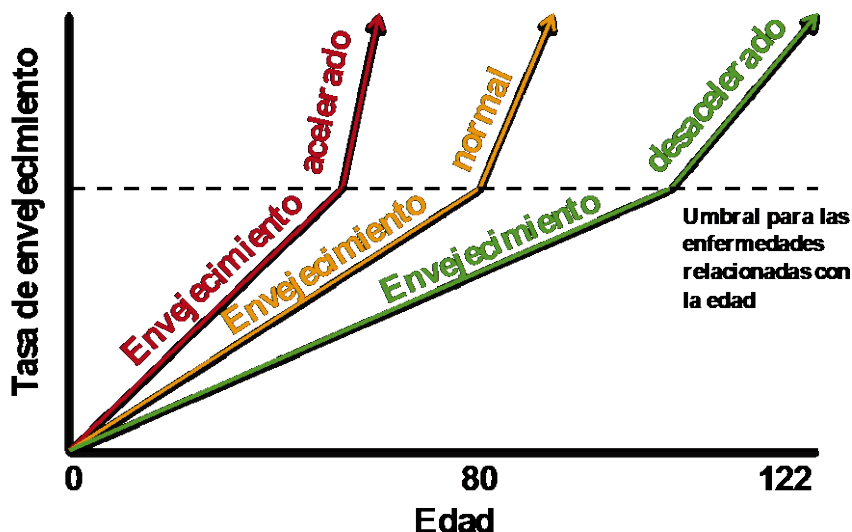


Figura 1.4 Teoría de “la desaceleración del envejecimiento”
(Franceschi et al., 2018a)

En cuanto a las diferencias de sexo con respecto al estado funcional en centenarios, están bien documentadas: los hombres centenarios, aunque menos numerosos, tienden a tener un mejor estado cognitivo y funcional que las mujeres centenarias. De hecho, se ha visto que los hombres centenarios tienen menor morbilidad y sufren menos síndromes geriátricos que las mujeres (Hazra *et al.*, 2015). En este sentido, mientras que la compresión tanto de la morbilidad como de la discapacidad parece ser una característica esencial de la supervivencia en la mayoría de los centenarios, para otros, en particular los hombres, la compresión de la discapacidad y no necesariamente la morbilidad, puede ser el requisito clave (Terry *et al.*, 2008).

Se ha explorado la relación entre la edad, la morbilidad y la discapacidad entre los centenarios (de 100 a 104 años), los semicentenarios (de 105 a 109 años) y los supercentenarios (de 110 a 119 años). En este sentido, en general, cuanto

mayor sea la persona, más tarde aparecen las enfermedades, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la demencia y el accidente cerebrovascular, así como el deterioro cognitivo y funcional (Andersen *et al.*, 2012). Más específicamente, se ha sugerido que la supervivencia a edades tan avanzadas depende principalmente de mantener la integridad funcional, más que de prevenir enfermedades específicas (Nascimento *et al.*, 2019). Además, los centenarios muestran menos comorbilidades (promedio de 3.3) y tienen un aumento menos pronunciado de comorbilidades en los últimos años antes de la muerte, en comparación con los nonagenarios u octogenarios (Gellert *et al.*, 2018).

La fragilidad y la depresión son dos condiciones comunes que tienen un impacto importante sobre los adultos mayores. Un estudio realizado en 91 centenarios mostró que, de ellos, el 5.5% fueron clasificados como robustos, el 42.9% como pre-frágiles, y el 51.6% como frágiles. La prevalencia de depresión fue del 35.2% (51.1% en centenarios frágiles; 21.1% en centenarios pre-frágiles; 0% en robustos) en toda la muestra. Los centenarios frágiles presentaban un mayor riesgo de depresión en comparación con los centenarios pre-frágiles, lo que llevó a la conclusión de que la depresión es una condición clínica independiente que es frecuente en centenarios frágiles y pre-frágiles (Ribeiro *et al.*, 2018).

1.1.4.2 ENVEJECIMIENTO EXITOSO FRENTE A ENVEJECIMIENTO ORDINARIO

Tal y como se ha comentado anteriormente, en las últimas décadas el concepto de "envejecimiento exitoso" ha cobrado especial importancia (Rowe & Kahn, 1997). Así, existe un interés creciente en cuantificar el envejecimiento saludable midiendo los cambios relacionados con la edad en la morbilidad, la función física y el estado cognitivo, con el fin de evitar la discapacidad. Como ya se ha comentado, los centenarios mantienen un estado de salud tan notable hasta sus

últimos años de vida que la duración de su salud es similar a su vida útil, siendo considerado así como el paradigma de "envejecimiento exitoso" (Franceschi *et al.*, 1995). En este sentido, el estudio de centenarios de Tokio reveló que la mayoría de los centenarios conservaron su independencia en las actividades de la vida diaria hasta los 90 años. Curiosamente, aquellos centenarios que gozaban de independencia física y cognitiva a la edad de 100 años (20%), eran propensos a convertirse en semi-supercentenarios (más allá de 105 años) o incluso supercentenarios (más de 110 años) (Arai *et al.*, 2017).

Identificar los factores protectores que mejoran el envejecimiento saludable y la longevidad y traducir dichos hallazgos en intervenciones basadas en la evidencia se está convirtiendo en una prioridad de investigación. En este sentido, se han realizado muchos estudios, con el fin de determinar si los centenarios viven más tiempo y con más salud que sus contemporáneos debido a factores genéticos, epigenéticos o ambientales (Kirkwood, 2005).

Dado que los centenarios están expuestos a las mismas condiciones ambientales básicas que sus contemporáneos que experimentan un "envejecimiento ordinario", se ha postulado que los factores genéticos podrían desempeñar un papel crítico en su longevidad (Schoenmaker *et al.*, 2006). De hecho, la evidencia existente sugiere que la contribución genética a una vida saludable en los centenarios puede ser mayor que en la población general (Abbott *et al.*, 1978; Perls *et al.*, 2002). Así, en nuestro grupo de investigación, hemos determinado el exoma de familias centenarias, proporcionando de esta manera un catálogo inicial de genes que podrían contribuir al envejecimiento excepcional (Cash *et al.*, 2014). Además, en el próximo apartado de la presente tesis, describiremos algunos de los hallazgos más importantes en cuanto al componente genético de la longevidad extrema.

Sin embargo, cada vez hay más evidencias de que las contribuciones no genéticas también pueden desempeñar un papel importante en la longevidad. Estudios en diversos modelos animales han revelado que varios estímulos ambientales como nutrientes, ejercicio, hormonas y ciclos circadianos son capaces de alterar la esperanza de vida y la salud, induciendo cambios epigenéticos (Benayoun *et al.*, 2015).

Una de las estrategias más estudiadas para inducir tales cambios es la restricción calórica. De hecho, un estudio realizado en moscas demostró que esta estrategia es capaz de retrasar los cambios epigenéticos asociados al envejecimiento normal (es decir, pérdida relacionada con la edad de la heterocromatina facultativa) en 3 días y de forma reversible (Jiang *et al.*, 2013). En este sentido, los centenarios son epigenéticamente más jóvenes de lo que les correspondería por edad cronológica y similares a las personas que han seguido regímenes de restricción calórica (Biagi *et al.*, 2017). Esto podría deberse, en parte, a sus hábitos nutricionales particulares, que implican un consumo moderado de alimentos (es decir, poca carne y grasa animal, dieta reducida en calorías), dieta de tipo mediterráneo y regularidad en el tiempo de las comidas, junto con estilos de vida activa, y una microbiota intestinal particular que se adapta a los cambios relacionados con la edad (Biagi *et al.*, 2017). Curiosamente, la regularidad en el tiempo de las comidas se ha sugerido para favorecer su mantenimiento de los ritmos circadianos, incluyendo su ciclo de sueño (Franceschi *et al.*, 2018c).

Además de la epigenética, se han documentado otras particularidades biológicas. En este sentido, se ha demostrado que los centenarios son menos propensos al estrés oxidativo y tienen mejores defensas antioxidantes que el envejecimiento ordinario (Borras *et al.*, 2015; Paolisso *et al.*, 1998). Además, tienen un perfil inmunológico, endocrino y metabólico particular, los cuales se ha

propuesto que ejercen una protección antiinflamatoria contra el *inflammaging* (Franceschi *et al.*, 2017a; Franceschi *et al.*, 1995; Monti *et al.*, 2017). Por ejemplo, se ha sugerido que el estado hipotiroideo que caracteriza a los centenarios puede constituir una adaptación protectora contra un catabolismo excesivo, favoreciendo así la longevidad al reducir la tasa de metabolismo, el estrés oxidativo y la senescencia celular (Garasto *et al.*, 2017). El perfil endocrino de los centenarios también se ha caracterizado por un buen mantenimiento del metabolismo de la glucosa y sensibilidad a la insulina, mientras que los datos relativos al eje GH/IGF-I son controvertidos (Vitale *et al.*, 2017). Otras huellas biológicas específicas de la longevidad y el envejecimiento saludable en humanos se han relacionado con la lipidómica de los centenarios (Jové *et al.*, 2017; Pradas *et al.*, 2019), la glicómica (Monti *et al.*, 2017), la metagenómica (Biagi *et al.*, 2017) y los perfiles metabolómicos (Martin *et al.*, 2017) que podrían revelar las características moleculares “antienvjecimiento” que dotan a los centenarios con una resiliencia única para mostrar una desaceleración del envejecimiento.

Además, se ha relacionado otros factores no biológicos con el envejecimiento saludable. De hecho, diversos estudios psicosociales han mostrado que la educación (Sebastiani & Perls, 2012), la capacidad de hacer frente al estrés (Tafaro *et al.*, 2009), la adaptación a los retos del envejecimiento y los recursos sociales (Blazer, 2008) son también factores protectores que favorecen la longevidad y el envejecimiento saludable entre las personas mayores. Además, en estos estudios se ha observado que los centenarios muestran puntuaciones más bajas para la ansiedad y la depresión que los octogenarios (Dello Buono *et al.*, 1998).

A la luz de lo anterior, es probable que la prevalencia de los centenarios esté aumentando porque la capacidad de sobrevivir a la vejez extrema es multifactorial.

1.2 GENÉTICA

1.2.1 CONCEPTO DE mRNA

El RNA mensajero (mRNA) es el ácido ribonucleico que transfiere el código genético procedente del DNA del núcleo celular al ribosoma en el citoplasma. Determina el orden en que se unirán los aminoácidos de una proteína y actúa como patrón para la síntesis de la misma. Se trata de un ácido nucleico monocatenario (Alberts B. *et al.*, 2010).

El mRNA obtenido después de la transcripción se conoce como RNA transcrito primario de RNA o preRNA (formado por intrones y exones), que en la mayoría de los casos no se libera del complejo de transcripción en forma totalmente activa, sino que ha de sufrir modificaciones (maduración del RNA), basadas en la eliminación de los intrones, antes de ejercer su función (Figura 1.5) (Alberts B. *et al.*, 2010).

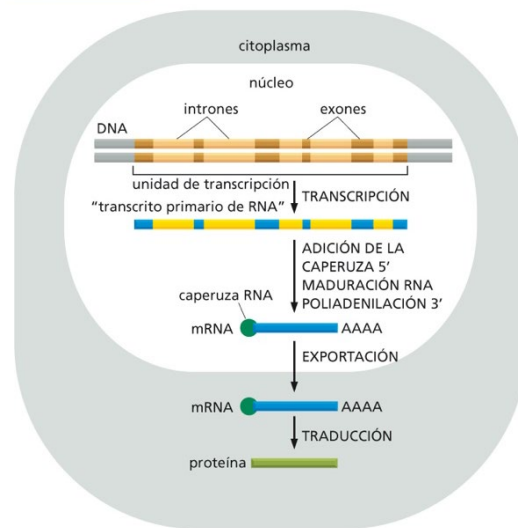


Figura 1.5 Síntesis del mRNA
(Alberts B. et al., 2010)

1.2.2 ESTUDIOS DE mRNA EN EL ENVEJECIMIENTO

La genética de la longevidad extrema se ha intentado determinar a través del análisis de genes candidatos, el mapeo de desequilibrios de ligamiento, el análisis de variaciones de número de copia y, más recientemente, la secuenciación del exoma y del genoma completo. De hecho, la secuenciación del genoma completo es, hasta la fecha, el enfoque más informativo para el análisis genético (Giuliani *et al.*, 2018).

Se ha estimado que la herencia de la longevidad es de aproximadamente el 25 por ciento (Herskind *et al.*, 1996). Además, se ha visto que la esperanza de vida útil es hereditaria en islandeses mayores de 70 años (Gudmundsson *et al.*, 2000). En línea con estos hallazgos, los hermanos de los centenarios de Okinawa mostraron una mayor probabilidad de sobrevivir hasta edades avanzadas, que

comenzó a los 55 años y aumentó con la edad (Willcox *et al.*, 2006). Por lo tanto, cada vez hay más evidencia de que la influencia genética en la longevidad aumenta a partir de los 90 años. En consecuencia, la heredabilidad de vivir hasta los 100 años se ha estimado en 0,33 en mujeres y 0,48 en hombres (Sebastiani & Perls, 2012). Así, los centenarios (100 años de edad), los semisupercentenarios (≥ 105 años de edad) y los supercentenarios (≥ 110 años de edad) son los sujetos que proporcionan una mayor información para investigar la genética de la longevidad humana (Giuliani *et al.*, 2018).

Por ello, se han estudiado ampliamente los centenarios para identificar los llamados "genes de longevidad". En este sentido, se ha propuesto que influye en la longevidad de los seres humanos una lista de entre 300 y más de 750 genes (sin incluir el número de copias raras variants o alelos). Dato *et al.* y Shadyab & LaCroix (Dato *et al.*, 2013; Shadyab & LaCroix, 2015) identificaron muchos genes, incluyendo mitocondriales, que influyen en la esperanza de vida en humanos: *IGF1*, *SOD1*, *SOD2*, *SOD3*, *P53*, *APOE1*, *ATM*, *BCL*, *CETP*, *eNOS*, *FOXO1A*, *FOXO3A*, *KLOTHO*, *LMNA*, *TERC*, *HSPA*, *RAGE*. Algunos de estos genes son conocidos por desempeñar un papel importante en las funciones metabólicas y celulares, como el metabolismo de la glucosa (*IGF1*), el estrés oxidativo (*SOD3*; *HSPA*), mantenimiento del genoma (*P53*), vías cognitivas (*APOE*), metabolismo lipídico (*APOE*, *CETP*) y desarrollo (*FOXO1*) (Govindaraju *et al.*, 2015).

Un estudio exhaustivo estableció la asociación entre una variante cercana al gen *APOE* y la supervivencia más allá de los 90 años en el estudio *European Genetics of Healthy Aging* (GEHA). *APOE* tiene tres alelos comunes, E2, E3 y E4. Estudios epidemiológicos han sugerido que estos alelos podrían afectar a las características relacionadas con la edad, con E4 y E2 desempeñando un papel perjudicial y protector en el envejecimiento, respectivamente. Por ejemplo, Schächter *et al.*

demonstraron que los centenarios franceses tenían aproximadamente la mitad de la proporción del alelo E4 y el doble de la proporción del E2 que el resto de la población examinada (Schächter *et al.*, 1994).

Esta frecuencia más baja del alelo *APOE-ε4* en los centenarios es consistente con el hecho de que sea factor de riesgo para las enfermedades cardíacas, mientras que el aumento de la frecuencia de alelo *APOE-ε2* proporciona evidencia acerca del efecto protector a largo plazo de este alelo, cuando actúa a edades avanzadas. Además, las personas portadoras del alelo *APOE-ε4* son más propensas a desarrollar la enfermedad de Alzheimer (AD), mientras que las personas portadoras del alelo *APOE-ε2* muestran un menor riesgo de padecer dicha enfermedad. También se ha informado de que una variante de la enzima convertidora de angiotensina, que predispone a la cardiopatía coronaria, es sorprendentemente más frecuente en los centenarios, con un aumento significativo del genotipo homocigoto. Otro estudio en centenarios italianos ha demostrado que la frecuencia de la Apolipoproteína B con número variable de repeticiones en tándem (Apo B VNTR) es el 50% de la de los controles jóvenes (De Benedictis *et al.*, 1998), pero esta diferencia no se ha encontrado en los centenarios franceses y finlandeses (Gonos, 2000).

Por último, en nuestro laboratorio demostramos que los centenarios sobreexpresan genes relacionados con la pluripotencia (i.e. *OCT3/4*, *SOX2*, *c-MYC*, *VIM*, *NCAM*, *BMP4* y *BMPR2*), cuando se comparan con los octogenarios, lo cual sugiere que los centenarios mantienen su capacidad de autorrenovar y reponer sus tejidos dañados mejor que los octogenarios, por lo que estarían mejor protegidos contra la senescencia celular (considerada como un *hallmark* del envejecimiento) que los octogenarios (Inglés *et al.*, 2018).

1.2.3 CONCEPTO DE microRNAs. SÍNTESIS Y FUNCIÓN

Un microRNA es un ácido ribonucleico monocatenario de una longitud entre 21 y 25 nucleótidos. Son moléculas transcritas a partir de genes de DNA, pero que no son traducidas a proteínas. Se expresan en una amplia variedad de organismos y tienen la capacidad de regular la expresión de otros genes.

En cuanto a su síntesis, la secuencia de DNA que codifica para un gen de miRNA tiene una longitud que supera al tamaño final del propio miRNA, lo cual conlleva que, en su síntesis, mediada por la RNA polimerasa II, se formen regiones en forma de horquilla, generando un RNA bicatenario primario conocido como *pri-miRNA*, con un casquete (7-metil-guanosina) en el extremo 5' y una cola de poli (A) en el extremo 3'. Estos transcritos primarios se autocomplementan formando estructuras de aproximadamente 80 nucleótidos. Posteriormente, estos *pri-miRNA* son procesados por una enzima nuclear llamada Drosha, que corta las bases de la horquilla, para generar un precursor más pequeño conocido como *pre-miRNA*, de ~65 nucleótidos de longitud. A continuación, el *pre-miRNA* será transportado desde el núcleo al citoplasma por la exportina 5, donde la enzima Dicer lo escindirá formando un miRNA de doble cadena de entre 21 y 24 nucleótidos (Figura 1.6). Pero los miRNAs no trabajan solos, suelen ejercer su regulación induciendo la acción de un complejo de silenciamiento génico, el RISC. Para formar este complejo el miRNA duplex debe ser cargado a proteínas Argonata (Ago) que será la encargada de desenrollar el miRNA dúplex y eliminar la cadena complementaria a la guía, de forma que solamente queda incorporada la cadena guía. Finalmente, se obtiene el miRNA maduro, que se queda junto a Argonata y forman el complejo de silenciamiento inducido miRNA (miRISC) que ya es funcional y es responsable de ejercer la represión de sus mensajeros diana (Ha *et al.*, 2014; Catalanotto *et al.*, 2016).

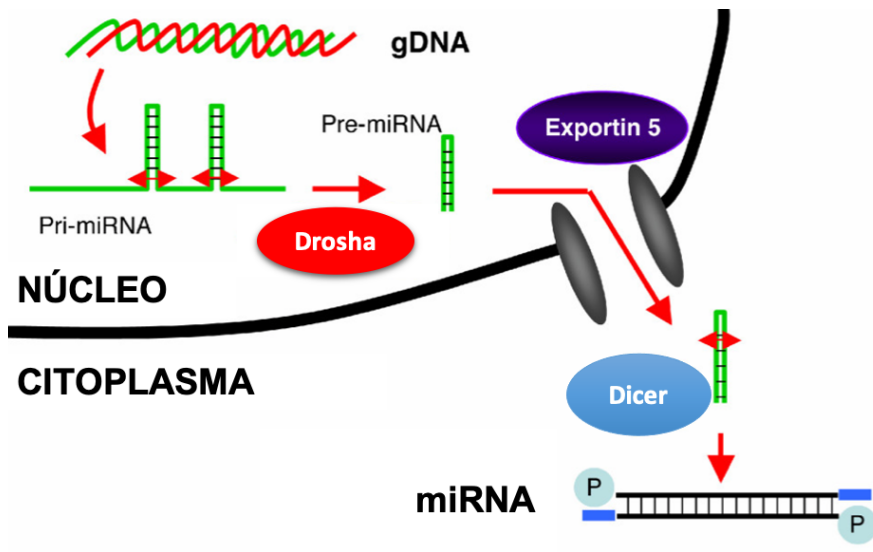


Figura 1.6 Síntesis de un miRNA
(Alberts B. et al., 2010)

El descubrimiento de este sistema de regulación génica bajo el control de RNA pequeños no codificantes (miRNA) ha tenido un impacto significativo en la biología molecular. Son **reguladores pos-transcripcionales** de la expresión génica, se unen por apareamiento imperfecto a sus mRNA blanco, generalmente en la región 3'-no traducible, bloqueando la síntesis de proteínas por desestabilización del mRNA y represión traduccional. Un gran número de miRNA han sido identificados en el genoma de varias especies incluyendo el humano, y el número de miRNA sigue incrementándose debido a los esfuerzos combinados de la biología molecular y a la predicción bioinformática. Se ha descrito que estas moléculas regulan funciones celulares, por lo que no es sorprendente que los miRNA estén implicados en la mayoría de patologías, como el cáncer, la diabetes mellitus y enfermedades asociadas al envejecimiento (Barthel, 2018; Kinser & Pincus, 2020).

La función de los miRNA está relacionada con la regulación de la expresión génica. El estudio en modelos animales *Knockout* de miRNA ha dado como resultado fenotipos anormales, incluyendo defectos celulares, fisiológicos y conductuales, destacando así el papel crucial de estas moléculas pequeñas en una serie de procesos biológicos (Bartel, 2018).

Del mismo modo, los miRNA han sido señalados como reguladores importantes del proceso de envejecimiento y moduladores de la longevidad (Kinser & Pincus, 2020)

1.2.4 RELACIÓN ENTRE mRNA, miRNA Y EXPRESIÓN GÉNICA.

La actividad de un gen comienza con la transcripción, proceso que consiste en la síntesis de una molécula de RNA mediante el copiado de una porción de una de las hebras del DNA (unidad de transcripción) que se extiende desde una secuencia génica denominada promotor hasta el terminador. La reacción es catalizada por una RNA polimerasa y comprende eventos complejos, tales como el desenrollamiento del DNA, el reconocimiento de secuencias del promotor o la presencia de factores de transcripción entre otros (Kornberg, 2005).

El primer producto de la transcripción es un transcrito primario o pre-RNA, una molécula de mRNA inactiva que debe sufrir modificaciones en el propio núcleo celular (maduración del mRNA) antes de poder ejercer su función en el citosol. Es por tanto obvio que la alteración o ausencia de esas modificaciones es el primer control de la transcripción que ejerce la célula. Entre esas modificaciones se encuentran los siguientes procesos:

- Adición al extremo 5' de una estructura denominada «caperuza» o «casquete», que es un nucleótido modificado de guanina, la 7-metilguanosina trifosfato, que se añade al extremo 5' de la cadena del mRNA transcrito

primario. Su función es proteger al transcrito de la degradación, también ayuda al ribosoma a unirse al mRNA para comenzar la transcripción

- Proceso de poliadenilación que consiste en la adición al extremo 3' de una cola poli-A, una secuencia larga de poliadenilato, es decir, un tramo de RNA cuyas bases son todas adenina. Esta cola proporciona estabilidad al mRNA en el citoplasma, lo ayuda a ser exportado del núcleo al citosol y lo protege de la degradación. Además, aumenta su vida media y de este modo puede sintetizar mayor cantidad de proteína (Nevins, 1983; Lewin, 1990)
- La siguiente modificación es la eliminación y empalme de fragmentos (*splicing*). En la mayoría de los casos, el mRNA todavía en el núcleo, sufre la eliminación de secuencias internas, no codificantes, llamadas intrones y la conexión o empalme de los exones durante el *splicing* (Smith *et al.*, 1989). Cuando este proceso de corte y empalme es selectivo, un mismo transcrito primario o pre-RNA_m se puede ajustar de diversas maneras, y esto permite que con un solo gen se obtengan varias proteínas diferentes; a este fenómeno se le llama *alternative splicing* o ajuste alternativo.

Finalmente, una vez que el mRNA maduro pasa al citoplasma tiene lugar la síntesis proteica, un proceso con multitud de eventos, en el que participan los tres tipos de RNA celulares (tRNA, rRNA, mRNA), varias proteínas estructurales (ribosómicas) y factores de transcripción.

Por otro lado, y como ya se ha mencionado con anterioridad, los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA endógeno que no codifican para proteína y que actúan como moléculas reguladoras postranscripcionales de la expresión génica. Este papel regulador se lleva a cabo mediante la unión por complementariedad de bases al mRNA diana (más concretamente a la región 3' UTR), provocando su represión transcripcional o degradación.

Forman parte de una de las clases más abundantes de moléculas reguladoras en organismos multicelulares; además, son de gran importancia en la homeostasis celular y en el desarrollo y diferenciación celular. Un solo microRNA puede tener cientos de mRNA diana, por lo que pueden controlar la expresión de un gran número de genes.

Al participar en numerosos procesos celulares, la alteración de la expresión de los miRNAs puede propiciar la aparición de un gran número de patologías. Es por ello que los miRNAs pueden regular negativamente la expresión génica a través de dos mecanismos: la degradación del mRNA diana o mediante la represión traduccional. Será el mRNA diana y su grado de complementariedad con el miRNA el que determinará la utilización de uno u otro mecanismo. Así, si la complementariedad es elevada o total, como ocurre en las plantas, se producirá la degradación del mRNA (Meister & Tuschli, 2004), mientras que si la complementariedad de los miRNAs con la región 3' UTR del mRNA no es total o es insuficiente, como ocurre en los animales, se producirá una inhibición de la traducción.

La concentración intracelular de miRNA depende de la transcripción, procesamiento y renovación. A diferencia de los mRNAs, los miRNA son moléculas muy estables cuya vida media es 10 veces mayor que la de los mRNAs. Si bien, de forma similar a éstos, la regulación de la transcripción de los miRNAs es dependiente del tejido y línea celular. Actualmente se sabe que cada tejido y cada célula puede expresar miRNAs específicos, y aunque un mismo miRNA puede ser expresado en distintos tejidos o líneas celulares, su función puede variar en uno u otro. En definitiva, se estima que el 30% de los genes humanos son regulados por mecanismos dependientes de los miRNA (Pabón-Martínez, 2011; Lin & Gregory, 2015).

La piedra angular del funcionamiento del miRNA es la formación del complejo denominado RISC que se compone de una proteína AGO y una molécula de miRNA. La utilidad de este complejo se debe a los siguientes factores: (i) los miRNA pueden reconocer específicamente sus mRNA diana a través del emparejamiento de bases de Watson y Crick y, al mismo tiempo, pueden separarse y volver a adherirse fácilmente a diferentes dianas, ejerciendo así su control en serie en una amplia gama de moléculas diana; (ii) las proteínas AGO proporcionan una plataforma muy eficiente sobre la cual los cofactores moduladores pueden unirse a sus objetivos. Es decir, el miRNA es el que se encarga del reconocimiento del mRNA diana que se va a modular y AGO determina cuál va a ser el modo de acción, según qué proteínas reguladoras se recluten al complejo (Lui *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2005).

Los RISC de mamíferos no suelen adoptar la capacidad endonucleolítica de degradar los mRNAs celulares, ya que, normalmente, el apareamiento de bases entre miRNA-mRNA no es perfecto. Así pues, muy a menudo, el complejo RISC (AGO y miRNA) actúa como una plataforma para reclutar diferentes tipos de proteínas que, según su funcionalidad, son las que definirán el destino final de los mRNAs diana (Fabian & Sonenberg, 2012).

Desde su descubrimiento hace 20 años, la función principal del miRNA-RISC (miRISC) parecía ser la regulación del mRNA postranscripcional en el citoplasma. Varios modelos han sido propuestos para explicar cómo el complejo miRNA-RISC controla el destino del mRNA. En general, los miRISC dificultan la traducción o mejoran la degradación del mRNA. Así, durante mucho tiempo, la idea predominante fue que la variación en la composición de los RISC conducía a mecanismos alternativos para el control postranscripcional. Más recientemente, la perspectiva ha cambiado y el modelo actual propone que, en un proceso secuencial, el RISC actúa inhibiendo la traducción del mRNA al principio y

posteriormente iniciando la degradación (Meijer *et al* 2013). Sin embargo, se ha sugerido que el orden secuencial de estos dos eventos refleja las diferencias cinéticas entre la represión traduccional y la desintegración del mRNA en lugar de una relación de causa y efecto entre ellos (Djuranovic *et al.*, 2012; Bazzini *et al.*, 2012).

Diversos autores han descrito que miRISC reconoce y se une al mRNA, pudiendo actuar dificultando su traducción o potenciando su degradación. Esto ocurre en un proceso secuencial, primero se inhibe la traducción y luego se degradan los mensajeros, por tanto, el miRISC puede actuar a nivel de inicio de la traducción, aunque cabe destacar que en el estudio realizado por Béthune *et al.* se mostró que la desadenilación y la desintegración del mRNA prevalecen en el estado estacionario (Béthune *et al.*, 2012).

Asimismo, en los últimos años, ha habido varios informes que indican que los complejos miRISC también están presentes en los núcleos de las células de los mamíferos (Catalanotto *et al.*, 2016).

Rigurosamente hablando, el término **expresión génica** abarca desde la activación del gen hasta que la proteína madura se localiza en el lugar adecuado y es plenamente funcional, de tal manera que dicha proteína contribuye a la expresión del fenotipo celular.

Es un hecho que la abundancia de un mRNA y el número de moléculas de ese transcrito se correlaciona con el nivel de síntesis de la proteína correspondiente y, por esta razón, el grado de expresión de un gen puede ser estudiado con gran aproximación mediante detección y/o cuantificación de los mRNAs funcionales del citoplasma, utilizando principalmente RT-PCR e hibridación *in situ*.

Sin embargo, la expresión génica no es necesariamente un proceso automático una vez se ha iniciado, sino que existen unos niveles de control intermedios (Darnell *et al.*, 1982). Uno de estos controles intermedios que regulan

la expresión génica controlando los niveles de mRNA, es la regulación post-transcripcional que ejercen los miRNAs. Normalmente la célula coordina la tasa de degradación o estabilización de sus mRNA según las necesidades que tenga de dichas proteínas. Así se pueden dar estímulos celulares, tanto intrínsecos como extrínsecos, que activan vías de transducción de señales y que modifican los distintos mecanismos de descomposición del mRNA.

Es decir, la concentración de mRNAs funcionales disponibles para traducción a proteína depende, no sólo de la tasa de síntesis de mRNA, sino también de la estabilidad relativa del mRNA, una vez localizado en el citoplasma. Cuando se detecta un incremento o reducción del nivel de un mRNA en el estado estacionario en respuesta un estímulo particular, se puede precisar si esto ocurre por mecanismos transcripcionales.

1.2.5 TRANSCRIPTÓMICA FUNCIONAL Y REGULACIÓN

La transcriptómica funcional estudia la forma en la que se pueden usar los datos de los transcriptomas para explorar la función génica. Así pues, el obtener un listado de los transcritos en una determinada célula o en un grupo poblacional puede ofrecer información sobre la función de un determinado gen. Es decir, si un gen se expresa en el tejido adiposo y no en el óseo o muscular, el gen desconocido pudiera estar implicado en el almacenamiento de grasa o en el metabolismo, del mismo modo que si un gen o un transcrito se expresa en una persona centenaria pero no en la octogenaria o en los jóvenes, puede inferirse su implicación en la longevidad extrema (Samuels *et al.*, 2021).

Evolutivamente, en los eucariotas, han ido apareciendo mecanismos de regulación postranscripcionales cada vez más sofisticados, como el control por microRNAs, dando lugar a esquemas más complejos que regulan la estabilidad del

mRNA. Sin embargo, es cierto que el mecanismo de estabilización por traducción sigue siendo el que desempeña un papel más destacado en la regulación del transcriptoma eucariota. Un análisis cuantitativo del impacto de la actividad de traducción en la regulación del transcriptoma ha mostrado una correlación positiva moderada, entre el índice de traducción del mRNA y la abundancia de mRNA en la tasa de transcripción (Jiang *et al* 2018). Por tanto, una alta actividad de traducción protege a una especie de mRNA de la degradación, mientras que otros mRNA menos traducidos se degradan activamente y se eliminan del transcriptoma. Esto conduce al enriquecimiento de esa especie de mRNA. Por el contrario, la baja actividad de traducción hace que una especie de mRNA sea más susceptible al proceso de degradación (Jiang *et al.*, 2018).

1.3 MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN EL ENVEJECIMIENTO EXITOSO

1.3.1 ESTRÉS OXIDATIVO

El proceso de envejecimiento está asociado, entre otros, con inflamación, activación del “factor nuclear kappa B” (NFkB), descenso de la función inmunitaria (Baeza *et al.*, 2009), aumento de la apoptosis (Chung *et al.*, 2002; Zhang & Herman, 2002), daño a las mitocondrias (Rodríguez *et al.*, 2007), aumento en la tasa de producción de radicales libres y descenso de defensas antioxidantes (Wickens, 2001), con el consiguiente aumento del estrés oxidativo.

El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies, 1985).

A pesar del papel fisiológico que desempeñan algunas especies activadas de oxígeno, también pueden dar lugar a reacciones de oxidación indeseadas, contra las cuales los organismos han tenido que desarrollar defensas antioxidantes (Halliwell, 1996).

La formación de cierta tasa de radicales libres es un proceso normal e inevitable (Slater, 1984), ya que son producto de infinidad de reacciones químicas imprescindibles para la vida celular. En condiciones normales, estas especies tan reactivas no causan daño oxidativo debido a que la célula está provista de gran cantidad de mecanismos antioxidantes. Además, se ha visto que los radicales libres, a dosis moderadas, juegan un papel muy importante en la regulación de procesos de señalización celular (Droge, 2002)

Así pues, el estrés oxidativo puede originarse por: un exceso de sustancias prooxidantes, una deficiencia de agentes antioxidantes, o ambos factores a la vez (Sies, 1983), pudiendo producir así un daño oxidativo a biomoléculas, principalmente lípidos, proteínas y DNA (Bokov *et al.*, 2004).

1.3.1.1 Concepto de radical libre

Radical libre es aquella especie química que contiene uno o más electrones desapareados en su capa de valencia, lo cual confiere a estas especies una gran reactividad (Fridovich, 1978). Se caracterizan por su gran poder oxidante y porque su vida media es normalmente muy corta, aunque varía en función del radical libre (Simic & Taylor, 1988).

Los radicales libres abundan en los sistemas vivos y han sido propuestos como una de las causas del origen de la vida en nuestro planeta (Harman, 2001).

Por tanto, vemos como el oxígeno tiene una “doble cara”: por una parte, interviene en el origen a la vida y por otra, debido a su capacidad para formar distintos radicales libres, es capaz de dañar estructuras esenciales para el desarrollo de ésta, tales como el DNA, proteínas, glúcidos y lípidos (Sies, 1983; Halliwell & Gutteridge, 1985; Bokov *et al.*, 2004).

Además, los radicales libres intervienen en procesos fisiopatológicos, tales como cáncer, aterosclerosis, diabetes, enfermedades neurodegenerativas e inflamatorias y en procesos fisiológicos como el envejecimiento y el ejercicio físico agotador (Davies *et al.*, 1982; Pacifici & Davies, 1991; Sastre *et al.*, 1992; Durackova, 2010; Nogueira & Hay, 2013).

En la naturaleza, son mayoritariamente compuestos derivados del oxígeno y se denominan especies reactivas del oxígeno (ROS). Estas especies, o bien son muy reactivas, o son dar lugar a especies reactivas (Tabla 1.1). Algunas de ellas son auténticos radicales libres derivados del oxígeno, como el radical hidroxilo. Otras como el H_2O_2 , no son en realidad radicales en el sentido estricto de su definición. Además, existen otras especies radicalarias no derivadas del oxígeno que están tomando interés en los últimos años, como las derivadas del nitrógeno (RNS).

Tabla 1.1. Especies activadas del oxígeno y nitrógeno

ESPECIE	SÍMBOLO
Radical superóxido	$\cdot O_2^-$
Radical hidroperóxido	$HO_2\cdot$
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Radical hidroxilo	$\cdot OH$
Radical alcóxido	$RO\cdot$
Radical peróxido	$ROO\cdot$
Óxido nítrico	$NO\cdot$
Dióxido de nitrógeno	$NO_2\cdot$

1.3.1.2 Génesis de radicales libres

Las especies reactivas de oxígeno pueden tener un origen exógeno o endógeno (Finkel & Holbrook, 2000). Los radicales libres de origen exógeno son aquellos que provienen de fuentes externas al organismo, tales como la dieta (en la que son ingeridos muchos compuestos de naturaleza prooxidante), xenobióticos, toxinas ambientales (humo del tabaco, contaminación ambiental), radiaciones ionizantes y luz ultravioleta.

Los radicales libres de origen endógeno son aquellos que se producen en el interior de la célula. Muchos procesos biológicos liberan ROS como productos de desecho, a través de una vía de señalización celular o como mecanismo de defensa (Morgan & Liu, 2011). Entre ellos destacan la reacción de Fenton-Haber-Weiss, la familia de las nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH oxidasas), los peroxisomas, citocromo p450, citoquinas, factores de crecimiento, lipooxigenasas, ciclooxigenasas y, sobre todo, la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

La cadena de transporte electrónico mitocondrial es una de las principales fuentes generadoras de radicales libres en el interior de la célula (Finkel & Holbrook, 2000; Balaban *et al.*, 2005). Está compuesta por una serie de proteínas con capacidad redox que reducen al oxígeno molecular hasta la formación de una molécula de agua. Esta reacción está acoplada a la fosforilación oxidativa, en la cual se produce energía en forma de adenosín trifosfato (ATP).

1.3.1.3 Mecanismos de protección frente a los radicales libres: antioxidantes fisiológicos

Dado que los seres vivos han evolucionado en presencia de sustancias oxidantes, han sido dotados de sistemas capaces de hacer frente a este tipo de sustancias tan reactivas. Halliwell en 1995 definió como antioxidante a “cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato” (Sies, 1993; Halliwell & Gutteridge, 1995). Pueden actuar de las siguientes formas:

- Previniendo la formación de ROS.
- Interceptando el ataque de ROS.
- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas.
- Amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de ROS.
- Facilitando la reparación del daño causado por ROS.
- Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.

Bajo el punto de vista de la fisiología celular, los podemos dividir en antioxidantes primarios, secundarios y terciarios.

Los **antioxidantes primarios** previenen la formación de nuevas especies de radicales libres. Estos antioxidantes actúan por conversión de los radicales libres existentes en moléculas menos dañinas, o impidiendo su formación desde otras moléculas. Dentro de este grupo se incluye a la SOD, la glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa y las proteínas ligadoras de metales (ferritina y ceruloplasmina) que

limitan la disponibilidad de hierro necesario para la formación del radical hidroxilo (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Los **antioxidantes secundarios** son protectores no enzimáticos o captadores de radicales libres que intervienen cuando hay superproducción de los mismos y los sistemas enzimáticos están desbordados, previniendo así las reacciones en cadena. Se incluye el glutatión, la vitamina E, vitamina C, ácido úrico, bilirrubina y albúmina (Halliwell & Gutteridge, 1990).

Los **antioxidantes terciarios** reparan biomoléculas dañadas por los radicales libres. Entre ellos se encuentran los sistemas proteolíticos intracelulares, que actúan degradando proteínas dañadas oxidativamente, evitando de este modo su acumulación (Davies *et al.*, 1987; Pacific & Davies, 1991). También podemos destacar las enzimas reparadoras de DNA, la metionina sulfóxido reductasa y la fosfolipasa A2, que corta los fosfolípidos oxidados de la membrana (Sevanian *et al.*, 1985).

1.3.1.4 Papel de los antioxidantes en el proceso de envejecimiento

En un estudio se observó que los niveles de diversos antioxidantes, tales como la vitamina E, el urato, la ceruloplasmina y la actividad SOD en diferentes organismos mostraban una correlación con la tasa metabólica multiplicada por la longevidad máxima de cada especie (Cutler, 1984). Consecuentemente, se propuso que la duración de la vida se debería correlacionar con la capacidad de protección antioxidante. En esta línea, se crearon moscas *Drosophila melanogaster* doblemente transgénicas, que sobreexpresaban Cu, Zn-SOD y catalasa y se observó que la disminución del estrés oxidativo se correlacionaba con el aumento de la longevidad media y máxima de dichas moscas (Orr & Sohal, 1994). Además, se enlentecía el proceso de envejecimiento, ya que las moscas transgénicas

presentaban un retraso en la pérdida de la capacidad física y niveles inferiores de daño oxidativo a proteínas.

Sin embargo, tal y como se ha comentado anteriormente, diversos estudios han generado controversia en cuanto al papel de los antioxidantes en el proceso de envejecimiento. Así, se ha visto que la sobreexpresión de enzimas antioxidantes o la administración de sustancias antioxidantes no siempre prolonga la vida en ratones (Huang *et al.*, 2000; Perez *et al.*, 2009; Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2014) ni en humanos (Howes, 2006; Bjelakovic *et al.*, 2007). En estos estudios, se ha visto como el suministro de sustancias antioxidantes no sólo no disminuye la incidencia de eventos adversos (como el cáncer o enfermedades cardiovasculares), sino que incluso puede producir efectos indeseados o aumentar el riesgo de mortalidad.

1.3.1.5 Estrés oxidativo y daño a biomoléculas

1.3.1.5.1 *Daño oxidativo a lípidos*

De los principales tipos de biomoléculas, los lípidos y, sobre todo, los ácidos grasos poliinsaturados, son los más susceptibles de ser atacados por radicales libres (Cheeseman & Slater, 1993), siendo el radical hidroxilo (OH●), el peróxido (ROO●), el alcoxilo (RO●) y el alquílico (R●) los principales generadores de daño oxidativo a lípidos.

El proceso de ataque oxidativo a lípidos, denominado peroxidación lipídica, comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico (Halliwell, 1994; Krinsky, 1994). Esta reacción se produce preferentemente en los carbonos contiguos a enlaces dobles de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que los radicales formados se pueden estabilizar por resonancia con el enlace doble.

Los radicales peróxido pueden reaccionar con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados, con lo que se propaga la reacción en cadena radicalaria (Halliwell, 1994).

De esta manera, un sólo ataque por un radical libre da lugar a la formación de un gran número de productos de oxidación, sobre todo aldehídos como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-2,3-nonanal (HNE), e hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano (Freeman & Crapo, 1982; Halliwell, 1991; Cheeseman & Slater, 1993; Halliwell, 1994). Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, con lo que causan mutaciones en el DNA y producen daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas (Krinsky, 1994; Hohn *et al.*, 2013).

La peroxidación lipídica se considera un factor muy importante en el envejecimiento de células aeróbicas (Lippman, 1985) y se relaciona con diversos estados patológicos, tales como la inflamación, la arterioesclerosis, las enfermedades neurodegenerativas y el cáncer (Gueraud *et al.*, 2010). Además, el daño oxidativo a los lípidos de membrana constituye, muy probablemente, un factor clave en la disminución de la fluidez de dichas membranas (Shigenaga *et al.*, 1994) y está relacionado con la longevidad de las especies (Jové *et al.*, 2013).

1.3.1.5.2 Daño oxidativo a proteínas

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, especialmente por el radical hidroxilo (Stadtman, 1992). Dentro de los aminoácidos fisiológicos, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina, la y la leucina son los que más procesos oxidativos sufren (Davies *et al.*, 1987; Hohn *et al.*, 2013).

En la Tabla 1.2 se resumen los sistemas fisiológicamente más importantes que producen la oxidación de proteínas.

Tabla 1.2. Sistemas más importantes que generan la oxidación de proteínas.

ENZIMÁTICOS	NO ENZIMÁTICOS
NAD(P)H oxidasas/ NAD(P)H/ Fe(III)/ O ₂	Ascorbato/Fe(III)/O ₂
Xantina oxidasa/ Hipoxantina/ Fe(III)/ O ₂	RSH/Fe(III)/O ₂
Citocromo P450 reductasa/ Citocromo P450/ NADPH/ Fe(III)/ O ₂	Fe(II)/O ₂
Citocromo P450 Reductasa/ redoxina/ Citocromo P450/ NADH/ Fe(III)/ O ₂	Fe(II)/H ₂ O ₂ (reactivo de Fenton)
Nicotinato hidroxilasa/ NADPH/ Fe(III)/ O ₂	Ascorbato/Fe(III)/O ₂

En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como la lisina, prolina y arginina se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de modo que la carbonilación de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas (Stadtman, 1992; Dalle-Donne *et al.*, 2003). Otros aminoácidos como la histidina, cisteína y metionina, presentan daño oxidativo, pero de manera indirecta, por los productos generados durante la peroxidación (MDA, HNE, entre otros), pero no forman derivados de tipo carbonilo (Stadtman, 1992).

Como consecuencia, la exposición proteica a los radicales libres puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína, produciendo así modificaciones en su estructura primaria, secundaria y, en última instancia, terciaria, lo cual, a su vez, puede dar lugar a una pérdida o modificación de su función biológica, que suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de dicha proteína (Dean *et al.*, 1993). Además, si dichas proteínas disfuncionales no son degradadas, los residuos hidrofóbicos pueden formar agregados proteicos que, con el tiempo, se

entrecruzan covalentemente, dando lugar al complejo proteico conocido como lipofuscina (Hohn *et al.*, 2013).

1.3.1.5.3 Daño oxidativo a glúcidos

Los glúcidos reaccionan con facilidad con el radical hidroxilo. Los monosacáridos y disacáridos resisten la acción de los radicales libres de oxígeno. La glucosa constituye un captador del radical superóxido, al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas. La manosa y el manitol son eliminadores del radical hidroxilo. Por ello, se ha observado que diversos polisacáridos actúan como agentes protectores celulares (Albertini *et al.*, 1996).

El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres (Borel *et al.*, 1988), dando lugar a procesos degenerativos. Un caso especial es el del ácido hialurónico, cuya función estructural reside en mantener la viscosidad del fluido sinovial. La exposición a agentes oxidantes, sobre todo al radical superóxido, provoca su fragmentación, lo cual conduce a la desestabilización del tejido conectivo y a la pérdida de viscosidad del fluido sinovial, como es el caso de la artritis reumatoide (Greenwald & Moy 1980). Se ha observado que la SOD es capaz de proteger frente a la despolimerización del ácido hialurónico en el líquido sinovial (McCord, 1974). Los proteoglicanos están sujetos a rotura oxidativa de forma similar (Greenwald & Moy, 1980).

1.3.1.5.4 Daño oxidativo al DNA

El DNA también es susceptible de daño oxidativo, pudiendo así encontrar diversos subproductos tras dicho ataque oxidativo. Entre ellos, la oxidación de la 2-desoxiguanosina a 8-hidroxi 2'-desoxiguanosina (8-OHdG) es una de las lesiones

más frecuentes, la cual reviste gran importancia por su elevado efecto mutagénico, ya que durante la replicación producirá transversiones de purinas (Kasai & Nishimura, 1984; Shibutani *et al.*, 1992).

El daño oxidativo asociado a las proteínas y al DNA no debe ser considerado de manera independiente. La acumulación de formas inactivas de enzimas reparadoras puede aumentar la acumulación de daño oxidativo en el DNA, por lo que se pueden potenciar uno a otro. Cuando la replicación del DNA dañado tiene lugar antes de la reparación o cuando un DNA dañado se repara de manera incorrecta, tiene lugar una mutación (Breen & Murphy, 1995). Por ello, las lesiones oxidativas en el DNA parecen estar implicadas, no sólo en el envejecimiento celular, sino también en la patogénesis de las enfermedades asociadas a la edad avanzada. El DNA dañado es reparado por enzimas que cortan la parte afectada, que es entonces excretada por la orina (Viguie *et al.*, 1993). Puesto que las enzimas reparadoras no llegan a eliminar todas las lesiones se acumulan, por lo que el número de mutaciones aumenta con la edad (Viguie *et al.*, 1993).

El DNA mitocondrial sufre mucho más daño oxidativo que el nuclear (Richter *et al.*, 1988), ya que presenta ciertos rasgos que le hacen especialmente susceptible de ser atacado por agentes oxidantes: carece de histonas que puedan recibir el ataque en lugar del DNA (Johns, 1995); el sistema de reparación es menos efectivo (Suter & Richter, 1999) y, por último, se encuentra muy cerca de la cadena de transporte mitocondrial, uno de los sistemas principales de producción de especies reactivas del oxígeno (Giulivi & Davies, 1993). Otro factor distintivo del DNA mitocondrial es que no posee intrones, de manera que la modificación de cualquier base afecta usualmente a una zona de DNA codificante (Linnane *et al.* 1989) y su repercusión suele ser, por tanto, más importante.

1.3.1.6 Marcadores de estrés oxidativo

Dada la importancia del daño que el estrés oxidativo puede producir en las células y en el organismo, en los últimos años se ha intentado encontrar índices que nos permitan medirlo. Entre los marcadores o indicadores propuestos se encuentra el cociente glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH), como indicador del estado redox, de modo que un aumento en la concentración de glutatión oxidado produce una alteración de dicho estado redox celular (Sies, 1986).

El estrés oxidativo modifica la actividad de las proteínas, provocando cambios en su función, y haciéndolas más susceptibles a la degradación (Stadtman, 1992). La interacción directa ROS-proteína, en presencia de metales, produce derivados carbonilos altamente reactivos que resultan de la oxidación de las cadenas laterales de residuos de lisina, arginina, prolina y treonina, de la ruptura del enlace peptídico mediante la ruta de la α -amidación o de la oxidación de residuos de ácido glutámico (Stadtman, 2003). Estos grupos carbonilo (aldehídos y cetonas) se pueden detectar mediante la técnica *Western blotting* (ver apartado de material y métodos de la presente tesis) y su cuantificación es el método más empleado para determinar la oxidación proteica (Berlett & Stadtman, 1997; Chevion *et al.*, 2000; Beal, 2002; Dalle-Donne *et al.*, 2003).

Además, como indicadores de daño oxidativo a lípidos, el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-2,3-nonenal son los más empleados, aunque también se pueden considerar los niveles de pentano y de etano. El MDA es uno de los productos generados durante el proceso de la oxidación de los lípidos en las membranas biológicas, capaz de provocar una alteración estructural en las mismas que desemboca en una pérdida de fluidez y, por tanto, un aumento de su rigidez (Shigenaga *et al.*, 1994). Por ello, es un índice ampliamente utilizado para conocer

el nivel de oxidación lipídica de las membranas celulares. Se han descrito varios métodos para la determinación de MDA (Bird & Draper, 1984; Esterbauer *et al.*, 1991). La mayoría son poco específicos, ya que utilizan el ácido tiobarbitúrico como reactivo y éste reacciona con todos los aldehídos de la muestra. Estos métodos se han mejorado gracias a la separación, por cromatografía líquida de alta resolución, del aducto malondialdehído- ácido tiobarbitúrico de otras sustancias que puedan interferir en la determinación (Knight *et al.*, 1988).

1.4 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Debido al aumento de la esperanza de vida que ha tenido lugar en los últimos años, las estimaciones de esperanza de vida activa (exenta de discapacidad) y de prevalencia de discapacidad entre la población anciana proporcionan las herramientas necesarias para conformar los actuales y futuros escenarios del gasto sanitario público y privado en estas materias.

Como hemos comentado en la Introducción, los centenarios son considerados como un modelo de envejecimiento excepcional, ya que, en ellos, las enfermedades asociadas a la edad o comorbilidades suelen aparecer a edades más tardías y se desarrollan más lentamente. Esto hace que su periodo de vida libre de discapacidad sea mayor que el de las personas que muestran un envejecimiento normal.

Por ello, identificar los mecanismos moleculares que pueden contribuir al envejecimiento exitoso contribuiría a ampliar el conocimiento sobre los factores que influyen en la longevidad libre de discapacidad.

Por tanto, la presente tesis, pretende contribuir a la identificación de los mecanismos moleculares implicados en el envejecimiento exitoso que caracteriza a los centenarios.

1.5 HIPÓTESIS DE TRABAJO

La hipótesis de la presente tesis es que las personas centenarias poseen un patrón de expresión de miRNAs y mRNAs característicos que difiere de los septuagenarios, así como un menor nivel de estrés oxidativo, que podría condicionar mecanismos moleculares particulares en este grupo de personas excepcionalmente longevas.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo general

El objetivo general de la presente tesis es esclarecer si las personas centenarias tienen un perfil genético de expresión característico en comparación con personas septuagenarias y jóvenes, así como evaluar sus diferencias a nivel de estrés oxidativo.

1.6.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

1. Identificar los mRNAs y miRNAs expresados diferencialmente en centenarios, en comparación con personas septuagenarias y jóvenes.
2. Identificar los procesos biológicos que agrupan un mayor número de genes característicos de centenarios.
3. Identificar los genes que, funcional o estructuralmente, se relacionan con los genes característicos de los centenarios.
4. Evaluar si existen diferencias a nivel de estrés oxidativo entre los tres grupos de edad.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MUESTRA

Los sujetos, objeto de esta tesis, fueron seleccionados de un estudio demográfico de centenarios realizado por *The Spanish Centenarian Study Group* en 2007 en una zona cercana a Valencia, conocida como La Ribera, que comprende 29 pueblos y 240.000 habitantes. Esta zona, donde el índice de prevalencia de centenarios es superior a la media, pertenece al Departamento 11 de Salud de la Comunidad Valenciana y allí se encuentra el Hospital Universitario La Ribera, en la localidad de Alzira.

Para la presente tesis se reclutaron un total de 71 sujetos, divididos en 3 grupos: 31 centenarios, 20 septuagenarios y 20 jóvenes.

De todos ellos sólo 20 centenarios, 16 septuagenarios y 14 jóvenes pudieron formar parte del estudio tras la aplicación de los criterios de inclusión y exclusión que a continuación se detallan.

Los criterios de inclusión para formar parte del estudio fueron los siguientes:

- Para los centenarios, haber nacido antes de 1908.
- Para los septuagenarios, haber nacido entre 1928 y 1938.
- Para los jóvenes, haber nacido entre 1968 y 1988.
- Todos deberían haber pertenecido al área 11ª de Salud de la Comunidad Valenciana durante, al menos, los 6 últimos años.
- Todos los pacientes (o representantes legales) debieron firmar el consentimiento informado.

El único criterio de exclusión fue la presencia de cualquier enfermedad terminal.

2.2 DISEÑO DEL ESTUDIO Y CONSIDERACIONES ÉTICAS

El estudio fue concebido como un estudio longitudinal, de base poblacional, tipo cohorte abierta.

El ámbito del estudio fue la zona de la Ribera, Valencia, España.

A continuación, en la Figura 2.1 se muestra un esquema del estudio, donde se puede observar el número total de sujetos reclutados y la división en los diferentes grupos de estudio.

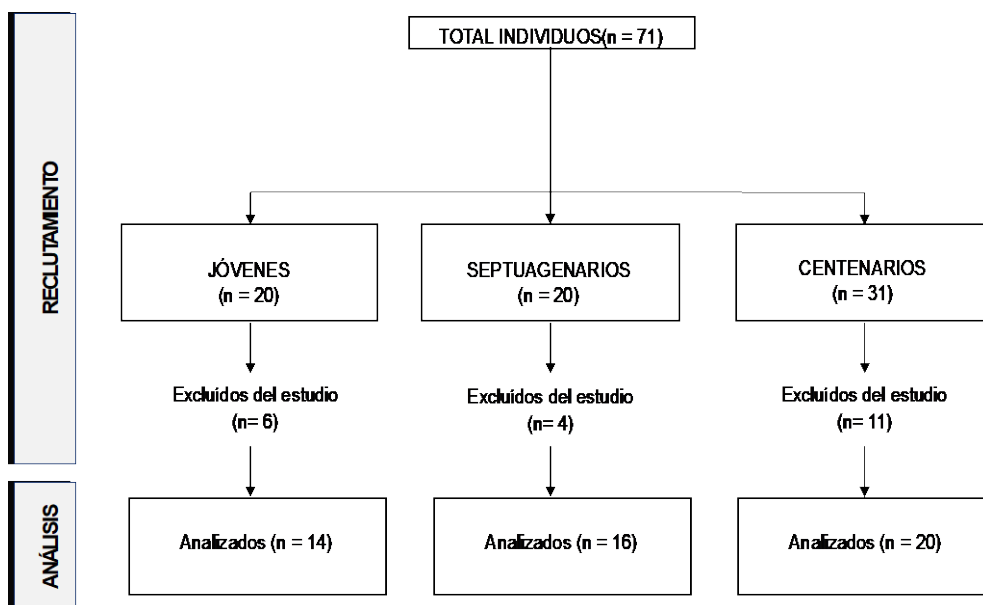


Figura 2.1. Esquema del diseño del estudio

Todos los individuos fueron informados acerca de la naturaleza y objetivos del estudio, la voluntareidad del mismo y se solicitó su consentimiento informado por escrito (Anexo 2).

El estudio se sometió a los principios de bioética recogidos en la declaración de Helsinki y a la legislación española pertinente. Además, contó con la aprobación del comité ético de investigación clínica del Hospital de Alzira (Anexo 3).

2.3 RECURSOS MATERIALES

2.3.1 RECURSOS MATERIALES CLÍNICOS

La fase clínica del presente estudio fue llevada a cabo en el Hospital de La Ribera, en el término municipal de Alzira, y en el propio domicilio de los sujetos. En esta fase se emplearon los siguientes materiales:

- Hoja de información al paciente y consentimiento informado (Anexo 2).
- Balanza de precisión digital SECA, modelo 803, capacidad 150 Kg, para determinar el peso del paciente.
- Tallímetro de pared SECA para la determinación de la altura. Rango de medición: 0-220 cm, peso: 202 g.
- Material para extracción sanguínea:
 - Impresos de petición de analítica.
 - Nevera portátil KODIAK R16 (capacidad 11L) para transporte de muestras, con capacidad de regulación térmica.
 - Compresor o torniquete.
 - Contenedor de objetos punzantes BD (capacidad 1.5L).
 - Esparadrapo de papel antialérgico MEDAPORE.

- Etiquetas para la identificación de las muestras.
- Gasas estériles MEDICOMP.
- Guantes estériles KIMTECH.
- Jeringuillas y agujas intravenosas.
- Povidona yodada.
- Tubos de extracción de sangre BD Vacutainer® PPT™ (*Plasma Preparation Tube*) (BD, Franklin Lakes, NJ) con EDTA (8,5mL), para medir parámetros bioquímicos de laboratorio y de estrés oxidativo.
- Tubos de extracción de sangre BD Vacutainer® CPT™ (*Cell Preparation Tube*) (BD, Franklin Lakes, NJ) con heparina sódica (8 mL) para aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

2.3.2 RECURSOS MATERIALES DE LABORATORIO

La fase experimental de este trabajo fue llevada a cabo en el Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

En este apartado se detallan los aparatos y reactivos de laboratorio utilizados para la medición de las distintas variables bioquímicas de la presente tesis.

2.3.2.1 Aparatos

- Balanzas:
 - Balanza de precisión Sartorius, modelo 6110 *balance*, sensibilidad ± 0.0001 g.
 - Balanza Gram precision, modelo AHZ, sensibilidad ± 0.01 g.

- Centrífugas:
 - Centrífuga Hettich, rotina 35 R para eppendorfs.
 - Centrífuga Thermo scientific, Sorvall legend XTR.
 - Centrífuga Sigma, 1-14.
- Espectrofotómetro (Cecil, CE3021, 3000 series) para determinación de concentración de proteínas totales.
- Material para el aislamiento de miRNA/ RNA:
 - Espectrofotómetro GeneQuant Pro Classic (GE Healthcare) para determinar por OD 260/280 la pureza y concentración de RNA.
 - Bioanalizador 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA; USA) dónde se miden los LabChip a través de un programa específico (electroforesis capilar, perfiles de integridad, valor RIN).
- Material para expresión de miRNA/ RNA:
 - Termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystem).
 - Horno de hibridación específico Hybridization Oven 640 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)
 - Estación de lavados GeneChip®Fluidics Station 450 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), protocolo FS450_0003
 - GeneChip®Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) y las imágenes se analizaron con el programa *GeneChip®Command Console* (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) y el programa miRNA QC Tool v.1.1.10 (www.affymetrix.com)
- Material para la obtención cDNA: Termociclador *Gene Amp®PCR System 9700* (Applied Biosystems).
- Material para la amplificación y cuantificación del cDNA: *7900 HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems).

- Sistema de purificación de agua: Marca MILLIPORE, modelos Milli-Q y Milli-R.
- pHmetro: marca Crison, *pHmeter*, GLP21, con elerctrodo incorporado INGLOD.
- Material para electroforesis (Figura 2.2):
 - Cubetas de electroforesis y electrotransferencia: casa SIGMA-ALDRICH.
 - Fuentes de alimentación de electroforesis: Marca BIO-RAD, modelo PowerPac Basic.
 - Material adicional para electroforesis: peines, cristales... Marca BIO-RAD.



Figura 2.2. Material para electroforesis

- Dispositivo fotográfico: Sistema fotográfico marca Polaroid, modelo MP 4+.
- Equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Figura 2.3): Cromatógrafo DIONEX modelo Ultimate 3000, compuesto por:
 - Bomba marca SHIMADZU, modelo LC-10 AD.
 - Autoinyector SHIMADZU, modelo SIL-10AD vp.

- Detector UV SHIMADZU, modelo SPD-10 AV.
- Detector de fluorescencia RF 2000.
- Controlador del equipo: programa Chromoleon.
- Ordenador
- Columna de fase reversa C18 Hypersil GOLD, dimensiones 150 x 4,6 mm y 5 μ m de partícula.



Figura 2.3. Equipo de HPLC para la determinación de los niveles de MDA

- Campana de gases (flujo laminar vertical):
 - Marca Crumair, 1100-G A.
 - Marca Burdinola, OR-ST 1200.
- Baño seco: Marca Stuart, Block heater, SBH 130 D.
- Agitador magnético: Marca Stuart, Hotplate stirrer, SB 162-3.
- Baño caliente: Marca Clifton, modelo Shaking bath, con agitación regulable.
- Congeladores:
 - (-80°C) Marca Revco, modelo Ultima II.
 - (-80°C) Marca Platinum 500.
 - (-20°C) Marca Liebherr, modelo Comfort Nofrost.

- (2°C) Nevera Lynx.

2.3.2.2 Reactivos

- Aislamiento de miRNA y RNA:
 - Kit mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA) (PN AM1560).
 - Cloroformo (Sigma-Aldrich C2432)
 - Etanol 100% grado HPLC (Sigma-Aldrich E-031)
 - Kit RNA 6000 Nano LabChip® y el marcador de pesos moleculares RNA 6000 Ladder® Ambion para determinar integridad del RNA por electroforesis capilar.

- Expresión de miRNA y RNA:

Para miRNA:

- Microarrays GeneChip® miRNA 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) y oligos controles del microarray: RNA Spike Control Oligos.
- Kit FlahTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit de Genisphere (artíc Eva) / 5X FlahTag Biotin HSR Ligation Mix.

Para RNAs:

- GeneChip Human Gene 1.0ST Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)
- WT Expression Kit (Ambion).

A modo de resumen de los aparatos y reactivos empleados para la extracción, aislamiento, y determinación de perfiles de expresión, puede verse la Tabla 2.1.

Tabla 2 1. Resumen de los aparatos y reactivos empleados para la extracción, aislamiento, y determinación de perfiles de expresión

	miRNA	RNA
EXTRACCIÓN	<p><u>Reactivos:</u> VACUTAINER CPT™ (Cell Preparation Tube) (BD, Franklin Lakes, NJ).</p> <p><u>Aparatos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrífuga Thermo Scientific, Sorvall legend XTR. • Micropipetas 	
AISLAMIENTO:	<p>1. CONCENTRACIÓN (OD 260nm) Y PUREZA (OD 260/280nm):</p> <p><u>Reactivos:</u> Kit mirVana™miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA) (PN AM1560)</p> <p><u>Aparatos:</u> Espectro GeneQuant Pro (GE Healthcare).</p>	
1. CONCENTRACIÓN Y PUREZA		
2. INTEGRIDAD	<p>2. INTEGRIDAD (electroforesis capilar):</p> <p><u>Reactivos:</u> Kit RNA 6000 LabChip® y marcador de PM RNA 6000 Ladder®Ambion.</p> <p><u>Aparatos:</u> Bioanalizador 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA; USA).</p>	
[RNA] partida	200 ng RNA RIN ≥ 7	
PERFILES DE EXPRESIÓN	<p><u>Marcaje:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Kit FlasTag™Biotin HSR RNA Labeling Kit de Genisphere • GeneChip®miRNA 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) 	<p><u>Marcaje:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • WT Expression Kit (Ambion). • GeneChip Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)
	<p><u>Hibridación:</u> Hybridization Oven 640 (Affymetrix) 45°C for 18 hours.</p> <p><u>Lavado:</u> GeneChip®Fluidics Station 450 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Para GeneChip®miRNA 2.0 Array, protocolo FS450-0003 • Para GeneChip Human Gene 1.0 ST Array, protocolo FS 450-0007 	
	<p>Escaneado:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aparato: GeneChip®Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), • Programa: GeneChip®Command Console (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) y miRNA QC Tool v.1.1.10 (www.affymetrix.com) 	

- Obtención cDNA (validación la expresión de genes mediante RT-PCR):
 - Transcriptasa inversa MultiScribe™RT (Applied Biosystems),
 - kit *TaqMan®MicroRNA Assays* (Applied Biosystems) (PN 4366596,4366597).
- Amplificación y cuantificación del cDNA (validación la expresión de genes mediante RT-PCR):
 - Sistema TaqMan® (Applied Biosystems), sondas TaqMan
 - *TaqMan®Universal Master Mix* (Applied Biosystems) (PN 4428173 Rev.B) para 4 miRNAs
 - *TaqMan®Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems) (PN 4369016) para el snoRNA scaRNA17
- Determinación de proteínas totales: Se empleó el *Protein ASSAY kit* de Sigma-Aldrich Química, que contiene el reactivo Lowry y Folin.
- Determinación de proteínas carboniladas: Se empleó el *OxyBlot protein oxidation detection Kit* de Millipore.
- Revelado de las membranas de los *Western blottings*: Para revelar las membranas de polivinilidenedifluoruro (PVDF) (marca BIO-RAD) se empleó el *Proton blot Western blot AP System kit*.
- Otros reactivos químicos: 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (Tris) 1.5 M y 0.5 M, acrilamida/ bisacrilamida, dodecil sulfato sódico (SDS), N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED), β-Mercaptoetanol, ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de potasio (KOH), glicina, azul Comassie, rojo Ponceau, ácido etilendiamino-N,N,N',N'-tetraacético (EDTA), H₂O₂, etc. El resto de los reactivos se obtuvieron de los laboratorios: Sigma-Aldrich Química (España), Boehringer Mannheim S.A. (Alemania), Molecular Probes, Panreac, Merck Biochemica (Alemania).

2.4 MÉTODOS

2.4.1 PROCESADO DE LA MUESTRA BIOLÓGICA

2.4.1.1 Procedimiento de la extracción sanguínea

Las muestras de sangre fueron tomadas en el propio domicilio del sujeto, en ayunas. A continuación, se indican los puntos más importantes del método de extracción:

1. Colocar al sujeto en posición adecuada con el brazo en hiperextensión (el sujeto nunca debe de estar de pie), y el compresor 7-10 cm por encima de la zona de punción elegida.
2. Localizar la vena más adecuada por calibre y movilidad, preferentemente en la fosa antecubital, aplicar antiséptico sobre la zona e introducir la jeringuilla.
3. Llenar cada tubo con cuidado hasta que exista la suficiente cantidad de sangre. Se deben llenar primero los tubos para muestra coagulada y terminar con los tubos con anticoagulantes. Como anticoagulante para el plasma y sangre total se utilizó ácido etilendiamino-N,N,N',N'-tetraacético (EDTA) (plasma) o heparina sódica. Los tubos con anticoagulante deben llenarse hasta consumir todo el vacío para mantener la proporción correcta de anticoagulante y sangre. Una vez llenos, invertir varias veces los tubos.
4. Retirar la aguja y ejercer presión sobre la zona de punción con la gasa hasta que deje de sangrar.
5. Meter los tubos o bien directamente en un congelador de -80°C o en la nevera para ser transportados al laboratorio.

2.4.1.2 Procedimiento de la obtención del plasma

Una vez extraída la sangre con los tubos de extracción de sangre BD Vacutainer® PPT™ (Plasma Preparation Tube) (BD, Franklin Lakes, NJ) con EDTA (8,5mL), éstos se centrifugaron durante 10 minutos a 2200 G, en un tiempo no superior a una hora después de la extracción.

El plasma sobrenadante se aspiró cuidadosamente y se alícuotó en crioviales de 1.5 mL (cada criovial debía estar adecuadamente etiquetado e identificado). Seguidamente, éstos se almacenaron en cajas de crioolmacenaje y se guardaron en un congelador de -80°C para las posteriores determinaciones de parámetros bioquímicos y de estrés oxidativo.

2.4.1.3 Procedimiento de la obtención de células mononucleares de sangre periférica

Una vez extraída la sangre en el tubo correspondiente (VACUTAINER CPT™), se centrifugó durante 15 minutos a 3000 g y temperatura ambiente, en un tiempo no superior a una hora después de la extracción. El protocolo de centrifugación indica no usar freno para evitar la rotura de la fase monocitarias. Los tubos CPT permiten, en un solo paso, la separación y transporte de PBMC, estandarizando y simplificando el proceso. Como anticoagulante contienen heparina de sodio, y un gel como medio para la formación del gradiente de densidad (Ficoll) que permite la separación de células.

Tras la centrifugación, en los CPT se forman varias capas según el gradiente de densidad distinguiéndose tres anillos (Figura 2.4):

1. Eritrocitos y granulocitos, cuya densidad es mayor que la del Ficoll y lo atraviesan depositándose en el inferior (anillo inferior).
2. PBMC, al ser de menor densidad que el Ficoll, no lo atraviesan y quedan retenidas en la interfase, formando una capa fina y opalescente que forma una barrera estable e impermeable entre el sedimento situado en la parte inferior del tubo y el plasma situado en la zona superior (anillo blanco intermedio).
3. Plasma (anillo superior).

Tras la centrifugación, se descartó el plasma con ayuda de una pipeta y se recogió el anillo blanco intermedio que contiene las PBMC. Estas células fueron lavadas dos veces con PBS y se congelaron a -80°C en crioviales de 1.5 mL para el posterior aislamiento del RNA y miRNA.

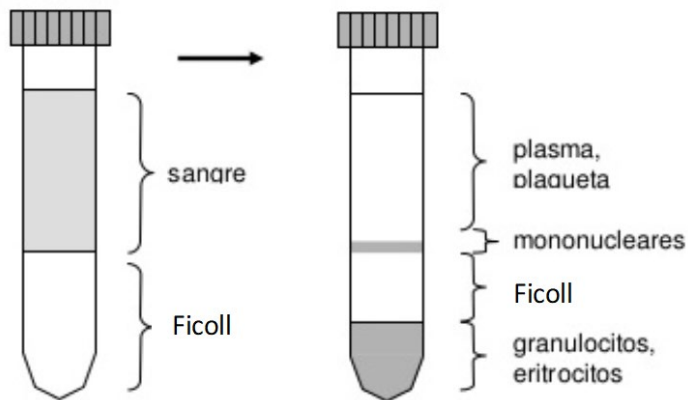


Figura 2.4. Esquema de las capas formadas según el gradiente de densidad. Tras la centrifugación, las PBMC se encuentran en la capa superior blanquecina de la interfase.

2.4.1.4 Procedimiento de la obtención del RNA y miRNA

Es importante remarcar que no precisamos de dos aislamientos diferentes pues, tanto para el estudio de los mRNAs como de los miRNAs, partimos de RNA total y la extracción de ese RNA fue llevada a cabo usando el kit mirVana™miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA) (PN AM1560). Previamente se comprobó que dicho kit no retiene los miRNAs, obteniéndose todos los RNAs, tanto los transcriptos largos como los miRNAs

El RNA total de las PBMC fue aislado mediante el kit mirVana™miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA) (PN AM1560) según las instrucciones del fabricante. A continuación, se resumen las fases de dicho proceso:

1. LISADO Y HOMOGENIZACIÓN: A cada tubo eppendorf que contenía las PBMC, se le añadió 500µl del Tampón de Lisis. Se homogeneizó y se añadió, a cada muestra, 50µl del Aditivo Homogenizador de miRNA a fin de estabilizar el RNA e inactivar las RNAasas, invirtiendo cada eppendorf varias veces y dejando reposar la mezcla 10 min en hielo.
2. EXTRACCIÓN ORGÁNICA: Tras el reposo, se adicionaron 500µl de Ácido-Fenol: Cloroformo (Sigma-Aldrich C2432) a cada eppendorf, mezclando por pipeteo cada muestra. Se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 rpm y temperatura ambiente para separar la fase orgánica (donde están los restos lisados de otros componentes celulares) de la fase acuosa (RNA), creando una interfase compacta. De este modo se consiguió eliminar los componentes celulares no deseados.
3. AISLAMIENTO DE RNA: La fase acuosa, donde se encontraba el RNA total, se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL, anotando el volumen

recuperado. Se añadieron 1.25 volúmenes de etanol absoluto 100% por volumen recuperado de la fase acuosa. Cada muestra se transfirió a una columna de filtrado y se centrifugó a 14.000 rpm, Tª ambiente, durante 15 segundos para hacer pasar la mezcla a través del filtro de fibra de vidrio, a fin de que el RNA quedara retenido en el filtro.

A continuación, se procedió a realizar los lavados: el primer lavado con 700µL de la Solución de Lavado 1 y dos lavados posteriores con 500µL de la Solución de Lavado 2/3. Tras cada uno de los lavados se realizó una centrifugación a 10.000 rpm, Tª ambiente, durante 10 segundos.

Una vez finalizados los lavados, se eluyó el RNA total contenido en el filtro, añadiendo 50µL de agua libre de RNAasas (volumen final 50µl).

Todas las eluciones se almacenaron a -80°C para posteriores mediciones.

Este protocolo fue usado tanto para aislar RNA total como para aislar miRNAs puesto que, según las indicaciones del fabricante, el proceso de enriquecimiento para el aislamiento de pequeños RNAs (como serían los miRNAs), no es adecuado cuando vamos a usar técnicas de microarrays para medir los perfiles de expresión.

2.4.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN, PUREZA E INTEGRIDAD DEL RNA

Sin duda, uno de los mayores avances de la era post-genómica es el cambio de paradigma y de perspectiva. Si en la era pre-genómica podíamos estudiar a fondo un único gen, con la llegada de la era post-genómica, podemos obtener cantidad de mediciones simultaneas y estudiar muchos genes a la vez. De esta

manera, podemos tener una perspectiva más general, aunque sea con menor resolución.

Como sabemos, no todos los genes se expresan a la vez y los perfiles de expresión génica pretenden medir la actividad de los genes en un momento determinado.

Para la medición de los perfiles de expresión génica diferencial entre centenarios, septuagenarios y jóvenes por medio de arrays, no sólo es importante la cantidad de RNA sino también su calidad, que mediremos en base a su pureza e integridad, siendo tanto la cantidad como la calidad condiciones imprescindibles para obtener resultados reproducibles y comparables en el análisis de expresión génica.

En nuestro estudio se partió de 200 ng totales de RNA con un RIN (RNA Integrity Number) ≥ 6 .

2.4.2.1 Determinación de la concentración y pureza

El control inicial de la cantidad de RNA total obtenido, y de su grado de pureza, se midió mediante técnicas espectrofotométricas, con el espectrofotómetro GeneQuant Pro Classic (GE Healthcare Little Chalfont, UK).

En el laboratorio se realizó una dilución 1:3 del RNA total de cada muestra con 1 μL de la muestra obtenida y 2 μL de agua libre de RNAasas. En este sentido, es importante tener en cuenta la dilución que se le realiza al RNA para que los resultados se ajusten a los límites de medida del espectrofotómetro.

Cada dilución se introdujo en un capilar de cuarzo para su medición en el espectrofotómetro. La medida de referencia o blanco se realizó con 3 μL del agua libre de RNAasas utilizada para la disolución.

Debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas, los ácidos nucleicos absorben luz ultravioleta a 260nm (A_{260}) de longitud de onda y esta característica se usó para determinar su **concentración**: 1 unidad absorbancia a 260 nm de longitud de onda (A_{260}) de RNA de cadena simple es igual a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este cálculo lo realizó automáticamente el espectrofotómetro y nos proporcionó directamente la concentración del RNA presente en cada muestra.

$$1 \text{ unidad } A_{260} \text{ de RNAsc} = 40\mu\text{g}/\text{mL}$$

Del mismo modo, para evaluar el grado de **pureza** de las muestras, se empleó la relación OD 260/280 (A_{260}/A_{280}) que también proporciona automáticamente el espectrofotómetro GeneQuant Pro Classic (GE Healthcare Little Chalfont, UK). Siendo A_{260} la absorbancia debida a los ácidos nucleicos y A_{280} la absorbancia debida a las proteínas y las impurezas orgánicas e inorgánicas (por ejemplo, fenol, cloroformo, etc) resultantes del proceso de extracción. Así, las extracciones puras de RNA tienen un valor A_{260}/A_{280} cercano a 2,0 (tabla 2.2).

Tabla 2.2. Determinación de la pureza en base a los valores obtenidos mediante el OD 260/280

RATIO	VALOR	PUREZA
260/280	2.0-2.2	Pureza óptima
260/280	> 1.7	Pureza aceptable
260/280	< 1.7	Presencia de compuestos aromáticos (proteínas, fenoles, etc)

2.4.2.2 Determinación de la integridad

Las medidas anteriores (i.e. A260 nm y la relación A260/280), sólo nos indican la cantidad de RNA y su grado de pureza, pero no permiten conocer la integridad del RNA y este es un parámetro esencial en los estudios de expresión génica.

Existen diversos métodos para determinar el grado de degradación del RNA total, uno de ellos es la relación entre bandas ribosomales 28S/18S observadas en gel de agarosa (parámetro subjetivo que, en buena medida, depende de la interpretación del investigador) y otro es el RIN (*RNA Integrity Number*).

En este trabajo se empleó este último, pues el RIN es un parámetro objetivo que pretende proporcionar una medida universal, objetiva y robusta de la calidad de las muestras.

Así pues, en nuestro estudio la **integridad** del RNA se midió con el kit RNA 6000 LabChip® siguiendo las instrucciones del fabricante, tal y como se detalla a continuación:

1. Los reactivos se dejaron 30 min a temperatura ambiente antes de su utilización.
2. El gel se preparó utilizando una columna de 550µL que se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min, recogándose el gel filtrado. Posteriormente se depositó 9µL de dicho gel en los pocillos correspondientes del LabChip® para formar el gel de migración.
3. 1µL del marcador de peso molecular (RNA 6000 Ladder® Ambion) y 1µL del RNA total extraído de cada una de las muestras a analizar se

desnaturalizaron durante 2 min a 70°C (desnaturalización altamente recomendada por el fabricante), y se introdujeron en los pocillos correspondientes.

4. Finalmente, los chips se agitaron en un vórtex, con ayuda del acoplador específico, durante 1 min a máxima potencia (2400 rpm) y se introdujeron en el Bioanalizador 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA; USA).

El Bioanalizador 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA; USA) es un equipo de análisis automatizado que combina la tecnología de la electroforesis capilar (análisis electroforético) y la fluorescencia (electroferograma). Así, el programa informático del Bioanalizador 2100 calculó un algoritmo a partir de la información obtenida del análisis electroforético y teniendo en cuenta el electroferograma resultante. El valor obtenido o RIN (*RNA Integrity Number*) permitieron determinar la calidad de las muestras de una manera objetiva en base a un rango numérico del 1 al 10. Un valor de 10 correspondió a una muestra con la máxima integridad posible.

- RNA íntegro, valor de RIN entre 9 y 10
- RNA degradado, RIN <6
- Sólo RNA con RIN ≥ 6 fueron consideradas aptas para estudio de expresión génica mediante arrays.

El bioanalizador, a través del programa informático 2100 Expert v.B.01.02.SI136, permitió visualizar los resultados de la electroforesis capilar, así como de los perfiles de integridad en un ordenador acoplado. El bioanalizador empleó una fluorescencia entre 670 nm y 700 nm para determinar la calidad e integridad del RNA total. Para cada muestra, el programa realizó un

electroferograma específico y calculó el valor de integridad (RIN), tal y como se refleja en la Figura 2.5.

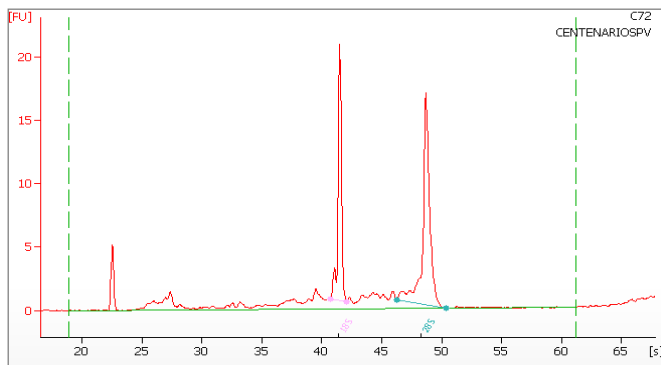


Figura 2.5. Ejemplo de un electroferograma del RNA total extraído de las PBMC de una muestra del grupo de centenarios. Se aprecian los 18S y 28S ribosomales. El RIN obtenido en esta muestra fue de 8.80.

2.4.3 DETERMINACIÓN DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE miRNA

Las técnicas genómicas de alto rendimiento desarrolladas en los últimos años han automatizado las técnicas experimentales de biología molecular convencional para poder realizar análisis y obtener datos a gran escala, es decir, a nivel ómico o global, que son derivados de análisis de genomas completos. Estas técnicas que proporcionan un gran volumen de información en poco tiempo han ido incrementando su potencial y reduciendo costes, llegando a convertirse en herramientas indispensables en el ámbito de la investigación actual.

En la presente tesis, los perfiles de expresión de RNAs no codificantes se estudiaron mediante el microarray GeneChip®miRNA 2. 0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Este microarray reunía 15.644 secuencias de miRNA maduros

procedentes de la base miRBASE (v15) codificados a partir de 131 organismos, abarcando además 2.334 snoRNAs/ scaRNAs y 2.202 conjuntos de sondas exclusivas de secuencias de pre-miRNA.

Se partió de un total de 200ng de RNA de cada muestra, siguiendo las instrucciones del fabricante:

1. Los miRNA presentes en la muestra se marcaron con el Kit *FlasTagTM Biotin HSR RNA Labeling Kit* de Genisphere.
2. Se añadieron a la muestra los oligos *RNA Spike Control Oligos*, que contienen los controles del microarray.
3. Se realizó la mezcla de la reacción, que contenía el tampón de reacción junto con $MnCl_2$ (25nM), ATP y la enzima PAP (poliadenilato polimerasa) para generar el extremo donde, seguidamente, se procede al marcaje. La mezcla de la reacción, junto con la muestra, se incubó durante 15 minutos a 37°C.
4. El marcaje se realizó añadiendo *5X FlahTag Biotin HSR Ligation Mix* y la T4 DNA Ligasa, que une las moléculas de marcaje a los extremos sintetizados en la reacción anterior. Se incubó durante 30 minutos a 25°C y finalmente se paró la reacción añadiendo la solución IISR Stop Solution. Este proceso se realizó en el termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystem).
5. Posteriormente, se preparó el cóctel de hibridación para cada una de las muestras, que contenía los controles de hibridación y de alineamiento respectivos. Cada cóctel de hibridación fue introducido en su respectivo

microarray e hibridado en el horno de hibridación *Hybridization Oven 640* (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) durante 18h a 48°C.

6. A continuación, se pasaron los microarrays por un tren de lavados y marcaje con ficoeritrina-estreptavidina, en la estación de lavados *GeneChip®Fluidics Station 450* (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). El protocolo específico, en la estación de lavados, indicado para los *GeneChip®miRNA 2.0 Array* fue el FS450_0003.

7. Tras este paso, los microarrays fueron escaneados con el *GeneChip®Scanner 3000 7G* (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), obteniéndose las imágenes de cada muestra. Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el programa *GeneChip®Command Console* (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) y junto con el programa *miRNA QC Tool* v.1.1.10 (www.affymetrix.com) se procedió a realizar el resumen, normalización y controles de calidad de cada una de ellas.

2.4.4 DETERMINACIÓN DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE mRNA

Para la determinación de los perfiles de expresión génica diferencial entre centenarios, septuagenarios y jóvenes, se seleccionaron las muestras de RNA que cumplieran con las condiciones establecidas de concentración (≥ 20 ng/ μ L) y de calidad (RIN ≥ 6), desechando las que no se ajustaban a dichos criterios.

Una vez seleccionadas, se procedió al análisis de los perfiles de expresión utilizando el array de transcriptoma humano *GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array* (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Este array, analiza los modelos de expresión de

28.869 genes con más de 750.000 sondas (el elemento esencial de la tecnología GeneChip es la unión de los oligonucleótidos sobre una superficie de silicio).

Para nuestro estudio partimos de muestras de RNA total con una cantidad de 200 ng y un RIN ≥ 6 , que fueron marcadas con *WT (Whole Transcript) Expression Kit* de Ambion. Este kit permite preparar muestras de RNA para el análisis por microarrays del transcriptoma completo, de ahí sus siglas WT. Los kits WT, usan protocolos que evitan el sesgo de las amplificaciones, y las sondas están ubicadas a lo largo de toda la secuencia de cada *locus* génico, haciendo que la señal de expresión sea más fiable y siendo además posible la detección de los distintos exones del gen. A modo de resumen, el kit genera cDNA a partir del RNA total previa amplificación y posterior fragmentación y marcaje usando para esto último el *GeneChip WT Terminal Labeling Kit*. Además, utiliza unos primers específicamente diseñados usando un algoritmo patentado, que evita la unión del RNA ribosómico, un serio problema en los estudios de expresión.

Las muestras se analizaron siguiendo las instrucciones del fabricante, que se resumen a continuación:

Paso Previo: el kit incluye unos Poly-A RNA Controles los cuales fueron adicionados a las muestras de RNA, de modo que este fuera amplificado y marcado siguiendo el mismo proceso descrito anteriormente. Cuando finaliza el protocolo, la intensidad de hibridación de esos controles en el array, nos ayuda a monitorizar el proceso de marcaje, independientemente de la calidad de las muestras de RNA de partida.

Paso 1: **Síntesis de la primera hebra de cDNA** usando la transcriptasa inversa y usando como primer T7-(N) oligos (esto es un oligonucleótido corto complementario en la cola de poli-A del extremo 3' del mRNA, con 7 Tiaminas). Este

T7 oligo, se hibrida al RNA, actuando de cebador para la transcriptasa inversa y ésta copiará el RNA a su cadena complementaria de DNA, formando una doble hélice híbrida DNA/RNA.

Paso 2: Síntesis de la segunda hebra de cDNA. En este paso la hebra simple de cDNA es convertida en doble hebra. La reacción usa DNA polimerasa y RNasa H que es una enzima que sólo ataca al RNA generando cortes y deleciones en su cadena.

Paso 3: Síntesis de cRNA usando Transcripción In Vitro (IVT) T7: En este paso se sintetizó cRNA y se amplificó por IVT usando la enzima T7 RNA polimerasa. Este método para obtener RNA se conoce como método de transcripción inversa-IVT (RT-IVT), también llamado método Eberwine (Van Gelder *et al.*, 1990). Se basa en el método de amplificación de RNA lineal y reactivos con mejoras que crean un flujo de trabajo simplificado, un rendimiento mejorado y requisitos de entrada de RNAs más flexibles. Este paso de incubación es largo (duración aproximada 16h).

Paso 4: Purificación del cRNA y evaluación del rendimiento y del tamaño este paso es importante pues a partir de ese cRNA se va a volver a sintetizar cDNA. Para ello, al igual que en el RNA de las muestras de estudio, el cRNA ha de cumplir unos estándares mínimos de pureza. Se trata principalmente de procesos de lavado donde usamos isopropanol, etanol y los reactivos preparados para este fin en el kit (tampones, soluciones de lavado, etc).

En cuanto al rendimiento, determinamos la concentración del cRNA midiendo la absorbancia a 260 nm con un NanoDrop espectrofotómetro. La cantidad de cRNA obtenido depende de la cantidad y calidad del poli(A)RNA que haya en el total del RNA inicial. Debido a que la proporción de poli (A)RNA en el RNA total de un organismo depende del estado de salud y del órgano del que se

aisla, cantidades iniciales de RNA total pueden producir cantidades variables de cRNA. Como media podemos decir que 100ng de RNA inicial deberían proporcionar valores $\geq 20 \mu\text{g}$ de cRNA.

Paso 5: **Segundo ciclo de síntesis de cDNA**: partimos de 10 μg del cRNA obtenido anteriormente y le añadimos los random primers (cebadores aleatorios), dUTP/dNTP mix y la transcriptasa inversa. De este modo obtendremos un cDNA que contiene dUTP en una proporción fija en relación con los dTTP, pero como sabemos uracilo no es base del DNA. Podríamos decir que en este paso se sintetiza un cDNA con “muesca” (dUTP) y por esa muesca es por donde se fragmentará.

Paso 6: **Hidrólisis usando RNasa H**: en este paso eliminamos el RNA quedándonos con el cDNA de una hebra (el cDNA con muesca).

Paso 7: **Purificación y evaluación del rendimiento del cDNA del 2º ciclo**: como en la purificación anterior del cRNA, usamos los reactivos proporcionados en el kit: la mezcla de unión de cDNA (cDNA Binding Mix), las soluciones de lavado, las de elución, etc.

Para evaluar el rendimiento medimos la absorbancia a 260 nm usando el Nanodrop. Hay que recordar que partimos de 10 μg de cRNA y, para la mayoría de los tejidos, eso nos debería proporcionar una cantidad $>6 \mu\text{g}$ de cDNA.

Paso 8: **Fragmentación y marcaje del cDNA de hebra simple (monocatenario)**: para ello usamos el kit *GeneChip® WT Terminal Labeling* de Affymetrix. Como el cDNA del segundo ciclo (sensestrand) contiene dUTP usaremos una enzima llamada uracil-DNA glicosilasa (UDG) y una endonucleasa apurínica/apirimidínica 1 (APE1) para reconocer y fragmentar el cDNA por los residuos de dUTP no naturales (muesca). Una vez fragmentado, se procede al marcaje con

Materiales y métodos

deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) y con el reactivo de marcaje de DNA patentado por Affymetrix.

Paso 9: **Hibridación en dispositivos microarrays** tienen alta densidad de oligonucleótidos y así podemos medir la expresión global.

Todos estos pasos están esquematizados en la Figura 2.6.

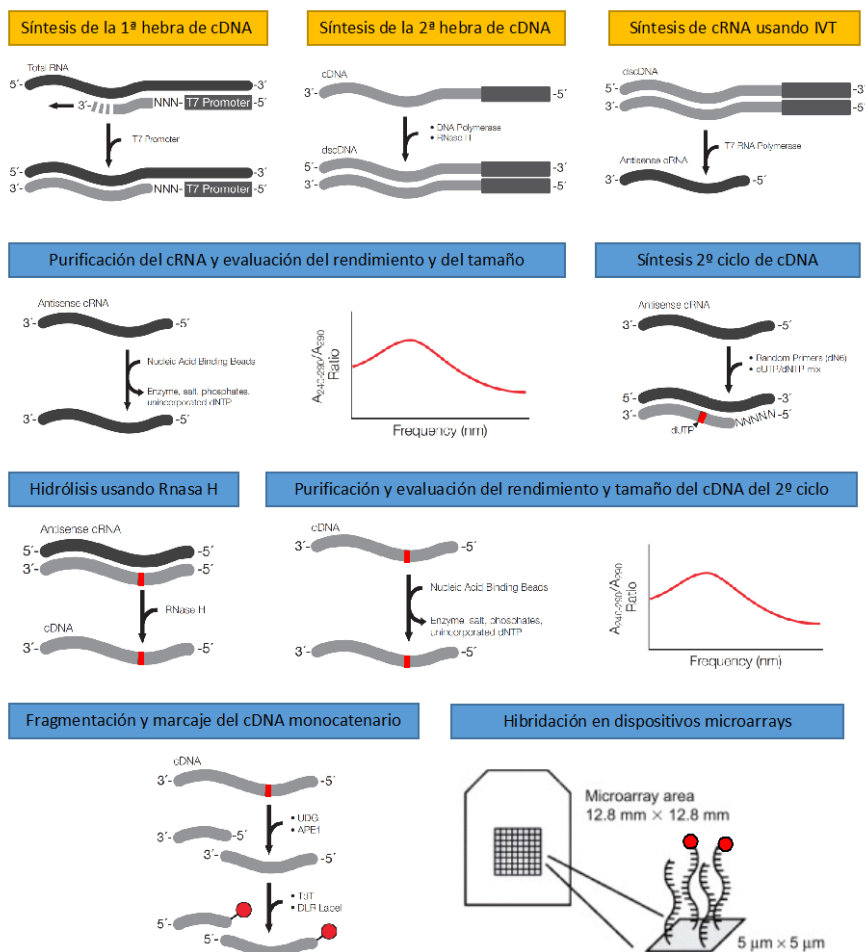


Figura 2.6. Esquema resumen del protocolo de WT Expression Kit de Ambion.

2.4.5 ANÁLISIS DE LOS DATOS DE LOS MICROARRAYS

Los datos (.CEL files) fueron filtrados y analizados estadísticamente mediante el programa *Partek Genomic Suite 6.6* (Partek Inc., St Louis, MO). Se normalizaron los resultados mediante el algoritmo RMA. Tras realizar una ANOVA unifactorial con todas las muestras, se identificaron los miRNA y mRNAs estadísticamente significativos entre los diferentes grupos de estudio. Los genes se filtraron cuando presentaban un un p-valor ≤ 0.05 y un cambio de expresión (*fold change*) de ± 1.8 .

Los datos resultantes fueron analizados mediante un Análisis de Componentes Principales (PCA) para determinar las fuentes significativas de la variabilidad de los datos. En este tipo de análisis, la menor distancia entre parejas de puntos en un espacio dimensional indica la similitud entre dichas muestras en una variable determinada, ya que este caso, cada variable correspondía a un espacio dimensional. Así, las muestras que están cerca en el conjunto, son similares en un gran número de variables. Al contrario, muestras que están lejos del conjunto son diferentes en un gran número de variables.

Finalmente, los miRNAs y mRNA que eran estadísticamente significativos fueron importados al *Pathway Studio v8.0* de *Ariadne* para clasificar la función molecular y los procesos biológicos representados por la expresión diferencial entre los tres grupos de estudio: centenarios, septuagenarios y jóvenes.

2.4.6 VALIDACIÓN DE LOS DATOS OBTENIDOS: RETROTRANSCRIPCIÓN- AMPLIFICACIÓN DEL RNA

En la actualidad, existen varios métodos de determinación de la expresión génica para validación de los datos obtenidos en análisis génicos masivos. Nosotros empleamos la retrotranscripción-amplificación del RNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), que consta básicamente de dos pasos:

2.4.6.1 Síntesis del DNA complementario (cDNA)

El cDNA se obtuvo a partir del RNA total mediante el proceso de transcripción inversa conocido como retrotranscripción (RT). Para ello, fue necesaria la enzima transcriptasa inversa *MultiScribeTMRT* (Applied Biosystems), se llevó a cabo mediante el kit *TaqMan[®]MicroRNA Assays* (Applied Biosystems) (PN 4366596,4366597). Este kit permite realizar la RT en el rango de concentración de 1 hasta 10ng del RNA total por cada 15µL de reacción. Nosotros partimos de 10ng de RNA total para la retrotranscripción a cDNA.

Cada uno de los componentes se adicionaron en un tubo eppendorf de 0,2 mL y se incubaron a 16°C durante 30 minutos, seguido de un ciclo a 42°C durante 30 minutos, y finalmente se inactivó la transcriptasa inversa mediante una incubación a 85°C durante 5 min. Todo el proceso se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp[®]PCR System 9700 (Applied Biosystems). El cDNA obtenido se almacenó a - 20°C hasta su uso.

2.4.6.2 Amplificación cuantitativa del RNA mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

Una vez sintetizado el cDNA (mediante la RT), lo amplificamos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), llamada también PCR cuantitativa. Este método permite amplificar de forma selectiva secuencias específicas de DNA a través del uso de fluoróforos, de modo que se establece una relación exponencial directa entre la intensidad de fluorescencia y la cantidad de producto formado. Es actualmente el método más sensible y exacto para la detección de niveles de mRNA, tanto en células como en tejido.

El método de RT-PCR está basado en la síntesis de una hebra complementaria de DNA, utilizando una cadena simple como molde. La RT-PCR utiliza dos fragmentos cortos de DNA (oligonucleótidos) como cebadores de la síntesis. Estos cebadores o *primers* se unen específicamente a secuencias que flanquean la región a amplificar, uno en cada una de las cadenas del DNA, y permiten la amplificación selectiva.

El proceso básico se desarrolla en tres pasos que se repiten sucesivas veces, según el gen a amplificar:

- Desnaturalización: separación de las cadenas complementarias del DNA.
- Unión o *annealing*: unión de los cebadores específicos a sus secuencias complementarias. La temperatura de unión es característica de cada pareja de cebadores.
- Extensión: síntesis de la hebra complementaria a partir del respectivo cebador.

La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial de la cantidad de la región diana del DNA, que viene dado

por la expresión $2n$ (siendo n el número de ciclos) hasta que se llega a un punto en que disminuye la eficiencia de la enzima, y la reacción deja de ser exponencial.

En el caso de la RT-PCR cuantitativa, el parámetro de medida de la expresión de un determinado gen no es la fluorescencia, sino el ciclo en el que la amplificación comienza a ser exponencial. Este ciclo se denomina ciclo umbral ("*threshold cycle*", *Ct*), pues es a partir del cual la amplificación empieza a ser realmente apreciable. De este modo, los valores de ciclo umbral decrecerán linealmente conforme aumenta la cantidad de cDNA de partida, puesto que cuantas más copias de mRNA de partida del gen estudiado haya, más cDNA se obtendrá en la retrotranscripción, y antes comenzará la amplificación a ser exponencial.

Así pues, realizando una curva estándar de cantidades de mRNA de partida conocidas, este método permite la cuantificación relativa de la expresión de un gen en función de la expresión de un gen de expresión constitutivo, es decir, que no varía según diferentes condiciones. La cuantificación absoluta supone el conocimiento del número exacto de copias de mRNA de partida empleado para la realización de la curva estándar

Otro método para determinar la expresión a partir de las curvas de amplificación obtenidas consiste en la comparación de *Ct*. Como hemos señalado, cuanto más mRNA de partida hay, menor es el *Ct* obtenido. Este método se asemeja al método de la curva estándar, pero utiliza fórmulas aritméticas cuya resolución conduce a la cuantificación relativa de la expresión de un determinado gen.

En la presente tesis, la RT-PCR se realizó con el sistema de detección 7900 *HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), mediante el kit *TaqMan® Universal Master Mix* (Applied Biosystems) para la detección de los

miRNA y el kit *TaqMan®Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems) para la detección de snoRNA, scaRNA17 y mRNA.

La reacción se realizó según el protocolo proporcionado por el citado kit. Cada una de las muestras se analizó por triplicado. En cada una de las placas realizadas se añadió el control endógeno de cada una de las muestras por triplicado y los controles negativos.

Cada reacción de RT-PCR contenía 1µL del producto de la RT, 5µL de *TaqMan®Universal Master Mix* o *TaqMan®Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems) y 0.5µL de la sonda correspondiente en un volumen final de 10µL. Los niveles de transcritos fueron detectados por *7900 HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems).

Las condiciones de la PCR que se siguieron se resumen en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Condiciones de la RT-PCR

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95	10 min	1
Desnaturalización	95	15 s	40
Unión/ Extensión	60	60	

Los sistemas de PCR a tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y mediante un programa de análisis se representa dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos.

En esta tesis se empleó el programa informático *Sequence Detection Software (SDS) v 2.4* (Applied Biosystems) para obtener la información generada en cada uno de los ciclos. Este programa construye las curvas de amplificación a partir de los datos de emisión de fluorescencia, generando una gráfica que recoge en el

eje de ordenadas, la intensidad de la fluorescencia y el eje de abscisas, el número de ciclos transcurridos (Figura 2.7). El ciclo dónde la amplificación comienza a ser exponencial se denomina ciclo umbral (*threshold cycle*, C_T), a partir del cual la intensidad de fluorescencia empieza a ser apreciable y proporcional a la cantidad inicial de cDNA. Cuantas más copias existan en la muestra de partida, más cDNA se obtendrá en la transcripción inversa, y menores C_T obtendremos en la amplificación de RT-PCR. Nuestro valor C_T se estableció en 0,05.

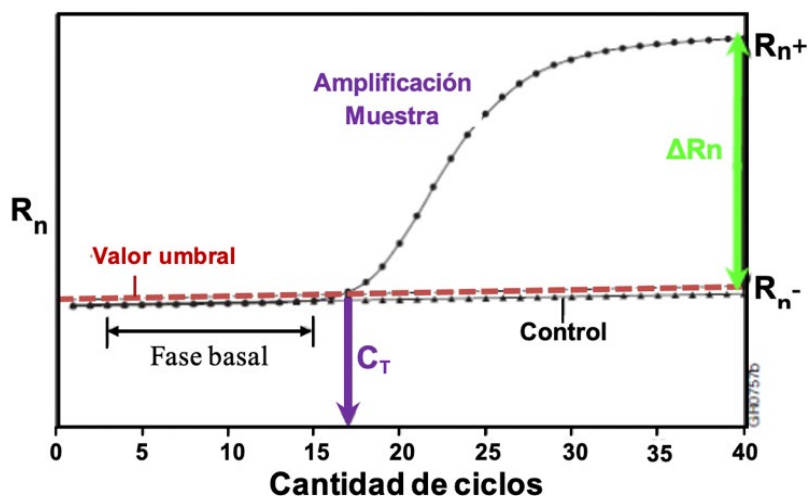


Figura 2.7. Curva de amplificación RT-PCR. La línea horizontal de color rojo indica el valor umbral, el ciclo en el cual la amplificación empieza a ser exponencial es el ciclo umbral (C_T), representado en morado. El ΔR_n (en verde) es el incremento de fluorescencia.

Para el análisis de los resultados usamos el método semicuantitativo $\Delta\Delta C_T$. Este método permite extrapolar la cantidad de miRNA o mRNA existente en una muestra frente a otra de referencia. Consiste en calcular el ΔC_T , que es la diferencia entre el C_T del miRNA o mRNA que se quiere cuantificar y el C_T del control endógeno. Para calcular la expresión relativa de la muestra frente al control

comparamos el ΔC_T del grupo de estudio en relación con el ΔC_T de la muestra control. Así aplicamos la siguiente fórmula para conocer la expresión relativa: $2^{(\Delta(\Delta C_T))}$, donde: $\Delta C_T = (C_T \text{ problema} - C_T \text{ control endógeno})$, y $\Delta(\Delta C_T) = (\Delta C_T \text{ grupo estudiado} - \Delta C_T \text{ basal})$.

2.4.7 CUANTIFICACIÓN DE MDA EN PLASMA

El malondialdehído (MDA) resulta de la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados existentes en la célula (principalmente en las membranas) cuando éstos son atacados y degradados por las especies reactivas del O_2 . El MDA es por tanto un marcador de peroxidación lipídica.

Para esta determinación emplearemos la cromatografía líquida de alta resolución conocida por sus siglas en inglés, HPLC (high performance liquid chromatography). Como sabemos, la cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes que se van a separar se distribuyen entre dos fases, la fase estacionaria (columna de partículas de sílice o alúmina) y la fase móvil que en este caso es líquida y actúa de portador de la muestra. La **separación cromatográfica en HPLC** es el resultado de las interacciones específicas de las moléculas de la muestra en ambas fases. Por un lado, está la retención de los componentes de la muestra por la fase estacionaria (**ADSORCIÓN**) y por otro la solubilidad de los mismos en el eluyente o fase móvil (**REPARTO**); de este modo la HPLC logra una migración diferencial entre los componentes de la muestra y una separación de estos. Las especies más retenidas serán las que presenten una mayor afinidad (solubilidad) por la fase estacionaria que por la fase móvil.

Existen 2 modos básicos de operación para la HPLC:

- ❖ Fase normal: cuando se emplea una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar.
- ❖ Fase reversa: cuando se emplea una fase estacionaria no polar y fase móvil polar.

Actualmente los métodos cromatográficos en **fase reversa** son los más extendidos dada la naturaleza hidrofílica de las muestras biológicas que son las de mayor interés (clínico, alimentario, farmacéutico) y como en nuestro caso el MDA.

La cromatografía líquida de alta eficacia, HPLC, requiere de una instrumentalización para llevarse a cabo y estos dispositivos constituyen el cromatógrafo que, por simbiosis con la técnica, se conoce también como HPLC. Muy a groso modo, un cromatógrafo está constituido por una bomba para el suministro de eluyentes, un dispositivo de inyección para inyectar la muestra en la fase móvil, una columna (fase estacionaria) donde se producirá la retención y separación del analito y un detector que es el recurso usado para identificar y medir la cantidad del componente o componentes de la muestra que se han separado, siendo el más usado el detector UV/visible. Es importante señalar que en los últimos años ha habido un auge de las técnicas espectrométricas sobre todo de la espectrometría de masas (MS) en detrimento de la espectroscopia, pero el detector de nuestro cromatógrafo utiliza la espectroscopia de absorción molecular UV/VIS.

El MDA [$\text{CH}_2(\text{CHO})_2$] es un compuesto muy reactivo, su molécula es muy pequeña con apenas un peso molecular de 72,0636 g/mol y es volátil todo lo cual dificulta mucho su medición. Estas razones nos abocan a medir los valores de MDA mediante la técnica de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) previa **derivatización** de la muestra. Dicha derivatización consiste en “capturar” las “escurridizas” moléculas de MDA mediante la formación de aductos con otros

compuestos químicos, en nuestro caso el ácido tiobarbitúrico (TBA) y de este modo hacerlas “medibles”.

Así pues, para la determinación de malondialdehído (MDA) por HPLC se utilizó el método descrito por Wong *et al.*, (Wong *et al.*, 1987), en el cual, una molécula de MDA reacciona con 2 moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) produciendo un aducto que es un cromógeno rosado con un máximo de absorción entre $\lambda = 532-535$ nm. Los resultados obtenidos se expresarán en micromolaridad (μM) equivalente a nanomoles/mL (nm/mL). A continuación, se describe dicho método:

a) Preparación de los reactivos

- Tampón acetato sódico anhidro 2 M, pH 3,5 con TBA 0,2%: Para preparar 200 mL de tampón se toman 23,8 mL de ácido acético glacial (pureza 98%) y se le añaden a unos 120 mL de agua desionizada (“mili-Q”). Se ajusta el pH hasta 3,5 con hidróxido de sodio (NaOH) 10 M. A continuación, se añade a la solución 0,4 g de ácido tiobarbitúrico y se mantiene en agitación, a 50-60°C, hasta la total disolución del TBA. Se comprueba que el pH se mantiene y, si no es así, se vuelve a ajustar. Finalmente, se enrasa el volumen a 200 mL y se guarda protegido de la luz a 4° C.

- Tampón KH_2PO_4 50 mM, pH 6,8: Para preparar 200 mL se pesan 1,36 g de KH_2PO_4 y se añaden a unos 120 mL de agua desionizada. A continuación, se ajusta el pH con KOH (1 M) hasta 6,8 y se enrasa con agua desionizada hasta alcanzar el volumen final. Posteriormente, se guarda a 4° C.

- Tampón KH_2PO_4 50 mM, pH 3,5: Para preparar 200 mL se pesan 1,36 g de KH_2PO_4 y se añaden a unos 120 mL de agua desionizada; se ajusta el pH con HCl (1

M) hasta 3,5 y se enrasa con agua desionizada hasta el volumen final. Se guarda también a 4° C.

b) Preparación de los patrones

La identificación y cuantificación del MDA de las muestras analizadas se lleva a cabo por medio de una recta de calibrado, la cual se prepara previamente con una solución comercial de MDA. Para ello se procede de la manera siguiente:

1. Se parte de una solución comercial de MDA-bis (dimetilacetil, PM: 164,2 g/mol, Merck) a concentración de 12,2 M. Haremos los cálculos para obtener una solución 100 mM que será nuestra solución de partida o solución madre (100 mM) luego haremos diluciones seriadas hasta obtener los puntos de la recta de calibrado. Para la solución inicial de 100 mM, diluiremos 8,2 μL de MDA 12,2 M en 991,8 μL de agua desionizada, alicuotaremos 25 μL en eppendorfs y congelaremos a -20°C.
2. Partiendo de la solución madre de 100 mM haremos diluciones seriadas hasta obtener las concentraciones de MDA que queremos configuren nuestra recta patrón:
 - 10 mM dilución 1:2 y obtenemos una solución 5 mM
 - 5 mM dilución 1:100 obtenemos una solución 50 μM
 - 50 μM dilución 1:2 y obtenemos 1º punto de la recta 25 μM
 - 25 μM dilución 1:2 obtenemos solución 12,5 μM
 - 12,5 μM ó nmol/mL
 - 5 μM obtenida por dilución 1:5 de la solución 25 μM
 - 2,5 μM obtenida por dilución 1:2 de la solución 5 μM
 - 1,25 μM obtenida por dilución 1:2 de la solución 2,5 μM
 - 0,625 μM obtenida por dilución 1:2 de la solución 1,25 μM

Los puntos elegidos para nuestra recta patrón son: 25 μM – 12,5 μM – 5 μM – 2,5 μM – 1,25 μM – 0,625 μM además de un blanco que contendrá agua desionizada en lugar de muestra y que seguirá el mismo proceso de derivatización.

Tener en cuenta que para la preparación de cualquier recta de calibrado es de suma importancia la homogeneidad de las disoluciones, motivo por el cual es muy recomendable el uso de un vortex.

c) Procedimiento de derivatización

1. A 500 μL del tampón inicial (con TBA) se le añaden 20 μL de plasma.
2. La preparación se incuba durante 60 minutos a una temperatura de 95°C. Es en este paso donde se produce la hidrólisis de los lipoperóxidos y la consiguiente liberación de moléculas de MDA, que se conjugan con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), por tanto, lo que se determina es el **aducto MDA-TBA₂**, como índice de peroxidación lipídica.
3. Al sacarlas, las muestras deben mantenerse en hielo.
4. Añadir 500 μL del tampón de KH_2PO_4 (pH 6,8) a cada muestra. Agitar. Este paso es crítico ya que el aducto MDA-TBA₂ es inestable en el rango de pH neutro-básico, por lo que debe hacerse con rapidez.
5. Centrifugar durante 5 min. a 13000 g, a una temperatura de 4°C.
6. A 200 μL del sobrenadante añadirle 200 μL del tampón KH_2PO_4 50 mM, pH 3,5 y agitar.
7. Tomar 200 μL y colocarlos en un vial para realizar el análisis por HPLC.

d) Preparación de las fases móviles para HPLC

Se trata de una elución “isocrática”, donde la composición de la fase móvil es constante.

Como ya se ha dicho, es una cromatografía en “fase reversa”, es decir, la fase estacionaria o columna es no polar (hidrocarburos adheridos a partículas de sílice) mientras que la fase móvil es polar, en nuestro caso está constituida por una solución salina KH_2PO_4 50 mM de pH 6,8 y acetonitrilo en proporción 73/18. Esto quiere decir que el tiempo de retención será mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente y es sabido que el MDA es uno de los aldehídos más polares.

En el proceso cromatográfico hay dos fases: una fase de elución, que es el intervalo de tiempo donde eluirá nuestra molécula, y posteriormente una fase de lavado y equilibrado de la columna a fin de prepararla para el paso de la siguiente muestra.

- *Fase de lavado (Fase B)*: está constituida por una mezcla de acetonitrilo/ agua desionizada al 70%, ambos de máxima pureza (agua desionizada tipo “milli-Q”).

- *Fase de elución (Fase A)*: La sal que contiene esta fase es KH_2PO_4 50 mM, pH 6,8. La relación es de 83/17 (KH_2PO_4 50 mM, pH 6,8/ acetonitrilo). El modo de preparación es el siguiente:

1. Pesar 13,6 g de KH_2PO_4 y disolverlos en unos 1800 mL de agua desionizada (“mili-Q”).
2. Ajustar el pH de esta disolución a 6,8 con KOH 1 M.
3. Enrasar hasta 2000 mL.

4. Añadir 410 mL de acetonitrilo. Esta solución debe homogeneizarse bien.
5. La solución será filtrada con un kitasatos, mediante bomba de vacío y filtro de 0,22 micras (Millipore).

Antes de pasar por el HPLC, ambas fases deben desgasificarse por baño de ultrasonidos unos 20 minutos ya que las burbujas de aire suponen un serio problema en la HPLC.

e) Condiciones cromatográficas

- Flujo de las fases: 1 mL/min
- Detección en HPLC: se utilizó el detector UV a 532 nm.
- Columna: C18 Hypersil GOLD, dimensiones 150 x 4,6 mm y 5 µm de partícula.

f) Método cromatográfico

Al ser un método isocrático, sólo se necesita programar el tiempo que va a estar pasando cada una de las fases líquidas correspondientes. Cada cromatograma conlleva unos 24 minutos y la secuencia de las fases móviles a través del HPLC es la que se muestra en la Figura 2.8:




Fase A	Fase B	Fase A
 ELUCIÓN DE LA MUESTRA 13minutos	 LIMPIEZA DE LA COLUMNA 9minutos	 PREPARACIÓN DE COLUMNA 8minutos

Figura 2.8. Programación de la duración (minutos) de las Fases A y B, durante un cromatograma del análisis de Malondialdehído (MDA).

Una programación de muestras supone el repetir cada secuenciación anterior tantas veces como muestras y patrones se deseen analizar, de tal manera que se obtiene de cada muestra un cromatograma como el que se muestra en la siguiente figura (Figura 2.9).

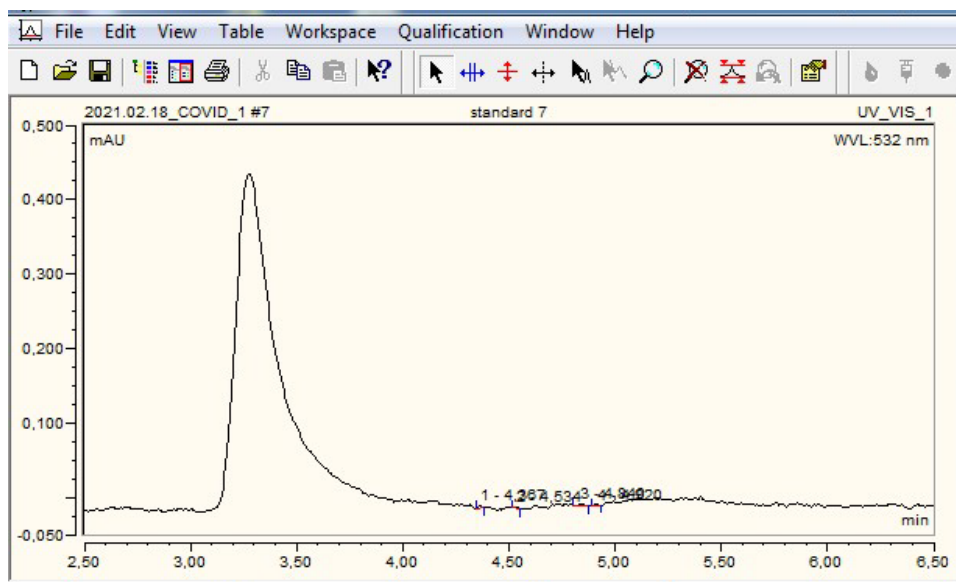


Figura 2.9. Cromatograma de una muestra problema.

2.4.8 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR LOWRY

Se empleó el *Protein Assay Kit*, basado en el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. El reactivo de Lowry, incluido en el kit, contiene SDS, que facilita la disolución de las proteínas parcialmente insolubles y tartrato cúprico alcalino, que se une a las proteínas. El reactivo de Folin, también incluido en el kit, contiene fenol, que al interactuar con el tartrato da lugar a un compuesto de color azul.

A la muestra de plasma se le añadieron los reactivos antes mencionados, formándose un complejo coloreado, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer. A continuación, se detalla dicho procedimiento:

a) Preparación de los reactivos

- *Reactivo Lowry*: Añadir 40 mL de agua desionizada al reactivo comercial *Lowry Reagent Powder*. A continuación, mezclar hasta disolver por completo. Guardar a temperatura ambiente.

- *Reactivo Folin*: Añadir 90 mL de agua desionizada a 18 mL de la solución *Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent* en una botella opaca y mezclar bien. Guardar a temperatura ambiente.

b) Preparación de la recta patrón

Dado que, como hemos mencionado anteriormente, la cuantificación de proteínas totales de las muestras analizadas se llevó a cabo gracias a una curva patrón, previamente al ensayo hubo que prepararla:

1. Preparar un concentrado de seroalbúmina bovina (BSA) (10 mg/mL): pesar 10 mg de BSA en un eppendorf y añadirle 1 mL de agua desionizada ("milli Q").
2. Realizar diferentes diluciones a partir de la solución anterior, para conseguir los siguientes puntos para nuestra recta patrón:
 - 5 mg/mL (diluir a la mitad la solución de 10 mg/mL).
 - 2.5 mg/mL (diluir a la mitad la solución anterior).
 - 1 mg/mL (diluir 1/10 la solución de 10 mg/mL).
 - 0.1 mg/mL (diluir 1/10 la solución anterior).

- Blanco (sólo agua desionizada).

c) Protocolo

1. En un eppendorf pipetear 490 μL de agua desionizada y 10 μL de la muestra.
2. Añadir 500 μL del reactivo de Lowry e incubar 20 minutos en oscuridad.
3. Añadir 250 μL del reactivo de Folin Ciocalteu e incubar 30 minutos en oscuridad.
4. Medir la absorbancia a $\lambda = 660 \text{ nm}$.

d) Cuantificación de los resultados

Para calcular las absorbancias de las diferentes muestras problema, se descartaron las llamadas “interferencias” (otros solventes o reactivos del sistema que absorben a la misma longitud de onda que dichas muestras). Para ello, se preparó una muestra que contenía todos los componentes del sistema menos aquel que se desea medir (muestra o patrón). Esta muestra se llama blanco y la absorbancia de éste debe restarse a las muestras problema y a los patrones, o bien, con el blanco se calibra el instrumento a absorbancia igual a 0, es decir, 100% de transmisión.

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs muestra o patrón} - \text{Abs blanco}$$

El resultado se expresó en una gráfica de la absorbancia en función de la concentración (mg/mL). Si el sistema seguía la ley de Lambert-Beer, se obtenía una línea recta que pasaba cerca del origen. A continuación, se determinó gráficamente la concentración de la muestra desconocida dibujando la absorbancia frente concentraciones conocidas de nuestro patrón interno (BSA). Se escogió la parte

lineal y se calculó la recta de regresión lineal que mejor se ajustaba y a ésta se interpolaron los datos de absorción de nuestras muestras de plasma (Figura 2.10).

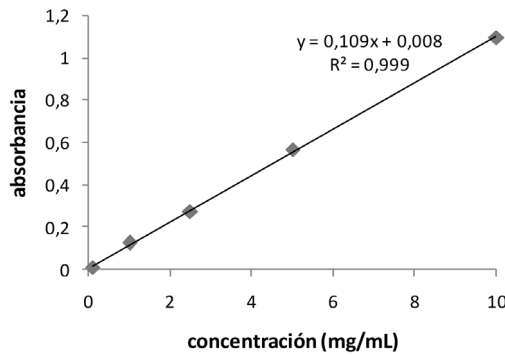


Figura 2.10. Ejemplo de recta patrón para la determinación de la concentración de proteínas en mg/mL en función de la absorbancia a $\lambda = 660$ nm.

2.4.9 DETERMINACIÓN DE CARBONILACIÓN PROTEICA EN PLASMA

Para la determinación de proteínas carboniladas se empleó el método *Western blotting* o *immunoblotting*, mediante el *OxyBlot protein oxidation detection Kit*.

La electroforesis fue llevada a cabo en geles con una matriz de poliacrilamida (PAGE), en condiciones desnaturizantes, ya que para conseguir que las proteínas se separen por su peso molecular, es imprescindible que éstas se encuentren completamente desnaturizadas, en su estructura primaria. Para ello, se utilizó la combinación de un detergente desnaturizante (dodecilsulfato sódico, SDS) y un agente reductor (β - mercaptoetanol). A continuación, se detalla el procedimiento completo:

a) Derivatización de las muestras

1. Añadir 5 μL de muestra a un eppendorf, o el volumen necesario para tener 20 μg de proteína. Si el volumen es inferior, ajustar a 5 μL con agua desionizada.
2. Añadir 5 μL de SDS al 12% p/v. En el caso de que el volumen de la muestra exceda los 5 μL , se corrige añadiendo menor volumen de SDS a mayor concentración.
3. Añadir 10 μL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) a cada muestra, que marcará los grupos carbonilo. También se prepararán muestras como controles negativos, a los que se añade solución de derivatización control.
4. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
5. Añadir 7.5 μL de la solución de neutralización. Si no se había añadido un agente reductor a la muestra durante el homogenado, añadir 1-1.5 μL de β -mercaptoetanol.

b) Western blotting

1. Cargar las muestras en los geles: Se carga un volumen total por muestra de 28 μL en cada pocillo (15 pocillos en total), empleando geles discontinuos al 12.5% de Acrilamida (29:1 Acrilamida: Bisacrilamida) con un 0.1% de SDS.
2. Electroforesis (Figura 2.11): Se aplica un campo eléctrico de voltaje constante de 20 miliamperios (mA) durante al menos 2 horas en tampón Tris-Glicina (25 mM Tris, 200 mM Glicina, 0.1% SDS, pH 8.3).

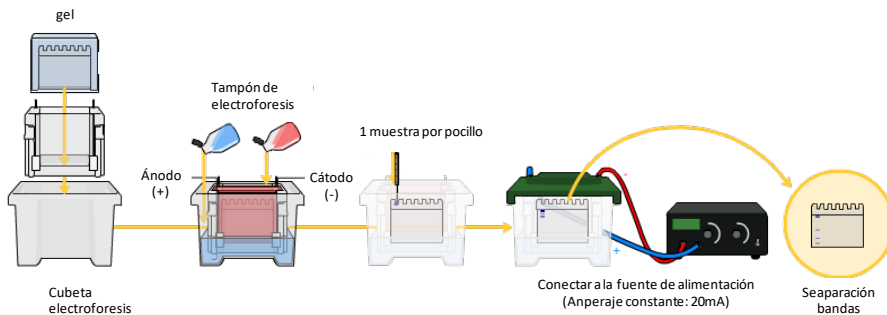


Figura 2.11. Esquema electroforesis SDS-PAGE

3. Transferencia: Una vez finalizado el desplazamiento electroforético, el gel se transfiere (*blotting*) a una membrana de PVDF (Schelider & Schuel, USA), mediante electrotransferencia en condiciones húmedas, por medio del sistema Mini-protean II (Bio-Rad, USA). El proceso se mantiene de forma que pasan 170 mA por cada membrana de la cual se hace transferencia, en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20% v/v, pH 8.3).
4. Bloqueo: Tras la transferencia, las membranas se incuban 60 minutos a temperatura ambiente en tampón de bloqueo: 5% p/v de BSA, 0.1% Tween-20 en 1x PBS (PBS-T).
5. Lavados: Se realiza 1 lavado de 15 minutos y dos de 5 minutos con 10 mL de PBS-T.
6. Anticuerpo primario: Las membranas se incuban durante toda la noche a 4°C en agitación orbital, en tampón de anticuerpo primario (5% BSA, 0.1 % Tween-20 en 1x PBS) con una dilución de anticuerpo primario 1:150.
7. Lavados: Se repite el paso 5.

8. Las membranas son incubadas 60 minutos con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano. El anticuerpo se disuelve en tampón de bloqueo a la concentración 1:300.
9. Lavados: Se repite el paso 5.
10. Revelado: La membrana se incuba 1-5 minutos con reactivo ECL (Amersham Pharmacia, USA) e inmediatamente se revela con un detector quimioluminiscente, mediante el programa *Image Gauge* V4.0 de FUJIFILM.

c) Cuantificación de los resultados

Las imágenes obtenidas fueron almacenadas en formato digital TIF para poder realizar la densitometría de las bandas, utilizando el programa "Image J". Como control de carga, se tiñeron las membranas con rojo Ponceau. Así, se calculó la densitometría de la membrana haciendo una ratio: densitometría de la carbonilación de proteínas/ densitometría de la membrana teñida con rojo Ponceau, expresándose el resultado como unidades arbitrarias de proteínas oxidadas.

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa estadístico SPSS (versión 24.0).

Para la descripción de las variables se emplearon la media aritmética, la desviación estándar, el mínimo, el máximo, frecuencias y porcentajes.

Mediante el test Kolmogorov-Smirnov se comprobó el ajuste o no a una distribución normal de cada variable.

Para la comparación de medias se aplicaron:

- En los casos en que la variable se distribuyera de manera normal: ANOVA para muestras independientes (además de las correspondientes pruebas post-hoc: Tukey y Games Howell).
- En los casos en los que la variable no se distribuyera de manera normal: prueba de Kruskal-Wallis, además de las correspondientes comparaciones por pares, empleando la prueba U de Mann-Whitney.

Para aceptar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los diferentes análisis se ha tomado un intervalo de confianza al 95% ($p= 0.05$).

2.6 TRATAMIENTO BIBLIOGRÁFICO

Respecto al tratamiento de la documentación bibliográfica, se ha hecho en base a los requisitos exigidos a los artículos científicos enviados a revistas biomédicas para su aceptación y posterior publicación recogidos en las normas de la asociación americana de psicología (Normas APA).

3. RESULTADOS

3.1 IDENTIFICACIÓN DE LOS miRNA EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN CENTENARIOS

3.1.1 SELECCIÓN DE MUESTRAS PARA EL ESTUDIO DE miRNA

3.1.1.1 Control de calidad de las muestras

Para la realización de este estudio de miRNAs, el primer paso, y el más crítico, fue el cribado de las muestras antes de procesarlas. Para seleccionar las muestras, establecimos como criterios de inclusión los siguientes parámetros:

- Una concentración de RNA total superior a 20 ng/ μ L por muestra.
- Una pureza no inferior a 1.8, en base a la ratio de absorción 260/280 nm.
- Una integridad determinada por un RNA Integrity Number (RIN) superior o igual a 6.

La Tabla 3.1 muestra la media de dichos parámetros para cada grupo de edad.

Tabla 3.1. Media de los parámetros de calidad establecidos para el RNA total obtenido de las muestras de PBMC para el estudio de miRNAs, por grupos de edad

miRNA	JÓVENES	SEPTUAGENARIOS	CENTENARIOS
CONCENTRACIÓN (ng/ μ L) [mín-máx]	94,7 \pm 55,6 [22,0 – 198,4]	92,2 \pm 70,3 [28,8 – 300,4]	120,4 \pm 52,4 [32,0 – 215,2]
PUREZA (ratio A 260/280)	2,00 \pm 0,11	2,04 \pm 0,08	2,02 \pm 0,06
INTEGRIDAD (RIN)	8,1 \pm 1,1	7,7 \pm 1,3	8,1 \pm 1,1

Resultados

Así, en la Tabla 3.1 podemos observar que todas las muestras que finalmente se seleccionaron para realizar el estudio de miRNAs, cumplían con los criterios establecidos. Asimismo, constatamos que las muestras de los tres grupos de edad eran de calidad similar.

En la Figura 3.1 podemos observar los óptimos perfiles de integridad de los 3 grupos objeto de estudio, con un solapamiento casi perfecto. Además, en cada electroferograma, se puede apreciar 2 picos bien resueltos correspondientes a las bandas 18S y 28S ribosomales y la confirmación nos la proporciona la electroforesis capilar realizada en paralelo, donde claramente se diferencian las dos bandas de migración ribosomales características. El solapamiento de los 3 grupos implica calidades de RNAs muy parecidas y justifica la comparación entre grupos.

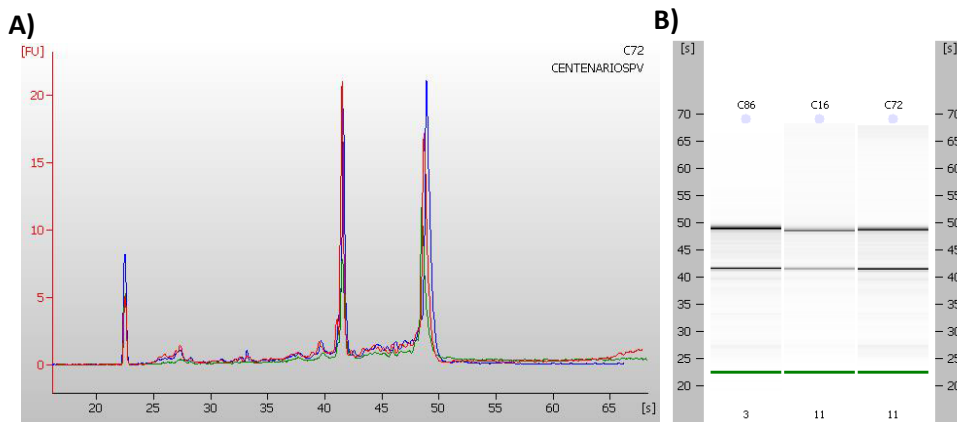


Figura 3.1. Representación gráfica de la calidad de las muestras incluidas en el estudio de miRNAs. A) Solapamiento de los electroferogramas representativos de cada grupo de estudio; Jóvenes (verde), septuagenarios (rojo) y centenarios (azul). B) Gel de electroforesis capilar correspondiente a las bandas 18S y 28S ribosomales representativo para cada uno de los grupos de estudio.

Las muestras que presentaban valores de RIN inferiores a 6, fueron excluidas del estudio. Así, de los 22 centenarios que inicialmente eran candidatos por cumplir el criterio de inclusión, 2 fueron eliminados por este motivo, reduciéndose el grupo de centenarios a 20. En cuanto a los 20 octogenarios iniciales, de ellos sólo 16 tenían un valor de integridad superior a 6 ($RIN \geq 6$), y con lo que respecta a los jóvenes, del grupo inicial de 20, se descartaron 6, pues presentaban RINs propios de degradación.

En definitiva, se realizaron 20 microarrays de centenarios, 16 microarrays de octogenarios y 14 microarrays de jóvenes, lo que supuso un total de 50 microarrays que debieron pasar los siguientes controles de calidad.

3.1.1.2 Control de calidad de los microarrays

Affymetrix ha desarrollado varios controles de calidad en los análisis de expresión génica, los cuales permiten asegurar la calidad de los datos obtenidos. Todos ellos fueron aplicados en el presente estudio.

- I. El **primer control** consistió en obtener imágenes escaneadas de todos los microarrays para generar unos archivos llamados .DAT y comprobar con ellos que no existían artefactos o diferencias en la intensidad de señal de la matriz.

Todas las imágenes .DAT obtenidas de nuestros 50 microarrays fueron correctas, las intensidades fueron homogéneas y no se detectó ningún artefacto que pudiera interferir en la detección de la fluorescencia.

- II. Mediante el **segundo control**, se comprobó la hibridación y el alineamiento. Esto se hizo mediante un oligo sintético de control llamado

oligo B2 y el programa de análisis GeneChip®CommandConsole®3.0 (AGCC) de Affymetrix.

El oligo B2 se añadió al cóctel de hibridación y, además de servir como control positivo de hibridación, nos permitió visualizar el correcto alineamiento de la gradilla sobre la imagen (por el patrón de tablero de ajedrez y por el nombre del array en la esquina superior izqda.). Esta alineación se hizo de manera automática a través del programa mencionado.

En todas las muestras la intensidad de hibridación del oligo B2 a lo largo del array fue similar y, por tanto, hubo una buena eficacia de hibridación y un correcto alineamiento de la gradilla así que el programa generó unos archivos, denominados archivos **.CEL**, para cada una de las muestras.

- III. El **tercer control** y los posteriores se llevaron a cabo con el programa anteriormente mencionado para poder evaluar la eficiencia de la hibridación.

Se usó un kit control de hibridación que contenía una mezcla de transcritos de cRNA marcados con biotina de los genes *bioB*, *bioC*, *bioD* y *cre* de *E. coli* y del Bacteriófago P1 con lo cual no se esperaba hibridación cruzada y así, al representar las concentraciones de estos controles en una gráfica, deberíamos obtener un patrón de intensidad creciente. Patrones diferentes a lo esperado evidenciarían que la hibridación no ha sido eficiente.

Comprobamos que, para nuestras 50 muestras hibridadas, se cumplía el patrón de intensidades de los controles, concluyendo que nuestro proceso de hibridación había sido correcto.

- IV. Los **otros controles** son obtenidos a través de los archivos .CEL generados y del programa empleado (GeneChip®CommandConsole®3.0 (AGCC) de Affymetrix).

Por un lado, se comprobó la intensidad de la fluorescencia para todas las sondas hibridadas presentes en el microarray, esto nos permitió verificar si ciertos chips eran inusualmente brillantes o tenues.

Nosotros comprobamos mediante una t-Student que no existían diferencias significativas en los valores de intensidades obtenidos entre grupos:

- 59.0 ± 1.3 para centenarios
- 55.2 ± 1.3 para septuagenarios
- 56.4 ± 1.2 para jóvenes

- V. Por último, se emplearon los gráficos de expresión logarítmica relativa (**gráficos RLE**), considerados como una buena herramienta para la visualización de variaciones no deseadas en datos de alta dimensión, como pueden ser los microarrays.

Los gráficos de RLE son particularmente útiles para evaluar si un procedimiento destinado a eliminar variaciones no deseadas, es decir, un procedimiento de normalización ha tenido éxito.

Tal y como se deduce de lo anterior, todos los controles de calidad de los microarrays que empleamos para el estudio de miRNAs en nuestras muestras fueron favorables y, por tanto, podemos asegurar la calidad de los datos obtenidos.

3.1.2 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS miRNA

Un análisis de componentes principales (PCA) sirve para reducir la dimensionalidad de la matriz de datos hasta conseguir un número inferior de variables nuevas o “componentes principales” con la característica siguiente: los “componentes principales” son combinaciones lineales de las variables originales.

Así pues, el objetivo de un PCA es transformar un conjunto de variables (variables originales) en un nuevo conjunto de variables (componentes principales) correlacionadas entre sí.

En la Figura 3.2, podemos observar el PCA el de todos los RNA no codificantes de las muestras de los tres grupos de estudio, obtenidos a través del GeneChip® miRNA 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).

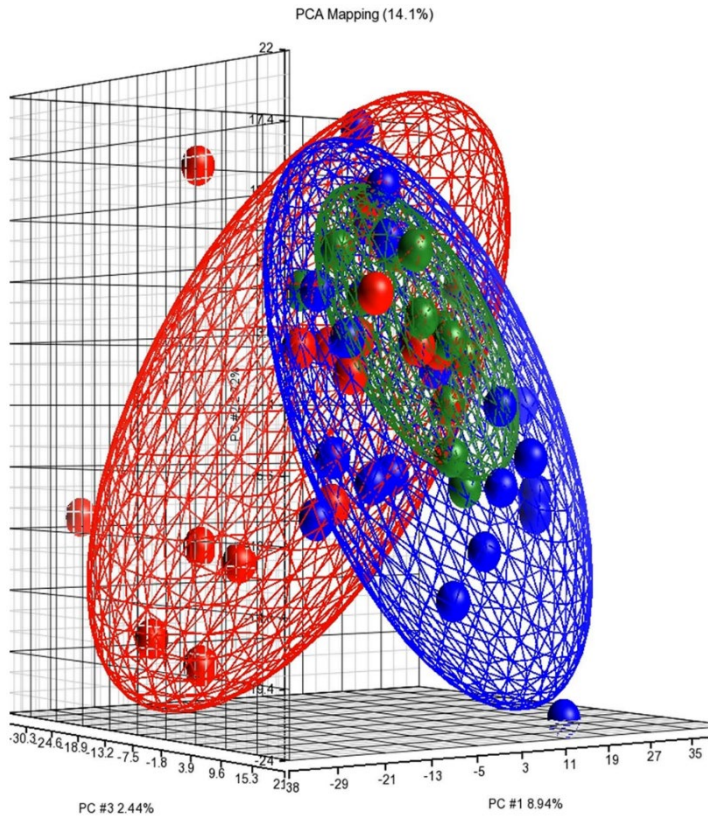


Figura 3.2. Análisis de componentes principales de los RNA no codificantes en PBMC de los tres grupos de estudio. En rojo septuagenarios, en azul centenarios y en verde jóvenes. Los ejes corresponden al componente principal 1 (PC1 – eje de las x), componente principal 2 (PC2 – eje de las y) y al componente principal 3 (PC3 – eje de las z).

Así, cuando observamos la Figura 3.2, podemos observar que la elipse azul, que engloba al grupo de centenarios, se encuentra claramente solapada con la elipse verde que representa el grupo de jóvenes; mientras que el grupo de septuagenarios, representados por la elipse roja, tiene una direccionalidad totalmente distinta de los otros dos grupos.

Estos resultados indican que los perfiles de expresión de miRNA del grupo de centenarios son similares a los del grupo de jóvenes; mientras que el grupo de septuagenarios muestra un patrón de expresión de miRNA visiblemente diferente cuando se compara con centenarios y jóvenes.

3.1.3 ESTUDIO DE miRNAs CARACTERÍSTICOS DE CENTENARIOS

Prosiguiendo con el estudio, se realizó un análisis estadístico ANOVA para comparar nuestras 3 variables (jóvenes, septuagenarios y centenarios) y obtuvimos los RNAs no codificantes estadísticamente significativos. Posteriormente, llevamos a cabo un análisis más restrictivo fijando el filtrado en un “*fold change*” $\geq |1.8|$ y en un p-valor ≤ 0.05 .

La Figura 3.3 muestra el número de RNAs no codificantes que cambian significativamente, ya sea al alza o a la baja, al comparar los tres grupos de estudio por parejas.

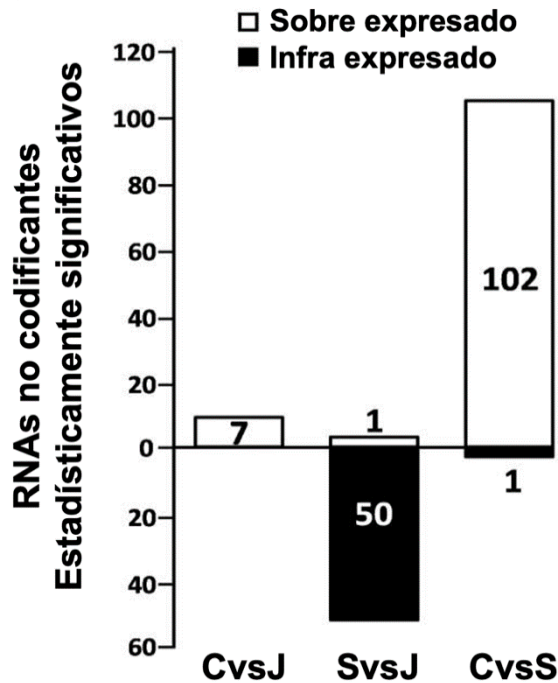


Figura 3.3. Número de RNA no codificantes cuya expresión está modificada significativamente al comparar los 3 grupos de estudio. Análisis estadístico (ANOVA) restrictivo basado en $p \leq 0.05$ y cambio $\geq |1.8|$ para comparar centenarios con jóvenes (CvsJ), septuagenarios versus jóvenes (SvsJ) y centenarios versus septuagenarios (CvsS).

Tal y como queda reflejado en la figura 3.3, se identificaron 7 RNAs no codificantes que cambiaban significativamente al alza cuando comparábamos centenarios y jóvenes (C vs J).

En claro contraste, cuando comparamos septuagenarios y jóvenes (S vs J) encontramos 50 RNAs no codificantes infraexpresados y sólo 1 sobreexpresado. La situación era similar cuando comparábamos centenarios y septuagenarios (C vs S), ya que 102 RNAs no codificantes estaban sobreexpresados en centenarios y sólo 1 estaba infraexpresado en comparación con los septuagenarios.

A raíz de los datos obtenidos, identificamos los 7 RNAs no codificantes sobreexpresados que cambiaban significativamente al comparar centenarios y jóvenes. De ellos, 6 eran miRNAs y el séptimo se trataba de otro tipo de RNA no codificante. Los 6 miRNAs en cuestión eran **miR-4281**, **miR-21**, **miR-130a**, **miR-494**, **miR-1975** y **miR-1979**. El séptimo RNA no codificante identificado fue el **scaRNA17** o también llamado **U91**. Es importante señalar que todos ellos estaban sobreexpresados y ninguno infraexpresado.

3.1.4 VALIDACIÓN DE miRNAs SOBREENPRESADOS EN CENTENARIOS

De los 7 RNA no codificantes relevantes, uno fue descartado, concretamente el **miR-4281**, ya que su expresión no cambiaba entre centenarios y septuagenarios y, por tanto, no era específico del grupo de centenarios. Por otro lado, los **miR-1975** y **miR-1979** no pudieron ser validados porque el diseño de sus sondas no estaba disponible comercialmente; probablemente porque sus funciones biológicas, hasta el momento, no se han descrito.

De los 4 restantes RNA no codificantes significativos (que distinguirían a los centenarios de los otros dos grupos), se procedió a su validación con la técnica de RT-PCR mediante sondas Taqman, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 3.4.

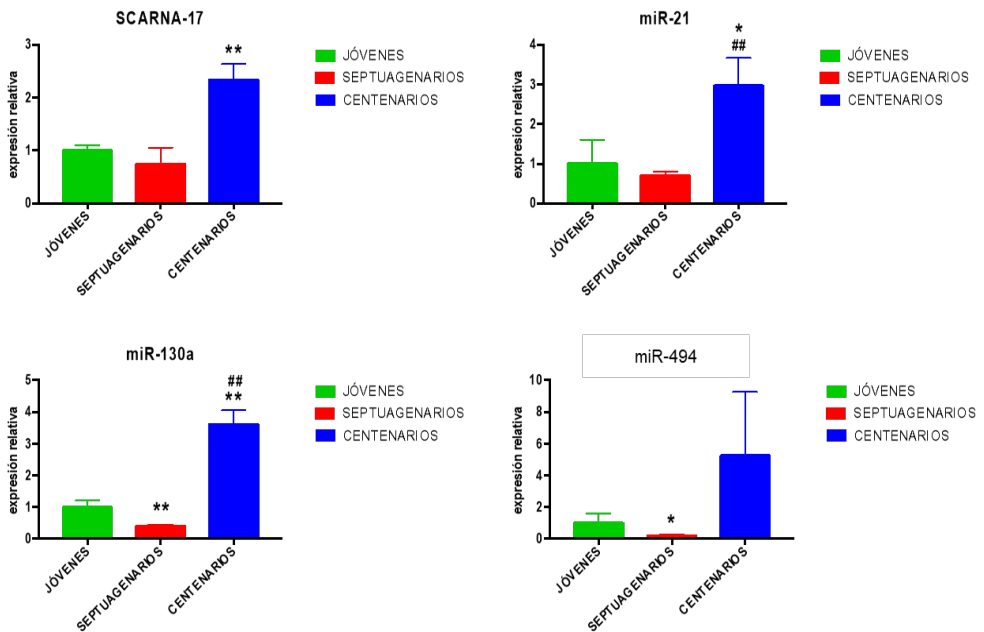


Figura 3.4. Validación de los RNA no codificantes que únicamente se sobreexpresan en centenarios al compararlos con septuagenarios y jóvenes. Expresión de SCARNA-17, miR-21, miR-130a y miR-494 determinada por RT-PCR. Los valores se representan como la media \pm DE. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ versus jóvenes y ## $p < 0.01$ versus septuagenarios.

Tal y como muestra la Figura 3.4, la validación nos mostró que los 4 RNAs no codificantes estaban efectivamente sobreexpresados en el grupo de centenarios, en comparación con los otros dos grupos de edad:

- scaRNA17 sobreexpresado 2,34 veces respecto al grupo de jóvenes
- miR-21 sobreexpresado 2,97 veces respecto al grupo de jóvenes
- miR-130a sobreexpresado 3,61 veces respecto a jóvenes

- miR-494. En este miRNA encontramos una tendencia a la sobreexpresión en centenarios frente a jóvenes, pero no estadísticamente significativa (5,26 veces)

Obtenidos estos resultados, el siguiente paso fue estudiar la implicación biológica de los RNAs no codificantes que cambiaban específicamente en centenarios. Procedimos a analizar los procesos celulares, enfermedades y genes diana que podían estar regulando estos miRNAs significativos de nuestro grupo de centenarios mediante el programa *Pathway Studio*, versión 8.0 (AriadneGenomics, Rockville, MD).

A continuación, se resume la información obtenida tras la búsqueda:

- I. Por lo que respecta al **mi-R21** (el más estudiado), se conocen 198 genes descritos (no de forma teórica) regulados por este miRNA. Además, tiene alguna función en, al menos, 10 procesos celulares tales como apoptosis, proliferación celular, daño mitocondrial, crecimiento celular, quimiosensibilidad, ciclo celular, respuesta al estrés, inestabilidad genómica, escisión del mRNA e invasión y traslación celular. También se ha descrito su implicación en enfermedades tales como neoplasmas, fibrosis, hipertrofia y cardiopatías, entre otras.
- II. En cuanto al **miR-130**, se han encontrado 668 genes diana y los procesos celulares donde se ha descrito alguna función son principalmente cardíacos y/o vasculares. En lo referente a enfermedades, está relacionado con neoplasmas, al igual que los otros 2 miRNA (miR-21 y miR-494).
- III. El **miR-494** regula 336 genes descritos y parece tener un papel relevante en el proceso de muerte celular.

- IV. Por último, del **scaRNA17** disponemos de poca información, se sabe que se acumula en los cuerpos de Cajal y que está involucrado en procesos metabólicos y en el mantenimiento de los telómeros.

3.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS mRNA EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN CENTENARIOS

3.2.1 SELECCIÓN DE MUESTRAS PARA EL ESTUDIO DE mRNAs

Los miRNAs, como es sabido (Saumet *et al.*, 2006), tienen la capacidad de regular muchos genes al mismo tiempo, lo cual los convierte en candidatos idóneos para controlar los procesos fisiológicos y especialmente los procesos multifactoriales como es el envejecimiento (Lu *et al.*, 2005).

Llegado a este punto, nos planteamos analizar el patrón de expresión de los mRNAs (utilizando microarrays de mRNAs), para buscar posibles dianas de estos miRNAs y así analizar las vías de señalización que diferencian al grupo de centenarios.

Igual que para el estudio de los miRNAs, el primer paso fue el cribado de las muestras de RNA total obtenido de las PBMC en función de su calidad, concentración e integridad (ver Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Media de los parámetros de calidad establecidos para el RNA total obtenido de las muestras de PBMC para el estudio de mRNA, por grupos de edad.

mRNA	JÓVENES	SEPTUAGENARIOS	CENTENARIOS
CONCENTRACIÓN (ng/μL) [mín-máx]	97,2 ± 65,5 [26,0 – 198,4]	82,4 ± 44,7 [31,2 – 139,2]	153,9 ± 39,4 [76,6 – 193,6]
PUREZA (ratio A 260/280)	2,00 ± 0,08	2,00 ± 0,06	2,04 ± 0,06
INTEGRIDAD (RIN)	8,0 ± 1,4	8,3 ± 0,5	8,3 ± 0,9

En la Tabla 3.2 podemos observar que todas las muestras que se seleccionaron para realizar el estudio cumplían con los criterios establecidos (i.e. concentración de RNA total \geq a 20 ng/μL por muestra, ratio de absorción 260/280 \geq 1.8 y un RIN \geq 6). Asimismo, constatamos que las muestras de los tres grupos de edad eran de calidad similar.

En definitiva, se realizaron 8 microarrays de centenarios, 6 microarrays de septuagenarios y 8 microarrays de jóvenes, lo que hace un total de 22 microarrays que debieron pasar los mismos controles de calidad ya mencionados para los microarrays de miRNAs.

3.2.2 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS mRNA

Para identificar qué genes son expresados diferencialmente en centenarios frente a jóvenes y septuagenarios y por tanto son característicos de centenarios, llevamos a cabo un análisis transcriptómico funcional usando el GeneChip Human

Gene 1.0ST Array, que analizaba 28.869 genes humanos y realizamos un análisis de componentes principales (PCA) de las muestras de los tres grupos de estudio (Figura 3.5).

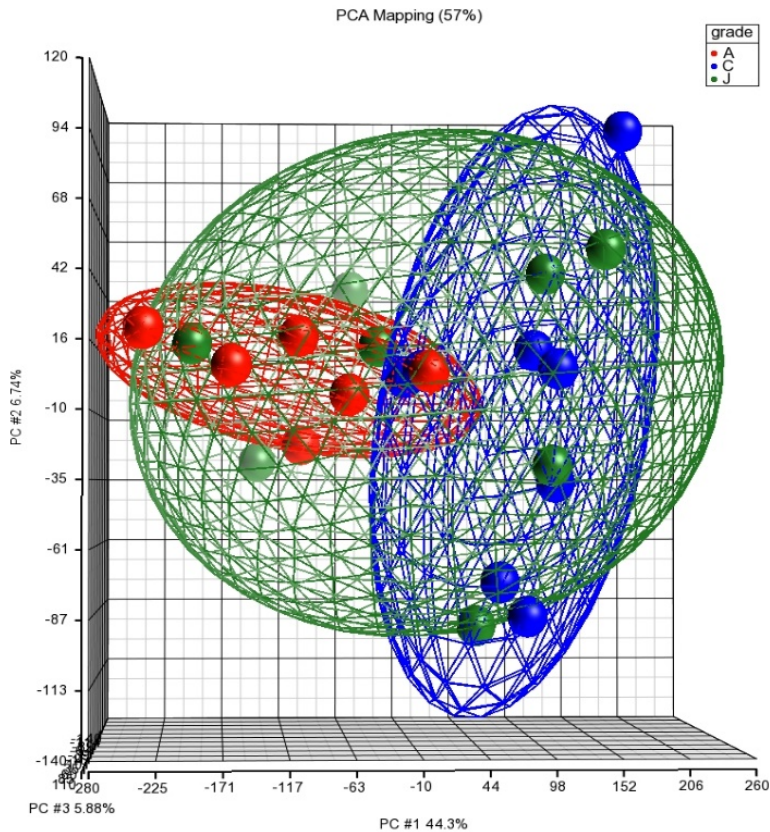


Figura 3.5. Análisis de componentes principales de los mRNA en PBMC de los tres grupos de estudio. En rojo septuagenarios, en azul centenarios y en verde jóvenes. Los ejes corresponden al componente principal 1 (PC1 – eje de las x), componente principal 2 (PC2 – eje de las y) y al componente principal 3 (PC3 – eje de las z).

Tal y como se observa en la Figura 3.5, la elipse azul, que engloba a los centenarios, tiene una direccionalidad muy diferente a la elipse roja, que representa a los septuagenarios. Estos resultados están en línea con los encontrados en el estudio de los miRNA, y confirman que los centenarios muestran un patrón de expresión de mRNA diferente al de los septuagenarios.

3.2.3 ESTUDIO DE mRNAs CARACTERÍSTICOS DE CENTENARIOS

Tras dicho análisis, se realizó un análisis estadístico ANOVA para comparar los 3 grupos de estudio, y obtuvimos 12.754 mRNAs expresados diferencialmente a niveles significativos ($p \leq 0.05$) entre centenarios y septuagenarios. Procedimos de igual modo y comparamos centenarios y jóvenes, encontrando 2985 mRNAs expresados diferencialmente ($p \leq 0.05$).

Posteriormente, tal y como muestra la Figura 3.6, mediante un diagrama de Venn pudimos identificar 1721 mRNAs que se expresaban de forma característica en los centenarios.

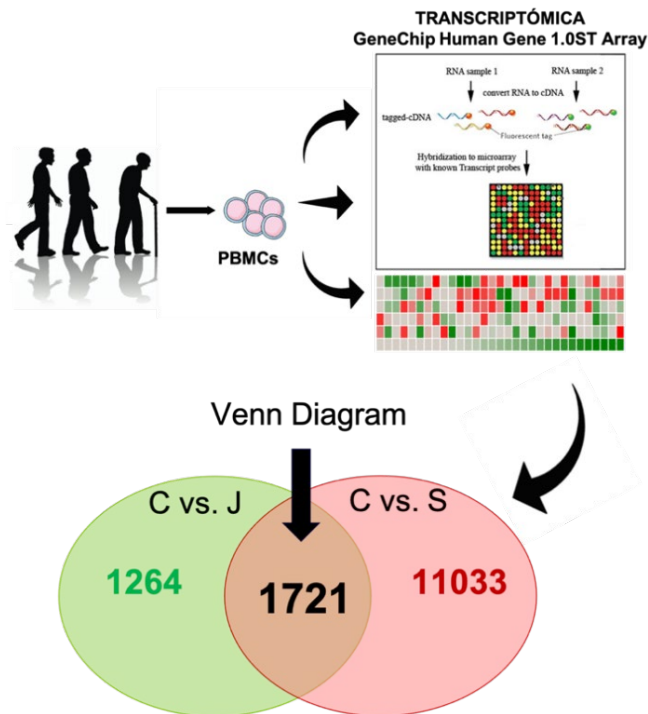


Figura 3.6. Esquema del procedimiento hasta la obtención del Diagrama de Venn. Se muestra el nº de mRNAs regulados en los diferentes grupos de edad y el nº de mRNAs (1721) que se modifican significativamente al comparar jóvenes, septuagenarios y centenarios. Los datos (archivos .CEL) se analizaron y filtraron estadísticamente usando Partek Genomic Suite 6.6 software. Los mRNAs estadísticamente significativos se filtraron aplicando un valor de $p < 0,05$ y un fold change $\geq | 1,8 |$.

3.3 IDENTIFICACIÓN DE PROCESOS BIOLÓGICOS Y "SUBNETWORKS" CARACTERÍSTICOS DE LOS CENTENARIOS.

A tenor de los resultados obtenidos, el manejo de 1721 genes era muy complicado así que decidimos buscar medios de agruparlos y las dos opciones que

elegimos eran: i) agrupar los genes en procesos biológicos; ii) agrupar los genes en *subnetworks*. Un *subnetwork* es un conjunto de genes conectados estructural o funcionalmente mediante un gen común.

A continuación, se desarrollarán cada una de ellas:

3.3.1 Procesos biológicos asociados a los genes característicos de centenarios.

Este análisis nos permitió comprobar cuáles eran los principales procesos biológicos asociados, en mayor o menor medida, a los 1721 genes diferenciales de centenarios y de esta manera conjeturar sobre aquellos más significativos, característicos y exclusivos del envejecimiento exitoso.

Por tanto, agrupamos esos 1721 genes en términos de procesos biológicos (Figura 3.7). En esta figura, en el eje de las Y mostramos el número de genes y en el eje X los procesos biológicos implicados. Los procesos se muestran agrupados en términos de su p-valor, de modo que aquellos con los valores más altos se muestran en el lado izquierdo de la figura. Es de señalar que sólo están representados los 20 primeros cuyo p-valor era más alto, de un total de 100 procesos significativos en los que aparecían implicados algunos de estos 1721 genes. Podemos observar que la respuesta inmune seguida de la adhesión celular y de la actividad del receptor de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) encabezan la lista, pero una mirada detallada al resto nos deja entrever la estrecha relación que existe entre muchos de ellos.

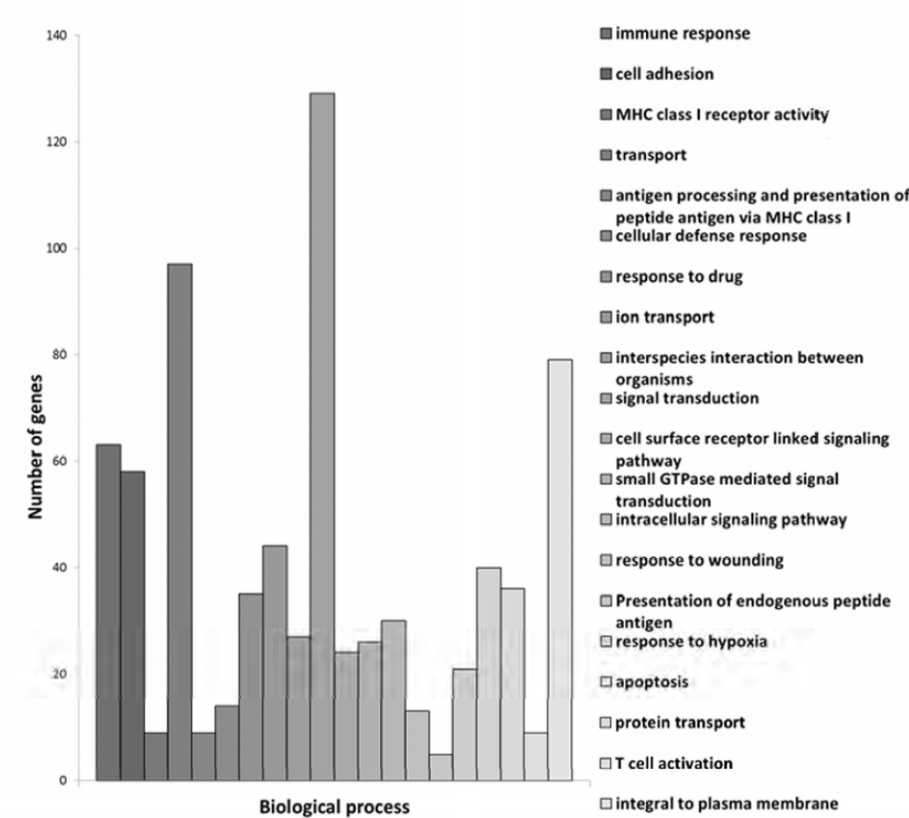


Figura 3.7. Genes característicos de centenarios, agrupados en términos de procesos biológicos. En el eje X se muestran los procesos biológicos implicados y en el eje Y el número de genes característicamente expresados en los centenarios que tienen relación con un proceso biológico concreto.

Así pues, vemos que la respuesta inmune está estrechamente relacionada con la actividad del receptor de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), con la adhesión celular, con el procesamiento y presentación del antígeno peptídico endógeno al CMH I, con la activación de las células T y con el transporte a través de la membrana entre otros. También muy relacionada con la respuesta inmune y, a nuestro parecer, de suma importancia en la longevidad extrema,

encontramos la apoptosis. Esta es una vía clave, pues en ella convergen, no sólo el análisis de procesos biológicos, sino también el análisis de subnetworks a través de uno de los genes implicados en ella, BCL-xL, como más tarde se desvelará en el desarrollo de este trabajo. Todo ello corrobora la teoría de la respuesta inmune del envejecimiento (Ostan *et al.*, 2008). Así pues, la inmunosenescencia que está estrechamente asociada al envejecimiento ordinario, parece “haber hecho un paréntesis” con los centenarios, ya que mantienen una respuesta inmune excepcional que los hace similares a los jóvenes y muy diferentes de los septuagenarios (Borras *et al.*, 2016)

El otro gran proceso celular que destaca notablemente (Figura 3.7) es la señalización celular. Las células están en permanente comunicación a través de señales moleculares de diferente naturaleza (hormonas, citoquinas, péptidos, etc.) y, de este modo, regulan la proliferación, diferenciación, metabolismo y también la muerte celular. Cuando estas señales se desencadenan, se produce la activación de rutas específicas de transducción de señales para generar las respuestas adecuadas. Las células han diseñado un complejo entramado de vías de señalización donde muchas están interconectadas, por lo que se suele hablar de redes de señalización celular. Como en el caso de la respuesta inmune, la señalización celular engloba muchas de los procesos que hemos visto en la Figura 3.7 (*i.e.* transporte de proteínas, receptores de membrana, vías de señalización ligadas a receptores de superficie, transporte iónico, etc). Los resultados obtenidos aunan en la idea de que los centenarios mantienen una red de señalización más precisa que sus congéneres septuagenarios, lo cual concuerda con la teoría de la alteración de la señalización celular del envejecimiento desarrollado por nuestro grupo (Viña *et al.*, 2012). Para afianzar estos resultados, tenemos los datos previamente reportados sobre el miRNoma de centenarios, que es similar al de

jóvenes y muy diferente al de septuagenarios. Como sabemos, los miRNAs están implicados en la señalización celular y en el control de la expresión del mRNA. El hecho de que la señalización celular sea un proceso mantenido en el envejecimiento satisfactorio se puede explicar porque los centenarios mantienen una alta expresión de los miRNAs mientras que los septuagenarios la han perdido, al menos en parte.

3.3.2 Análisis de *subnetworks*.

Como hemos señalado anteriormente, un *subnetwork* es un conjunto de genes conectados estructural o funcionalmente mediante un gen común.

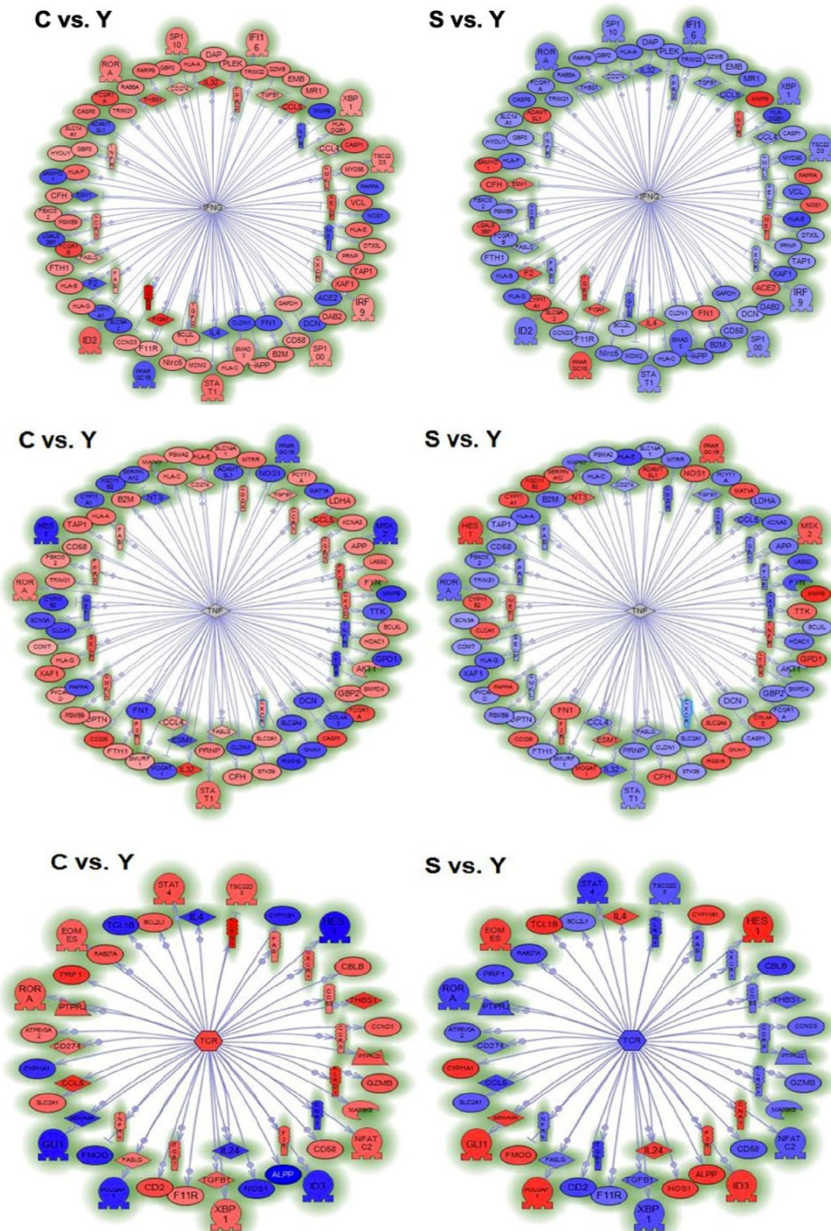
Para lograr nuestro propósito empleamos el programa *Pathway Studio* de *Ariadne*. Este programa lleva a cabo análisis de *subnetworks*, buscando relaciones funcionales o estructurales entre los genes y agrupándolos.

Nuestro análisis de los 1721 genes cuya expresión resultó ser estadísticamente diferente en centenarios frente a las otras dos poblaciones dio lugar en 6 genes: interferon IFN- γ (**IFNG**); receptor células T (**TCR**); factor de necrosis tumoral (**TNF**); SP1 factor de transcripción (**SP1**); factor de crecimiento transformador (TGF)- β 1 (**TGF β 1**); e interleuquina 32 (**IL-32**) (Figura 3.8).

Resulta muy interesante que, cuando comparamos centenarios con jóvenes y septuagenarios con jóvenes, obtenemos unas casi perfectas **imágenes especulares** (Figura 3.8). En ellas podemos observar que los genes que están sobreexpresados (color rojo) en centenarios tienden a estar infraexpresados (color azul) en septuagenarios, lo que nos lleva a la conclusión de que la expresión de los

Resultados

mRNAs en el envejecimiento exitoso difiere significativamente de la expresión que encontramos en el envejecimiento ordinario.



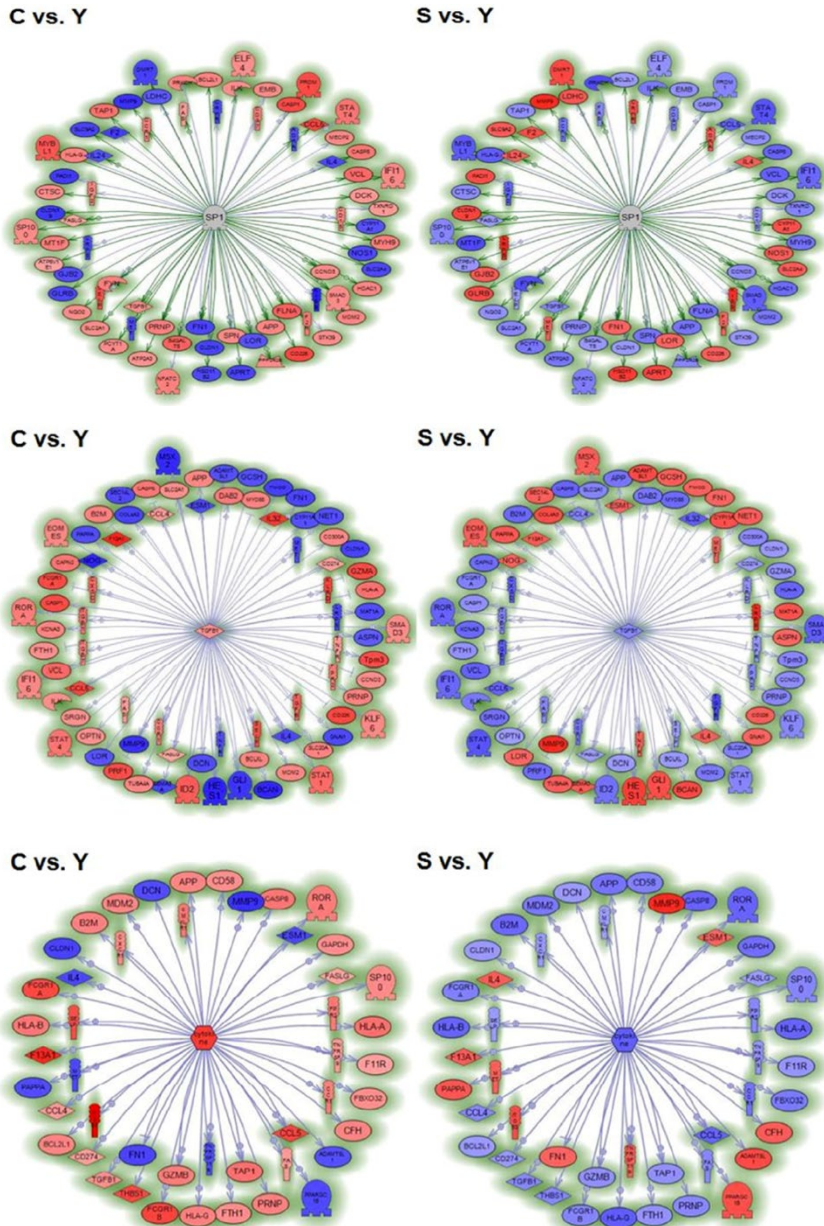


Figura 3.8. Análisis de subnetworks de genes específicamente regulados por centenarios (C) o septuagenarios (S) en comparación con jóvenes (Y) que señalan a *INFG*, *TCR*, *TNF*, *SP1*, *TGFB1* e *IL-32* como genes con importancia en la regulación. Los subnetworks se generaron en la base de datos ResNet 8.0; 2010Q4 Mammal por las conexiones que se establecen entre determinados genes con sus genes vecinos. El color rojo indica sobreexpresión, mientras que el color azul infraexpresión.

A continuación, describimos brevemente el papel biológico de estos 6 genes identificados en el análisis de *subnetworks*:

- I. **Interferon γ (IFNG o IFN- γ):** Se trata de una citoquina proinflamatoria que es fundamental para la inmunidad innata y adaptativa contra infecciones víricas, bacterianas y protozoarias. Lo secretan predominantemente células asesinas naturales (NK) y asesinas naturales T (NKT) (inmunidad innata) y linfocitos T activados por antígenos a través del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH): linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ (inmunidad adaptativa). (Schoenborn *et al.*, 2007). Estudios recientes han señalado que el IFNG también es producido por células inmunes descubiertas a principios de la década de 2010, las denominadas células linfoides innatas no citotóxicas (ILC) (Artis *et al.*, 2015).

Los linfocitos T CD8+ son linfocitos citotóxicos que reconocen el antígeno a través del CMH I, y eliminan a las células diana del mismo modo que lo hacen las células NK, esto es, induciendo la apoptosis en la célula infectada.

Los linfocitos T CD4+ reconocen antígenos presentados en el CMH II y han sido clasificadas en Th 1 y Th2 (células T “helper” o colaboradoras), según sea su perfil de producción de citoquinas:

- Los Th1 producen IL-2, IL-12, TNF- α e IFN- γ , controlan la inmunidad celular y son útiles en infecciones intracelulares.
- Los Th2 producen IL-10, IL-4, IL-6, IL-13 y colaboran en las respuestas de inmunidad humoral (anticuerpos).

Con el envejecimiento, son numerosos los estudios que proponen un cambio en el sistema Th1/Th2, pasándose de una respuesta predominante de los linfocitos Th1 en edades más tempranas, a una respuesta mayoritaria de los Th2 con el envejecimiento. Esto conduciría a una alteración en el perfil de citoquinas con la edad, y podría explicar de algún modo la disfunción del sistema inmunitario en los individuos de edades avanzadas. (Shearer *et al.*, 1997; Alberti *et al.*, 2006).

En cuanto a las células NKs tienen una importante actividad citotóxica, dirigida a células infectadas por virus y a células cancerígenas que, según algunos autores, se ve disminuida por el descenso en la cantidad de NK al avanzar la edad. Este estudio fue realizado con células procedentes de sangre periférica tanto de hombres como de mujeres y se comprobó que este efecto es independiente del género. (Mariani *et al.*, 1996; Di Lorenzo *et al.*, 1999; Mocchegiani *et al.*, 2004; Arranz *et al.*, 2008). Sin embargo, otros autores han detectado un aumento progresivo del número de células NK con la edad en sangre periférica (Camous *et al.*, 2012). Estas discrepancias y resultados aparentemente contradictorios podrían verse reflejados en distintos niveles de IFNG en pacientes de avanzada edad.

Cabe destacar que existen otras poblaciones de células NK, como las NKT también productoras del IFNG, que coexpresan el receptor antígeno-específico de los linfocitos T (TCR), y que se encuentran aumentadas en número con la edad (Solana *et al.*, 2000).

Son varias las funciones que lleva a cabo el IFNG, si bien su función principal es la activación de los macrófagos a fin de aumentar su capacidad fagocitaria en la respuesta inmune. Otra función destacable es la de inducir

a los linfocitos B a cambiar la clase de inmunoglobulina (Ig) que están sintetizando.

Además, el IFNG aumenta la expresión molecular del CMH I y II en células. También tiene propiedades inmunoregulatorias, antivirales y antitumorales y lleva a cabo la transcripción de 30 genes que están relacionados con respuestas celulares y fisiológicas (Schroder *et al.*, 2004).

II. Receptor células T (TCR): es el receptor antígeno-específico de los linfocitos T, es un receptor celular asociado a una vía de señalización intracelular caracterizado por poseer como ligandos a péptidos pequeños, asociados con moléculas del CMH en la membrana plasmática de macrófagos y otras células presentadoras de antígenos (APC). Está conformado por inmunoglobulinas, de hecho, es muy similar al fragmento Fab de éstas, se trata de un heterodímero compuesto por 2 cadenas polipeptídicas distintas unidas entre sí por un enlace disulfuro. Se presenta siempre como una molécula integral de la membrana plasmática del linfocito T y también de las células NK T, insertado en ella por sus regiones hidrófobas, de modo que el TCR siempre tiene una porción extracelular, otra transmembrana y una cola intracitoplásmica.

Las células T son responsables de las reacciones inmunológicas mediadas por células y por ello estos receptores TCR sólo reconocen antígenos foráneos de tipo peptídico cuando son “presentados” formando un complejo con las moléculas del CMH; tanto de la clase I como de la clase II.

Los TCR se encuentran estrechamente asociados a diversas proteínas invariables unidas a la membrana, implicadas en la transmisión de la señal desde el receptor, que ha sido activado por el antígeno, al interior de la

célula. Por lo general, la afinidad de los TCR por los complejos MHC-péptido de una célula presentadora de antígeno (APC) es muy baja como para inducir una interacción funcional entre las dos células.

Algunos autores describen errores en las vías de señalización de las células T a través del receptor de membrana TCR y también defectos en la transducción de señales de las células T desde la membrana al núcleo (Larbi *et al.*, 2011). Se ha propuesto que estos errores pudieran explicar la inmunosenescencia, esto es la disminución de la capacidad de respuestas inmunitarias asociadas al envejecimiento.

- III. **TNF- α (factor de necrosis tumoral):** Se trata de una citoquina proinflamatoria multifuncional, secretada por una amplia variedad de estirpes celulares, siendo las mayores productoras las células mononucleares, principalmente macrófagos activados. El TNF está involucrado en un gran número de actividades biológicas tanto celulares como orgánicas que van desde la fiebre y el daño tisular, hasta su implicación en la diferenciación celular, en la apoptosis y en la regulación genética de otras citoquinas y moléculas inmunoregulatoras. Tal es así que, hasta ahora, no se ha encontrado ninguna célula de mamíferos que carezca de receptores para esta citoquina (Goeddel, 1999). Además, una de las funciones de TNF- α es ser mediador temprano de la respuesta de fase aguda y además está implicado en la producción de quimioquinas, IL-6 y PCR, y en el reclutamiento de leucocitos durante las reacciones inflamatorias (Bruunsgaard *et al.*, 2000).

Al determinar en el envejecimiento los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias, tanto en el plasma como en el suero, se han descrito

valores aumentados de toda una serie de estas citoquinas, entre ellas **TNF- α** (Fagiolo *et al.*, 1993; Himmerich *et al.*, 2006; Kaszubowska *et al.*, 2011). Sin embargo, en la bibliografía algunos autores no detectan cambios asociados con la edad en los niveles plasmáticos de TNF- α (Fagiolo *et al.*, 1993), e incluso otros autores describen que los niveles de TNF- α en plasma son indetectables en la mayoría de los sujetos (Catania *et al.*, 1997).

La desregulación del perfil de citoquinas hacia un estado proinflamatorio característico del envejecimiento conlleva patologías asociadas a la edad. De hecho, los estudios epidemiológicos sugieren que la inflamación crónica de bajo grado o “inflamm-aging” que se da en individuos de avanzada edad, está asociada a enfermedades tales como el Alzheimer, la demencia, la osteoporosis y la diabetes tipo II entre otras (van den Biggelaar *et al.*, 2004).

IV. TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante beta 1 ó TGF β 1): Se trata de una citoquina antiinflamatoria, una proteína perteneciente a la superfamilia de TGF- β (factor de crecimiento transformante beta) la cual incluye las 3 isoformas de TGF β (1, 2 y 3) y otras proteínas y hormonas. Es sintetizado por muchas estirpes celulares principalmente linfocitos, macrófagos, células dendríticas, pero también por fibroblastos, miocitos, condrocitos, astrocitos, células epiteliales, células de riñón, células de placenta y plaquetas, así como por algunas células tumorales. Su expresión regula de manera autocrina y paracrina el crecimiento celular, la diferenciación, la proliferación, el estado de activación de muchas células y, en general, la homeostasis fisiológica de los tejidos (Da Cunha *et al.*, 1992).

El TGF- β 1 puede ser considerado como el prototipo de una citoquina multifuncional, debido a los efectos que tiene sobre los diferentes tipos celulares. Tiene funciones importantes en el desarrollo embrionario y en diversas afecciones patológicas. El TGF- β 1 ejerce potentes actividades inhibitoras del crecimiento en varios tipos celulares (cél mesenquimales, epiteliales, endoteliales y tumorales entre otras) y se han relacionado múltiples mecanismos reguladores del crecimiento con los fenotipos de senescencia celular y envejecimiento de las células madre. Además, la evidencia experimental acumulada, parece indicar una asociación multifacética entre la señalización de TGF- β 1 y los trastornos asociados al envejecimiento, incluida la enfermedad de Alzheimer, la atrofia muscular y la obesidad. Los hallazgos con respecto a estas enfermedades sugieren que el deterioro de la señalización de TGF- β 1 en ciertos tipos de células y la regulación positiva de los ligandos de TGF- β 1 contribuyen a la degeneración celular, fibrosis tisular, inflamación, disminución de la capacidad de regeneración y mal funcionamiento metabólico (Tominaga *et al.*, 2019).

- V. Interleuquina 32 (IL-32):** Se trata de una citoquina proinflamatoria de reciente descubrimiento que se produce tanto en la respuesta inmunitaria innata como en la adaptativa. Se reportó por primera vez en 2005 y es una citoquina bastante peculiar pues su estructura proteica no se parece a ninguna de las citoquinas hasta ahora conocidas y por ese motivo no ha podido ser englobada dentro de sus familias.

Se expresa principalmente de forma intracelular en células inmunitarias, pero puede aparecer en otros tejidos. Su expresión aumenta después de la activación de las células T por mitógenos o de la activación de las células NK por IL-2. Hasta ahora, se han descrito 9 isoformas de IL-32, todas las

cuales muestran diferencias en términos de efecto y en la potencia para provocar un efecto específico.

Entre sus funciones está la de inducir a los macrófagos a secretar diversas citoquinas inflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-8. Se ha demostrado que IL-32 activa las rutas de señalización de NF- κ B y p38 MAPK implicadas en la respuesta inflamatoria.

VI. SP1 también llamada proteína de especificidad 1: Se trata un factor de transcripción que se une con alta afinidad a zonas ricas en guanina-citosina de muchos promotores. Su función es regular la expresión de un gran número de genes implicados en variados procesos celulares como el crecimiento celular, la apoptosis, la diferenciación celular, la respuesta inmune, la respuesta al daño del DNA y la remodelación de la cromatina. También juega un papel importante en la carcinogénesis, así en pacientes con cáncer, los niveles altos de SP1 se consideran un pronóstico negativo (Vizcaino *et al.*, 2015).

Este factor de transcripción puede alterar significativamente su actividad según el tipo de estímulo fisiológico y patológico a que se vea sometido. Las modificaciones postraduccionales como la fosforilación, acetilación, glicosilación y procesamiento proteolítico pueden hacer que SP1 pase de ser un factor de transcripción activador de muchos genes, a ser un factor represor de esos mismos genes según demande la célula.

Así pues, los 6 genes hacia los que convergió nuestro análisis de *subnetworks* mediante el uso del programa *Pathway Studio* de *Ariadne* y de la base de datos ResNet 8.0; 2010Q4 Mammal, nos dio una idea de cuáles eran los mecanismos

biológicos mantenidos en el envejecimiento exitoso y dos conceptos claves parecían emerger cuando estudiamos las funciones celulares de los 6 genes centrales de nuestras rosetas: **SEÑALIZACIÓN CELULAR** y **RESPUESTA INMUNE**. Esto concuerda con la teoría de la respuesta inmunitaria del envejecimiento (Viña *et al.*, 2013; Ostan *et al.*, 2008).

3.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES MÁS RELEVANTES IMPLICADOS EN LA MAYOR LONGEVIDAD DE LOS CENTENARIOS.

Quisimos ir un paso más allá a través de un nuevo análisis reduccionista mediante el programa *Pathway Studio* de *Ariadne*, para buscar los genes comunes que compartían los 6 *subnetworks* comentados anteriormente. Tal y como muestra la Figura 3.9, el resultado nos indicó que esos 6 *subnetworks* convergían en 4 genes: **Bcl-xL, Fas, Fas Ligando (FasL) y CCL5**.

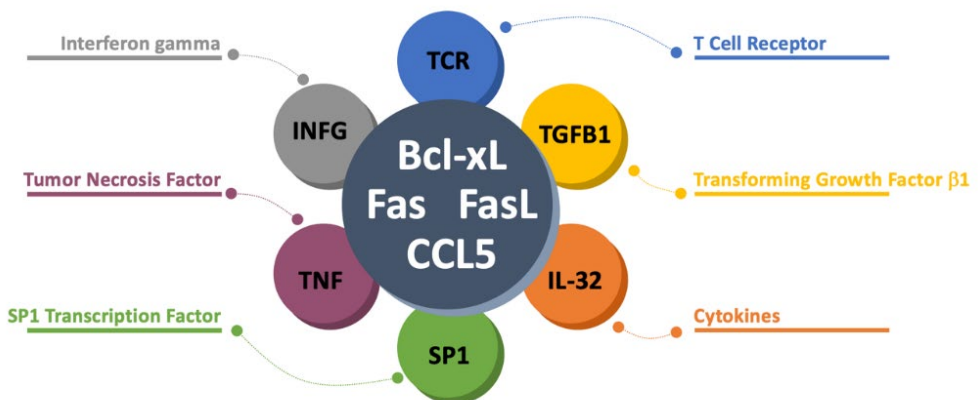


Figura 3.9. Esquema de los genes con importancia regulatoria obtenidos en los análisis de sub-network. Los genes *INFG*, *TCR*, *TGFB1*, *IL-32*, *SP1* y *TNF* obtenidos en el primer análisis, convergen finalmente en 4: *Bcl-xL*, *Fas*, *Fas Ligando* y *CCL5*

Seguidamente, haremos una breve descripción de cada uno de los 4 genes y en el capítulo de discusión de la presente tesis ahondaremos en ellos.

Es de destacar que las funciones celulares de 3 de los 4 los genes obtenidos en el 2º análisis están relacionadas con la apoptosis celular.

- I. **Bcl-xL: Se trata de uno de los miembros de la familia de proteínas Bcl-2** relacionadas con la muerte celular programada o apoptosis. Todos los miembros contienen al menos uno de los cuatro dominios de homología de Bcl-2. Ciertos miembros (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) son antiapoptóticos, mientras que otros (Bax, Bak, Bok) son proapoptóticos. En particular, Bcl-xL se encuentra localizada principalmente en la membrana externa de la mitocondria y, en menor medida, en la membrana nuclear y en el retículo endoplasmático.

Bcl-xL está implicado en la **inhibición** de la **vía intrínseca**, también llamada vía mitocondrial de la **apoptosis**. La apoptosis intrínseca se activa en la célula en respuesta a una variedad de perturbaciones de la homeostasis intracelular, incluyendo daño al DNA y estrés oxidativo, procesos que sabemos, ocurren durante el envejecimiento (Esteve *et al.*, 1999; de la Asuncion *et al.*, 1996).

Bcl-xL promueve la supervivencia celular al migrar a la membrana externa mitocondrial, para contrarrestar así la permeabilización mitocondrial (formación de poros), y evitar la liberación del citocromo c que es la proteína crucial de la vía intrínseca. Al evitar estos cambios en la permeabilidad mitocondrial (no se libera citocromo C, ni Ca⁺⁺) no se desencadena la formación del apoptosoma, la consiguiente activación de la cascada de las caspasas y por tanto se inhibe la apoptosis intrínseca.

Además, Bcl-xL también juega un papel importante en la bioenergética mitocondrial modulando la fusión y fisión mitocondrial, aumentando la biomasa mitocondrial total y mejorando la eficiencia de la síntesis de ATP al disminuir una fuga de protones dentro de la F1FO ATPasa. Esto da como resultado una mejora del metabolismo celular y la prevención del estrés oxidativo (Borrás *et al.*, 2020).

- II. **Fas y Fas ligando:** La proteína Fas es una proteína de superficie con un dominio citoplasmático de muerte celular conservado. El Fas ligando (FasL) es una proteína de membrana, miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), que está altamente expresado en linfocitos citotóxicos. Cuando Fas se activa por la unión de FasL, los dominios de muerte de las colas citosólicas de los receptores de muerte Fas, reclutan proteínas intracelulares adaptadoras FADD (Fas-Associated Death Domain), las cuales a su vez reclutan caspasas iniciadoras (caspasa 8) y a través de un dominio efector de muerte presente tanto en FADD como en la caspasa, forman el llamado “complejo señalizador inductor de muerte” (DISC: death-inducing signaling complex). Esto desencadena la cascada enzimática de las caspasas y pone en marcha la vía de la **apoptosis extrínseca** (mediada por receptores).
- III. **CCL5:** Se trata de una quimioquina o citoquina quimiotáctica también conocida como RANTES (Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted). Una quimioquina es un tipo especial de citoquina, con unas características estructurales determinadas, que estimula la motilidad de las células del sistema inmune y las dirige hacia el lugar dañado mediante **quimiotaxis**. CCL5 es una proteína de pequeño tamaño y

bajo peso molecular que pertenece al numeroso grupo de quimioquinas CC (por la posición adyacente de las dos primeras cisteínas). Es proinflamatoria, participa en variedad de respuestas inmunes e inflamatorias, actuando principalmente como quimioatrayente y activador de tipos específicos de leucocitos.

CCL5 es liberada por muchos tipos de células distintas y sirve para guiar tanto a células del sistema inmunitario innato como del adaptativo. Su función principal es la de atraer monocitos, linfocitos T CD4+ de memoria, basófilos y eosinófilos. Juega un papel activo en el reclutamiento de leucocitos en sitios inflamatorios provocando la liberación de histamina por parte de los basófilos, activando así los eosinófilos.

Algunos estudios señalan que CCL5 en colaboración con IL-2 e IFNG, también puede inducir la proliferación y activación de ciertas células NK (Maghazachi *et al.*, 1996).

El análisis de los genes sobreexpresados en centenarios nos reveló un patrón de genes relacionados con la apoptosis. Nos centramos en **Bcl-xL** porque no sólo está implicado en el control de la apoptosis, sino que también participa en la protección del daño mitocondrial, la modulación de la respuesta inmune, el control de la respiración mitocondrial y la reparación del DNA. Todos estos procesos están asociados al envejecimiento saludable.

A fin de verificar los datos obtenidos, evaluamos la expresión de Bcl-xL en las células polimorfonucleares (PBMC) de los individuos de nuestro estudio mediante RT-PCR y confirmamos que esta expresión está regulada al alza en centenarios en comparación con septuagenarios y jóvenes (Figura 3.10. a). La validación de este resultado nos la dió el *Western Blotting* que realizamos

posteriormente, donde pudimos comprobar el mismo patrón al medir los niveles de proteína (Figura 3.10. b).

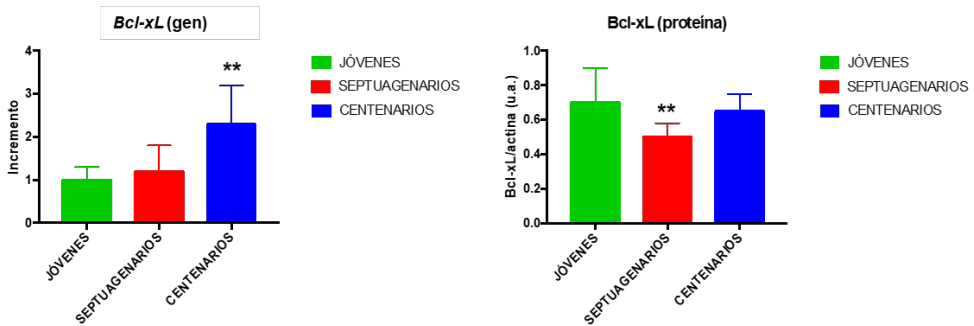


Figura 3.10. Expresión génica y niveles proteicos de Bcl-xL en PBMC de la población de Alzira. **a)** Expresión del gen Bcl-xL en PBMC de jóvenes ($n=14$), septuagenarios ($n=6$), y centenarios ($n=19$) medido por RT-PCR versus GAPDH. **b)** Niveles de la proteína Bcl-xL en PBMC de jóvenes ($n=4$), septuagenarios ($n=5$), y centenarios ($n=4$) medido por Western Blot versus Actina. Los datos se expresan como media \pm DE. ** $p < 0,01$.

3.5 ESTUDIO DE PARÁMETROS MOLECULARES RELACIONADOS CON ESTRÉS OXIDATIVO IMPLICADOS EN LA LONGEVIDAD EXTREMA.

Al tratarse Bcl-xL de una proteína mitocondrial involucrada en el control de la cadena respiratoria y por lo tanto estar muy implicada en la producción de radicales libres, quisimos estudiar parámetros de estrés oxidativo.

Medimos daño oxidativo en lípidos y en proteínas, así determinamos los niveles de peroxidación lipídica medidos como malondialdehído (MDA) y los niveles de carbonilación de proteínas.

Resultados

En base a la teoría de envejecimiento de radicales libres, el envejecimiento se acompaña de un aumento de los parámetros de estrés oxidativo (Viña *et al.*, 2007). En la Figura 0.11 podemos observar cómo los septuagenarios tienen valores aumentados de peroxidación lipídica, en comparación con los jóvenes, y cómo los centenarios conservan los valores reducidos de peroxidación siendo éstos comparables a los de los jóvenes. En cuanto a la carbonilación proteica, comprobamos que los niveles de de carbonilación proteica son menores en centenarios comparado con los septuagenarios, e incluso con los jóvenes.

Estos resultados confirman la idea de que el daño oxidativo está asociado al envejecimiento ordinario, pero no al envejecimiento extraordinario.

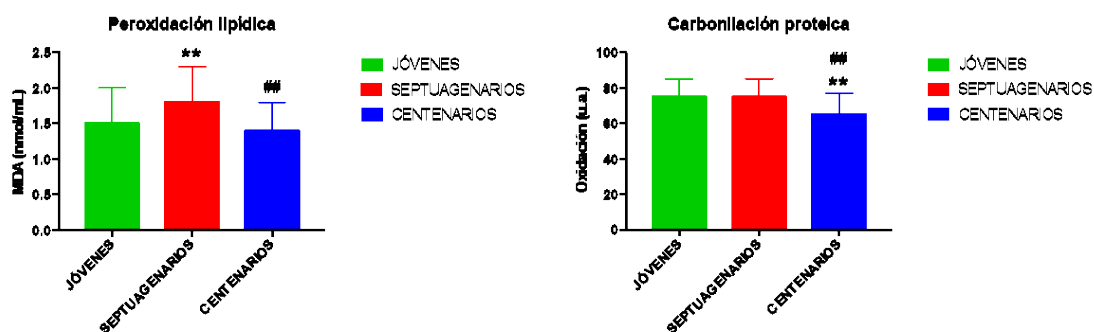


Figura 3.11. Medición de parámetros de estrés oxidativo en plasma de sujetos del estudio de Alzira. **a)** Peroxidación lipídica medida como niveles de malondialdehído (MDA) determinada por HPLC en jóvenes ($n=31$), septuagenarios ($n=31$), y centenarios ($n=21$) de la cohorte de Alzira. **b)** Carbonilación proteica medida por los niveles de proteínas carboniladas en plasma determinadas por Western Blot en jóvenes ($n=31$), septuagenarios ($n=31$), y centenarios ($n=21$). Los datos se expresan como media \pm DE. ** $p < 0,01$ vs jóvenes; ## $p < 0,01$ vs septuagenarios.

4. DISCUSIÓN

4.1 ENVEJECIMIENTO ORDINARIO VERSUS EXITOSO

Tradicionalmente, la mayoría de las investigaciones se han centrado en alargar la supervivencia y prolongar la esperanza de vida, pero se obviaba un concepto muy importante, la calidad de vida. Actualmente, las investigaciones sobre envejecimiento consideran más importante prevenir la discapacidad que aumentar la longevidad y este es el motivo por el cual en las últimas décadas nuevos conceptos sobre envejecimiento están surgiendo con fuerza y asentándose en nuestra sociedad.

Uno de los que está más en auge es el concepto de “envejecimiento exitoso” o “envejecimiento satisfactorio” propuesto por primera vez en 1995 por Franceschi (Franceschi *et al.*, 1995; Rowe & Kahn, 1997). El aumento de la esperanza de vida unido a la disminución de la tasa de natalidad nos está abocando irreversiblemente a una sociedad cada vez más envejecida. Debido a los altos costes sociosanitarios que esto supone, el foco de atención se ha centrado en estudiar y cuantificar de algún modo este envejecimiento saludable y esto se ha hecho midiendo los cambios en la morbilidad relacionados con la edad biológica y midiendo también la condición física y el estado cognitivo a fin de evitar la discapacidad. En este sentido, los **centenarios** parecen ser capaces de evitar o, al menos de retrasar, las principales enfermedades relacionadas con la edad (enfermedades cardíacas, cáncer no cutáneo, accidentes cerebrovasculares, entre otras) y también son capaces de retrasar la discapacidad especialmente en edades más avanzadas (Evert *et al.*, 2003). Razones todas ellas por las que decidimos estudiar este grupo ya que parecen ser el modelo perfecto de envejecimiento satisfactorio.

Además, tal y como se ha comentado en la introducción de la presente tesis, dado que los centenarios están expuestos a las mismas condiciones ambientales básicas que sus contemporáneos que experimentan un “envejecimiento ordinario”, se ha postulado que los factores genéticos pueden desempeñar un papel fundamental en su longevidad (Schoenmaker *et al.*, 2006). De hecho, la evidencia existente sugiere que la contribución genética a una esperanza de vida saludable en los centenarios puede ser mayor que en la población general (Abbott *et al.*, 1978; Perls *et al.*, 2002). Por ello, nuestro estudio se basó fundamentalmente en analizar el miRNoma y el mRNoma de los centenarios de nuestra cohorte, lo cual se explica con más detalle en los siguientes apartados de la discusión de la presente tesis doctoral.

4.2 miRNA EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN CENTENARIOS

La mayor parte de comunidad científica ha priorizado tradicionalmente sus esfuerzos en buscar rasgos genéticos diferenciales y específicos de la longevidad extrema en el propio genoma y así, el grueso de las investigaciones, se centraron en descubrir polimorfismos de un solo nucleótido (de sus siglas en inglés, SNP) que pudieran ser característicos de los centenarios. Tal es el caso, a nivel europeo, de Franceschi *et al.*, (Gravina *et al.*, 2009) quienes demostraron que existen polimorfismos en el gen p21^{Cip1} (CDKN1A) que se correlacionan con la longevidad extrema en una población italiana. Del mismo modo, en Norte América, el Estudio de Centenarios de New England, llevado a cabo por Perls y otros investigadores, ha estudiado la frecuencia de 281 SNPs en su cohorte de centenarios (Sebastiani & Perls, 2012).

El descubrimiento de nuevos sistemas de regulación génica bajo el control de pequeños RNAs no codificantes (ncRNAs) ha tenido un gran impacto en la biología molecular (O'Donnell *et al.*, 2005). Se ha descrito que estas moléculas están altamente implicadas en procesos reguladores de la expresión génica a nivel pos-transcripcional, pues regulan funciones celulares tales como diferenciación celular y desarrollo, adquisición y mantenimiento de un fenotipo dado, entre muchas otras (Robinson, 2009; Chu & Rana, 2007). Los pequeños RNAs no codificantes asociados a complejos multienzimáticos reconocen secuencias complementarias en mRNAs y se aparean con ellas. La interacción entre ambos deriva en la degradación del mRNA y en la represión traduccional e incluso, en algunos casos, pueden causar modificaciones epigenéticas (Filipowicz *et al.*, 2005; Vázquez-Ortiz *et al.*, 2006).

Los más estudiados y conocidos ncRNAs son los miRNAs. Se trata de un tipo de RNA de interferencia (siRNA) o RNA de silenciamiento, pero a diferencia de éstos, los miRNAs son monocatenarios y regulan finamente la expresión de una red de genes diana, pero no los silencian completamente lo cual los convierte en dianas terapéuticas muy prometedoras (Ma *et al.*, 2009)

Así pues, nuestro grupo decidió centrarse en los miRNAs y estudiar sus perfiles de expresión en PBMC de individuos jóvenes, septuagenarios y centenarios con el fin de encontrar características moleculares específicas que nos ayudaran a explicar el envejecimiento exitoso (Serna *et al.*, 2012). La particularidad de que un único miRNA puede apuntar a muchos genes y múltiples miRNAs compartan objetivos, los hace especialmente adecuados para regular procesos como el envejecimiento que, como es sabido, involucra múltiples vías. Queríamos averiguar qué tipos de genes expresaban los centenarios que los hacía tan únicos.

Afortunadamente en nuestro entorno geográfico (Alzira) teníamos una cohorte de centenarios y pudimos obtener muestra de sangre de los tres grupos de estudio.

En los últimos años (primera década de este siglo), el desarrollo de las técnicas genómicas de alto rendimiento ha automatizado y miniaturizado técnicas experimentales de la biología molecular convencional, permitiendo obtener datos a nivel ómico (o global) derivados del análisis de genomas completos. El estudio del transcriptoma completo de un determinado tipo celular es hoy en día posible y asequible gracias al uso de la tecnología de los microarrays de expresión y esa técnica fue empleada en nuestro estudio.

En este punto cabe destacar que, en la actualidad, cada vez cobra más importancia la Secuenciación masiva de Nueva Generación (NGS) también llamada secuenciación masiva en paralelo y parece estar tomando el relevo a la tecnología de los microarrays. Pero debido a la gran cantidad de muestras hibridadas con microarrays y almacenadas en los distintos repositorios públicos, las bases de datos son muy amplias y esto hace conveniente seguir utilizando estos métodos computacionales bioinformáticos para su análisis.

Los estudios previos realizados hasta la fecha se habían interesado por estos miRNAs reguladores de la expresión génica, pero sólo comprobaron la expresión diferencial del miRNoma completo que se produce con el envejecimiento (Noren Hooten *et al.*, 2010), pero no con la longevidad extrema. Así, algunos grupos de investigación que estudiaron el miRNoma de individuos con envejecimiento ordinario determinaron que, en el envejecimiento normal, había cuatro miRNAs que estaban infraexpresados, concretamente miR-17, miR-19b, miR-20a y miR-106a (Hackl *et al.*, 2010). Otro grupo comprobó que el *cluster* (conjunto de miRNAs) miR 17-92 también estaba regulado negativamente (Grillari *et al.*, 2010); pero

ningún estudio había comparado los miRNomas de los 3 tipos de población (jóvenes, septuagenarios y centenarios).

Para reducir y simplificar la complejidad de toda la batería de datos obtenidos de los análisis con microarrays, utilizamos un Análisis de Componentes Principales (siglas en inglés PCA) que hiciera más fácil la comparación entre los grupos

Cuando aplicamos el método de PCA pudimos comprobar que el PCA de los RNAs no codificantes en el grupo de centenarios y en el de jóvenes estaban casi solapados, mientras que el de septuagenarios seguía un patrón completamente diferente. Estos datos nos llevan a concluir que la regulación de la expresión génica en centenarios es muy similar a la de jóvenes mientras que los septuagenarios regulan de modo completamente diferente.

Como ya se ha mencionado, el volumen y complejidad de los datos obtenidos permite diferentes tipos de análisis y tratamientos estadísticos que arrojan una amplia variedad de resultados. Así, una prueba ANOVA nos condujo a un resultado especialmente llamativo: los centenarios sobreexpresaban pequeños RNAs no codificantes (en concreto 7) cuando los comparábamos con jóvenes, mientras que los septuagenarios infraexpresaban 50 en la misma comparación. Este último resultado concuerda con los datos obtenidos por Noren Hooten (Noren Hooten *et al.*, 2010) en el estudio que llevaron a cabo sobre el miRNoma de jóvenes de 30 años y personas de 64 años, también en células mononucleares de sangre periférica. Identificaron nueve miRNA (miR-103, miR-107, miR-128, miR-130a, miR-155, miR-24, miR-221, miR-496, miR-1538) que eran significativamente más bajos en los sexagenarios que en los jóvenes.

Cuando cotejamos el miRNoma de centenarios *versus* septuagenarios, encontramos que los primeros sobreexpresan 102 miRNAs no codificantes frente a un único miRNA sobreexpresado por septuagenarios. Esta regulación al alza en la expresión de miRNAs que mantienen los centenarios *versus* la regulación a la baja que observamos en los septuagenarios cuando comparamos ambos con jóvenes, se vió corroborada por un interesante estudio llevado a cabo por Gombar y colaboradores (Gombar *et al.*, 2012). En este trabajo, realizado en células B de centenarios y sexagenarios (estos últimos como grupo control), se describen 22 miRNAs regulados al alza en centenarios y sólo 2 miRNAs infraexpresados en centenarios en comparación con los controles. Seguidamente realizaron un análisis transversal de expresión de estos miRNAs en diferentes grupos de edad que añadieron a posteriori: quincuagenarios, septuagenarios y octogenarios. Y observaron que, los niveles de expresión disminuyen significativamente con la edad, salvo en el caso de los centenarios quienes mantienen los niveles en el mismo rango que el grupo más joven (quincuagenarios). Gombar *et al.*, emplearon la técnica de secuenciación masiva de nueva generación (NGS), en lugar de la técnica de microarrays empleada en nuestro estudio, pero los resultados fueron similares a los nuestros, en la expresión diferencial relacionada con la longevidad, los centenarios conservan los patrones de expresión de los más jóvenes, mientras que los patrones de expresión de los septuagenarios disminuyen con la edad (Gombar *et al.*, 2012).

De todos los RNAs no codificantes sobreexpresados específicamente en centenarios frente a jóvenes, 7 fueron relevantes: scaRNA17, miR-21, miR-130a, miR-494, miR-1975, miR-1979 y miR-4281. Este último fue descartado porque se sobreexpresaba igual en centenarios y en septuagenarios.

En la actualidad, hay identificados más de 38589 miRNA, catalogados en la base de datos miRBase11. Existen herramientas y bases de datos específicas para el estudio de los miRNA humanos (Solomon *et al.*, 2020). Estos han sido objeto de muchos estudios, pues al estar tan implicados en la expresión génica, se les considera posibles dianas terapéuticas y es por ello por lo que la bibliografía encontrada se concentra principalmente en su relación con diversas enfermedades, sobre todo cáncer y otras relacionadas con el envejecimiento.

Así, por ejemplo, el **scaRNA 17** se acumula específicamente en los cuerpos de Cajal (Darzacq *et al.*, 2002). Los cuerpos de Cajal son estructuras nucleares implicadas en la biogénesis de ribonucleoproteínas (RNPs) necesarias para el procesamiento de pre-mRNA y para la formación y mantenimiento de los telómeros (Zhao *et al.*, 2011). Los telómeros y la telomerasa están implicados en el envejecimiento y, en estudios realizados en ratones, se ha comprobado que la sobreexpresión de la telomerasa incrementa la esperanza de vida (Tomas-Loba *et al.*, 2008)

miR-21 es uno de los más conocidos, pues está implicado en numerosos procesos biológicos, tales como: apoptosis, proliferación celular, daño mitocondrial, crecimiento celular, quimiosensibilidad, ciclo celular, inestabilidad del genoma, respuesta a estrés, escisión del mRNA y traducción. Su desregulación está relacionada con numerosas enfermedades, tales como neoplasias, fibrosis, miocardiopatías y cáncer, entre otras (Kumarswamy *et al.*, 2011). La sobreexpresión de este miR-21 se ha relacionado con un efecto neuroprotector por muerte isquémica (Buller *et al.*, 2010) y con un incremento en la protección cardíaca (Dong *et al.*, 2009; Cheng & Zhang, 2010). La regulación positiva (sobreexpresión) de miR-21 puede disminuir la muerte celular (Matsumoto & Hwang, 2007) e inhibir el daño mitocondrial (Sayed *et al.*, 2010), mientras que su

infraexpresión desemboca en enfermedades como el cáncer (Iorio & Croce, 2012) y otras relacionadas con trastornos metabólicos (Rottiers & Näär, 2012). Estudios recientes han comprobado su implicación en procesos de apoptosis y proliferación celular (Liu *et al.*, 2019).

También vimos que **miR-130a** estaba regulado al alza en centenarios. La principal función conocida de este miRNA es la regulación de la expresión de la proteína FOG-2, proteína reguladora de cardiogénesis y hematopoyesis en mamíferos (Kim *et al.*, 2009), además de estar relacionada con los procesos de vascularización. Análisis bioinformáticos recientes (Zheng *et al.*, 2019) han revelado que PTEN es un objetivo de miR-130a y han descubierto que una sobreexpresión (regulación positiva) del miR-130a, activa la vía PI3K/AKT mediada por PTEN y previene el accidente cerebrovascular isquémico.

La sobreexpresión de **miR-494** se ha comprobado que produce una inhibición de la apoptosis y favorece la cardioprotección (Wang *et al.*, 2010). Además, hay estudios más recientes que relacionan este miR-494 con senescencia celular y con estrés oxidativo (Faraonio *et al.*, 2012; Zeng & Zeng, 2019), procesos biológicos que están estrechamente relacionados con el envejecimiento. Algunos trabajos más recientes lo correlacionan con la modulación de las células inmunes (macrófagos) en el adenocarcinoma de páncreas (Zhao *et al.*, 2019).

miR-1975 es uno de los menos conocidos, algunos autores han descrito que, en humanos, actúa como unidad de transcripción para la RNA polimerasa III (Pol III) (Canella *et al.*, 2010). También se ha visto que desempeña un papel fundamental en la defensa contra la infección por el virus de la influenza a través de un mecanismo de liberación de exosomas, lo que lo convierte en un buen candidato para luchar contra esta enfermedad (Liu *et al.*, 2019).

Por último, con respecto al **miR-1979**, en la bibliografía encontramos poca información acerca de este miRNA. Se sabe que está infraexpresado en pacientes con cáncer colorectal (Wu *et al.*, 2015) y también en pacientes con esclerosis múltiple (Siegel *et al.*, 2012).

4.3 LA EXPRESIÓN DE LOS mRNAs EN INDIVIDUOS DE LONGEVIDAD EXTREMA DIFIERE SIGNIFICATIVAMENTE DE LA QUE PRESENTAN LOS INDIVIDUOS CON ENVEJECIMIENTO ORDINARIO

Como se ha comentado en el apartado material y métodos de la presente tesis, llevamos a cabo un análisis transcriptómico funcional para estudiar cómo se controla la expresión de los mRNAs en personas centenarias. Al igual que ocurrió con los datos de expresión de los miRNAs, encontramos que el mRNoma de centenarios y septuagenarios es sustancialmente diferente, con más de 12.000 mRNAs expresados diferencialmente entre estas dos poblaciones. Además, se identificaron 1721 genes que eran característicos de centenarios, ya que se expresaban de modo diferente cuando los comparábamos con septuagenarios y jóvenes. Posteriormente, agrupamos estos genes en base a dos estrategias: i) en función de los procesos biológicos y ii) en *subnetworks*.

En primer lugar, agrupamos estos genes en función de los procesos biológicos en los que se ven envueltos a fin de obtener una idea de aquellos procesos implicados en la longevidad extrema/envejecimiento satisfactorio. Al agruparlos, observamos que están implicados en al menos 20 procesos biológicos diferentes, aunque en unos procesos había un mayor número de genes

involucrados que en otros. Dos procesos destacaban particularmente por tener el mayor número de genes involucrados: la respuesta inmune y la señalización celular.

Es interesante comentar que algunos de los procesos estaban interrelacionados entre sí, como, por ejemplo: el receptor del complejo principal de histocompatibilidad, la adhesión celular, el procesamiento de antígenos, la presentación de antígenos peptídicos endógenos y la activación de las células T que bien pueden asociarse a la **respuesta inmune**, dándole todavía más peso a su papel en el envejecimiento satisfactorio. Esto está en consonancia con la teoría de la respuesta inmunitaria del envejecimiento (Ostan *et al.*, 2008).

El segundo proceso biológico de especial relevancia que surge en nuestro estudio de envejecimiento extraordinario es la **señalización celular**. La alteración de la señalización celular ha sido recientemente descrita como una de las 7 claves del envejecimiento (López-Otín, *et al.*, 2013). Además, se ha propuesto que la alteración de la señalización celular en relación con los radicales libres también está implicada en el envejecimiento tal y como publicó nuestro grupo (Viña, *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral corroboran la idea de que la red de señalización celular se ve alterada en el envejecimiento ordinario, pero se mantiene en el envejecimiento excepcional. Esto es sustentado por los resultados obtenidos en la expresión de los miRNomas de centenarios, de jóvenes y de septuagenarios, donde al compararlos, podemos destacar la similitud del de centenarios y jóvenes y su gran discrepancia con el de los septuagenarios. La conclusión que podemos extraer es que los centenarios mantienen una señalización celular más precisa que los septuagenarios.

En cuanto al análisis de *subnetworks*, este convergió en seis genes: IFNG; TCR; TNF; SP1; TGFβ1 y IL-32. Este resultado manifestó ser coherente, pues los seis

genes son relevantes en las células inmunitarias y nuestro objeto de estudio eran PBMC. Al analizar los *subnetworks* de cada uno de estos 6 genes y su red de genes interconectados, obtuvimos unas llamativas imágenes prácticamente especulares al comparar “centenarios vs. jóvenes” y “septuagenarios vs. jóvenes”. Los genes que estaban regulados al alza en los centenarios tendían a estar regulados a la baja en los septuagenarios, lo que sugiere que la activación de estas redes está asociada con un envejecimiento excepcional. Concluimos que la expresión de mRNA en humanos con una longevidad excepcional difiere significativamente de la del envejecimiento ordinario.

Las características genéticas de la longevidad extrema se han estudiado a fondo mediante el análisis de variantes genéticas: polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, de sus siglas en inglés *Single Nucleotide Polymorphisms*) (Sebastiani *et al.*, 2012) y, más recientemente, mediante el análisis epigenético (Jones *et al.*, 2015), pero hasta donde sabemos no se han realizado estudios que analicen la expresión génica global asociada a la longevidad extrema en humanos. Sarup *et al.*, demostraron que las moscas seleccionadas por su longevidad conservan un perfil de expresión genética "joven" (Sarup *et al.*, 2011). Estos resultados, en invertebrados, están en consonancia con los nuestros en humanos, es decir, los individuos que muestran una longevidad excepcional mantienen la expresión (regulación positiva) de determinados genes cuya expresión se pierde (regulación negativa) en el envejecimiento ordinario, de ahí las imágenes especulares.

4.4 EL ANÁLISIS DE LOS GENES SOBREENEXPRESADOS EN CENTENARIOS REVELA UN PATRÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA APOPTOSIS

Los seis genes identificados en el análisis de los *subnetworks* IFNG; TCR; TNF; SP1; TGFβ1 y IL-32 se relacionan, a su vez, con cuatro genes, tres de los cuales están involucrados en el control de la apoptosis: **Bcl-xL** (también conocido como BCL2L1), **Fas** y **Fas ligando (FasL)**. Además, utilizando la plataforma *Gene Ontology* (<http://geneontology.org>), detectamos que la apoptosis es uno de los procesos más comúnmente conservados en los centenarios.

Probablemente, el principal mecanismo responsable del envejecimiento saludable sea el mantenimiento de una correcta homeostasis que garantice la eficacia de las funciones fisiológicas, bioquímicas e inmunológicas. Para llevar a cabo esto, el organismo necesita eliminar las células dañadas para poder reemplazarlas por células nuevas y funcionales. La apoptosis está involucrada en este proceso, de ahí que tenga pleno sentido su implicación en el envejecimiento exitoso. Sin embargo, si la apoptosis está desregulada, es probable que aparezcan enfermedades derivadas de a la acumulación de células aberrantes y la consecuente pérdida de la homeostasis (Pomatto & Davies, 2017).

Fas y FasL son genes implicados principalmente en el control de la vía extrínseca a la apoptosis, mientras que Bcl-xL inhibe la vía intrínseca también conocida como vía mitocondrial de la apoptosis (Jin & El-Deiry, 2005). La unión de FasL al receptor Fas activa la cascada enzimática de las caspasas, lo que lleva a la escisión de varias proteínas diana con funciones estructurales o reguladoras y consecuentemente a la destrucción de la célula (Zimmermann *et al.*, 2001). Fas y

FasL son moduladores esenciales de la apoptosis del sistema inmunológico, promueven la eliminación de las células T estimuladas para evitar la inflamación crónica y las patologías inflamatorias relacionadas con la edad. Fas se puede producir en 2 formas principales, de membrana (mFas) y soluble (sFas), que tienen diferentes actividades. Después de unirse a FasL, la forma de membrana desencadena la apoptosis, mientras que la forma soluble puede bloquear FasL inhibiendo de ese modo su capacidad para inducir la muerte celular. Así, se ha planteado la hipótesis de que la relación entre las 2 formas podría ser crucial para la propensión de la célula a sufrir apoptosis o sobrevivir (Kavathia *et al.*, 2009). Se ha observado que, en el envejecimiento ordinario, la forma soluble de Fas (sFas) aumenta, mientras que disminuye la concentración total de citocromo c (liberado por las células durante la apoptosis), lo que contribuye a un desequilibrio de la apoptosis global (Kavathia *et al.*, 2009).

La apoptosis en personas centenarias también se ha examinado en varios estudios. En uno de ellos, los autores analizaron los niveles de mRNA de las diferentes formas de Fas: Fas de membrana (mFas), Fas soluble (sFas) y FasL en linfocitos de sangre periférica de un grupo de centenarios y lo compararon con jóvenes e individuos de mediana edad. Encontraron que los centenarios son capaces de equilibrar la producción de moléculas proapoptóticas (mFas y FasL) y antiapoptóticas (sFas), cuyas proporciones parecen esenciales para conservar la funcionalidad del sistema inmunológico en la longevidad extrema. Los centenarios previenen la apoptosis excesiva de linfocitos en condiciones fisiológicas, y además mantienen una vía apoptótica Fas/ FasL enormemente eficiente (Pinti *et al.*, 2004)

Alternativamente, en la vía apoptótica intrínseca (o vía mitocondrial) son varias las señales que convergen en las mitocondrias y las estimulan a liberar activadores de la cascada de las caspasas; una de las más importantes es la señal

mediada por el citocromo c. Se cree que la apoptosis intrínseca se produce en respuesta a una variedad de perturbaciones de la homeostasis intracelular, incluido el daño del DNA y el estrés oxidativo, todos ellos conocidos procesos que se acumulan con el envejecimiento (Esteve *et al.*, 1999; de la Asunción *et al.*, 1996). Bcl-xL pertenece a la gran familia de proteínas BCL-2, familia conocida por formar una compleja red reguladora que controla la supervivencia celular y la muerte en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos y patológicos (Lomonosova & Chinnadurai, 2008).

Bcl-xL inhibe la vía intrínseca de la apoptosis y promueve la supervivencia celular al migrar a la membrana externa mitocondrial, impidiendo la permeabilización mitocondrial (formación de poros) por la dimerización de BAX y BAK, y evitando la liberación del citocromo c y de los iones calcio. De este modo, no se produce la formación del apoptosoma ni la consiguiente activación de la cascada de las caspasas, causantes del desmantelamiento de la célula, y por tanto se inhibe la apoptosis intrínseca (Adams & Cory, 1998; Gross *et al.*, 1999).

La visión global que emerge con fuerza de nuestro estudio es que los centenarios mantienen intacta la vía extrínseca de la apoptosis a fin de eliminar las células dañadas, pero mantienen regulada negativamente (inhibida) la apoptosis intrínseca (por altos niveles de Bcl-xL). De este modo, salvaguardan las células que no han sido expuestas a agresiones.

Algunas intervenciones farmacológicas y no farmacológicas contribuyen a disminuir la apoptosis relacionada con la edad en células postmitóticas, lo cual representa una ventaja, pues previene la pérdida celular y la disfunción tisular. Las intervenciones antienvjecimiento (farmacológicas o no) en las células mitóticas aumentan la apoptosis, acción muy ventajosa para evitar la acumulación de células

no funcionales. Por ejemplo, el resveratrol inhibe la apoptosis en el músculo gastrocnemio y las neuronas (Liao *et al.*, 2017), la restricción calórica inhibe la apoptosis en los cardiomiocitos (Yan *et al.*, 2013) y las neuronas (Shelke & Leeuwenburgh, 2003) y el ejercicio disminuye la apoptosis en el músculo gastrocnemio y las células neuronales (Liao *et al.*, 2017).

En las células mitóticas y posmitóticas, los niveles bajos de apoptosis contribuyen a la acumulación de células dañadas, senescencia e inestabilidad genómica, pero en respuesta a una lesión/ daño, los niveles bajos de apoptosis previenen la destrucción de tejidos y promueven la supervivencia celular, la proliferación, la reparación de daños y regeneración. En las células mitóticas y posmitóticas, los niveles fisiológicos de apoptosis tienen varias ventajas para el proceso de envejecimiento. De hecho, la eliminación de células disfuncionales y la reducción de la acumulación de células senescentes mejoran la homeostasis y la longevidad (Argüelles *et al.*, 2019)

4.5 PARÁMETROS ASOCIADOS A BCL-xL Y AL ENVEJECIMIENTO EXITOSO, ESTÁN PRESERVADOS EN CENTENARIOS

Bcl-xL no sólo participa en el control de la apoptosis, sino también en la protección del daño mitocondrial (Kharbanda *et al.*, 2000), la modulación de la respuesta inmune (Opferman and Korsmeyer, 2003), el control de la respiración mitocondrial (Shimizu *et al.*, 1996) y la reparación del DNA (Fan S *et al.*, 2000). Todos estos procesos están estrechamente relacionados con la longevidad extrema/envejecimiento exitoso (Hoeijmakers, 2009).

Bcl-xL, además, es importante en el desarrollo y mantenimiento del sistema inmunológico (Opferman and Korsmeyer, 2003). La inmunosenescencia, que es el declive de la función inmunológica con la edad, se ha planteado como la principal causa del aumento de enfermedades infecciosas, cáncer y enfermedades autoinmunes que se dan en personas mayores que muestran un envejecimiento normal (Franceschi *et al.*, 2005; Alonso-Fernández *et al.*, 2008). Borrás *et al.*, analizaron la función de los linfocitos en los centenarios y mostraron que la quimiotaxis de los leucocitos y la actividad de las células NK estaban significativamente deterioradas en los septuagenarios en comparación con los jóvenes, mientras que en los centenarios estos indicadores de inmunosenescencia eran similares a los observados en los jóvenes (Borrás *et al.*, 2016). Todo lo anteriormente expuesto está en consonancia con la idea de inmunoenvejecimiento postulada por primera vez por Franceschi (Bucci *et al.*, 2014).

A fin de demostrar aún más el papel de Bcl-xL en la longevidad, un estudio realizó curvas de longevidad utilizando el nematodo *C. elegans* con una función de ganancia de Ced-9, que es el ortólogo de BCL-xL humano. Curiosamente, los animales que sobreexpresaban Ced-9 mostraron un aumento significativo tanto en el tiempo medio como en el tiempo máximo de supervivencia frente a los controles (Borrás *et al.*, 2016). Aunque el envejecimiento es un proceso multifactorial, estos estudios sugieren que la función de BCL-xL es relevante en el envejecimiento y puede ser uno de los factores que contribuye a una longevidad excepcional.

Además, se ha demostrado que Bcl-xL regula la plasticidad presináptica y confiere neuroprotección. Mientras que otros miembros de la familia de proteínas BCL-2 disminuyen sustancialmente durante el desarrollo (Krajewska *et al.*, 2002), la expresión de Bcl-xL se mantiene durante toda la vida en el cerebro adulto (González-García *et al.*, 1995).

Estos datos concuerdan con nuestros resultados donde se ha identificado al gen Bcl-xL como uno de los más relevantes implicados en la longevidad de los centenarios. Por todo lo expuesto, consideramos que Bcl-xL parece jugar un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis celular y, por tanto, en el envejecimiento exitoso.

4.6 ESTRÉS OXIDATIVO Y LONGEVIDAD

Como hemos señalado en la Introducción de la presente tesis, la teoría de los radicales libres en el envejecimiento postula que una acumulación progresiva e irreversible de daño oxidativo, provocada por las especies reactivas de oxígeno, contribuye al deterioro de las funciones fisiológicas asociadas al envejecimiento (Harman *et al.*, 1956). Por ello, la relación entre estrés oxidativo y envejecimiento ha sido objeto de muchos estudios, demostrando que los sujetos más viejos presentan mayores niveles de daño oxidativo que los jóvenes (Stadtman, 1992; Sohal, 1993). Numerosos trabajos corroboran este dato y relacionan el daño oxidativo con procesos fisiopatológicos que aparecen en el envejecimiento, tales como cáncer, aterosclerosis, diabetes y enfermedades neurodegenerativas e inflamatorias (Durackova, 2010; Nogueira & Hay, 2013).

Estudios previos de nuestro laboratorio revelaron que las mitocondrias constituyen la principal fuente endógena de especies reactivas de oxígeno (Sastre *et al.*, 1996) y, además, contribuyen en gran medida al metabolismo celular. En este sentido, es bien conocido que con el envejecimiento tiene lugar un descenso del gasto metabólico basal. Sin embargo, se ha demostrado que con la aparición de enfermedades crónicas a edades avanzadas se produce un aumento de dicho gasto metabólico, debido a la gran cantidad de energía necesaria para mantener la homeostasis celular (Ruggiero & Ferrucci, 2006).

Dado que el envejecimiento está asociado a dificultades para mantener dicha homeostasis y a la presencia de enfermedades crónicas, la gran cantidad de energía necesaria para hacer frente a dichos procesos causaría una producción excesiva de radicales libres por parte de la mitocondria (Inglés *et al.*, 2014). Este incremento podría, a su vez, activar la vía de señalización de NF- κ B, y desencadenar procesos inflamatorios, los cuales también están estrechamente relacionados con el envejecimiento.

Bcl-xL es una proteína mitocondrial involucrada en el control de la cadena respiratoria y, por consiguiente, en la tasa de producción de radicales libres mitocondriales (Cherbonnel-Lasserre *et al.*, 1997; Vander Heiden *et al.*, 1997). Es por ello por lo que determinamos los parámetros de estrés oxidativo en los tres grupos de estudio, mediante el estudio del daño oxidativo a lípidos y a proteínas.

La peroxidación de lípidos a menudo ocurre en respuesta al estrés oxidativo, donde las ROS causan la oxidación de lípidos que contienen dobles enlaces carbono-carbono en las bicapas lipídicas de la membrana. Se ha visto que la peroxidación lipídica aumenta con la edad y en diversas situaciones patológicas y fisiológicas. Si bien no podemos definir valores umbral de MDA para las distintas etapas de la vida, sí encontramos valores medios representativos para cada una de ellas, en los que se muestra la evolución de los valores de malondialdehído (MDA) en plasma desde la niñez hasta la vejez. Aunque no se puede ajustar a una línea de regresión lineal, sí que se ha determinado que los niveles de MDA alcanzan valores más altos en edades más avanzadas (Mas-Bargues *et al.*, 2021). Esto concuerda con los resultados de nuestro trabajo, donde observamos valores reducidos de MDA en el grupo de jóvenes y muy similares en los centenarios mientras que en septuagenarios los valores eran claramente superiores. Datos que afianzan la idea

de que los centenarios presentan un envejecimiento exitoso ya que se parecen más a los jóvenes que a los septuagenarios en sus índices de peroxidación lipídica.

En nuestro laboratorio, también se llevó a cabo un estudio sobre estrés oxidativo y fragilidad. La fragilidad es un síndrome geriátrico que fue definido hace 20 años por Linda Fried (Fried *et al.*, 2001), siendo un buen indicador del riesgo de muerte y de las enfermedades asociadas a la edad (Fried *et al.*, 2004). En este estudio se determinó la peroxidación lipídica en individuos en edad geriátrica, es decir todos mayores de setenta años, y se observó que la peroxidación lipídica no aumenta con la edad cronológica sino con su estado de fragilidad, que podríamos asimilar con su edad biológica (Inglés *et al.*, 2014). Demostraron que hay un aumento de los niveles de MDA en plasma de individuos frágiles en comparación con los prefrágiles y los no frágiles o vigorosos.

El estrés oxidativo no sólo modifica la actividad de los lípidos, también modifica la actividad de las proteínas, aumentando su susceptibilidad a la degradación. Así pues, la oxidación de proteínas es una buena medida para determinar el estrés oxidativo sistémico en humanos. La determinación de proteínas oxidadas a través de la cuantificación de sus grupos carbonilo es relativamente reciente (década de los 90), y desde entonces ha sido un método ampliamente empleado como marcador de daño oxidativo a estas macromoléculas (Stadtman, 1992; Dalle-Donne. *et al.*, 2003). Por esta razón fue elegido parámetro de estudio en nuestro trabajo.

Las primeras investigaciones sobre la carbonilación de proteínas fueron llevadas a cabo por Levine y Stadtman en la década de los 90 y se estudió intensamente tanto *in vivo* como *in vitro* usando un amplio panel de técnicas bioquímicas y analíticas (Levine *et al.*, 1990; Stadtman, 1992). La carbonilación de

proteínas pronto se reconoció como un marcador universal de estrés oxidativo y se relacionó con diversos trastornos humanos, como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad pulmonar crónica, insuficiencia renal crónica, diabetes, sepsis, esclerosis lateral amiotrófica, formación de cataratas, fibrosis quística, artritis reumatoide y lesión por isquemia- reperfusión, etc., todas ellas patologías asociadas al envejecimiento (Dalle-Donne *et al.*, 2003a; Dalle-Donne *et al.*, 2006). Diversos artículos respaldan el papel de la carbonilación de proteínas en la patogénesis de las enfermedades humanas proporcionando una relación entre la progresión de la enfermedad y el estrés oxidativo (Biswas *et al.*, 2006; Doria *et al.*, 2012).

Es interesante destacar que mayores niveles de proteínas carboniladas se han asociado a una disminución en la fuerza de agarre (Howard *et al.*, 2007), la cual a su vez está estrechamente relacionada con el envejecimiento. Además, se ha propuesto los niveles elevados de proteínas carboniladas como un marcador de dependencia severa en las actividades básicas de la vida diaria en hombres y mujeres mayores de 65 años (de Gonzalo-Calvo D. *et al.*, 2012).

En esta dirección, se establece una correlación entre el envejecimiento biológico y la acumulación de proteínas oxidadas en una amplia variedad de especies y tejidos (Oliver *et al.*, 1987; Sohal *et al.*, 1995; Berlett y Stadtman, 1997).

Por otro lado, Levine y Stadtman (Levine & Stadtman, 2001) postularon un aumento de los niveles de carbonilación de proteínas en función de la edad, hecho que apoya la teoría de los radicales libres (estrés oxidativo) en el envejecimiento tanto a nivel celular como tisular. También otros investigadores (Baraibar *et al.*, 2012) muestran como la acumulación de proteínas oxidadas es un sello distintivo del envejecimiento *in vivo* y de la senescencia replicativa celular.

La cantidad de proteínas carboniladas identificadas mediante técnicas proteómicas en enfermedades humanas ha aumentado exponencialmente en los últimos años. Aunque se dispone de poca información sobre la identificación de proteínas oxidadas durante el envejecimiento humano. En 2010, Ahmed y colaboradores publicaron un informe utilizando enfoques proteómicos para identificar proteínas carboniladas en el envejecimiento humano (Ahmed *et al.*, 2010). Los autores identificaron la oxidación de proteínas durante la senescencia replicativa de fibroblastos embrionarios humanos WI-38 utilizando un método proteómico de electroforesis en gel 2D junto con inmunodetección. Estudios más recientes del 2020 también han observado modificaciones oxidativas del proteoma y deterioro metabólico durante el envejecimiento y la senescencia celular, no sólo en fibroblatos sino también en otros tipos celulares. (Hamon *et al.*, 2020).

Si bien es cierto que nuestros resultados no muestran una diferencia significativa en los niveles de proteínas carboniladas entre jóvenes y septuagenarios, sí encontramos claras diferencias entre septuagenarios y centenarios, lo cual corrobora la idea de que el daño oxidativo está asociado al envejecimiento ordinario, pero no al envejecimiento extraordinario.

5. CONCLUSIONES

5.1 CONCLUSIÓN GENERAL

Las personas centenarias tienen un perfil característico de expresión de miRNAs y de mRNAs relacionados con procesos asociados a la longevidad y están protegidos frente al estrés oxidativo, lo cual podría explicar en parte su envidiable envejecimiento satisfactorio.

5.2 CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

1. Los centenarios presentan perfiles de expresión de miRNAs y mRNAs característicos, siendo estos, además, más parecidos a los jóvenes que a los septuagenarios.
2. La **respuesta inmune** y la **señalización celular** encabezan la lista de los procesos biológicos que involucran a un mayor número de genes diferencialmente expresados en centenarios.
3. Se han identificado 6 genes (i.e. IFNG; TCR; TNF; SP1; TGF β 1; IL-32), que, funcional o estructuralmente, se relacionan con los genes característicos de los centenarios. Estos, a su vez, convergen en Bcl-xL, Fas, FasL y CCL5, implicados en la regulación de la apoptosis y la respuesta inmune.
4. Los centenarios mantienen niveles de estrés oxidativo comparables al de los jóvenes, mientras que los septuagenarios poseen niveles superiores.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, J. W. (1978). Hospice. *Aging*, (289-290), 38–40.
- Abbott, M. H., Abbey, H., Bolling, D. R., & Murphy, E. A. (1978). The familial component in longevity--a study of offspring of nonagenarians: III. Intrafamilial studies. *Am J Med Genet*, 2(2), 105-120.
- Adams, J.M., & Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* (New York, N.Y), 28(5381), 1322–26.
- Ahmed, E. K., Rogowska-Wrzesinska, A., Roepstorff, P., Bulteau, A. L., & Friguet, B. (2010). Protein modification and replicative senescence of WI-38 human embryonic fibroblasts. *Aging cell*, 9(2), 252–272.
- Alberti, S., Cevenini, E., Ostan, R., Capri, M., Salvioli, S., Bucci, L., Ginaldi, L., De Martinis, M., Franceschi, C., & Monti, D. (2006). Age-dependent modifications of Type 1 and Type 2 cytokines within virgin and memory CD4+ T cells in humans. *Mechanisms of ageing and development*, 127(6), 560–566.
- Albertini, R., Rindi, S., Passi, A., Bardoni, A., Salvini, R., Pallavicini, G., & De Luca, G. (1996). The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 327(2), 207-214.
- Alberts, B. et al. (2010). DNA, cromosomas y genomas. *Biología molecular de la célula*. Omega. Barcelona. 1: 195-262
- Alonso-Fernández, P., Puerto, M., Maté, I., Ribera, J.M., & de la Fuente, M. (2008). Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of young adults. *J Am Geriatr Soc.*,56:2244–51.
- Andersen, S. L., Sebastiani, P., Dworkis, D. A., Feldman, L., & Perls, T. T. (2012). Health span approximates life span among many supercentenarians: compression of morbidity at the approximate limit of life span. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 67(4), 395-405.
- Arai, Y., Sasaki, T., & Hirose, N. (2017). Demographic, phenotypic, and genetic characteristics of centenarians in Okinawa and Honshu, Japan: Part 2 Honshu, Japan. *Mechanisms of ageing and development*, 165(Pt B), 80–85.
- Argüelles, S., Guerrero-Castilla, A., Cano, M., Muñoz, M. F., & Ayala, A. (2019). Advantages and disadvantages of apoptosis in the aging process. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1443(1), 20–33.
- Arranz, L., Fernández, C., Rodríguez, A., Ribera, J. M., & De la Fuente, M. (2008). The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. *Free radical biology & medicine*, 45(9), 1252–1262.
- Artis, D., & Spits, H. (2015). The biology of innate lymphoid cells. *Nature*, 517(7534), 293–301.
- Baeza, I., Alvarado, C., Alvarez, P., Salazar, V., Castillo, C., Ariznavarreta, C., Fdez-Tresguerres, J. A., & De la Fuente, M. (2009). Improvement of leucocyte functions in ovariectomised aged rats after treatment with growth hormone, melatonin, oestrogens or phyto-oestrogens. *Journal of reproductive immunology*, 80(1-2), 70–79.
- Balaban, R. S., Nemoto, S., & Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120(4), 483-495.

- Baraibar, M. A., Liu, L., Ahmed, E. K., & Friguet, B. (2012). Protein oxidative damage at the crossroads of cellular senescence, aging, and age-related diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012, 919832.
- Bartel, D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, 173(1), 20-51.
- Bazzini, A.A., Lee M.T., Giraldez, A.J. (2012) Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science*. 336:233–237
- Beal, M. F. (2002). Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med*, 32(9), 797-803.
- Benayoun, B. A., Pollina, E. A., & Brunet, A. (2015). Epigenetic regulation of ageing: linking environmental inputs to genomic stability. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(10), 593-610.
- Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*, 272(33), 20313-20316.
- Béthune, J., Artus-Revel, C. G., & Filipowicz, W. (2012). Kinetic analysis reveals successive steps leading to miRNA-mediated silencing in mammalian cells. *EMBO reports*, 13(8), 716–723.
- Castrillo, J.L. (1992). Factores de Transcripción Especificos de Tejido. *Invest y Ciencia* 64-72.
- Biagi, E., Rampelli, S., Turroni, S., Quercia, S., Candela, M., & Brigidi, P. (2017). The gut microbiota of centenarians: Signatures of longevity in the gut microbiota profile. *Mech Ageing Dev*, 165(Pt B), 180-184.
- Bird, R. P., & Draper, H. H. (1984). Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Methods Enzymol*, 105, 299-305.
- Biswas, S., Chida, A.S., & Rahman, I. (2006). Redox modifications of protein-thiols: Emerging roles in cell signaling. *Biochem Pharmacol* 71: 551– 564.
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Glud, L. L., Simonetti, R. G., & Glud, C. (2007). Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 297(8), 842-857.
- Blazer, D. G. (2008). How do you feel about...? Health outcomes in late life and self-perceptions of health and well-being. *Gerontologist*, 48(4), 415-422.
- Bokov, A., Chaudhuri, A., & Richardson, A. (2004). The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev*, 125(10-11), 811-826.
- Borel, J. P., Monboisse, J. C., & Bellon, G. (1988). *Med. Sci.*, 5, 304-311.
- Borras, C., Abdelaziz, K. M., Gambini, J., Serna, E., Ingles, M., de la Fuente, M., Garcia, I., Matheu, A., Sanchís, P., Belenguier, A., Errigo, A., Avellana, J. A., Baretino, A., Lloret-Fernández, C., Flames, N., Pes, G., Rodriguez-Mañas, L., & Viña, J. (2016). Human exceptional longevity: transcriptome from centenarians is distinct from septuagenarians and reveals a role of Bcl-xL in successful aging. *Ageing*, 8(12), 3185–3208.
- Borras, C., Ingles, M., Mas-Bargues, C., Dromant, M., Sanz-Ros, J., Román-Domínguez, A., Gimeno-Mallench, L., Gambini, J., & Viña, J. (2020). Centenarians: An excellent example of resilience for successful ageing. *Mechanisms of ageing and development*, 186, 111199.
- Borras, C., Ingles, M., Mas-Bargues, C., Serna, E., Abdelaziz, K. M., Gimeno, L., et al. (2015). Centenarians overexpress BCL-xL, which confers them a protection against

- apoptosis, oxidative stress and immunosenescence. *Free Radical Biology and Medicine*, 86, S11-S11.
- Borras, C., Mas-Bargues, C., Román-Domínguez, A., Sanz-Ros, J., Gimeno-Mallench, L., Inglés, M., Gambini, J., & Viña, J. (2020). BCL-xL, a Mitochondrial Protein Involved in Successful Aging: From *C. elegans* to Human Centenarians. *International journal of molecular sciences*, 21(2), 418.
- Borras, C., Serna, E., Gambini, J., Ingles, M., & Vina, J. (2017). Centenarians maintain miRNA biogenesis pathway while it is impaired in octogenarians. *Mechanisms of ageing and development*, 168, 54–57.
- Brown, S. (2015). Life expectancy gap between women and men getting smaller. *Post reproductive health*, 21(2), 45.
- Breen, A. P., & Murphy, J. A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free radical biology & medicine*, 18(6), 1033–1077.
- Brunsgaard, H., Pedersen, A. N., Schroll, M., Skinhøj, P., & Pedersen, B. K. (2000). Proliferative responses of blood mononuclear cells (BMNC) in a cohort of elderly humans: role of lymphocyte phenotype and cytokine production. *Clinical and experimental immunology*, 119(3), 433–440.
- Bucci, L., Ostan, R., Giampieri, E., Cevenini, E., Pini, E., Scurti, M., Vescovini, R., Sansoni, P., Caruso, C., Mari, D., Ronchetti, F., Borghi, M. O., Ogliari, G., Grossi, C., Capri, M., Salvioli, S., Castellani, G., Franceschi, C., & Monti, D. (2014). Immune parameters identify Italian centenarians with a longer five-year survival independent of their health and functional status. *Experimental gerontology*, 54, 14–20.
- Buchner, D. M., & Wagner, E. H. (1992). Preventing frail health. *Clinics in geriatric medicine*, 8(1), 1–17.
- Buller, B., Liu, X., Wang, X., Zhang, R. L., Zhang, L., Hozeska-Solgot, A., Chopp, M., & Zhang, Z. G. (2010). MicroRNA-21 protects neurons from ischemic death. *The FEBS journal*, 277(20), 4299–4307.
- Camous, X., Pera, A., Solana, R., & Larbi, A. (2012). NK cells in healthy aging and age-associated diseases. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012, 195956.
- Canella, D., Praz, V., Reina, J. H., Cousin, P., & Hernandez, N. (2010). Defining the RNA polymerase III transcriptome: Genome-wide localization of the RNA polymerase III transcription machinery in human cells. *Genome research*, 20(6), 710–721.
- Cash, T. P., Pita, G., Domínguez, O., Alonso, M. R., Moreno, L. T., Borrás, C., Rodríguez-Mañas, L., Santiago, C., Garatachea, N., Lucia, A., Avellana, J. A., Viña, J., González-Neira, A., & Serrano, M. (2014). Exome sequencing of three cases of familial exceptional longevity. *Ageing cell*, 13(6), 1087–1090.
- Catalanotto, C., Cogoni, C., & Zardo, G. (2016). MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *International Journal of molecular sciences*, 17(10), 1712.
- Catania, A., Airaghi, L., Motta, P., Manfredi, M. G., Annoni, G., Pettenati, C., Brambilla, F., & Lipton, J. M. (1997). Cytokine antagonists in aged subjects and their relation with cellular immunity. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 52(2), B93–B97.

Bibliografia

- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.*, 49(3), 588-603.
- Cheng, Y., & Zhang, C. (2010). MicroRNA-21 in cardiovascular disease. *Journal of cardiovascular translational research*, 3(3), 251–255.
- Cherbonnel-Lasserre, C., & Dosanjh, M. K. (1997). Suppression of apoptosis by overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL promotes survival and mutagenesis after oxidative damage. *Biochimie*, 79(9-10), 613–617.
- Chevon, M., Berenshtein, E., & Stadtman, E. R. (2000). Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res*, 33 Suppl, S99-108.
- Chu, C. Y., & Rana, T. M. (2007). Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *Journal of cellular physiology*, 213(2), 412–419.
- Chung, H. Y., Kim, H. J., Kim, K. W., Choi, J. S., & Yu, B. P. (2002). Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Microsc Res Tech*, 59(4), 264-272.
- Collaborators, G. M. (2018). Global, regional, and national age-sex-specific mortality and life expectancy, 1950-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, 392(10159), 1684-1735.
- Cutler, R. G. (1984). Antioxidants, aging and longevity. In W. A. Pryor (Ed.), *Free radicals in biology*. (Vol. IV, pp. 371-428). Orlando: Academic Press.
- da Cunha, A., & Vitković, L. (1992). Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) expression and regulation in rat cortical astrocytes. *Journal of neuroimmunology*, 36(2-3), 157–169.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 329(1-2), 23–38.
- Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2006). Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of cellular and molecular medicine*, 10(2), 389–406.
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2003). Protein carbonylation in human diseases. *Trends in molecular medicine*, 9(4), 169–176.
- Darnell, J. E. (1982). Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. *Nature*, 297(5865), 365-371.
- Darzacq, X., Jády, B. E., Verheggen, C., Kiss, A. M., Bertrand, E., & Kiss, T. (2002). Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. *The EMBO journal*, 21(11), 2746–2756.
- Dato, S., Crocco, P., D'Aquila, P., de Rango, F., Bellizzi, D., Rose, G., et al. (2013). Exploring the role of genetic variability and lifestyle in oxidative stress response for healthy aging and longevity. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Int J Mol Sci*, 14(8), 16443-16472.
- Davies, K. J., Lin, S. W., & Pacifici, R. E. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *J Biol Chem*, 262(20), 9914-9920.
- Davies, K. J., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A., & Packer, L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, 107(4), 1198-1205.

- De Benedictis, G., Carotenuto, L., Carrieri, G., De Luca, M., Falcone, E., Rose, G., et al. (1998). Age-related changes of the 3'APOB-VNTR genotype pool in ageing cohorts. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Ann Hum Genet*, 62(Pt 2), 115-122.
- de Gonzalo-Calvo, D., de Luxán-Delgado, B., Rodríguez-González, S., García-Macia, M., Suárez, F. M., Solano, J. J., Rodríguez-Colunga, M. J., & Coto-Montes, A. (2012). Oxidative protein damage is associated with severe functional dependence among the elderly population: a principal component analysis approach. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 67(6), 663–670.
- de la Asuncion, J. G., Millan, A., Pla, R., Bruseghini, L., Esteras, A., Pallardo, F. V., Sastre, J., & Viña, J. (1996). Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10(2), 333–338.
- De la Fuente, C. (2001) Fundamentos demográficos y biomédicos para una atención sanitaria específica al anciano. *Bases de la Atención Sanitaria al Anciano* (pp. 15-55). Madrid Sociedad Española de Medicina Geriátrica; .
- Dean, R. T., Gieseg, S., & Davies, M. J. (1993). Reactive species and their accumulation on radical damaged proteins. *TIBS.*, 18, 437-441.
- Dello Buono, M., Urciuoli, O., & De Leo, D. (1998). Quality of life and longevity: a study of centenarians. *Age Ageing*, 27(2), 207-216.
- Di Lorenzo, G., Balistreri, C. R., Candore, G., Cigna, D., Colombo, A., Romano, G. C., Colucci, A. T., Gervasi, F., Listì, F., Potestio, M., & Caruso, C. (1999). Granulocyte and natural killer activity in the elderly. *Mechanisms of ageing and development*, 108(1), 25–38.
- Djuranovic, S., Nahvi A., Green R. (2012) miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science*. 336:237–240
- Dong, S., Cheng, Y., Yang, J., Li, J., Liu, X., Wang, X., Wang, D., Krall, T. J., Delphin, E. S., & Zhang, C. (2009). MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction. *The Journal of biological chemistry*, 284(43), 29514–29525.
- Doria, E., Buonocore, D., Focarelli, A., & Marzatico, F. (2012). Relationship between human aging muscle and oxidative system pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2012: 830257.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82(1), 47-95.
- Durackova, Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res*, 59(4), 459-469.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 11(1), 81-128.
- Esteve, J. M., Mompo, J., Garcia de la Asuncion, J., Sastre, J., Asensi, M., Boix, J., Vina, J. R., Vina, J., & Pallardo, F. V. (1999). Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(9), 1055–1064.
- Evert, J., Lawler, E., Bogan, H., & Perls, T. (2003). Morbidity profiles of centenarians: survivors, delayers, and escapers. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 58(3), 232-237.

- Fabian, M. R., & Sonenberg, N. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature structural & molecular biology*, 19(6), 586–593.
- Fagiolo, U., Cossarizza, A., Scala, E., Fanales-Belasio, E., Ortolani, C., Cozzi, E., Monti, D., Franceschi, C., & Paganelli, R. (1993). Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *European journal of immunology*, 23(9), 2375–2378.
- Fan, S., Ma, Y. X., Wang, J. A., Yuan, R. Q., Meng, Q., Cao, Y., Lattera, J. J., Goldberg, I. D., & Rosen, E. M. (2000). The cytokine hepatocyte growth factor/scatter factor inhibits apoptosis and enhances DNA repair by a common mechanism involving signaling through phosphatidylinositol 3' kinase. *Oncogene*, 19(18), 2212–2223.
- Faraonio, R., Salerno, P., Passaro, F., Sedia, C., Iaccio, A., Bellelli, R., Nappi, T. C., Comegna, M., Romano, S., Salvatore, G., Santoro, M., & Cimino, F. (2012). A set of miRNAs participates in the cellular senescence program in human diploid fibroblasts. *Cell death and differentiation*, 19(4), 713–721.
- Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F. A., & Pillai, R. S. (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Current opinion in structural biology*, 15(3), 331–341.
- Finch, C. E., & Tanzi, R. E. (1997). Genetics of aging. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5337), 407–411.
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239–247.
- Franceschi, C., Olivieri, F., Marchegiani, F., Cardelli, M., Cavallone, L., Capri, M., Salvioli, S., Valensin, S., De Benedictis, G., Di Iorio, A., Caruso, C., Paolisso, G., & Monti, D. (2005). Genes involved in immune response/inflammation, IGF1/insulin pathway and response to oxidative stress play a major role in the genetics of human longevity: the lesson of centenarians. *Mechanisms of ageing and development*, 126(2), 351–361.
- Franceschi, C., Garagnani, P., Morsiani, C., Conte, M., Santoro, A., Grignolio, A., Monti, D., Capri, M., & Salvioli, S. (2018a). The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates. *Frontiers in medicine*, 5, 61.
- Franceschi, C., Garagnani, P., Parini, P., Giuliani, C., & Santoro, A. (2018b). Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nature reviews. Endocrinology*, 14(10), 576–590.
- Franceschi, C., Garagnani, P., Vitale, G., Capri, M., & Salvioli, S. (2017a). Inflammaging and 'Garb-aging'. *Trends Endocrinol Metab*, 28(3), 199–212.
- Franceschi, C., Monti, D., Sansoni, P., & Cossarizza, A. (1995). The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunol Today*, 16(1), 12–16.
- Franceschi, C., Ostan, R., & Santoro, A. (2018c). Nutrition and Inflammation: Are Centenarians Similar to Individuals on Calorie-Restricted Diets? *Annu Rev Nutr*, 38, 329–356.
- Franceschi, C., Passarino, G., Mari, D., & Monti, D. (2017b). Centenarians as a 21st century healthy aging model: A legacy of humanity and the need for a world-wide consortium (WWC100+). *Mechanisms of ageing and development*, 165(Pt B), 55–58.
- Freeman, B. A., & Crapo, J. (1982). Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 47, 412–426.

- Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*, 201(4359), 875-880.
- Fried, L. P., Ferrucci, L., Darer, J., Williamson, J. D., & Anderson, G. (2004). Untangling the concepts of disability, frailty, and comorbidity: implications for improved targeting and care. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 59(3), 255–263.
- Fried, L. P., Tangen, C. M., Walston, J., Newman, A. B., Hirsch, C., Gottdiener, J., Seeman, T., Tracy, R., Kop, W. J., Burke, G., McBurnie, M. A., & Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group (2001). Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 56(3), M146–M156.
- Fries J. F. (1980). Aging, natural death, and the compression of morbidity. *The New England journal of medicine*, 303(3), 130–135.
- Garasto, S., Montesanto, A., Corsonello, A., Lattanzio, F., Fusco, S., Passarino, G., Prestipino Giarritta, V., & Corica, F. (2017). Thyroid hormones in extreme longevity. *Mechanisms of ageing and development*, 165(Pt B), 98–106.
- Gellert, P., von Berenberg, P., Oedekoven, M., Klemt, M., Zwillich, C., Hörter, S., Kuhlmeier, A., & Dräger, D. (2018). Centenarians Differ in Their Comorbidity Trends During The 6 Years Before Death Compared to Individuals Who Died in Their 80s or 90s. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 73(10), 1357–1362.
- Giuliani, C., Garagnani, P., & Franceschi, C. (2018). Genetics of Human Longevity Within an Eco-Evolutionary Nature-Nurture Framework. *Circ Res*, 123(7), 745-772.
- Giulivi, C., & Davies, K. J. (1993). Dityrosine and tyrosine oxidation products are endogenous markers for the selective proteolysis of oxidatively modified red blood cell hemoglobin by (the 19 S) proteasome. *The Journal of biological chemistry*, 268(12), 8752–8759.
- Goeddel, D. V. (1999). Signal transduction by tumor necrosis factor: the Parker B. Francis Lectureship. *Chest*, 116(1 Suppl), 69S–73S.
- Gombar, S., Jung, H. J., Dong, F., Calder, B., Atzmon, G., Barzilai, N., Tian, X. L., Pothof, J., Hoeijmakers, J. H., Campisi, J., Vijg, J., & Suh, Y. (2012). Comprehensive microRNA profiling in B-cells of human centenarians by massively parallel sequencing. *BMC genomics*, 13, 353.
- Gonos, E. S. (2000). Genetics of aging: lessons from centenarians. *Experimental gerontology*, 35(1), 15-21.
- González-García, M., García, I., Ding, L., O'Shea, S., Boise, L. H., Thompson, C. B., & Núñez, G. (1995). bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), 4304–4308.
- Govindaraju, D., Atzmon, G., & Barzilai, N. (2015). Genetics, lifestyle and longevity: Lessons from centenarians. *Appl Transl Genom*, 4, 23-32.
- Gravina, S., Lescai, F., Hurteau, G., Brock, G. J., Saramaki, A., Salvioli, S., Franceschi, C., & Roninson, I. B. (2009). Identification of single nucleotide polymorphisms in the p21 (CDKN1A) gene and correlations with longevity in the Italian population. *Ageing*, 1(5), 470–480.

Bibliografía

- Greenwald, R. A., & Moy, W. W. (1980). Effect of oxygen derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum.*, 23, 455-463.
- Grillari, J., Hackl, M., & Grillari-Voglauer, R. (2010). miR-17-92 cluster: ups and downs in cancer and aging. *Biogerontology*, 11(4), 501–506.
- Gross, A., McDonnell, J. M., & Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development*, 13(15), 1899–1911.
- Gudmundsson, H., Gudbjartsson, D. F., Frigge, M., Gulcher, J. R., & Stefánsson, K. (2000). Inheritance of human longevity in Iceland. *Eur J Hum Genet*, 8(10), 743-749.
- Gueraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., Eckl, P. M., Huc, L., et al. (2010). Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res*, 44(10), 1098-1124.
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(8), 509-524.
- Hackl, M., Brunner, S., Fortschegger, K., Schreiner, C., Micutkova, L., Mück, C., Laschober, G. T., Lepperdinger, G., Sampson, N., Berger, P., Herndler-Brandstetter, D., Wieser, M., Kühnel, H., Strasser, A., Rinnerthaler, M., Breitenbach, M., Mildner, M., Eckhart, L., Tschachler, E., Trost, A., ... Grillari, J. (2010). miR-17, miR-19b, miR-20a, and miR-106a are down-regulated in human aging. *Aging cell*, 9(2), 291–296.
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.*, 91(3C), 14S-22S.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence? *Lancet*, 344, 721-724.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.*, 16, 33-50.
- Halliwell, B. (2000). The antioxidant paradox. *Lancet (London, England)*, 355(9210), 1179–1180.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, 186, 1-85.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1989). Free Radicals in Biology and Medicine. *Oxford, Clarendon Press*.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med*, 18(1), 125-126.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., & Blake, D. (1985). Metal ions and oxygen radical reactions in human inflammatory joint disease. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 311(1152), 659–671.
- Hamon, M. P., Ahmed, E. K., Baraibar, M. A., & Friguet, B. (2020). Proteome Oxidative Modifications and Impairment of Specific Metabolic Pathways During Cellular Senescence and Aging. *Proteomics*, 20(5-6), e1800421.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.*;11(3):298-300.
- Harman, D. (2001). Aging: overview. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928, 1–21.
- Hayflick L. (2000). The future of ageing. *Nature*, 408(6809), 267–269.
- Hazra, N. C., Dregan, A., Jackson, S., & Gulliford, M. C. (2015). Differences in Health at Age 100 According to Sex: Population-Based Cohort Study of Centenarians Using Electronic Health Records. *J Am Geriatr Soc*, 63(7), 1331-1337.

- Herskind, A. M., McGue, M., Holm, N. V., Sørensen, T. I., Harvald, B., & Vaupel, J. W. (1996). The heritability of human longevity: a population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870-1900. *Human genetics*, 97(3), 319–323.
- Himmerich, H., Fulda, S., Linseisen, J., Seiler, H., Wolfram, G., Himmerich, S., Gedrich, K., & Pollmächer, T. (2006). TNF-alpha, soluble TNF receptor and interleukin-6 plasma levels in the general population. *European cytokine network*, 17(3), 196–201.
- Hoeijmakers J. H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *The New England journal of medicine*, 361(15), 1475–1485.
- Hohn, A., König, J., & Grune, T. (2013). Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *J Proteomics*, 92, 132-159.
- Howard, C., Ferrucci, L., Sun, K., Fried, L. P., Walston, J., Varadhan, R., Guralnik, J. M., & Semba, R. D. (2007). Oxidative protein damage is associated with poor grip strength among older women living in the community. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 103(1), 17–20.
- Howes, R. M. (2006). The free radical fantasy: a panoply of paradoxes. *Ann N Y Acad Sci*, 1067, 22-26.
- Huang, T. T., Carlson, E. J., Gillespie, A. M., Shi, Y., & Epstein, C. J. (2000). Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 55(1), B5-9.
- Inglés, M., Gambini, J., Carnicero, J. A., García-García, F. J., Rodríguez-Mañas, L., Olaso-González, G., Dromant, M., Borrás, C., & Viña, J. (2014). Oxidative stress is related to frailty, not to age or sex, in a geriatric population: lipid and protein oxidation as biomarkers of frailty. *Journal of the American Geriatrics Society*, 62(7), 1324–1328.
- Inglés, M., Gimeno-Mallench, L., Mas-Bargues, C., Dromant, M., Cruz-Guerrero, R., García-García, F. J., Rodríguez-Mañas, L., Gambini, J., Borrás, C., & Viña, J. (2018). Identificación de polimorfismos de un solo nucleótido relacionados con la fragilidad [Identification of single nucleotide polymorphisms related to frailty]. *Revista española de geriatría y gerontología*, 53(4), 202–207.
- Inglés, M., Mas-Bargues, C., Berna-Erro, A., Matheu, A., Sanchís, P., Avellana, J. A., Borrás, C., & Viña, J. (2019). Centenarians Overexpress Pluripotency-Related Genes. *The journals of gerontology. Series A, Biological and medical sciences*, 74(9), 1391–1395.
- Iorio, M. V., & Croce, C. M. (2012). Causes and consequences of microRNA dysregulation. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 18(3), 215–222.
- Jiang, N., Du, G., Tobias, E., Wood, J. G., Whitaker, R., Neretti, N., et al. (2013). Dietary and genetic effects on age-related loss of gene silencing reveal epigenetic plasticity of chromatin repression during aging. *Aging (Albany NY)*, 5(11), 813-824.
- Jiang, W., Guo, Z., Lages, N., Zheng, W. J., Feliars, D., Zhang, F., & Wang, D. (2018). A multi-parameter analysis of cellular coordination of major transcriptome regulation mechanisms. *Scientific reports*, 8(1), 1-13.
- Jin, Z., & El-Deiry, W. S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer biology & therapy*, 4(2), 139–163.
- Johns D. R. (1995). Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Mitochondrial DNA and disease. *adman*638–644.

Bibliografía

- Jones MJ, Goodman SJ, Kobor MS. DNA methylation and healthy human aging. *Aging Cell*. 2015; 14:924–32.
- Jones, M. J., Goodman, S. J., & Kobor, M. S. (2015). DNA methylation and healthy human aging. *Aging cell*, 14(6), 924–932.
- Jové, M., Naudí, A., Aledo, J. C., Cabré, R., Ayala, V., Portero-Otin, M., Barja, G., & Pamplona, R. (2013). Plasma long-chain free fatty acids predict mammalian longevity. *Scientific reports*, 3, 3346.
- Jové, M., Naudí, A., Gambini, J., Borrás, C., Cabré, R., Portero-Otín, M., Viña, J., & Pamplona, R. (2017). A Stress-Resistant Lipidomic Signature Confers Extreme Longevity to Humans. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 72(1), 30–37.
- Kasai, H., & Nishimura, S. (1984). DNA damage induced by asbestos in the presence of hydrogen peroxide. *Gan*, 75(10), 841–844.
- Kaszubowska, L., Kaczor, J. J., Hak, L., Dettlaff-Pokora, A., Szarynska, M., & Kmiec, Z. (2011). Sensitivity of natural killer cells to activation in the process of ageing is related to the oxidative and inflammatory status of the elderly. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, 62(1), 101–109.
- Kavathia, N., Jain, A., Walston, J., Beamer, B. A., & Fedarko, N. S. (2009). Serum markers of apoptosis decrease with age and cancer stage. *Aging*, 1(7), 652–663.
- Kharbanda, S., Saxena, S., Yoshida, K., Pandey, P., Kaneki, M., Wang, Q., Cheng, K., Chen, Y. N., Campbell, A., Sudha, T., Yuan, Z. M., Narula, J., Weichselbaum, R., Nalin, C., & Kufe, D. (2000). Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry*, 275(1), 322–327.
- Kim, G. H., Samant, S. A., Earley, J. U., & Svensson, E. C. (2009). Translational control of FOG-2 expression in cardiomyocytes by microRNA-130a. *PLoS one*, 4(7), e6161.
- Kinser, H. E., & Pincus, Z. (2020). MicroRNAs as modulators of longevity and the aging process. *Hum Genet*, 139(3), 291-308.
- Kirkwood, T. B. (2005). Time of our lives. What controls the length of life? *EMBO Rep*, 6 Spec No, S4-8.
- Kornberg R. D. (2005). Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends in biochemical sciences*, 30(5), 235–239.
- Knight, J. A., Smith, S. E., Kinder, V. E., & Pieper, R. K. (1988). Urinary lipoperoxides quantified by liquid chromatography, and determination of reference values for adults. *Clin Chem*, 34(6), 1107-1110.
- Krajewska, M., Mai, J. K., Zapata, J. M., Ashwell, K. W., Schendel, S. L., Reed, J. C., & Krajewski, S. (2002). Dynamics of expression of apoptosis-regulatory proteins Bid, Bcl-2, Bcl-X, Bax and Bak during development of murine nervous system. *Cell death and differentiation*, 9(2), 145–157.
- Krinsky, N. (1994). In B. Frei (Ed.), *Natural antioxidants in human health and disease*. (pp. 239-262). San Diego: Academic Press.
- Kumarswamy, R., Volkmann, I., & Thum, T. (2011). Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA biology*, 8(5), 706–713.

- Larbi, A., Pawelec, G., Wong, S. C., Goldeck, D., Tai, J. J., & Fulop, T. (2011). Impact of age on T cell signaling: a general defect or specific alterations? *Ageing research reviews*, 10(3), 370–378.
- Levine, R. L., & Stadtman, E. R. (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental gerontology*, 36(9), 1495–1502.
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., & Stadtman, E.R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186: 464– 478.
- Lewin, B.: Genes IV. Oxford University Press, N. Y., 1990.
- Liao, Z. Y., Chen, J. L., Xiao, M. H., Sun, Y., Zhao, Y. X., Pu, D., Lv, A. K., Wang, M. L., Zhou, J., Zhu, S. Y., Zhao, K. X., & Xiao, Q. (2017). The effect of exercise, resveratrol or their combination on Sarcopenia in aged rats via regulation of AMPK/Sirt1 pathway. *Experimental gerontology*, 98, 177–183.
- Lin, S., & Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 15(6), 321–333.
- Linnane, A. W., Marzuki, S., Ozawa, T., & Tanaka, M. (1989). Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet (London, England)*, 1(8639), 642–645.
- Lippman, R. D. (1985). Rapid *in vivo* quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man. *Exp. Gerontol.*, 20, 1-5.
- Liu, H. Y., Zhang, Y. Y., Zhu, B. L., Feng, F. Z., Yan, H., Zhang, H. Y., & Zhou, B. (2019). miR-21 regulates the proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells through PTEN/PI3K/AKT. *European review for medical and pharmacological sciences*, 23(10), 4149–4155.
- Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., & Hannon, G. J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5689), 1437–1441.
- Liu, Y. M., Tseng, C. H., Chen, Y. C., Yu, W. Y., Ho, M. Y., Ho, C. Y., Lai, M., & Su, W. C. (2019). Exosome-delivered and Y RNA-derived small RNA suppresses influenza virus replication. *Journal of biomedical science*, 26(1), 58.
- Lomonosova, E., & Chinnadurai, G. (2008). BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene*, 27 Suppl 1(Suppl 1), S2–S19.
- López-Domínguez, J. A., Khraiwesh, H., González-Reyes, J. A., López-Lluch, G., Navas, P., Ramsey, J. J., de Cabo, R., Burón, M. I., & Villalba, J. M. (2015). Dietary fat and aging modulate apoptotic signaling in liver of calorie-restricted mice. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 70(4), 399–409.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. (2013). Las señas de identidad del envejecimiento. *Cell*, 153 (6), 1194-1217.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
- Lu, C., Tej, S. S., Luo, S., Haudenschild, C. D., Meyers, B. C., & Green, P. J. (2005). Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5740), 1567–1569.

Bibliografía

- Ma, L., & Weinberg, R. A. (2008). Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends in genetics: TIG*, 24(9), 448–456.
- Madian, A. G., & Regnier, F. E. (2010). Profiling carbonylated proteins in human plasma. *Journal of proteome research*, 9(3), 1330–1343.
- Maghazachi, A. A., Al-Aoukaty, A., & Schall, T. J. (1996). CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells. *European journal of immunology*, 26(2), 315–319.
- Mañas, R. (2001). Aproximación al desarrollo de un Programa Nacional de Investigación sobre Envejecimiento desde el concepto de fragilidad. *Rev Esp Geriatr Gerontol*, 36(3), 24-35.
- Mariani, E., Sgobbi, S., Meneghetti, A., Tadolini, M., Tarozzi, A., Sinoppi, M., Cattini, L., & Facchini, A. (1996). Perforins in human cytolytic cells: the effect of age. *Mechanisms of ageing and development*, 92(2-3), 195–209.
- Martin, F. J., Montoliu, I., & Kussmann, M. (2017). Metabonomics of ageing - Towards understanding metabolism of a long and healthy life. *Mech Ageing Dev*, 165(Pt B), 171-179.
- Mas-Bargues, C., Escrivá, C., Dromant, M., Borrás, C., & Viña, J. (2021). Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 709, 108941.
- Matsumoto, T., & Hwang, P. M. (2007). Resizing the genomic regulation of restenosis. *Circulation research*, 100(11), 1537–1539.
- McCord, J. M. (1974). Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*, 185, 5229-5531.
- Meijer H.A., Kong Y.W., Lu W.T., Wilczynska A., Spriggs R.V., Robinson S.W., Godfrey J.D., Willis A.E., & Bushell M. (2013) Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. *Science*. 340:82–85
- Meister, G., & Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431(7006), 343–349.
- Meister, G., Landthaler, M., Peters, L., Chen, P. Y., Urlaub, H., Lührmann, R., & Tuschl, T. (2005). Identification of novel argonaute-associated proteins. *Current biology: CB*, 15(23), 2149–2155.
- Mocchegiani, E., & Malavolta, M. (2004). NK and NKT cell functions in immunosenescence. *Ageing cell*, 3(4), 177–184.
- Monti, D., Ostan, R., Borelli, V., Castellani, G., & Franceschi, C. (2017). Inflammaging and human longevity in the omics era. *Mech Ageing Dev*, 165(Pt B), 129-138.
- Morgan, M. J., & Liu, Z. G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res*, 21(1), 103-115.
- Mussol, J. (2002). Resultados de la aplicación en atención primaria de un protocolo de valoración geriátrica integral en ancianos de riesgo. *Rev Esp Geriatr Gerontol*, 37(5), 249-253.
- Nascimento, C. M., Ingles, M., Salvador-Pascual, A., Cominetti, M. R., Gomez-Cabrera, M. C., & Vina, J. (2019). Sarcopenia, frailty and their prevention by exercise. *Free Radic Biol Med*, 132, 42-49.

- Nevins JR: (1983) The Pathway of Eukaryotic mRNA Formation. *Ann Rev Biochem* 52:441-466
- Nogueira, V., & Hay, N. (2013). Molecular pathways: reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 19(16), 4309-4314.
- Noren Hooten, N., Abdelmohsen, K., Gorospe, M., Ejiogu, N., Zonderman, A. B., & Evans, M. K. (2010). microRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age. *PLoS one*, 5(5), e10724.
- O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V., & Mendell, J. T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 435(7043), 839–843.
- Oliver, C. N., Ahn, B. W., Moerman, E. J., Goldstein, S., & Stadtman, E. R. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *The Journal of biological chemistry*, 262(12), 5488–5491.
- Opferman, J. T., & Korsmeyer, S. J. (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nature immunology*, 4(5), 410–415.
- Organización mundial de la salud (OMS) (2011) “Envejecimiento y ciclo de vida”. Ginebra. Suiza
- Orr, W. C., & Sohal, R. S. (1994). Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 263(5150), 1128-1130.
- Ostan, R., Bucci, L., Capri, M., Salvioli, S., Scurti, M., Pini, E., Monti, D., & Franceschi, C. (2008). Immunosenescence and immunogenetics of human longevity. *Neuroimmunomodulation*, 15(4-6), 224–240.
- Pabón-Martínez, Y. Vladimir. (2011). MicroARNs: una visión molecular. Revista de la Universidad Industrial de Santander. *Salud*, 43(3), 289-297. Retrieved August 11, 2021
- Pacifici, R. E., & Davies, K. J. (1991). Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology*, 37(1-3), 166-180.
- Paolisso, G., Tagliamonte, M. R., Rizzo, M. R., Manzella, D., Gambardella, A., & Varricchio, M. (1998). Oxidative stress and advancing age: results in healthy centenarians. *J Am Geriatr Soc*, 46(7), 833-838.
- Perez, V. I., Van Remmen, H., Bokov, A., Epstein, C. J., Vijg, J., & Richardson, A. (2009). The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Aging Cell*, 8(1), 73-75.
- Perls, T. T. (1997). Centenarians prove the compression of morbidity hypothesis, but what about the rest of us who are genetically less fortunate? *Medical hypotheses*, 49(5), 405–407.
- Perls, T. T., Wilmoth, J., Levenson, R., Drinkwater, M., Cohen, M., Bogan, H., Joyce, E., Brewster, S., Kunkel, L., & Puca, A. (2002). Life-long sustained mortality advantage of siblings of centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), 8442–8447.
- Perls, T. T., Kunkel, L. M., & Puca, A. A. (2002). The genetics of exceptional human longevity. *Journal of the American Geriatrics Society*, 50(2), 359–
- Pignolo, R. J. (2019). Exceptional Human Longevity. *Mayo Clinic proceedings*, 94(1), 110–124.

- Pinti, M., Troiano, L., Nasi, M., Bellodi, C., Ferraresi, R., Mussi, C., Salvioli, G., & Cossarizza, A. (2004). Balanced regulation of mRNA production for Fas and Fas ligand in lymphocytes from centenarians: how the immune system starts its second century. *Circulation*, 110(19), 3108–3114.
- Pomatto, L. C., & Davies, K. J. (2017). The role of declining adaptive homeostasis in ageing. *The Journal of physiology*, 595(24), 7275–7309.
- Pradas, I., Jové, M., Huynh, K., Puig, J., Ingles, M., Borrás, C., Viña, J., Meikle, P. J., & Pamplona, R. (2019). Exceptional human longevity is associated with a specific plasma phenotype of ether lipids. *Redox biology*, 21, 101127.
- Ribeiro, O., Duarte, N., Teixeira, L., & Paul, C. (2018). Frailty and depression in centenarians. *Int Psychogeriatr*, 30(1), 115–124.
- Richter, C., Park, J. W., & Ames, B. N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(17), 6465–6467.
- Robine, J. M., & Cubaynes, S. (2017). Worldwide demography of centenarians. *Mechanisms of ageing and development*, 165(Pt B), 59–67.
- Robinson, V. L. (2009). Rethinking the central dogma: noncoding RNAs are biologically relevant. *Urologic oncology*, 27(3), 304–306.
- Rodríguez, M. I., Carretero, M., Escames, G., López, L. C., Maldonado, M. D., Tan, D. X., Reiter, R. J., & Acuña-Castroviejo, D. (2007). Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice. *Free radical research*, 41(1), 15–24.
- Rottiers, V., & Näär, A. M. (2012). MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(4), 239–250.
- Rowe, J. W., & Kahn, R. L. (1997). Successful aging. *The Gerontologist*, 37(4), 433–440.
- Ruggiero, C., & Ferrucci, L. (2006). The endeavor of high maintenance homeostasis: resting metabolic rate and the legacy of longevity. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 61(5), 466–471.
- Sadowska-Bartosz, I., & Bartosz, G. (2014). Effect of Antioxidants Supplementation on Aging and Longevity. *Biomed Res Int*, 2014, 404680.
- Samuels, D. S., Lybecker, M. C., Yang, X. F., Ouyang, Z., Bourret, T. J., Boyle, W. K., ... & Caimano, M. J. (2021). Gene regulation and transcriptomics. *Current issues in molecular biology*, 42(1), 223–266.
- Sarup, P., Sørensen, P., & Loeschcke, V. (2011). Flies selected for longevity retain a young gene expression profile. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 33(1), 69–80.
- Sastre, J., Pallardó, F. V., Plá, R., Pellín, A., Juan, G., O'Connor, J. E., Estrela, J. M., Miquel, J., & Viña, J. (1996). Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 24(5), 1199–1205.
- Sastre, J., Asensi, M., Gascó, E., Pallardó, F. V., Ferrero, J. A., Furukawa, T., & Viña, J. (1992). Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *The American journal of physiology*, 263(5 Pt 2), R992–R995.
- Saumet, A., & Lecellier, C. H. (2006). Anti-viral RNA silencing: do we look like plants? *Retrovirology*, 3, 3.

- Sayed, D., He, M., Hong, C., Gao, S., Rane, S., Yang, Z., & Abdellatif, M. (2010). MicroRNA-21 is a downstream effector of AKT that mediates its antiapoptotic effects via suppression of Fas ligand. *The Journal of biological chemistry*, 285(26), 20281–20290.
- Schächter, F., Faure-Delanef, L., Guénot, F., Rouger, H., Froguel, P., Lesueur-Ginot, L., & Cohen, D. (1994). Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. *Nature genetics*, 6(1), 29–32.
- Schoenborn, J. R., & Wilson, C. B. (2007). Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Advances in immunology*, 96, 41–101.
- Schoenmaker, M., de Craen, A. J., de Meijer, P. H., Beekman, M., Blauw, G. J., Slagboom, P. E., & Westendorp, R. G. (2006). Evidence of genetic enrichment for exceptional survival using a family approach: the Leiden Longevity Study. *European journal of human genetics: EJHG*, 14(1), 79–84.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms, and functions. *Journal of leukocyte biology*, 75(2), 163–189.
- Sebastiani, P., Solovieff, N., Dewan, A. T., Walsh, K. M., Puca, A., Hartley, S. W., Melista, E., Andersen, S., Dworkis, D. A., Wilk, J. B., Myers, R. H., Steinberg, M. H., Montano, M., Baldwin, C. T., Hoh, J., & Perls, T. T. (2012). Genetic signatures of exceptional longevity in humans. *PloS one*, 7(1), e29848.
- Sebastiani, P., & Perls, T. T. (2012). The genetics of extreme longevity: lessons from the new England centenarian study. *Frontiers in genetics*, 3, 277.
- Serna, E., Gambini, J., Borrás, C., Abdelaziz, K. M., Belenguier, A., Sanchis, P., Avellana, J. A., Rodríguez-Mañas, L., & Viña, J. (2012). Centenarians, but not octogenarians, up-regulate the expression of microRNAs. *Scientific reports*, 2, 961.
- Sevanian, A., Davies, K. J., & Hochstein, P. (1985). Conservation of vitamin C by uric acid in blood. *J Free Radic Biol Med*, 1(2), 117-124.
- Shadyab, A. H., & LaCroix, A. Z. (2015). Genetic factors associated with longevity: a review of recent findings. *Ageing Res Rev*, 19, 1-7.
- Shearer, J. D., Richards, J. R., Mills, C. D., & Caldwell, M. D. (1997). Differential regulation of macrophage arginine metabolism: a proposed role in wound healing. *The American journal of physiology*, 272(2 Pt 1), E181–E190.
- Shelke, R. R., & Leeuwenburgh, C. (2003). Lifelong caloric restriction increases expression of apoptosis repressor with a caspase recruitment domain (ARC) in the brain. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(3), 494–496.
- Shibutani, Y., Inoue, D., Yokota, T., Okuda, J., & Mori, T. (1992). *Nihon Naibunpi Gakkai zasshi*, 68(8), 765–772.
- Shigenaga, M. K., Hagen, T. M., & Ames, B. N. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10771-10778.
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Waguri, S., Uchiyama, Y., Matsuda, H., & Tsujimoto, Y. (1996). Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. *Oncogene*, 13(1), 21–29.

- Siegel, S. R., Mackenzie, J., Chaplin, G., Jablonski, N. G., & Griffiths, L. (2012). Circulating microRNAs involved in multiple sclerosis. *Molecular biology reports*, 39(5), 6219–6225.
- Sies, H. (1983). Biochemistry of oxidative stress. In S. Y., T. Higashi & N. Tateishi (Eds.), *Glutathione: storage, transport and turnover in mammals*. (pp. 63-69.): Japan Scientific Press, Tokyo and UNU. Science Press, Utrecht.
- Sies, H. (1985). Oxidative stress: Introductory remarks. In H. Sies (Ed.), *Oxidative Stress* (pp. 1-8). London: Academic Press.
- Sies, H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem.*, 25, 1058-1071.
- Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*, 215(2), 213-219.
- Simic, M. G., & Taylor, K. A. (1988). Introduction to peroxidation and antioxidation mechanisms. *Basic Life Sci*, 49, 1-10.
- Slater, T. F. (1984). Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem. J.*, 222, 1-15.
- Smith, C. W., Patton, J. G., & Nadal-Ginard, B. (1989). Alternative splicing in the control of gene expression. *Annual review of genetics*, 23, 527–577.
- Sohal, R. S., Sohal, B. H., & Orr, W. C. (1995). Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies. *Free radical biology & medicine*, 19(4), 499–504.
- Sohal, R. S. (1993). The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status. *Aging (Milan, Italy)*, 5(1), 3–17.
- Solana, R., & Mariani, E. (2000). NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine*, 18(16), 1613–1620.
- Solomon, J., Kern, F., Fehlmann, T., Meese, E., & Keller, A. (2020). HumiR: Web Services, Tools and Databases for Exploring Human microRNA Data. *Biomolecules*, 10(11), 1576.
- Stadtman, E. R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science*, 257(5074), 1220-1224.
- Stadtman, E. R., Moskovitz, J., & Levine, R. L. (2003). Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences. *Antioxidants & redox signaling*, 5(5), 577–582.
- Strehler, B. L. (1985). Aging: a challenge to science, society, and the individual. *Clinics in geriatric medicine*, 1(1), 5–13.
- Strehler, B. L. (1995). Deletional mutations are the basic cause of aging: historical perspectives. *Mutation research*, 338(1-6), 3–17.
- Suter, M., & Richter, C. (1999). Fragmented mitochondrial DNA is the predominant carrier of oxidized DNA bases. *Biochemistry*, 38(1), 459–464.
- Tafaro, L., Tombolillo, M. T., Brükner, N., Troisi, G., Cicconetti, P., Motta, M., Cardillo, E., Bennati, E., & Marigliano, V. (2009). Stress in centenarians. *Archives of gerontology and geriatrics*, 48(3), 353–355.
- Teixeira, L., Araújo, L., Jopp, D., & Ribeiro, O. (2017). Centenarians in Europe. *Maturitas*, 104, 90–95.
- Terry, D. F., Sebastiani, P., Andersen, S. L., & Perls, T. T. (2008). Disentangling the roles of disability and morbidity in survival to exceptional old age. *Arch Intern Med*, 168(3), 277-283.
- The Gene Ontology Consortium (2019). The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic acids research*, 47(D1), D330–D338.

- Tomás-Loba, A., Flores, I., Fernández-Marcos, P. J., Cayuela, M. L., Maraver, A., Tejera, A., Borrás, C., Matheu, A., Klatt, P., Flores, J. M., Viña, J., Serrano, M., & Blasco, M. A. (2008). Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell*, *135*(4), 609–622.
- Tominaga, K., & Suzuki, H. I. (2019). TGF- β Signaling in Cellular Senescence and Aging-Related Pathology. *International journal of molecular sciences*, *20*(20), 5002.
- Troen, B. R. (2003). The biology of aging. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*, *70*(1), 3–22.
- Van den Biggelaar, A. H., Huizinga, T. W., de Craen, A. J., Gussekloo, J., Heijmans, B. T., Frölich, M., & Westendorp, R. G. (2004). Impaired innate immunity predicts frailty in old age. The Leiden 85-plus study. *Experimental gerontology*, *39*(9), 1407–1414.
- Van Gelder, R. N., von Zastrow, M. E., Yool, A., Dement, W. C., Barchas, J. D., & Eberwine, J. H. (1990). Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(5), 1663–1667.
- Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*. 1997; *91*:627–37.
- Vázquez-Ortiz, G., Piña-Sánchez, P., & Salcedo, M. (2006). Grandes alcances de los Rnas pequeños RNA de interferencia y microRNA [Great potential of small RNAs: RNA interference and microRNA]. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*, *58*(4), 335–349.
- Viguie, C. A., Frei, B., Shigenaga, M. K., Ames, B. N., Packer, L., & Brooks, G. A. (1993). Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, *75*(2), 566–572.
- Viña, J., Borrás, C., & Miquel, J. (2007). Theories of ageing. *IUBMB life*, *59*(4-5), 249–254.
- Viña, J., Borrás, C., Abdelaziz, K. M., Garcia-Valles, R., & Gomez-Cabrera, M. C. (2013). The free radical theory of aging revisited: the cell signaling disruption theory of aging. *Antioxidants & redox signaling*, *19*(8), 779–787.
- Vitale, G., Barbieri, M., Kamenetskaya, M., & Paolisso, G. (2017). GH/IGF-I/insulin system in centenarians. *Mech Ageing Dev*, *165*(Pt B), 107-114.
- Vizcaíno, C., Mansilla, S., & Portugal, J. (2015). Sp1 transcription factor: A long-standing target in cancer chemotherapy. *Pharmacology & therapeutics*, *152*, 111–124.
- Wang, X., Zhang, X., Ren, X. P., Chen, J., Liu, H., Yang, J., Medvedovic, M., Hu, Z., & Fan, G. C. (2010). MicroRNA-494 targeting both proapoptotic and antiapoptotic proteins protects against ischemia/reperfusion-induced cardiac injury. *Circulation*, *122*(13), 1308–1318.
- Wickens, A. P. (2001). Ageing and the free radical theory. *Respir Physiol*, *128*(3), 379-391.
- Willcox, B. J., Willcox, D. C., He, Q., Curb, J. D., & Suzuki, M. (2006). Siblings of Okinawan centenarians share lifelong mortality advantages. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *61*(4), 345-354.
- Wong, S. H., Knight, J. A., Hopfer, S. M., Zaharia, O., Leach, C. N., Jr, & Sunderman, F. W., Jr (1987). Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation

- of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clinical chemistry*, 33(2 Pt 1), 214–220.
- Wu, X., Li, S., Xu, X., Wu, S., Chen, R., Jiang, Q., Li, Y., & Xu, Y. (2015). The potential value of miR-1 and miR-374b as biomarkers for colorectal cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(3), 2840–2851.
- Yan, L., Gao, S., Ho, D., Park, M., Ge, H., Wang, C., Tian, Y., Lai, L., De Lorenzo, M. S., Vatner, D. E., & Vatner, S. F. (2013). Calorie restriction can reverse, as well as prevent, aging cardiomyopathy. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 35(6), 2177–2182.
- Zeng, Q., & Zeng, J. (2021). Inhibition of miR-494-3p alleviates oxidative stress-induced cell senescence and inflammation in the primary epithelial cells of COPD patients. *International immunopharmacology*, 92, 107044.
- Zhang, Y., & Herman, B. (2002). Apoptosis and successful aging. *Mech Ageing Dev*, 123(6), 563-565.
- Zhao, R., Ni, J., Lu, S., Jiang, S., You, L., Liu, H., Shou, J., Zhai, C., Zhang, W., Shao, S., Yang, X., Pan, H., & Han, W. (2019). CircUBAP2-mediated competing endogenous RNA network modulates tumorigenesis in pancreatic adenocarcinoma. *Aging*, 11(19), 8484–8501.
- Zhao, Y., Abreu, E., Kim, J., Stadler, G., Eskiocak, U., Terns, M. P., Terns, R. M., Shay, J. W., & Wright, W. E. (2011). Processive and distributive extension of human telomeres by telomerase under homeostatic and nonequilibrium conditions. *Molecular cell*, 42(3), 297–307.
- Zheng, T., Shi, Y., Zhang, J., Peng, J., Zhang, X., Chen, K., Chen, Y., & Liu, L. (2019). MiR-130a exerts neuroprotective effects against ischemic stroke through PTEN/PI3K/AKT pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 117, 109117.
- Zimmermann, K. C., Bonzon, C., & Green, D. R. (2001). The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & therapeutics*, 92(1), 57–70.

7. ANEXOS

7.1 ANEXO 1: ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

Abreviatura	TÉRMINOS EN CASTELLANO	TÉRMINOS EN INGLÉS
A	Adenina	Adenine
Abs	Absorbancia	Absorbance
AGO	Proteínas Argonauta	Argonaute proteins
ANOVA	Análisis de la varianza	Analysis of variance
APA	Asociación americana de psicología	American psychology association
APE1	Endonucleasa apurínica/apirimidínica 1	Apurinic/apyrimidinic (AP) endonuclease
Apo B VNTR	Apolipoproteína B con número variable de repeticiones en tándem	Apolipoprotein B with a variable number of tandem repeats
APOE	Apolipoproteína E	Apolipoprotein E
ARN	Ácido Ribonucleico	Ribonucleic acid
ATM	Ataxia telangiectasia mutado	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosín-5'-trifosfato	Adenosin-5'-triphosphate
Bcl	Linfoma de células B	B cell Lymphoma
Bcl-xL	Linfoma de células B extralargo	B-cell lymphoma-extra large
BMP4	Proteína morfogenética ósea 4	Bone morphogenetic protein 4
BMPR2	Receptor de proteína morfogenética ósea tipo 2	Bone morphogenetic protein receptor type 2
BSA	Albúmina bovina sérica	Bovine serum albumin
C	Centenarios	Centenarians
°C	Grados centígrados	Degrees centigrade
cc	Centímetros cúbicos	Cubic centimeters
CCL5	Ligando 5 de quimiocina (motivo CC)	C-C Motif Chemokine Ligand 5
cDNA	DNA complementario	Complementary DNA
CETP	Proteína de transferencia de éster de colesterol	Cholesteryl ester transfer protein
cMYC		Avian myelocytomatosis viral oncogene homolog

cRNA	RNA complementario	complementary RNA
C_T	Ciclo umbral	Threshold cycle
ΔC_T	Incremento del ciclo umbral	Threshold cycle increment
DE	Desviación estándar	Standard deviation
DNP	2,4-Dinitrofenilhidrazina	2,4-Dinitrophenylhydrazine
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato	Deoxynucleoside triphosphate
dUTP	Deoxiuridina Trifosfato	Deoxyuridine Triphosphate
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial	Endothelial nitric oxide synthase
FasL	Fas ligando	Fas ligand
FOXO	Proteína de caja forkhead O1,	Forkhead box O
g	Gramo/ Gravedades	Gram /gravities
G	Guanina	Guanine
GEHA	European Genetics of Healthy Aging	European Genetics of Healthy Aging
GPx	Glutación peroxidasa	Glutathione peroxidase
GSH	Glutación reducido	Reduced Glutathione
GSSG	Glutación oxidado	Oxidized glutathione
HCl	Ácido clorhídrico	Hydrogen Chloride
HNE	4-Hidroxi-2,3-nonenal	4-Hidroxi-2,3-nonenal
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno	Hydrogen peroxide
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución	High-performance liquid chromatography
HSPA	Proteína A de choque térmico	Heat Shock Protein A
IFNG	Interferon gamma	γ-interferon
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleuquina	Interleukine
INE	Instituto Nacional de Estadística	National Statistics Institute
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible	Inducible nitric oxide synthase
IVT	Transcripción in vitro	In vitro transcription
J	Jóvenes	Young
Kg	Kilogramo	Kilogram

K₂HPO₄	Hidrogenofosfato potásico	Potassium hydrogen phosphate
KH₂PO₄	Dihidrogenofosfato potásico	Potassium dihydrogen phosphate
KOH	Hidróxido potásico	Potassium hydroxide
LMNA	Lamina A/C	Lamin A/C
M	Molar	Molar
m	Metro	Meter
mA	Miliamperio	Miliamper
MDA	Malondialdehído	Malondialdehyde
mg	Miligramo	Miligram
miRNA	Micro RNA	Micro RNA
mL	Mililitro	Mililiter
mM	Milimolar	Milimolar
MnCl₂	Cloruro de manganeso (II)	Manganese (II) chloride
MnSOD	Manganeso superóxido dismutasa	Manganese Superoxide Dismutase
mRNA	RNA mensajero	Messenger RNA
n	Número muestral	Sample number
NADH	Nicotiamida adenina dinucleótido reducido	Reduced Nicotine Adenine Dinucleotide
NADPH	Nicotiamida adenina dinucleótido fosfato reducido	Reduced Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaOH	Hidróxido de sodio	Sodium hydroxide
NCAM	Molécula de adhesión de células neuronales	Neuronal Cell adhesion molecule
NFκB	Factor nuclear kappa B	Nuclear factor kappa B
NGS	Secuenciación masiva de nueva generación	Next generation sequencing
nM	Nanomolar	Nanomolar
8-oxodG	8-Hidroxi-2'desoxi guanosina	8 -Hydroxy-2-deoxyGuanosine
OCT3/4	Factor de transcripción 4 de unión al octámero	Octamer-binding transcription factor 4 gene
OMS	Organización mundial de la salud	World health organization
PAP	Poliadenilato polimerasa	Polyadenylate polymerase
PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Fosfato tampón salino	Phosphate buffered saline

PBS-T	Fosfato tampón salino+Tween	Phosphate buffered saline+Tween
PCA	Ácido perclórico	Perchloric acid
PCA	Análisis de componentes principales	Principal component analysis
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	Polymerase chain reaction
pg	Picogram	Picogram
Pri-miRNA	MicroRNA primario	Primary microRNA
p/v	Peso/volumen	
PVDF	Polifluoruro de vinilideno	Polivinil difluoride
P53	Proteína tumoral 53	Tumor protein 53
RAGE	Receptor para la glicación avanzada de productos finales	Receptor for advanced glycation endproducts
RIN	Número de integridad del RNA	RNA integrity number
RISC	Complejo silenciador inducido por RNA	RNA-induced silencing complex
ROS	Especies reactivas del oxígeno	Reactive oxygen species
rpm	Revoluciones por minuto	Revolutions per minute
RT	Retrotranscripción	Retrotranscription
rRNA	RNA ribosómico	Ribosomal RNA
S	Septuagenarios	Septuagenarians
SDS	Dodecil sulfato sódico	Sodium dodecyl sulfate
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple	Single Nucleotide Polymorphism
SOD	Superóxido dismutasa	Superoxide dismutase
SOX2	Gen de la caja 2 de la región determinante del sexo Y	Sex determining región Y-box 2 gene
SP1	Proteína de especificidad 1	Specificity protein 1
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico	Thio-barbituric acid
TCR	Receptor de células T	T cell receptor
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylene diamine	Tetramethylethylenediamine
TER	Gen de unión a la proteína de terminación de la replicación del ADN,	Telomeras RNA component
TGFβ1	Factor de crecimiento tumoral β1	Tumor growth factor β1

TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa	Tumor necrosis factor alpha
TRIS	2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
tRNA	RNA de transferencia	Transference RNA
u.a.	Unidades arbitrarias	Arbitrary units
UDG	Uracil-DNA glicosilasa	Uracil-DNA-glycosylase
UTR	Región no traducida	Untranslated region
UV	Ultravioleta	Ultraviolet
VIM	Vimentina	Vimentin
VIS	Visible	Visible
v/v	Volumen/volumen	Volume/ volume
μL	Microlitro	Microliter
μm	Micrometro	Micrometer
μM	Micromolar	Micromolar
λ	Longitud de onda	Wavelength

7.2 ANEXO 2: CONSENTIMIENTO INFORMADO

Versión corta del consentimiento para participar en una investigación

Esta es una invitación para ver si desea participar en un estudio de investigación. Antes de que acepte inscribirse en él, un miembro del equipo de investigación debe explicarle algunas cuestiones acerca de la investigación. Se le explicará lo siguiente:

- a. El propósito de la investigación
- b. Lo que le ocurrirá a usted durante la investigación
- c. La duración de la investigación y por cuánto tiempo se le pedirá que usted participe
- d. Las partes de la investigación que son de carácter experimental (que se están probando)
- e. Los riesgos o las partes de la investigación que podrían causarle algún daño o hacerle sentir molestias
- f. Los beneficios que podrían obtenerse con la investigación para usted u otras personas
- g. Los tratamientos o procedimientos que podrían servirle a usted en lugar de la investigación (alternativas)
- h. Cierta información para identificar a las personas u organizaciones a las que se les revelarán sus datos
- i. La manera en que se protegerá su confidencialidad y la privacidad de su información.

El personal de la investigación también le dará la información que se indica a continuación si se aplica a este estudio:

- a. Si recibirá alguna compensación (dinero o tratamiento médico gratuito) en caso de que sufra algún daño o lesión mientras participa en este estudio de investigación
- b. Si podría haber riesgos que desconocemos en este momento pero que podrían ocurrir en el futuro
- c. Si hay razones por las que los investigadores pueden interrumpir su participación en el estudio
- d. Los costos que usted podría tener por participar en el estudio
- e. Lo que sucede si usted desea dejar de participar
- f. Cuando se le informará de los nuevos hallazgos que podrían cambiar su decisión de participar en el estudio
- g. La cantidad de personas que participarán en este estudio.

Una vez que se le haya explicado toda la información mencionada anteriormente, el personal del estudio le preguntará si desea participar en la investigación. Si usted acepta, el personal le pedirá que firme este documento. Usted debe recibir una copia firmada de este documento en su propio idioma. También se le entregará un resumen de la investigación en inglés por escrito.

En caso de preguntas acerca de la investigación o sobre qué debe hacer si sufre alguna lesión, usted o su intérprete pueden llamar a _____ al _____ en cualquier momento. Si tiene preguntas sobre sus derechos como participante de una investigación, usted o su intérprete pueden llamar a la oficina del Consejo de Revisión Institucional (IRB) de BUMC al 617-638-7207.

Tiene la libertad de decidir si desea participar en este estudio de investigación o no. Es usted quien decide. Puede decidir que no desea participar y también puede decidir participar en el estudio y dejar de hacerlo en cualquier momento. Si decide no participar o retirarse de la investigación, no perderá ningún beneficio que tenga derecho a recibir. Más allá de su decisión, ésta no implicará ningún cambio en la manera en que el personal lo trata; sin embargo, si decide participar en el estudio, se podría modificar su plan de tratamiento.

La firma de este documento significa que se le ha explicado el estudio de investigación, es decir, que se le ha proporcionado toda la información anterior. Si firma este documento, significa que acepta participar en esta investigación.

Nombre del participante en letra de imprenta _____ Firma _____ Fecha _____

Nombre de la persona que obtuvo el consentimiento _____ Firma _____ Fecha _____

Nombre del testigo en letra de imprenta _____ Firma _____ Fecha _____

Spanish version Short Form Consent version 9.04.08

7.3 ANEXO 3: DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA



INFORME DE LA COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN

D. Antonio Guerrero Espejo, Presidente de la Comisión de Investigación del Departamento de la Ribera de la Comunidad Valenciana, Hospital Universitario de La Ribera de Alzira.

CERTIFICA

Que esta Comisión ha evaluado la propuesta del investigador, D. Juan Antonio Avellana Zaragoza para que se realice el Proyecto de Investigación titulado: "Expresión de Genes de Longevidad y Marcadores de Fragilidad en una Cohorte de Centenarios"

Y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del Proyecto de Investigación en relación con los objetivos.

La capacidad del investigador principal.

La adecuación del proyecto a los medios existentes en este Centro.

La adecuada elaboración y presentación de la Memoria.

La conveniencia e interés de los resultados para el Departamento de Salud y el Sistema Nacional de Salud.

Y que esta Comisión acepta que dicho proyecto sea realizado en el Departamento de la Ribera/ Hospital Universitario de La Ribera por D. Juan Antonio Avellana Zaragoza como investigador principal.

Lo que firmo en Alzira, a 5 de febrero de 2010

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA RIBERA
Comisión de Investigación

Fdo.: D. Antonio Guerrero Espejo



INFORME DE LA COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN

D. Antonio Guerrero Espejo, Presidente de la Comisión de Investigación del Departamento de la Ribera de la Comunidad Valenciana, Hospital Universitario de La Ribera de Alzira.

CERTIFICA

Que esta Comisión ha evaluado la propuesta del investigador, D. Juan Antonio Avellana Zaragoza para que se realice el Proyecto de Investigación titulado: "Ciclo biológico de la fragilidad en centenarios. Desde los mecanismos biológicos, moleculares y fisiopatológicos al fenotipo y sus consecuencias"

Y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del Proyecto de Investigación en relación con los objetivos.

La capacidad del investigador principal.

La adecuación del proyecto a los medios existentes en este Centro.

La adecuada elaboración y presentación de la Memoria.

La conveniencia e interés de los resultados para el Departamento de Salud y el Sistema Nacional de Salud.

Y que esta Comisión acepta que dicho proyecto sea realizado en el Departamento de la Ribera/ Hospital Universitario de La Ribera por D. Juan Antonio Avellana Zaragoza como investigador principal.

Lo que firmo en Alzira, a 5 de febrero de 2010


COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN

Fdo.: D. Antonio Guerrero Espejo



INFORME DE LA COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN

Dña. María Cuenca Torres, Secretaria de la Comisión de Investigación del Departamento de Salud de La Ribera de la Comunidad Valenciana, Hospital Universitario de La Ribera de Alzira.

CERTIFICA

Que esta Comisión ha evaluado la propuesta del investigador Dr. Juan Antonio Avellana Zaragoza, para que se realice el Proyecto de Investigación titulado: "Modulación de los genes de longevidad y su importancia en la prevención de enfermedades asociadas al envejecimiento"

Y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del Proyecto de Investigación en relación con los objetivos.

La capacidad del investigador principal.

La adecuación del proyecto a los medios existentes en este Centro y a los solicitados

La adecuada elaboración y presentación de la Memoria.

La conveniencia e interés de los resultados para el Departamento de Salud y el Sistema Nacional de Salud.

Y que esta Comisión acepta que dicho proyecto sea realizado en el Departamento de Salud de La Ribera/ Hospital Universitario de La Ribera por el Dr. Juan Antonio Avellana Zaragoza como investigador principal.

Lo que firmo en Alzira, a 17 de Diciembre de 2010


 Hospital Universitario de La Ribera
 Comisión de Investigación
 Dña. María Cuenca Torres

