



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

() **Facultad de
Medicina y Odontología**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLÓGÍA

**EFFECTO FAVORABLE DE LA COMUNICACIÓN
INTERCELULAR A TRAVÉS DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS MADRE DEL
TEJIDO ADIPOSO EN EL ENVEJECIMIENTO**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR
JORGE MANUEL SANZ ROS

Dirigida por
Prof. Dra. Consuelo Borrás Blasco
Prof. Dr. José Viña Ribes
Dra. Cristina Mas Bargues
Valencia, junio 2022



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Prof. Dra. Consuelo Borrás Blasco, Catedrática del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia.

Prof. Dr. José Viña Ribes, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia.

Dra. Cristina Mas BARGUES, Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que el Sr. Jorge Manuel Sanz Ros, Graduado en Medicina por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección la presente Tesis Doctoral, titulada:

“EFECTO FAVORABLE DE LA COMUNICACIÓN INTERCELULAR A TRAVÉS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS MADRE DEL TEJIDO ADIPOSO EN EL ENVEJECIMIENTO”

Para la obtención del título de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación.

Valencia, junio 2022

CONSUEL
O|BORRAS|
BLASCO

Firmado digitalmente por
CONSUELO|BORRAS|BLASCO
Fecha: 2022.05.30 20:04:17
+02'00'

JOSE VIÑA
RIBES -
NIF:19454
510Y

Firmado digitalmente por
JOSE VIÑA RIBES -
NIF:19454510Y
Fecha:
2022.06.01
12:40:20 +02'00'

CRISTINA|
MAS|
BARGUES

Firmado digitalmente
por CRISTINA|MAS|
BARGUES
Fecha: 2022.05.31
19:35:44 +02'00'

Dra. Consuelo Borrás Blasco

Dr. José Viña Ribes

Dra. Cristina Mas BARGUES

A MI FAMILIA Y AMIGOS

AGRADECIMIENTOS

Probablemente esta sea la parte más difícil de escribir, ya que por muchos agradecimientos que escribamos, siempre nos dejaremos a alguien que contribuyó de alguna manera a la realización de este trabajo. En mi caso parece que haya pasado una vida desde que entré por primera vez en ese laboratorio del departamento de Fisiología, más por casualidad que por voluntad propia. Era el día de mi vigésimo cumpleaños y acababa de finalizar el segundo curso del Grado en Medicina, aquel día no sabía todo lo que me esperaba allí y como acabaría enamorado de la investigación.

A mis directores, Pepe, Chelo y Cris.

Pepe, quería comenzar agradeciéndote a ti el permitirme formar parte de este grupo siendo tan joven. Todavía recuerdo aquella charla sobre el Alzheimer durante mi segundo año de carrera, en la que me acerqué a preguntarte una duda, y desde ese momento me ofreciste acercarme al laboratorio para que viese qué se hacía allí. Aquel momento cambió de seguro una parte importante de mi vida. Siempre recuerdo cómo me decías “aquí la gente es muy seria, si vas a venir al laboratorio debes comprometerte”, espero haber cumplido después de todo este tiempo. Gracias por hacerme descubrir la investigación básica, por tus enseñanzas y por apoyarme siempre y desde el principio.

Chelo, cuántas horas hemos pasado pensando experimentos que hacer y debatiendo nuevas ideas, cuántas ilusiones al ver que las cosas que planeábamos salían adelante. A ti tengo que agradecerte toda la confianza que has depositado en mí estos años. Desde el principio haciéndome partícipe de las cosas que pasaban en el grupo, dándome poco a poco más responsabilidades, respetando mi espacio y siempre preocupándote por mí (y por mis estudios). Gracias por aceptar que un estudiante como yo llevase a cabo un proyecto como este y enseñarme el camino.

Cris, contigo es con la persona que más horas he pasado en el laboratorio, ya sabes que sobran las palabras para agradecerte todo lo que me has enseñado desde el minuto uno. Sé que al principio te extrañó que alguien como yo me pasara todo un verano (en Valencia) aprendiendo a trabajar en el laboratorio, pero qué buen momento aquel en que decidiste enseñarme todo lo que sabías y acogerme de esa manera. Gracias por compartir todos los buenos y malos momentos estos años y ayudarme con cada cosa que he aprendido.

A todo el laboratorio al completo, a los que ya no están y a los que siguen aquí: Adri, Lucía, Pellín, Esther, Aitor, Fernando, Andrea, Coralie, Paloma, Dani, Raquel y Elisa. Con especial mención a Mar (la mami del laboratorio), Marta, Aurora y Nekane, fieles compañeras de bancada y de proyectos. A Mari Carmen, Ana Lloret, Gloria Olaso, Juan Gambini y Eva Serna. A Javier Cuenca, Cristina Amezcúa y Marilyn Noyes. A Mari Blanch.

A todo el resto de personas que han hecho posible este proyecto, sean de la Universidad o no: Daniel Monleón, Ana Díaz, Musta, Sergio, Guadalupe, Maritere, Mario Soriano, CIBERER, Linces y LabIMM. En general a toda la UCIM, SCSIE y CIPF.

Agradecer también a María Blasco, Aksinya, Ana, Steve Horvath, Juozas y Bobby su colaboración con los estudios de los telómeros y del reloj epigenético.

A mis amigos de toda la vida, Pepe, Ioritz, Fran, Frankete, Guillermo, Díaz, Miguel, Alberto, Lou y Casino. A todos mis amigos y amigas de la carrera, Jose, Guille, Pablo, Pedro, JC, María Ferrando, Belén, Pachi, María Mirabet, María Michó, María Alcaraz, Marta, Tamara, Elena Górriz, Clara, Claudia y muchos más. A los organizadores del CIB. A mis nuevos compañeros en el hospital, en especial a mis CoRs Kike y Valero, a los residentes del servicio de Cardiología y a mis compañeros del grupo de guardias.

A Elena, mi persona, gracias por todo, por el presente, pasado y futuro. Por cada momento juntos. Gracias por tu apoyo incondicional con todo lo que hago, y sobre todo gracias por sentirte tan orgullosa de mí como me siento yo de ti.

A toda mi familia.

Papá, gracias por hacer de mí el hombre que soy ahora, el chiquitín ya se va haciendo mayor, gracias por darme siempre esa libertad de elegir mi camino, gracias por tu fortaleza en cada momento.

A mis hermanas Lorena y Teresa, gracias por cuidar de mí y hacerme el mimado de la familia, son muchos momentos los vividos juntos y los que vendrán, sé que pase lo que pase siempre estaréis ahí para todo.

A mis tíos y a mis primos, en especial a mi tío Carlos que sé cuánto le gustaría estar hoy aquí. Gracias por vuestras enseñanzas y vuestro cariño, siempre fui un niño muy afortunado.

Y, por último, me gustaría dedicar este trabajo a mi madre. Mamá, gracias por todo lo que me diste y me sigues dando, no hay día en que no me acuerde de ti, sé que allá donde estés siempre estarás orgullosa de mí.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
MATERIALES Y MÉTODOS	3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	5
El tratamiento con VEs de ratones jóvenes mejora la salud y reduce la fragilidad en ratones envejecidos	6
El tratamiento con VEs revierte los cambios estructurales asociados al envejecimiento en el tejido renal y muscular de ratones envejecidos.....	7
Los marcadores moleculares del envejecimiento mejoran en los ratones tratados con VEs.....	8
El tratamiento con VEs reduce la edad epigenética de los tejidos en ratones envejecidos y modifica su epigenoma.....	10
Los microARNs contenidos en las VEs modulan procesos y vías moleculares implicadas en la regeneración tisular y el envejecimiento.....	10
CONCLUSIÓN	12
1 INTRODUCCIÓN.....	14
1.1 Envejecimiento.....	15
1.1.1 Definición.....	15
1.1.2 Evolución del envejecimiento a través de las especies.....	17
1.1.3 Historia del estudio del envejecimiento.....	20
1.1.4 Cantidad <i>versus</i> calidad de vida	23
1.1.4.1 Fragilidad.....	25
1.1.4.1.1 Concepto	25
1.1.4.1.2 Criterios clínicos de fragilidad	27
1.1.4.1.3 Sarcopenia	28
1.1.5 Factores promotores del envejecimiento en mamíferos	29

1.2	Senescencia celular	32
1.2.1	Definición	32
1.2.2	Indicadores de senescencia celular.....	33
1.2.2.1	β -galactosidasa asociada a la senescencia	33
1.2.2.2	Inhibidores del ciclo celular.....	34
1.2.2.3	Pérdida de lamina B1	35
1.2.2.4	Fenotipo secretor asociado a la senescencia.....	36
1.2.3	Senolíticos.....	37
1.2.3.1	Apoptosis	38
1.2.3.2	Vías moleculares de la apoptosis.....	39
1.2.3.3	Indicadores de apoptosis.....	40
1.3	Estrés oxidativo	41
1.3.1	Definición	41
1.3.2	Estrés oxidativo y envejecimiento	43
1.3.3	Daño oxidativo a las biomoléculas	44
1.3.3.1	Lípidos	44
1.3.3.2	Proteínas	44
1.3.3.3	Ácidos nucleicos	45
1.4	Telómeros	46
1.4.1	Definición	46
1.4.2	Papel de los telómeros en el envejecimiento	47
1.5	Epigenética	49
1.5.1	Definición	49
1.5.2	Alteraciones epigenéticas durante el envejecimiento	49
1.5.3	Relojes epigenéticos	50
1.6	Regeneración tisular	52
1.6.1	Células madre.....	52
1.6.1.1	Células madre adultas.....	53
1.6.1.2	Células madre derivadas de tejido adiposo (CMTAs).....	54
1.6.2	Pérdida de la capacidad regenerativa	55

1.7	Comunicación intercelular	57
1.7.1	Definición	57
1.7.2	Alteración de la comunicación intercelular en el envejecimiento	58
1.7.2.1	Parabiosis	60
1.8	Vesículas extracelulares	62
1.8.1	Definición	62
1.8.2	Aislamiento y caracterización de las VEs.....	64
1.8.3	Potencial regenerativo de las VEs.....	66
1.8.4	Vesículas extracelulares y envejecimiento	68
2	<i>OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN</i>	70
2.1	Objetivo general	71
2.1.1	Objetivos específicos	71
2.2	Justificación del estudio	72
3	<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	75
3.1	Obtención y caracterización de las células madre mesenquimales y sus VEs	76
3.1.1	Modelo animal	76
3.1.2	Aislamiento de células madre mesenquimales del tejido adiposo de ratón (CMTAs).....	76
3.1.2.1	Descripción	76
3.1.2.2	Procedimiento.....	77
3.1.3	Caracterización de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo por citometría de flujo	79
3.1.3.1	Descripción	79
3.1.3.2	Procedimiento.....	82
3.1.4	Aislamiento de VEs derivadas de células madre de tejido adiposo por ultracentrifugación diferencial	83
3.1.4.1	Descripción	83
3.1.4.2	Procedimiento.....	84

3.1.5	Estudio de las muestras de VEs por citometría de flujo	85
3.1.5.1	Descripción	85
3.1.5.2	Procedimiento.....	85
3.1.6	Análisis de la preparación de VEs mediante microscopía electrónica de transmisión.....	86
3.1.6.1	Descripción	86
3.1.6.2	Procedimiento.....	87
3.1.7	Determinación de la dosis de VEs para los estudios funcionales	87
3.1.7.1	Descripción	87
3.1.7.2	Procedimiento.....	88
3.2	Estudios <i>in vivo</i>	91
3.2.1	Inyección intravenosa del tratamiento	91
3.2.2	Extracción de muestras de plasma.....	91
3.2.2.1	Descripción	91
3.2.2.2	Procedimiento.....	92
3.2.3	Estudio de la función física en ratones envejecidos	92
3.2.3.1	Descripción	92
3.2.3.2	Procedimiento.....	93
3.2.4	Estudio de la regeneración del pelaje.....	97
3.2.4.1	Descripción	97
3.2.4.2	Procedimiento.....	97
3.2.5	Determinación de la concentración de urea plasmática.....	98
3.2.5.1	Descripción	98
3.2.5.2	Procedimiento.....	99
3.2.6	Sacrificio de los animales.....	100
3.2.7	Estudio histológico del músculo y riñón de ratones envejecidos.....	101
3.2.7.1	Descripción	101
3.2.7.2	Procedimiento.....	104
3.2.8	Estudio de la presencia de proteínas específicas mediante inmunofluorescencia	107
3.2.8.1	Descripción	107
3.2.8.2	Procedimiento.....	110

3.2.9	Determinación de malondialdehído mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	112
3.2.9.1	Descripción	112
3.2.9.2	Procedimiento.....	114
3.2.10	Estudio de los niveles de proteínas específicas mediante western blot	115
3.2.10.1	Descripción	115
3.2.10.2	Procedimiento.....	117
3.2.11	Determinación de la carbonilación proteica mediante western blot.	119
3.2.11.1	Descripción	119
3.2.11.2	Procedimiento.....	119
3.2.12	Aislamiento de ARN de las muestras de VEs	120
3.2.12.1	Descripción	120
3.2.12.2	Procedimiento.....	121
3.2.13	Estudio de los microARNs contenidos en las VEs mediante array ..	122
3.2.13.1	Procedimiento.....	122
3.2.14	Análisis de la regulación de vías de señalización y procesos biológicos por microARNs	123
3.2.14.1	Descripción	123
3.2.14.2	Procedimiento.....	124
3.3	Modelo <i>in vitro</i> de senescencia celular.....	125
3.3.1.1	Descripción	125
3.3.1.2	Procedimiento.....	125
3.3.2	Análisis de la senescencia en el modelo de senescencia celular	126
3.3.2.1	Descripción	126
3.3.2.2	Procedimiento.....	126
3.3.3	Análisis de la apoptosis en el modelo de senescencia celular	126
3.3.3.1	Descripción	126
3.3.3.2	Procedimiento.....	127
3.4	Determinación de la longitud telomérica y el daño al telómero..	128
3.4.1	Descripción	128
3.4.2	Procedimiento	128

3.5	Estimación de la edad epigenética mediante relojes epigenéticos	130
3.5.1	Descripción	130
3.5.2	Procedimiento	130
3.5.2.1	Aislamiento del ADN de los tejidos.....	130
3.5.2.2	Array de metilación y análisis	131
3.6	Análisis estadístico	133
4	RESULTADOS.....	135
4.1	Las CMTAs obtenidas de ratones jóvenes liberan VEs al medio de cultivo	136
4.2	El tratamiento con VEs derivadas de CMTAs de ratones jóvenes mejora la salud y disminuye la fragilidad de ratones viejos.....	138
4.2.1	Efecto del tratamiento sobre parámetros de estado físico y fragilidad ..	138
4.2.2	Efecto del tratamiento sobre la función renal.....	143
4.2.3	Efecto del tratamiento sobre la regeneración del pelaje	144
4.3	El tratamiento con VEs derivadas de CMTAs de ratones jóvenes revierte los cambios estructurales relacionados con el envejecimiento en ratones viejos.....	146
4.3.1	Efecto del tratamiento sobre la estructura de la corteza renal.....	146
4.3.2	Efecto del tratamiento sobre la estructura muscular	149
4.4	Las VEs derivadas de CMTAs de ratones jóvenes mitigan los rasgos moleculares asociados con el envejecimiento en el tejido renal y muscular de ratones viejos.....	151
4.4.1	Efecto del tratamiento sobre el estrés oxidativo	151
4.4.2	Efecto del tratamiento sobre los telómeros	152
4.4.3	Efecto del tratamiento sobre la senescencia celular	154
4.4.4	Efecto del tratamiento sobre la inflamación muscular.....	156
4.5	Las VEs derivadas de CMTAs disminuyen la senescencia y apoptosis en un modelo <i>in vitro</i> de senescencia celular	157

4.6	Las VEs derivadas de CMTAs reducen la edad epigenética de los tejidos y actúan sobre procesos biológicos relacionados con el envejecimiento	159
4.6.1	Efectos del tratamiento sobre la edad epigenética	159
4.6.2	Análisis de enriquecimiento de procesos biológicos basado en la metilación de islas CpG en distintos tejidos de ratones viejos tratados con VEs	160
4.7	El análisis del contenido en microARNs en las VEs revela que los microARNs sobreexpresados en las VEs derivadas de CMTAs jóvenes regulan el desarrollo y la regeneración de los tejidos	163
5	<i>DISCUSIÓN</i>.....	171
5.1	La restauración de la comunicación intercelular con EVs de ratones jóvenes mejora funciones fisiológicas alteradas con el envejecimiento..	172
5.2	Las VEs derivadas de CMTAs promueven la regeneración tisular en el envejecimiento	177
5.2.1	Efectos sobre el tejido renal	178
5.2.2	Efectos sobre el tejido muscular esquelético	180
5.3	Los rasgos moleculares del envejecimiento disminuyen en el tejido renal y muscular de los ratones tratados con VEs	182
5.3.1	El estrés oxidativo disminuye en el músculo de los ratones tratados con VEs	182
5.3.2	La longitud y el daño a los telómeros no se ven modificados en los tejidos de los ratones tratados con VEs	184
5.3.3	El tratamiento con VEs disminuye la senescencia celular en el tejido renal y muscular mediante un efecto senomórfico	185
5.4	El tratamiento con VEs modifica el epigenoma de los tejidos y reduce su edad epigenética.....	189
5.5	El desarrollo y la regeneración tisular son las principales dianas de los microARNs contenidos en las VEs de CMTAs jóvenes.....	193

5.6	Perspectiva general: VEs como terapia para el deterioro tisular en el envejecimiento	197
5.7	Limitaciones del estudio.....	199
6	CONCLUSIONES	202
6.1	Conclusión general	203
6.1.1	Conclusiones específicas.....	203
7	BIBLIOGRAFÍA	205
8	ANEXOS	231
8.1	Anexo 1: Datos del análisis de los microARNs con diferente expresión entre las VEs derivadas de CMTAs jóvenes y viejas	232
8.2	Anexo 2: Datos del análisis de los microARNs con diferente expresión entre las VEs derivadas de CMTAs viejas y del plasma de ratones viejos.....	233
8.3	Anexo 3: Datos del análisis de los microARNs con diferente expresión entre las VEs derivadas de CMTAs jóvenes y del plasma de ratones viejos.....	234

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

<i>Figura 1: Curvas de mortalidad y fertilidad de distintas especies.</i>	19
<i>Figura 2: Envejecimiento actual vs. envejecimiento óptimo.</i>	24
<i>Figura 3: Recopilaciones de las causas del envejecimiento.</i>	30
<i>Figura 4: Vías moleculares del estrés oxidativo.</i>	42
<i>Figura 5: Replicación de los telómeros por la telomerasa.</i>	46
<i>Figura 6: Clasificación de las células madre según su potencia.</i>	53
<i>Figura 7: Efecto de la parabiosis en ratones.</i>	61
<i>Figura 8: Liberación de distintos tipos de VEs.</i>	64

MATERIALES Y MÉTODOS

<i>Figura 9: Aislamiento de la fracción estromal del tejido adiposo.</i>	79
<i>Figura 10: Componentes de un citómetro de flujo.</i>	81
<i>Figura 11: Prueba de fuerza de agarre.</i>	94
<i>Figura 12: Prueba de coordinación motora.</i>	95
<i>Figura 13: Prueba de resistencia a la fatiga.</i>	96
<i>Figura 14: Regeneración del pelaje.</i>	98
<i>Figura 15: Componentes de un HPLC.</i>	113

RESULTADOS

<i>Figura 16: Citometría de flujo de marcadores de superficie de CMTAs y de sus VEs.</i>	137
<i>Figura 17: Microscopía electrónica de transmisión y marcaje de CD63 con inmuno-oro de VEs derivadas de CMTAs.</i>	138
<i>Figura 18: Cambio en el peso corporal de ratones viejos tras el tratamiento con VEs derivadas de CMTAs.</i>	139
<i>Figura 19: Cambio en la fuerza de agarre respecto al peso de ratones viejos tras el tratamiento con VEs derivadas de CMTAs.</i>	140
<i>Figura 20: Cambio en la coordinación motora de ratones viejos tras el tratamiento con VEs derivadas de CMTAs.</i>	140

<i>Figura 21: Cambio en la resistencia a la fatiga de ratones viejos tras el tratamiento con VEs derivadas de CMTAs.....</i>	<i>141</i>
<i>Figura 22: Cuantificación de la fragilidad en los animales antes y 30 días después del tratamiento con VEs derivadas de CMTAs.....</i>	<i>142</i>
<i>Figura 23: Cambios en la urea plasmática de ratones viejos tratados con VEs derivadas de CMTAs.</i>	<i>144</i>
<i>Figura 24: Cuantificación e imagen representativa de la capacidad de regeneración del pelaje dorsal en ratones viejos tratados con VEs derivadas de CMTAs.....</i>	<i>145</i>
<i>Figura 25: Cambios histológicos en la corteza renal de ratones viejos tratados con VEs derivadas de CMTAs.</i>	<i>147</i>
<i>Figura 26: Cuantificación de la fibrosis presente en la corteza renal de ratones viejos tratados con VEs derivadas de CMTAs.</i>	<i>148</i>
<i>Figura 27: Cuantificación e imagen representativa de la proliferación de células tubulares en la corteza renal de ratones viejos tratados con VEs derivadas de CMTAs.</i>	<i>149</i>
<i>Figura 28: Cuantificación e imagen representativa del área transversal de las fibras musculares y contenido proteico del músculo de ratones viejos tratados con VEs derivadas de CMTAs.....</i>	<i>150</i>
<i>Figura 29: Efecto del tratamiento con VEs derivadas de CMTAs en la oxidación de lípidos y proteínas del tejido renal y muscular de ratones viejos.</i>	<i>152</i>
<i>Figura 30: Efecto del tratamiento con VEs derivadas de CMTAs en la longitud y el daño a los telómeros del tejido renal y muscular de ratones viejos.</i>	<i>153</i>
<i>Figura 31: Efecto del tratamiento con VEs derivadas de CMTAs en la senescencia celular del tejido renal y muscular de ratones viejos.</i>	<i>155</i>
<i>Figura 32: Cuantificación de IL-6 en el tejido muscular de ratones viejos tratados con VEs derivadas de CMTAs.....</i>	<i>156</i>
<i>Figura 33: Efecto del tratamiento con VEs derivadas de CMTAs en la senescencia y apoptosis de un cultivo de mioblastos senescentes.</i>	<i>158</i>
<i>Figura 34: Efecto del tratamiento con VEs derivadas de CMTAs en la edad epigenética estimada mediante relojes epigenéticos en varios tejidos de ratones viejos.</i>	<i>160</i>
<i>Figura 35: Análisis de enriquecimiento de procesos biológicos a partir de las diferentes citosinas metiladas en el riñón, músculo, hígado y bazo de ratones viejos tratados con VEs derivadas de CMTAs.</i>	<i>162</i>
<i>Figura 36: Análisis de componentes principales de los microARNs contenidos en las VEs derivadas de CMTAs jóvenes, CMTAs envejecidas y plasma de ratones viejos.</i>	<i>164</i>

Figura 37: Síntesis de la comparación entre los microARNs con diferente expresión en las VEs derivadas de CMTAs jóvenes, CMTAs envejecidas y plasma de ratones viejos. 164

Figura 38: Mapas de calor de los microARNs con diferente expresión entre VEs derivadas de CMTAs jóvenes, CMTAs envejecidas y plasma de ratones viejos. 165

Figura 39: Gráfico volcán de los microARNs con diferente expresión entre las VEs derivadas de CMTAs jóvenes y el plasma de ratones viejos. 167

Figura 40: Análisis de vías moleculares y procesos biológicos de los 6 microARNs seleccionados en la comparación entre VEs derivadas de CMTAs jóvenes y plasma de ratones viejos. 169

DISCUSIÓN

Figura 41: Resumen gráfico del estudio. 198

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1: Lista de hallazgos clave en el estudio del envejecimiento.22

Tabla 2: Efecto regenerativo de las VEs derivadas de CMMS en distintos tejidos.67

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3: Fluoróforos usados en citometría de flujo.82

Tabla 4: Fluoróforos usados en inmunofluorescencia. 110

RESULTADOS

Tabla 5: Datos comparativos de las pruebas físicas 60 días después del tratamiento con VEs derivadas de CMTAs..... 141

SIGLAS Y ACRÓNIMOS

53BP1: Proteína de unión a p53.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

APC: Allophycocyanin.

ARN: Ácido ribonucleico.

AUF1: Factor de unión rico en AU.

BSA: Albúmina de suero bovino.

CDK: Ciclinas dependientes de quinasas.

CMM: Células madre mesenquimales.

CMTAs: Células madre de tejido adiposo (dentro de la parte experimental, si no se indica lo contrario, provienen de ratones jóvenes).

CMVs: Cuerpos multivesiculares.

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol.

DMEM: Medio modificado Dulbecco Eagle

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

FACS: Clasificación de células activadas por fluorescencia.

FDG: Fluorescein di- β -D-galactopiranósido.

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico.

FISH: Hibridación fluorescente *in situ*.

FITC: Flúor isothiocianate.

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia.

IGF1: Factor de crecimiento relacionado con la insulina 1.

LMNB1: Lamina B1.

MDA: Malondialdehído.

MET: Microscopía electrónica de transmisión.

mTOR: Diana de la rapamicina en mamíferos.

MVs: Microvesículas.

P/S: Penicilina/estreptomina.

PBS: Tampón fosfato salino.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PE/Cy7: Phycoerythrin/cyanine7.

PE: Phycoerythrin.

ROS: Especies reactivas del oxígeno.

SASP: Fenotipo secretor asociado a la senescencia.

SBF: Suero bovino fetal.

SDS: Dodecil sulfato sódico.

TBS: Tampón salino tamponado con tris.

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β .

TNF: Factor de necrosis tumoral.

Tris: 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol.

VEs: Vesículas extracelulares (dentro de la parte experimental, si no se indica lo contrario, provienen de CMTAs jóvenes).

RESUMEN

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En las sociedades actuales, especialmente en los países desarrollados, mejorar la salud de las personas mayores es una prioridad, tanto a nivel de salud pública como social. La búsqueda de estrategias que consigan retrasar la aparición de los cambios degenerativos asociados al envejecimiento son de particular interés. El envejecimiento se acompaña de una peor condición física y de un riesgo incrementado de fragilidad (Fried, Tangen et al. 2001). Se trata de un proceso biológico caracterizado por varios cambios a nivel celular y del organismo que conlleva un empeoramiento de la función de diversos tejidos (López-Otín, Blasco et al. 2013, Kennedy, Berger et al. 2014).

Las alteraciones en la comunicación intercelular se han descrito como potenciales causantes del envejecimiento y de las disfunciones que se asocian a este (López-Otín, Blasco et al. 2013). La función de las células no solamente depende de factores intrínsecos, sino que también se ve afectada por la composición del medio extracelular, y la modificación de este puede tener un gran impacto en la función de varios tejidos (Villeda, Luo et al. 2011). Los experimentos de parabiosis realizados en ratones demostraron que existen factores en la sangre de un organismo joven beneficiosos para un organismo envejecido, mejorando múltiples parámetros afectados en el envejecimiento (McCay, Pope et al. 1957, Conboy, Conboy et al. 2005, Conboy and Rando 2012, Loffredo, Steinhauser et al. 2013, Sinha, Jang et al. 2014).

Las vesículas extracelulares (VEs), pequeñas vesículas rodeadas de una bicapa lipídica y que carecen de núcleo, son liberadas por prácticamente todos los tipos celulares. Estas VEs presentan una habilidad innata para transmitir moléculas señalizadoras entre las células (proteínas, ARNs, ADN, lípidos, etc.), por lo que son uno de los factores implicados en la comunicación intercelular (Raposo and Stoorvogel 2013).

Las células madre son una de las grandes promesas de la medicina regenerativa, en el campo de la fragilidad, la infusión de células madre mesenquimales (CMMs) en ancianos frágiles mejora distintos parámetros de condición física (Tompkins, DiFede et al. 2017). Las células madre mejoran la regeneración tisular no solamente mediante la repoblación de un tejido dañado (Chen, Tredget et al. 2008). La liberación de moléculas señalizadoras se ha propuesto como uno de los principales mecanismos que median los efectos beneficiosos de estas células (Maguire 2013). De manera más específica, las VEs derivadas de múltiples tipos de células madre han demostrado ser capaces por sí mismas de mejorar la regeneración tisular tras un daño en varios órganos y tejidos (Bruno, Grange et al. 2009, Lai, Arslan et al. 2010, Bruno, Tapparo et al. 2017, Yan, Jiang et al. 2017). Si las comparamos con las células madre, las VEs son más estables, no presentan riesgo de aneuploidía, tienen una menor tasa de rechazo y son una alternativa muy válida para el tratamiento de distintas patologías (Maguire 2013).

En cuanto al envejecimiento, un estudio reciente demostró que las células del hipotálamo son capaces de modular la velocidad de envejecimiento en ratones, mediante la liberación de microARNs contenidos en las VEs (Zhang, Kim et al. 2017). Recientemente se ha demostrado que las VEs pueden mejorar la regeneración de los tejidos de ratones viejos, además de un menor daño asociado a la senescencia (Borghesan, Fafián-Labora et al. 2019, Fafián-Labora, Rodríguez-Navarro et al. 2020). Sin embargo, el efecto de las VEs derivadas de CMMs en la funcionalidad y la fragilidad de un organismo envejecido todavía no está completamente aclarado.

Por tanto, nuestro objetivo fue analizar por un lado el efecto de las VEs derivadas de CMTAs jóvenes sobre la capacidad física, la fragilidad, la función renal y la regeneración del pelaje. Por otro, el efecto sobre la estructura del tejido renal y muscular, y los patrones moleculares asociados al envejecimiento en animales envejecidos. Así como aportar datos sobre los microARNs contenidos en estas VEs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar el trabajo aislamos células madre del tejido adiposo (CMTAs) de los panículos adiposos inguinales de ratones jóvenes (4-6 meses) y las caracterizamos mediante citometría de flujo utilizando proteínas de membrana como marcadores negativos (CD31 y CD45) y positivos (CD29, CD44, CD90 y CD105). Las CMTAs fueron cultivadas con medio DMEM *High glucose* en un ambiente al 3% de O₂. Del medio de cultivo de estas células obtuvimos VEs usando la ultracentrifugación diferencial, para caracterizar las VEs determinamos la presencia de CD63 (marcador clásico de exosomas) en nuestras vesículas utilizando la citometría de flujo. Además, utilizamos la microscopía electrónica para observar la morfología y tamaño de las VEs, así como la presencia de CD63 en la membrana mediante el marcaje con inmuno-oro. Una vez obtenidas, la dosis de VEs se calculó en función a la concentración proteica medida por el método de Lowry.

Inyectamos dos dosis de VEs separadas una semana de manera intravenosa en ratones envejecidos (22-24 meses). Todos los animales usados fueron C57BL/6J de ambos sexos, utilizando gemelos de camada en ambos grupos de estudio siempre que fuese posible, las pruebas físicas y de regeneración del pelaje fueron realizadas de manera ciega por el mismo experimentador. Las pruebas físicas consistían en determinar la fuerza de agarre (dinamómetro), la coordinación motora (Rota Rod) y la resistencia a la fatiga (Treadmill). La urea plasmática se determinó mediante un kit comercial. Estas medidas fueron realizadas antes del tratamiento con VEs, 14 y 30 días después.

La estructura tisular se estudió mediante técnicas de histología a partir de cortes de distintos tejidos fijados previamente mediante paraformaldehído y luego congelados. Se utilizaron las tinciones de hematoxilina-eosina para cuantificar la densidad, dilatación y atrofia tubular en las muestras de tejido renal, y el área

transversal de las fibras musculares. Para estudiar la fibrosis renal se utilizó la tinción Sirius Red. Para determinar el porcentaje de células en división en el tejido renal se utilizó la inmunofluorescencia con marcaje de Ki67 mediante un anticuerpo monoclonal.

En los ensayos de estrés oxidativo, la oxidación proteica se analizó mediante Western Blot y el malondialdehído (MDA) mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Para determinar la longitud y el daño al telómero se utilizó la hibridación *in situ* (FISH) y la inmunofluorescencia con marcaje de p53BP. La senescencia celular en el tejido renal y muscular fue determinada mediante inmunofluorescencia con marcaje de LMNB1. Para el modelo *in vitro* de senescencia celular se utilizó una línea establecida de mioblastos murinos (C2C12), a los que se indujo la senescencia añadiendo al medio de cultivo Palbociclib. Se determinó la senescencia y la apoptosis del cultivo mediante citometría de flujo, utilizando kits comerciales para determinar la actividad β -galactosidasa y la Anexina V, respectivamente.

Para el análisis epigenético se extrajo el ADN de los distintos tejidos utilizando un kit comercial. El array utilizado fue el Illumina 850K, las citosinas con una diferencia en la metilación se detectaron usando una regresión lineal para cada tejido. El efecto del tratamiento con VEs fue estimado para cada isla CpG ajustando para distintos confusores como la edad cronológica, el sexo y la fila. Múltiples relojes epigenéticos fueron usados para estimar la edad epigenética de los animales. Estos predictores se agruparon en relojes generales y de intervención. Los relojes generales fueron entrenados mediante un gran espectro de tejidos y animales de distintas edades. En los relojes de intervención, se usaron los mismos tejidos, pero usando animales con intervenciones demostradas en el envejecimiento.

Para el estudio de los microARNs, se utilizó un kit comercial de extracción de ARN específico para VEs. El estudio fue realizado en un array de Affymetrix (miRNA

4.0). Para el análisis se utilizó la Transcriptome Analysis Suite (ThermoFisher), los datos obtenidos fueron normalizados con el algoritmo RMA. Se realizó un ANOVA en todas las muestras para obtener los microARNs diferentes entre las condiciones que fueran estadísticamente significativos. Se obtuvieron 6 microARNs diferentes entre las VEs de CMTAs jóvenes y el plasma de animales viejos, que además estaban conservados entre especies. Estos fueron introducidos en mirDIP para conseguir las dianas moleculares predichas, más tarde, los genes diana se analizaron mediante PANTHER con un análisis de enriquecimiento de procesos biológicos y vías moleculares.

Las tasas que compararon las pruebas físicas y los valores de urea plasmática después del tratamiento fueron determinadas y mostradas como porcentaje de cambio respecto al valor basal, el cual se definió como un 0%. Todos los grupos fueron sometidos a un análisis de *outliers* con el método ROUT (Q=2%). La prueba de Saphiro-Wilk se utilizó en cada comparación para comprobar la normalidad de cada grupo. La prueba de t de Student no emparejada o la prueba de Mann-Whitney fueron usadas para calcular el p-valor de las comparaciones entre dos grupos. Para las comparaciones de tres o más grupos se utilizó la prueba ANOVA con la prueba de Tukey como prueba post-hoc. Para el análisis y la construcción de las gráficas se utilizó el software GraphPad Prism 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio, observamos una mejora en múltiples parámetros alterados con el envejecimiento en el grupo de ratones tratados con VEs procedentes de ratones jóvenes, tanto a nivel fisiológico, celular como molecular.

El tratamiento con VEs de ratones jóvenes mejora la salud y reduce la fragilidad en ratones envejecidos

Para comprobar el efecto que las VEs tenían en la condición física de los animales envejecidos, medimos la fuerza de agarre, la coordinación motora y la resistencia a la fatiga antes y después del tratamiento con VEs, parámetros que empeoran con el envejecimiento (Lauretani, Russo et al. 2003). Observamos una mejoría en las tres pruebas con el tratamiento, el efecto fue mayor a los 30 días después de la primera dosis de VEs, mientras que este efecto beneficioso se perdía a los 60 días del tratamiento. Además, el tratamiento con VEs no resultó en toxicidad alguna para los animales. Para cuantificar la fragilidad nos basamos en una prueba diseñada previamente en nuestro grupo (Gomez-Cabrera, Garcia-Valles et al. 2017), consiguiendo una importante reducción de la fragilidad en los ratones tratados (0% vs 40%). Atendiendo a otra de las funciones más deterioradas en el envejecimiento, la función renal (Denic, Glassock et al. 2016), determinamos los niveles de urea plasmática antes y después de la inyección de VEs, observando una reducción en el grupo tratado tanto 14 como 30 días después del tratamiento. Para estudiar la regeneración del pelaje, otra de las características que disminuye con el envejecimiento (Matheu, Maraver et al. 2007), depilamos una zona en el dorso de los animales justo antes del tratamiento con VEs, observando una regeneración capilar mucho mayor en el grupo de animales tratados.

Estos resultados se encuentran en concordancia con resultados previos en ratones envejecidos en los que se inyectaban VEs provenientes de distintas fuentes (Lee, Kim et al. 2018, Fafián-Labora, Rodríguez-Navarro et al. 2020, Dorronsoro, Santiago et al. 2021). En estos estudios se demostró que las VEs mejoraban distintos parámetros asociados al envejecimiento, aunque en ninguno se realizó un estudio longitudinal para estudiar la duración y el máximo efecto de las VEs en distintas funciones fisiológicas.

El tratamiento con VEs revierte los cambios estructurales asociados al envejecimiento en el tejido renal y muscular de ratones envejecidos

El riñón y el músculo son dos de los órganos que más sufren el proceso de envejecimiento (Doherty 2003, Denic, Glassock et al. 2016), por tanto, seleccionamos estos tejidos para un estudio más exhaustivo de los cambios producidos por el tratamiento con VEs. Dado que el efecto máximo observado en las pruebas funcionales fue a los 30 días, estudiamos los tejidos de animales 30 días después del tratamiento con VEs.

En el análisis histológico de la corteza renal, observamos un gran cambio entre ambos grupos, los ratones tratados presentaban una mayor densidad tubular, con menor dilatación y atrofia, evidenciando una cantidad similar de glomérulos. Ya que en el tejido renal maduro los glomérulos no pueden regenerarse, pero los túbulos sí (Denic, Glassock et al. 2016), pensamos que las VEs estaban induciendo una proliferación de las células tubulares, que son las células presentes en el riñón capaces de regenerar el tejido tras un daño (Berger, Bangen et al. 2014). Esto lo comprobamos mediante el marcaje de la proteína Ki67, que identifica las células en división, encontrando una población de células tubulares proliferando en los túbulos de los ratones tratados con VEs, que no estaba presente en los animales control. Observamos además una reducción no significativa de la fibrosis intersticial en el grupo tratado.

Analizamos por otra parte el tejido muscular, encontrando un incremento en el área transversal de las fibras musculares de los animales tratados, uno de los principales marcadores de atrofia y sarcopenia (Lauretani, Russo et al. 2003), esto se acompañaba de una mayor concentración proteica en el tejido de los animales tratados.

En los estudios previos realizados con VEs derivadas de células madre, se había observado una mejora en la capacidad regenerativa de varios tejidos ante distintos tipos de daño (radiación, isquemia, etc.) (Xin, Li et al. 2013, Doeppner, Herz et al. 2015, Zhang, Chopp et al. 2015), pero hasta ahora no se había demostrado una mejora en la regeneración tisular de los animales envejecidos fisiológicamente, algo que se encuentra en línea con la acumulación de daño tisular en el envejecimiento y la pérdida de capacidad regenerativa (López-Otín, Blasco et al. 2013).

Los marcadores moleculares del envejecimiento mejoran en los ratones tratados con VEs

Existen multitud de marcadores moleculares asociados al envejecimiento, en este trabajo estudiamos el estrés oxidativo, los telómeros, la senescencia y la inflamación.

Para estudiar el estrés oxidativo, examinamos los niveles de oxidación en dos macromoléculas: los lípidos y las proteínas. Utilizamos el MDA como marcador de peroxidación lipídica (Ayala, Muñoz et al. 2014), observando una menor peroxidación lipídica en el músculo de los ratones tratados con VEs, sin encontrar cambios en el tejido renal. En los niveles de oxidación proteica, medidos mediante la determinación de grupos carbonilo (Fedorova, Bollineni et al. 2014), observamos resultados muy similares, con una reducción de la oxidación proteica en el tejido muscular en el grupo tratado, sin diferencias en el riñón.

Otro de los factores más estudiados en el envejecimiento es la longitud y el daño a los telómeros (Blasco 2007). Los telómeros se acortan y acumulan daño durante el envejecimiento, contribuyendo a múltiples enfermedades asociadas a este proceso (Blasco, Lee et al. 1997). No encontramos diferencias en este caso en el tejido renal y muscular de los ratones tratados, indicando que el efecto beneficioso de la VEs probablemente no se encuentre mediado por un efecto sobre los telómeros.

Las células senescentes se acumulan en los tejidos a medida que el envejecimiento avanza, contribuyendo a la disfunción tisular (Campisi 1997, Campisi and d'Adda di Fagagna 2007). Por tanto, determinamos el porcentaje de senescencia celular en el tejido renal y muscular de los ratones mediante el marcaje con LMNB1 (Freund, Laberge et al. 2012). Encontramos diferencias importantes en la cantidad de células senescentes ambos tejidos, los ratones tratados presentaban un porcentaje de senescencia menor, asociado además a unos niveles de IL-6 menores en el tejido muscular, uno de los factores proinflamatorios más importantes en el envejecimiento y el SASP (Coppé, Desprez et al. 2010, Franceschi and Campisi 2014).

Para terminar de esclarecer el efecto de las VEs en la senescencia celular, desarrollamos un modelo *in vitro* de senescencia de células musculares progenitoras (mioblastos). Queríamos comprobar si el tratamiento con VEs inducía la apoptosis de las células senescentes, de la misma forma que las moléculas senolíticas (Zhu, Tchkonja et al. 2015). Observamos una disminución de la senescencia en los mioblastos tratados con VEs, así como una disminución de la apoptosis. Una de nuestras hipótesis es que las VEs actúen como senomórficos, algo que ya se había propuesto previamente (Kim and Kim 2019, Dorronsoro, Santiago et al. 2021), los senomórficos son factores que actúan como inhibidores del SASP y la senescencia paracrina, cambiando el ambiente extracelular y consiguiendo una menor senescencia (Kim and Kim 2019).

Resultados previos mostraban una mejoría de distintos parámetros moleculares asociados al envejecimiento en ratones tratados con VEs, aunque todavía no se había realizado un estudio de múltiples parámetros moleculares del envejecimiento en diferentes tejidos en ratones envejecidos fisiológicamente.

El tratamiento con VEs reduce la edad epigenética de los tejidos en ratones envejecidos y modifica su epigenoma

Hasta la fecha, no se había demostrado un efecto de las VEs en la edad epigenética de ningún tejido. Por tanto, quisimos explorar cómo afectaban las VEs a la edad epigenética en cuatro tejidos: riñón, músculo, hígado y bazo. Para ello utilizamos los relojes epigenéticos, que son algoritmos basados en cómo cambia la metilación de las islas CpG a lo largo del envejecimiento (Horvath 2013, Horvath and Raj 2018). En el tejido renal, la edad epigenética en el grupo tratado fue menor utilizando ambos relojes. De manera similar, en el tejido hepático, ambos relojes mostraron una reducción en la edad epigenética, siendo de mayor cuantía en el reloj de intervención. En el caso del músculo y el bazo, no encontramos diferencias en la edad epigenética entre ambos grupos. Esta es la primera vez que se demuestra un cambio en la edad epigenética con un tratamiento con VEs, indicando un efecto pleiotrópico de las vesículas, modificando el epigenoma de los tejidos, además de marcadores del envejecimiento concretos.

Realizamos además un análisis de regresión en el que se observaron miles de *loci* modificados por el tratamiento con VEs. Indicando un profundo cambio a nivel epigenético en los tejidos de los animales tratados. Posteriormente, mediante un análisis de enriquecimiento de los genes más cercanos a los *loci* modificados, pudimos descubrir que las VEs actuaban sobre procesos biológicos muy implicados en el envejecimiento, como el desarrollo, diferenciación y regeneración tisular (Conboy and Rando 2005).

Los microARNs contenidos en las VEs modulan procesos y vías moleculares implicadas en la regeneración tisular y el envejecimiento

Por último, quisimos obtener factores concretos que fuesen posibles responsables del efecto beneficioso observado. Realizamos un análisis transcriptómico de las VEs

procedentes de diferentes condiciones, concretamente estudiamos el contenido en microARNs. Los microARNs han demostrado encontrarse en el interior de las VEs y modificar la expresión génica en tejidos distantes, siendo el tejido adiposo uno de los que más VEs libera a la circulación (Thomou, Mori et al. 2017). Comparamos las VEs de CMTAs jóvenes, CMTAs viejas y las VEs del plasma de animales viejos. En primer lugar, pudimos observar que las VEs de CMTAs jóvenes muestran una sobreexpresión del perfil de microARNs, indicando que la biogénesis de estos se encuentra menos activa en el envejecimiento, algo que ya se había propuesto anteriormente (Serna, Gambini et al. 2012, Borrás, Serna et al. 2017). Centrándonos en la comparación entre VEs de CMTAs jóvenes y VEs del plasma de animales viejos, seleccionamos 6 microARNs sobreexpresados en las VEs de CMTAs jóvenes cuya secuencia se encuentra además conservada entre especies. Realizamos esta selección basándonos en que el envejecimiento es un proceso altamente conservado entre las diferentes especies (Kim 2007, Jones, Scheuerlein et al. 2014). Analizando las dianas virtualmente predichas de estos microARNs, descubrimos que los microARNs enriquecidos en las VEs jóvenes modulan procesos biológicos y vías moleculares muy relacionadas con la regeneración tisular y el envejecimiento. Entre estos procesos encontramos la proliferación y diferenciación celular o el desarrollo de órganos y tejidos, procesos además modificados en el epigenoma de los tejidos previamente comentado. En cuanto a las vías moleculares, estos microARNs están implicados en vías relacionadas con la fibrosis e inflamación, así como en vías cruciales para el envejecimiento, como la apoptosis, p53, p38, estrés oxidativo o insulina/IGF.

Por el momento, este estudio es el primero que compara el contenido en microARNs de las VEs atendiendo a la edad de las células como principal variable, eso crea oportunidades de seguir buscando factores que sean beneficiosos para el envejecimiento, ya sean los microARNs u otras macromoléculas.

CONCLUSIÓN

El tratamiento de ratones envejecidos con VEs obtenidas de CMTAs jóvenes mejora su salud, disminuye su fragilidad y revierte la alteración de varios parámetros celulares y moleculares relacionados con el envejecimiento.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Envejecimiento

1.1.1 Definición

El envejecimiento es un proceso que todos los humanos experimentamos, todos somos conscientes del inevitable declive de nuestras funciones fisiológicas que ocurre una vez alcanzamos la madurez. Sin embargo, para comenzar a estudiar y comprender este proceso, es necesario conocer la terminología que engloba. En mi opinión, existen cuatro conceptos imprescindibles para entender el envejecimiento: envejecimiento, senescencia, longevidad y enfermedades asociadas al envejecimiento. En su trabajo, el Dr. Leonard Hayflick distingue perfectamente estos términos (Hayflick 2007). Para entender el envejecimiento debemos comprender el concepto de entropía, según la segunda ley de la termodinámica, la entropía de un sistema aumenta a medida que pasa el tiempo. Este concepto hace referencia a la tendencia de la energía concentrada en un sistema a dispersarse, conforme pasa el tiempo, las moléculas presentes en un sistema pasan de un estado inicial “ordenado” a estados sucesivos “desordenados”. Estos cambios ocurren tanto en los objetos inanimados, como en los seres vivos, todo envejece, es evidente que nuestros coches son más propensos a dejar de funcionar correctamente a medida que pasa el tiempo, el sistema “ordenado” que era el coche cuando lo compramos, va convirtiéndose en un sistema más “desordenado” y eventualmente deja de servirnos. De manera similar ocurre en los seres vivos, donde el aumento de la entropía conlleva una pérdida de la fidelidad molecular, el cambio en el estado energético de las biomoléculas que forman un ser vivo impiden su correcto funcionamiento. Para que la vida tenga lugar, es imprescindible mantener un sistema “ordenado” que permita la realización de las funciones básicas, por ello los seres vivos han desarrollado sistemas de reparación y reemplazo de estas moléculas disfuncionales.

Esto nos lleva al segundo término, la senescencia, definida como la pérdida de función que ocurre en los seres vivos una vez alcanzada cierta edad, que conlleva un

aumento en la mortalidad (Shefferson, Jones et al. 2017). En el idioma castellano utilizamos ambos términos indistintamente a pesar de que no son lo mismo. El envejecimiento se puede entender como el paso del tiempo y la senescencia tradicionalmente ha sido entendida en términos biológicos como una pérdida de función (Shefferson, Jones et al. 2017), recalcando que la senescencia del organismo hace referencia a un proceso distinto de la senescencia celular, que más tarde comentaremos. Siendo estrictos podríamos decir que el envejecimiento está presente en los seres vivos desde su formación, ya que la entropía del sistema siempre aumenta (un niño de tres años es más viejo que uno de dos), mientras que la senescencia del organismo aparece cuando los sistemas de reparación y reemplazo del organismo son sobrepasados y comienzan a acumularse moléculas disfuncionales. Cuando esto ocurre, se empieza a observar el fenotipo característico del envejecimiento. Las distintas teorías del envejecimiento tienen este denominador común, la pérdida de función de distintas moléculas se acumula y poco a poco sobrepasa los sistemas de mantenimiento que posee el organismo.

La longevidad de un individuo podríamos definirla como el tiempo que pasa entre su nacimiento y su muerte, la longevidad de la población de una determinada especie es el tiempo medio que transcurre entre el nacimiento y la muerte de todos sus individuos. La senescencia aparece en momentos distintos según la especie, por ello encontramos especies con una esperanza de vida tan dispar, desde los 2 años de los ratones a los 80 del *Homo Sapiens* (Jones, Scheuerlein et al. 2014). Lo que determina la longevidad de una especie concreta, más allá de los factores del medio que la rodea, es el genoma de esa especie, es decir, la especie *Homo Sapiens* presenta una longevidad concreta porque su genoma así lo dicta, siempre hablando en un ambiente favorable para llegar a una longevidad “máxima”. El envejecimiento es un proceso estocástico, pero la determinación de la longevidad no lo es, la longevidad se relaciona con el nivel de reserva fisiológica que una especie presenta en el momento de alcanzar la madurez, que, a través de la selección natural, fue conseguida para garantizar la supervivencia hasta esa edad.

El aspecto asociado al envejecimiento que probablemente más interesa a la sociedad es el de las enfermedades que aparecen como consecuencia de este proceso. Una enfermedad asociada al envejecimiento es aquella que no es frecuente observar en individuos jóvenes, mientras que su incidencia aumenta gradualmente a medida que estudiamos poblaciones más envejecidas. Mientras que el envejecimiento afecta a todas las personas, estas enfermedades no lo hacen; el Alzheimer, la aterosclerosis, la insuficiencia cardíaca o la insuficiencia renal son enfermedades que en gran parte tienen como sustrato biológico el proceso del envejecimiento, pero son algo distinto a este proceso. Es importante recalcar que el envejecimiento no es una enfermedad, aunque sí incrementa la vulnerabilidad del individuo a diferentes enfermedades.

Por tanto, existen cuatro términos que es importante diferenciar, ya que se refieren a conceptos distintos a pesar de que en la literatura científica en ocasiones se entremezclan: el envejecimiento, que se relaciona con la propiedad física de la entropía, la senescencia, entendida como la pérdida de función que ocurre en los seres vivos a medida que envejecen, la longevidad, definida como la duración de la vida, y las enfermedades asociadas al envejecimiento, que son afecciones que aumentan su incidencia drásticamente con la edad.

1.1.2 Evolución del envejecimiento a través de las especies

Tanto el proceso del envejecimiento como las vías moleculares implicadas en él se encuentran altamente conservadas entre categorías taxonómicas muy divergentes, desde las levaduras a los ratones, pasando por los gusanos o las moscas (Kim 2007, Smith, Tsuchiya et al. 2008). Sin embargo, existe una variación sustancial en los patrones del envejecimiento entre especies muy cercanas, incluso existen especies en muchas ramas taxonómicas que parecen no envejecer, su mortalidad no aumenta a medida que pasa el tiempo, incluso puede descender (Jones, Scheuerlein et al. 2014).

En la siguiente figura podemos observar las curvas de mortalidad (en rojo) de diferentes especies, la mayoría de las especies presentan una curva de mortalidad similar a la del *Homo Sapiens* o el *Pinus silvestris*, donde encontramos un incremento en la probabilidad de muerte con el paso del tiempo (Figura 1). Sin embargo, encontramos especies de categorías taxonómicas muy distintas que presentan patrones diferentes de envejecimiento, por ejemplo, la *Hydra magnipapillata* es un invertebrado que presenta una senescencia despreciable, como se puede observar la probabilidad de muerte se mantiene constante en el tiempo. La tortuga del desierto (*Gopherus agassizii*) es un vertebrado que presenta una senescencia negativa, de igual forma que la *Laminaria digitata*, una especie de alga. La senescencia negativa es una propiedad que presentan algunas especies y que consiste en un descenso de la mortalidad, normalmente acompañado por un aumento en la fertilidad, a medida que aumenta la edad de los individuos (Vaupel, Baudisch et al. 2004).

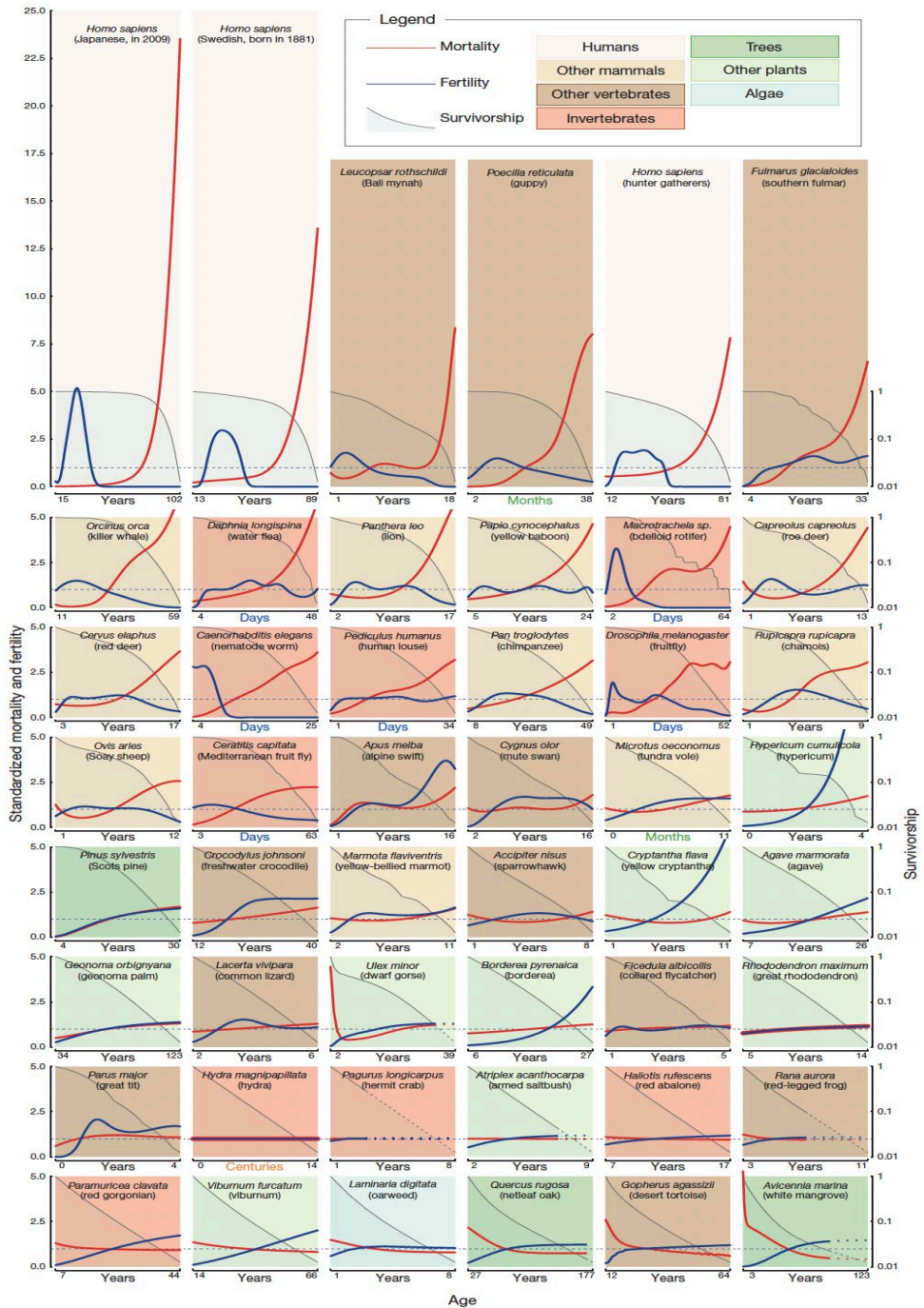


Figura 1: Curvas de mortalidad y fertilidad de distintas especies.

Tomado de (Jones, Scheuerlein et al. 2014)

La curva de mortalidad de una especie siempre depende del entorno en el cual sea medida, es poco frecuente encontrar individuos muy envejecidos en estado salvaje, ya que existen factores externos, como la falta de alimento o los depredadores, que impiden la llegada de estos individuos a edades avanzadas, pero ello no quiere decir que no los haya o que no tengan el potencial de alcanzarlas. Cuando observamos a estas especies en un entorno controlado e ideal podemos observar el declive de las funciones típico a medida que avanzan en edad.

El paso del tiempo y el inevitable deterioro de las moléculas que forman un ser vivo ocurre a todos los niveles en las distintas especies, sin embargo, la longevidad y el patrón de envejecimiento de cada especie es único y está determinado por su genoma (Vaupel, Carey et al. 1998). Esta conclusión es de gran importancia, ya que la mayoría de los estudios modernos relacionados con el envejecimiento, que nos han llevado a conocer a nivel celular y molecular algunas de las causas del envejecimiento, se basan en la noción de que la longevidad de una especie está determinada por sus genes y las vías de señalización y procesos biológicos de los que forman parte y, por tanto, pueden ser modulables. En la mayoría de estudios relacionados con la longevidad de las especies, asumimos un ambiente favorable para las distintas especies, ya que sus curvas de mortalidad pueden cambiar drásticamente si son introducidas en ambientes hostiles, dando lugar a una mortalidad aumentada en épocas más precoces de la vida (Shefferson, Jones et al. 2017).

1.1.3 Historia del estudio del envejecimiento

A mediados del siglo XX, cuando comenzaron a aparecer las primeras teorías que trataban de explicar el porqué del envejecimiento, se pensaba que el envejecimiento como lo conocemos era un producto de la selección natural, y no un proceso biológico susceptible de estudio (Zainabadi 2018). A pesar de que el envejecimiento

y el paso del tiempo es algo que siempre ha acompañado a la humanidad, los primeros estudios científicos sobre este proceso tienen menos de 40 años de antigüedad.

En la siguiente tabla podemos encontrar algunos de estos primeros estudios que más tarde llevarían a la conclusión de que el envejecimiento es un proceso genéticamente regulado sobre el que se puede actuar.

Año	Descubrimiento	Referencia
1935	La restricción calórica en roedores alarga la longevidad	(McCay, Crowell et al. 1989)
1977	La longevidad puede ser modulada por intervenciones en el ambiente en <i>C. elegans</i>	(Klass 1977)
1982	Diferentes cepas de <i>C. elegans</i> muestran longevidades muy dispares	(Johnson and Wood 1982)
1983	Primera creación de <i>C. elegans</i> mutantes que muestran un incremento en la longevidad	(Klass 1983)
1988	Identificación de la primera mutación en un gen (<i>age-1</i>) que aumenta la longevidad	(Friedman and Johnson 1988)

1995	Definición de la primera red de regulación génica relacionada con el envejecimiento (vía de la insulina)	(Larsen, Albert et al. 1995)
1996	Primera descripción definitiva de una cepa de ratón con un incremento de la longevidad	(Brown-Borg, Borg et al. 1996)

Tabla 1: Lista de hallazgos clave en el estudio del envejecimiento.

Tomado de (Zainabadi 2018).

A partir de estos estudios pioneros, la investigación en el ámbito del envejecimiento ha crecido de manera exponencial, especialmente en las dos últimas décadas. Se han desarrollado multitud de modelos animales para su estudio y se han descubierto un gran número de genes y vías de señalización capaces de modular el envejecimiento en diferentes especies, como por ejemplo el receptor de la insulina (Blüher, Kahn et al. 2003, Holzenberger, Dupont et al. 2003), el gen mTOR (Vellai, Takacs-Vellai et al. 2003) o la familia de las sirtuínas (Kennedy, Austriaco et al. 1995, Tissenbaum and Guarente 2001, Zhang, Bai et al. 2010). Esto ha llevado incluso a descubrir agentes, que modulando estas vías de señalización, son capaces de aumentar la longevidad en modelos animales, siendo la metformina (vía de la insulina) en 2008 (Anisimov, Berstein et al. 2008) y la rapamicina (vía de mTOR) en 2009 (Harrison, Strong et al. 2009) los dos primeros fármacos que se postularon como moduladores del proceso de envejecimiento.

1.1.4 Cantidad *versus* calidad de vida

La gran mayoría de estudios iniciales sobre el envejecimiento tenían como objetivo analizar el efecto de distintas intervenciones sobre la longevidad de los organismos que estudiaban, y de hecho se consiguieron importantes aumentos en la longevidad de diversas especies. Sin embargo, en la última década, conforme se ha ido avanzando en el conocimiento y especialmente al tratar de trasladar los hallazgos al ser humano, la comunidad científica poco a poco ha pasado de centrarse en la cantidad de vida a tratar de mejorar la calidad de vida de las personas más envejecidas (Olshansky 2018).

Todavía existe debate en cuanto al límite de la esperanza de vida en el ser humano (Dong, Milholland et al. 2016, Rozing, Kirkwood et al. 2017), pero en general la esperanza de vida continúa aumentando en la mayoría de poblaciones (Kontis, Bennett et al. 2017). El principal problema al que se enfrenta la sociedad actual es que la esperanza de vida aumenta a un ritmo mayor que la calidad de vida, llevando a una acumulación de morbilidad al final de la vida, lo que provoca un gran gasto social y económico, así como un gran desgaste para la persona y para sus cuidadores. Las enfermedades asociadas al envejecimiento son por tanto un reto global ya que son la principal causa de muerte y discapacidad en los países desarrollados (Crimmins 2015, Beard, Officer et al. 2016). Un envejecimiento “óptimo” sería aquel en el cual un individuo se mantiene sano hasta el final de sus días, y solo presenta enfermedad o discapacidad un breve período de tiempo hasta su muerte. No obstante, esto no es lo que encontramos en la mayoría de los ancianos, actualmente las personas pasan gran parte de los últimos años de su vida con alguna enfermedad o discapacidad. En la siguiente figura podemos observar un gráfico que ejemplifica el problema actual (Figura 2), en el que tenemos un largo período con enfermedades asociadas al envejecimiento, la parte inferior de la figura muestra lo que sería óptimo, con un período de enfermedad mucho más breve, lo que se conoce como la

compresión de la morbilidad, término acuñado por James Fries hace cinco décadas (Fries 1980).

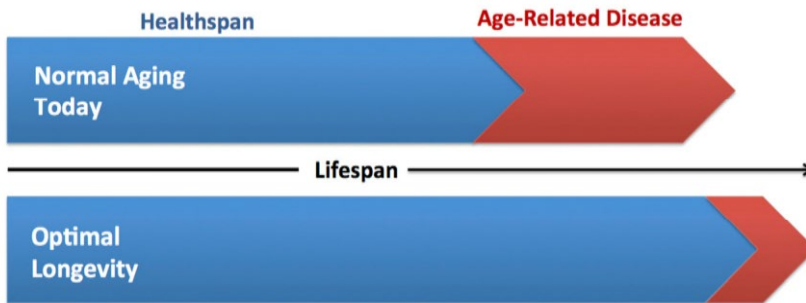


Figura 2: Envejecimiento actual vs. envejecimiento óptimo.

Tomado de (Seals and Melov 2014)

El principal objetivo del estudio del envejecimiento y sus causas es conseguir que la enfermedad y discapacidad aparezcan lo más tarde posible, para ello es imprescindible conocer los mecanismos del envejecimiento a nivel celular y molecular, ya que es ahí donde se encuentra el germen de todas las enfermedades y afecciones asociadas a este proceso, esta es una de las principales hipótesis de la denominada “gerociencia”, una iniciativa recientemente desarrollada desde el NIH de Estados Unidos que acoge a un gran número de investigadores del campo del envejecimiento. Esta iniciativa tiene como objetivo desarrollar terapias y métodos preventivos para las enfermedades asociadas al envejecimiento, entendiéndolas como productos del proceso de envejecimiento (Kennedy, Berger et al. 2014). Citando la conclusión del estudio de James Fries en 1980 podemos apreciar que, incluso antes del auge de la investigación en envejecimiento, ya existía esta visión: *“La extensión de la vitalidad de los adultos dentro de una longevidad fija comprime el periodo de senescencia cerca del final de la vida. Las estrategias de investigación en salud para mejorar la calidad de vida de las personas requieren del estudio minucioso de la variabilidad de los fenómenos del envejecimiento y cómo podrían ser modificados”* (Fries 1980).

Uno de los ejemplos que se acerca a un envejecimiento “óptimo” es el de los centenarios, siendo un modelo para estudiar por las características de su proceso de envejecimiento. Generalmente, estas personas llegan al final de su vida manteniendo la función de sus capacidades fisiológicas a un mejor nivel que el resto de los individuos cuando llegan a este punto (octogenarios). Los centenarios muestran una compresión de la morbilidad muy destacable, con un período de enfermedad y discapacidad generalmente más breve que el resto. En nuestro grupo siempre nos ha interesado estudiar a estos individuos y cuáles son los genes o vías moleculares que sobreexpresan, como búsqueda de posibles factores que contribuyan al envejecimiento saludable (Serna, Gambini et al. 2012, Borrás, Abdelaziz et al. 2016, Borrás, Serna et al. 2017, Borrás, Ingles et al. 2020, Borrás, Mas-Bargues et al. 2020).

1.1.4.1 Fragilidad

1.1.4.1.1 Concepto

En los humanos, distintas funciones fisiológicas se ven mermadas a medida que envejecemos. Pero esto no ocurre en todas las personas de la misma forma, la edad biológica y la edad cronológica no siempre están correlacionadas (Mitnitski, Mogilner et al. 2002). Existen individuos dentro de una población que presentan una capacidad funcional más reducida, son más vulnerables y se encuentran expuestos a la dependencia. Para identificar a estos individuos se acuñó el término de persona o anciano frágil, dado que estos individuos aparecen con mucha más frecuencia en edades avanzadas de la vida (Campbell and Buchner 1997). La fragilidad se trata por tanto no de una enfermedad si no de un síndrome, provocado por el deterioro en múltiples sistemas del organismo.

No existe una definición universal de fragilidad, sin embargo, la que más cerca está de serlo y que todavía utilizamos es la dada por Linda Fried y colaboradores en 2001, definida como “el estado fisiológico caracterizado por un aumento de la vulnerabilidad a las agresiones externas, como resultado de una disminución o desregulación de las reservas fisiológicas de múltiples sistemas, originando dificultades para mantener la homeostasis” (Fried, Tangen et al. 2001). El estado de fragilidad, definido por una serie de criterios que comentaremos más adelante, es uno de los mayores predictores de dependencia y mortalidad, mejor incluso que la edad cronológica, correlacionándose muy estrechamente con la calidad de vida del anciano (Mitnitski, Mogilner et al. 2002, Rockwood and Mitnitski 2007). Se trata además de un estado dinámico y modificable con distintas intervenciones, siendo la más estudiada el ejercicio físico, la fragilidad es más difícil de modificar a medida que el síndrome avanza, por lo que el diagnóstico y tratamiento temprano es una de las claves para mejorar la calidad de vida en los ancianos (Vellas, Wayne et al. 1997, Bortz 2002, Chen, Mao et al. 2014).

La prevalencia de este síndrome aumenta drásticamente con la edad, encontrando muy pocos individuos por debajo de los 65 años que cumplen los criterios propuestos por Fried (Collard, Boter et al. 2012). Existen múltiples estudios que intentan averiguar la prevalencia real de la fragilidad, siendo esta modificada por factores socioeconómicos, situándose en torno al 10% para los mayores de 65 años y del 25% para los mayores de 85 (Shamliyan, Talley et al. 2013).

Una de las principales críticas a la definición de Fried que ha surgido en los últimos años es que esta fragilidad está muy centrada en el sistema musculoesquelético del individuo ya que todos los criterios que se utilizan para clasificar a un individuo como frágil dependen del estado físico del individuo. Por tanto, han surgido múltiples definiciones y criterios que incluyen otros aspectos que se deterioran en los individuos más envejecidos. Estos aspectos, como el estado cognitivo, emocional

o social, contribuyen también al aumento de la vulnerabilidad a las agresiones externas (Rockwood, Song et al. 2005).

1.1.4.1.2 Criterios clínicos de fragilidad

Se han realizado un gran número de estudios que tratan de definir el estado de fragilidad en base a unos criterios que pueden ser utilizados en la clínica. En este trabajo nos centraremos en comentar los propuestos por Linda Fried y colaboradores, ya que siguen siendo los más usados en la actualidad nos basaremos en ellos para realizar el trabajo. En este estudio se propusieron 5 criterios y se identificó a los individuos como frágiles si cumplían al menos 3 de estos criterios, los que cumplían 1 o 2 se consideraron prefrágiles y los que no cumplían ninguno, robustos o no frágiles. Los criterios propuestos son los siguientes:

- I. Pérdida de peso no intencionada de al menos 4,5 Kg o un 5% del peso corporal total en el último año o durante el seguimiento.
- II. Fuerza de agarre por debajo del percentil 20, ajustado por sexo e índice de masa corporal (IMC).
- III. Agotamiento referido por el propio paciente, identificado por la escala CES-D.
- IV. Lentitud de la marcha identificada por el tiempo en andar 4,5 m por debajo del percentil 20, ajustado por sexo y altura corporal.
- V. Bajo nivel de actividad física cuantificado por una estimación de las kilocalorías consumidas por semana.

Como hemos comentado previamente, estos criterios se basan exclusivamente en el estado físico de los individuos, por lo que existen otras escalas que tratan de incluir criterios relacionados con el estado cognitivo, emocional o social. Por ejemplo, Rockwood y colaboradores desarrollaron un índice en el que se identifican 70 déficits relacionados con estos aspectos, correlacionando el estado de fragilidad con

la dependencia para las actividades básicas (ABVD) e instrumentales (AIVD) de la vida diaria (Rockwood, Stadnyk et al. 1999, Rockwood, Song et al. 2005). Además, diversos autores tratan de separar la fragilidad de la discapacidad, definiendo la fragilidad como un estadio precursor sobre el que se puede actuar para prevenir la dependencia (Martín Lesende, Gorroñoigoitia Iturbe et al. 2010, Abizanda, Sánchez-Jurado et al. 2011).

Dado el interés creciente en intervenciones que retrasen la aparición de la fragilidad se han desarrollado adaptaciones de las pruebas de fragilidad para poder ser usadas en animales de investigación como los ratones (Walston, Fedarko et al. 2008, Parks, Fares et al. 2012, Liu, Graber et al. 2014, Whitehead, Hildebrand et al. 2014, Gomez-Cabrera, Garcia-Valles et al. 2017). Estas pruebas se basan en la capacidad física de los ratones cuantificada mediante diversas pruebas que se asemejan a las utilizadas en humanos. Esto permite determinar qué ratones son frágiles dentro de una cohorte y evaluar diferentes estrategias para revertirla o prevenirla.

1.1.4.1.3 Sarcopenia

En los individuos frágiles se alteran múltiples órganos y sistemas que contribuyen al síndrome de fragilidad, siendo el más importante el sistema musculoesquelético. La sarcopenia se caracteriza por una pérdida de fuerza y de masa muscular que ocurre típicamente en los individuos ancianos. A nivel tisular, el tejido muscular de las personas con sarcopenia presenta cambios que también se correlacionan en mayor o menor medida con el envejecimiento del organismo. Estos cambios son una menor área transversal de las fibras, una mayor denervación de las unidades motoras, una mayor proporción de fibras lentas (tipo 1) y el depósito de lípidos intramusculares (Lang, Streiper et al. 2010, Larsson, Degens et al. 2019).

Todos estos cambios contribuyen a una menor fuerza muscular, que a su vez lleva a un mayor riesgo de fragilidad. A nivel molecular, se han propuesto numerosos

mecanismos que contribuyen al desarrollo de la sarcopenia. Entre estos mecanismos encontramos la senescencia de las células satélite, que se encargan de regenerar el tejido muscular, el estrés oxidativo aumentado en el músculo de los individuos con sarcopenia, o la inflamación crónica que se asocia al envejecimiento (Pascual-Fernández, Fernández-Montero et al. 2020).

1.1.5 Factores promotores del envejecimiento en mamíferos

Este apartado podría ocupar todo el trabajo, ya que engloba décadas de trabajos en el ámbito del envejecimiento y las vías y procesos implicados en él, tanto a nivel molecular como celular. Existen varias revisiones realizadas recientemente por importantes investigadores en este campo de estudio, que pretenden sintetizar las causas del envejecimiento que conocemos hasta ahora (Mahmoudi and Brunet 2012, López-Otín, Blasco et al. 2013, Kennedy, Berger et al. 2014). Para demostrar que una vía molecular o un proceso biológico está implicado directamente en el proceso de envejecimiento nos basamos en tres características: este debe aparecer a medida que aumenta la edad de un organismo, su agravamiento debería acelerar el proceso de envejecimiento y su mitigación debería ralentizarlo o mejorar la calidad de vida de los individuos envejecidos.

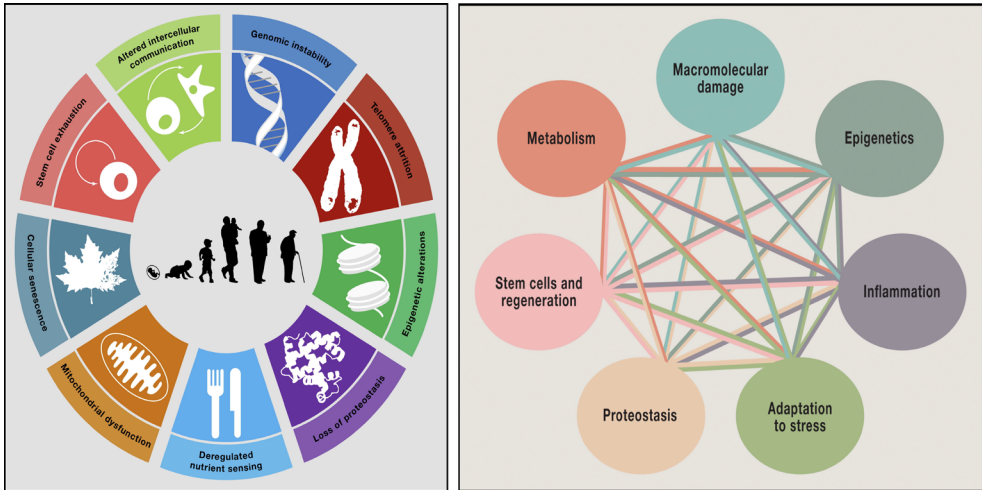


Figura 3: Recopilaciones de las causas del envejecimiento.

Tomado de (López-Otín, Blasco et al. 2013) y (Kennedy, Berger et al. 2014)

Como se puede observar en la Figura 3, los procesos más importantes implicados en el envejecimiento se han recopilado de manera similar y serían los siguientes:

1. Daño a las macromoléculas.
2. Inestabilidad genómica.
3. Alteraciones epigenéticas.
4. Afectación de los telómeros.
5. Pérdida de la proteostasis.
6. Alteraciones en el metabolismo de los nutrientes.
7. Disfunción mitocondrial.
8. Deficiente adaptación al estrés.
9. Senescencia celular.
10. Pérdida de capacidad regenerativa.
11. Alteración de la comunicación intercelular e inflamación.

Huelga decir que estas no son las únicas causas del envejecimiento y que existen múltiples formas de clasificarlas, pero es importante recalcar que el envejecimiento

es algo global en el que se implican numerosos mecanismos que se relacionan entre sí, es decir, si conseguimos modificar alguno de estos procesos también observaremos cambios en los demás. Todos estos procesos son complementarios y es seguro que a medida que avance nuestro conocimiento irán apareciendo más. Además, pueden servirnos de marcadores que podemos determinar al estudiar los efectos de distintas intervenciones sobre el envejecimiento. Si queremos comprobar que una intervención está actuando sobre el proceso de envejecimiento a nivel molecular, generalmente estudiamos las modificaciones que induce en estos procesos.

En los siguientes puntos de la introducción se describen de manera más detallada los procesos asociados al envejecimiento en los que está centrado el presente trabajo.

1.2 Senescencia celular

1.2.1 Definición

La senescencia celular fue descrita por primera vez cuando el Dr. Leonard Hayflick y sus colaboradores observaron que las células presentaban una capacidad limitada de proliferación en un cultivo celular (Hayflick and Moorhead 1961, Hayflick 1965). Estos experimentos demostraron que los fibroblastos humanos proliferaban a un ritmo alto al comienzo del cultivo, pero tras un determinado número de duplicaciones estas células dejaban de proliferar y presentaban cambios fenotípicos, manteniéndose viables, aunque sin conseguir dividirse.

Los numerosos estudios realizados con posterioridad llevaron a la conclusión de que la senescencia celular sería en principio un mecanismo protector frente al cáncer (caracterizado por la proliferación incontrolada), por el cuál las células entran en una detención irreversible del ciclo celular tras sufrir determinados estímulos, como el daño al ADN, el acortamiento excesivo de los telómeros, las mutaciones oncogénicas o la inestabilidad de la cromatina. Una vez las células entran en senescencia, son eliminadas por el sistema inmune, permitiendo al resto de células sanas proliferar (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007, Collado, Blasco et al. 2007). Este proceso, que tiene como principal propósito evitar la propagación de las células dañadas, necesita de un sistema eficiente de eliminación y sustitución para mantener la homeostasis. En organismos envejecidos, esta renovación se vuelve ineficiente, bien por una ineficacia del sistema inmune o por un agotamiento de la capacidad de regeneración, resultando en el acúmulo de estas células en los tejidos (Wang, Jurk et al. 2009).

1.2.2 Indicadores de senescencia celular

Bajo un microscopio óptico, las células senescentes presentes en cultivos celulares experimentan alteraciones morfológicas, como hipertrofia, vacuolización y acumulación de gránulos (Kuilman, Michaloglou et al. 2010, Rodier and Campisi 2011, Campisi 2013). También exhiben un patrón inusual en la heterocromatina nuclear, conocidos como focos de heterocromatina asociados a la senescencia (Narita, Núñez et al. 2003), estos focos están formados por *loci* de genes relacionados con la progresión del ciclo celular, como las dianas del factor de transcripción E2F. Existen multitud de marcadores de senescencia celular, no estando todos siempre presentes en las células senescentes, en este trabajo explicaremos más profundamente los marcadores que hemos utilizado para realizar el trabajo.

1.2.2.1 β -galactosidasa asociada a la senescencia

Las células senescentes presentan además una actividad característica de la enzima β -galactosidasa, capaz de catalizar reacciones a pH 6, lo que la distingue de la enzima común, que tiene un pH óptimo de 4-4,5, este tipo de enzima se conoce como β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β -gal) y fue descrita en el año 1995 por el Dr. Dimri y colaboradores en fibroblastos y queratinocitos humanos (Dimri, Lee et al. 1995). En el año 2000, David Kurz y colaboradores demostraron que la SA- β -gal es esencialmente la misma β -galactosidasa que se encuentra en los lisosomas de las células eucariotas. Sin embargo, en las células senescentes se acumulan lisosomas disfuncionantes, así como lipofuscinas (que son productos de degradación de los lisosomas, debido a la mayor abundancia de lisosomas en estas células, se puede detectar su actividad a pH 6, que es un pH subóptimo (Kurz, Decary et al. 2000).

La SA- β -gal es el marcador más comúnmente usado para detectar las células en estado senescencia, y ha sido usado universalmente desde su descubrimiento, describiendo su presencia en un gran número de tipos celulares, tanto en células en cultivo (Reznikoff, Yeager et al. 1996, Serrano, Lin et al. 1997, Bodnar, Ouellette et al. 1998, van der Loo, Fenton et al. 1998, Matsunaga, Handa et al. 1999) como en tejidos (Mishima, Handa et al. 1999, Pendergrass, Lane et al. 1999, Sigal, Rajvanshi et al. 1999).

1.2.2.2 Inhibidores del ciclo celular

Como hemos dicho, las células senescentes presentan una detención en su proliferación, por lo tanto, es lógico que aumente la expresión de proteínas relacionadas con la inhibición del ciclo celular. En la senescencia celular juegan un papel especialmente importante las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Estas proteínas son indispensables para la correcta progresión del ciclo celular, y su inhibición sirve de freno a la proliferación. La actividad de estas ciclinas está regulada por dos tipos de inhibidores: las proteínas de la familia INK4 (INK4a, INK4b, INK4c e INK4d) y las de la familia Cip/Kip (p21, p27 y p57) (Sherr 1995, Sherr and Roberts 1995).

De entre todos los inhibidores del ciclo celular, la proteína más característica de la senescencia celular es p16^{INK4a}, esta proteína se encuentra codificada por el gen CDKN2A, que presenta un ajustamiento alternativo que codifica la proteína p14^{ARF} en el humano y su ortólogo p19^{ARF} en el ratón, además, este se encuentra relacionado con el gen CDKN2B que codifica la proteína p15^{INK4b}. Las proteínas p16^{INK4a} y p15^{INK4b} son inhibidores de CDK4 y CDK6, dos quinasas encargadas de fosforilar Rb para permitir la progresión del ciclo, ya que cuando Rb se encuentra hipofosforilada, secuestra los factores de transcripción relacionados con E2F, necesarios para la duplicación del ADN (Serrano, Hannon et al. 1993, Quelle, Zindy et al. 1995).

El aumento de la expresión de p16^{INK4a} ha sido usado clásicamente como un marcador de senescencia en los estudios *in vitro*, ya que generalmente sus niveles se correlacionan con la proporción de células senescentes en el cultivo. Además de p16^{INK4a}, existen otros inhibidores del ciclo celular (p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} y p15^{INK4b}) que han demostrado ser capaces de inducir la senescencia en distintas células (Mirzayans, Andrais et al. 2012). Sin embargo, cabe destacar que la inactivación de estos factores de manera individual no siempre previene la senescencia, y pueden existir células con las características de una célula senescente que no expresan alguno de estos factores, llevando a la conclusión de que los inhibidores del ciclo celular actúan de manera complementaria en el proceso de senescencia celular, no siendo factores imprescindibles para su desarrollo (Pantoja and Serrano 1999, Latres, Malumbres et al. 2000, Herbig, Jobling et al. 2004).

1.2.2.3 Pérdida de lamina B1

La determinación de SA-β-gal ha sido el marcador más usado para demostrar la presencia de células senescentes tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, no obstante, este marcador presenta una importante limitación, al tratarse de una actividad enzimática, la enzima debe ser funcional para poder detectarla. Esto impide su uso como marcador de senescencia en tejidos fijados previamente, ya que la fijación inhibe completamente la acción enzimática. Para superar esta limitación, el grupo de la Dra. Campisi describió en 2012 un método basado en la determinación de la pérdida de la lamina B1, una proteína presente en la membrana nuclear en las células normales, pero que desaparece cuando estas entran en senescencia (Freund, Laberge et al. 2012). Este hecho ha sido comprobado en varios tejidos y actualmente la pérdida de lamina B1 se trata de un marcador de senescencia celular cada vez más usado, correlacionándose adecuadamente con la positividad para SA-β-gal (Dreesen, Chojnowski et al. 2013, Chen, Zheng et al. 2014, Baar, Brandt et al. 2017, Wang, Ong et al. 2017).

Las laminas son una familia de proteínas que forman parte de la membrana nuclear de las células eucariotas, se dividen en laminas de tipo A, cuyas mutaciones son causantes de las laminopatías (distrofias musculares, cardiomiopatía, lipodistrofia y progeria de Hutchinson-Gilford), y laminas de tipo B, que son necesarias para la correcta organogénesis. La lamina B1 ha demostrado regular el crecimiento y la proliferación celular, y el descenso de esta proteína durante la senescencia desencadena profundos cambios en la organización de la cromatina nuclear (Shah, Donahue et al. 2013).

1.2.2.4 Fenotipo secretor asociado a la senescencia

Cuando las células entran en el estado de senescencia las moléculas que secretan cambian radicalmente, es lo que se conoce como fenotipo secretor asociado a la senescencia o SASP por sus siglas en inglés, estas células comienzan a liberar distintos factores al medio: metaloproteinasas, interleuquinas pro-inflamatorias, quimiocinas, interferón, factores de crecimiento y proteasas, entre otros (Campisi 1997, Shelton, Chang et al. 1999, Kuilman and Peeper 2009, Coppé, Desprez et al. 2010). Estos factores contribuyen significativamente al efecto de la senescencia celular sobre la función tisular. A medida que un tejido envejece y se comienzan a acumular células senescentes, los factores liberados por estas actúan de manera deletérea sobre el propio tejido y sobre el organismo, aumentando la respuesta inflamatoria crónica que se observa durante el envejecimiento.

La citoquina más característica del SASP es la interleuquina-6 (IL-6), una interleuquina pro-inflamatoria con un gran número de efectos a nivel tisular y sistémico, que se relaciona con varias afecciones de base inflamatoria como la obesidad o la aterosclerosis (Fuster and Walsh 2014). La expresión de IL-6 se ha asociado al daño al ADN y las mutaciones oncogénicas en distintos tipos celulares (Coppé, Patil et al. 2008, Kuilman, Michaloglou et al. 2008, Rodier, Coppé et al.

2009), este efecto puede considerarse beneficioso inicialmente, ya que es un mecanismo por el cual las células comunican su estado a las células adyacentes, el problema radica en que la acumulación de las células senescentes con el envejecimiento contribuye al aumento de los niveles de esta y otras moléculas pro-inflamatorias. A su vez, esta inflamación promovida por la acumulación de células senescentes se correlaciona con la inflamación sistémica que acompaña tanto al proceso de envejecimiento como a varios síndromes asociados como la fragilidad (Tchkonia, Zhu et al. 2013).

1.2.3 Senolíticos

La noción de que la acumulación de células senescentes en el organismo contribuye de manera significativa al envejecimiento, en parte debido a la liberación de factores perjudiciales por el SASP, llevó a investigar la posibilidad de eliminar de alguna forma estas células y comprobar su efecto sobre el envejecimiento. El estudio fundamental en este aspecto se realizó en 2011 por Baker y colaboradores, en el que se creó un ratón progeroide que presentaba un gen suicida unido al promotor de $p16^{\text{INK4a}}$; esto permitió a los investigadores activar la apoptosis de las células que expresarán $p16^{\text{INK4a}}$, una característica que presenta la mayoría de las células senescentes. En el estudio se demostró que la eliminación de células senescentes conseguía paliar la disfunción asociada al envejecimiento de varios tejidos (músculo, tejido adiposo y ojos), mejorando la calidad de vida de los animales envejecidos (Baker, Wijshake et al. 2011).

A partir de entonces comenzó la búsqueda de los llamados senolíticos, moléculas capaces de inducir la muerte selectiva de las células senescentes, que son una de las grandes promesas en el campo del envejecimiento, siendo potencialmente útiles en un gran número de patologías asociadas al envejecimiento, como la sarcopenia, la insuficiencia renal, osteoporosis, aterosclerosis, etc (Tchkonia, Zhu et al. 2013).

La comparación transcriptómica entre células senescentes y sus homólogas ha abierto un amplio abanico de vías moleculares que actúan en el mantenimiento del estado de senescencia, siendo de especial importancia la resistencia a la apoptosis (Zhu, Tchkonja et al. 2015). Las células senescentes necesitan mantener inhibida la vía de la apoptosis para mantenerse con vida, y esto es lo que tratan de explotar la mayoría de senolíticos. Inhibiendo ciertas moléculas relacionadas con la resistencia a la apoptosis, como la familia de Bcl-2, se consigue la muerte por apoptosis de las células senescentes, no afectando al resto de células (Chang, Wang et al. 2016, Yosef, Pilpel et al. 2016, Zhu, Tchkonja et al. 2016). Pese a ser un ámbito muy novedoso, los senolíticos han demostrado ser capaces de reducir el número de células senescentes también en humanos (Hickson, Langhi Prata et al. 2019). En la actualidad, este es uno de los campos con más auge dentro del estudio del envejecimiento, con un número creciente de nuevas moléculas y ensayos clínicos sobre el efecto de estas en múltiples enfermedades asociadas al envejecimiento.

1.2.3.1 Apoptosis

Cuando una célula recibe un daño tiene varios mecanismos para evitar que se propague, dependiendo el tipo y la intensidad del daño, la célula puede morir por necrosis, morir por apoptosis, o entrar en estado de senescencia. La necrosis consiste en la ruptura de la membrana celular, con la consiguiente liberación del contenido que causa una reacción inflamatoria. La apoptosis, tradicionalmente conocida como muerte celular programada, es un proceso mediante el cual el contenido celular se mantiene empaquetado en los llamados cuerpos apoptóticos, que son fagocitados por el sistema inmune, evitando la respuesta inflamatoria (Alberts, Johnson et al. 2002). Las células senescentes muestran una característica resistencia a entrar en el proceso de apoptosis, a pesar de recibir estímulos pro-apoptóticos, en parte debido a la sobreexpresión de moléculas anti-apoptóticas (Wang 1995, Hampel, Malisan et al. 2004).

1.2.3.2 Vías moleculares de la apoptosis

La apoptosis puede ser inducida por dos vías distintas: la vía intrínseca y la vía extrínseca. La vía intrínseca es activada por distintos tipos de estrés celular como el estrés oxidativo, el daño al ADN o la hipoxia. Esta vía está gobernada por la mitocondria, en la membrana mitocondrial se encuentran distintas proteínas de la familia de Bcl-2, que incluye proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-6, Bcl-xL) y pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bid). En ausencia de señales de daño celular pro-apoptóticas estas proteínas se encuentran en equilibrio en la membrana mitocondrial, pero cuando un estímulo inicia esta vía, las proteínas pro-apoptóticas se activan y se agregan formando poros en la membrana mitocondrial que permiten la salida de citocromo c al citosol. El citocromo c se une en el citoplasma a la proteína Apaf1 para formar el apoptosoma, un heptámero que recluta a la Caspasa-9 para iniciar la cascada de las caspasas y finalizar el proceso de apoptosis. Las caspasas son una familia de proteasas que se encuentran inactivas de manera constitutiva y solo se activan durante el proceso de apoptosis, permitiendo la degradación de múltiples componentes celulares, terminando en la muerte celular y la formación de los cuerpos apoptóticos.

La vía extrínseca de la apoptosis consiste en la activación de los receptores de muerte celular presentes en la membrana plasmática mediante señales extracelulares. Existen dos tipos de receptores: el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) y el receptor Fas. Cuando estos receptores son activados, por ejemplo, por la presencia del ligando de Fas (FasL) en la membrana de un linfocito citotóxico, su dominio intracelular se une a caspasas iniciadoras (principalmente a la Caspasa-8) formando el complejo de señalización inductor de muerte (DISC), que a su vez activa a las caspasas ejecutoras para inducir la apoptosis. Existen tres caspasas donde confluyen las diferentes vías de la apoptosis, conocidas como caspasas ejecutoras, estas son las Caspasas 3, 6 y 7 (Alberts, Johnson et al. 2002).

1.2.3.3 Indicadores de apoptosis

La apoptosis es un proceso dinámico que termina con la condensación y fragmentación nuclear y la formación de los cuerpos apoptóticos, estos cambios pueden ser observados bajo la luz de un microscopio óptico, pero existen otros marcadores moleculares que nos permiten distinguir las células que han entrado en el proceso de apoptosis.

En primer lugar, ocurre una pérdida de la asimetría de la membrana plasmática, esto hace que la fosfatidilserina, un fosfolípido que se encuentra en la cara citosólica de la membrana, pase a formar parte de la cara externa, esta molécula parece ser un importante factor de señalización para la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos. Este proceso ha sido clásicamente estudiado mediante la unión y determinación de la Anexina V, una proteína que se une específicamente a la fosfatidilserina en presencia de calcio, descrito por primera vez en 1994 (Koopman, Reutelingsperger et al. 1994), y es actualmente el marcador más usado para la apoptosis temprana. Para estudiar la apoptosis más tardía se utiliza la determinación del citocromo c liberado por las mitocondrias o la forma activa de las diferentes caspasas, que pueden indicarnos la vía concreta del proceso apoptótico: Caspasa-9 activa para la vía intrínseca, Caspasa-8 activa para la extrínseca y Caspasa-3/7 activa para la vía final (Plenchette, Filomenko et al. 2004).

1.3 Estrés oxidativo

1.3.1 Definición

El estrés oxidativo se define como la alteración del balance entre las especies oxidantes y las anti-oxidantes, en favor de las primeras (Sies 1985). El oxígeno es el último aceptor de electrones en la respiración celular y por tanto un elemento básico para la vida. La formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) es un producto inevitable de las infinitas reacciones que ocurren en una célula, por lo que los seres vivos han desarrollado mecanismos protectores (anti-oxidantes) que disminuyen el daño oxidativo (Slater 1984, Halliwell 1996). El estrés oxidativo aparece cuando existe un exceso de moléculas pro-oxidantes, una deficiencia de las anti-oxidantes, o ambos factores al mismo tiempo.

Los radicales libres son especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados en su capa de valencia, que las convierte en especies con una gran reactividad, se caracterizan por un gran poder oxidante y una vida media muy corta. Estas especies son muy abundantes en los seres vivos y sirven como moléculas de señalización en un gran número de vías moleculares, sin embargo, debido a su alta reactividad, son capaces de dañar estructuras celulares como el ADN, proteínas, carbohidratos o lípidos (Fridovich 1978, Simic and Taylor 1988, Simic, Bergtold et al. 1989).

Los radicales libres son compuestos derivados principalmente del oxígeno (ROS), en la definición de ROS también se contemplan otras moléculas como el H_2O_2 , que pese a no ser estrictamente un radical, generalmente dan lugar a la formación de radicales. Además, también existen otros radicales libres no derivados del oxígeno, que están atrayendo interés en los últimos años, como los derivados del nitrógeno (RNS).

Normalmente las ROS están producidas por los procesos biológicos y vías moleculares propios de las células. Entre estos encontramos la reacción de Fenton-Haber-Weiss, las oxidasas de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, los peroxisomas, los citocromos, las citoquinas, lipooxigenasa, ciclooxigenasa, y la más importante, la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (Figura 4). Además, también existen ROS exógenas que provienen de la dieta, los xenobióticos, el humo del tabaco, la polución o las radiaciones ionizantes (Finkel and Holbrook 2000, Balaban, Nemoto et al. 2005).

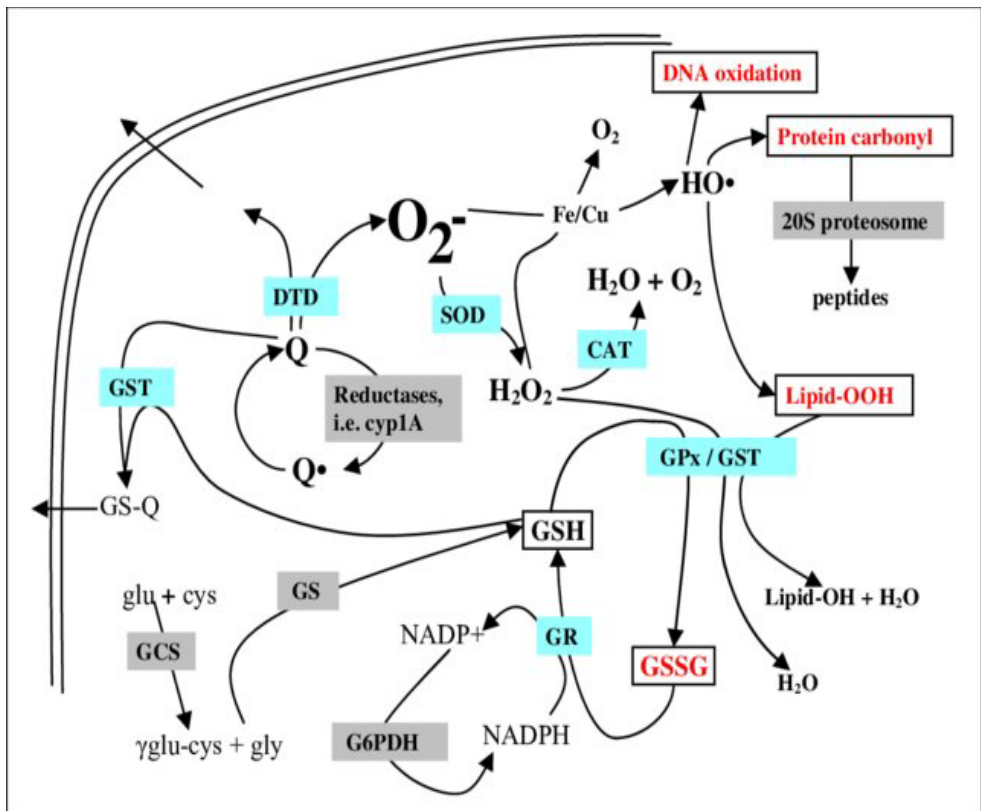


Figura 4: Vías moleculares del estrés oxidativo.

Tomado de (Carney 2008).

1.3.2 Estrés oxidativo y envejecimiento

En 1956, el Dr. Denham Harman formuló la teoría de los radicales libres del envejecimiento, que propone que los radicales libres del oxígeno y el daño que ejercen sobre las macromoléculas son responsables de los cambios que observamos con el envejecimiento. Los organismos más viejos presentan un mayor grado de daño oxidativo y muestran una acumulación de formas oxidadas de proteínas, lípidos y ADN (Harman 1956).

En los años subsiguientes se llevaron a cabo numerosos estudios en varios organismos que parecían indicar que la reducción del estrés oxidativo, o el aumento de la resistencia a él, podían aumentar la longevidad (Miquel and Economos 1979, Harrington and Harley 1988, Phillips, Campbell et al. 1989, Orr and Sohal 1994, Melov, Ravenscroft et al. 2000). Sin embargo, en los últimos años se ha reconsiderado el papel de los radicales libres en el envejecimiento. Los recientes estudios realizados en *C. elegans* y en levaduras mostraron que un aumento de las ROS podría aumentar la longevidad (Van Raamsdonk and Hekimi 2009, Mesquita, Weinberger et al. 2010). En ratones, mutaciones que aumentan las ROS mitocondriales y el daño oxidativo no aceleraban el proceso de envejecimiento (Van Remmen, Ikeno et al. 2003, Zhang, Ikeno et al. 2009), además, algunas manipulaciones que aumentan las defensas antioxidantes no aumentan la longevidad (Pérez, Van Remmen et al. 2009). Paralelamente, el estudio de la señalización intracelular ha evidenciado el papel regulador de las ROS, desencadenando señales de supervivencia y proliferación en las células, en respuesta a señales fisiológicas y de estrés (Sena and Chandel 2012).

Por tanto, tenemos dos corrientes de pensamiento, por una parte, el daño oxidativo aumenta con la edad y podría contribuir al proceso de envejecimiento, sin embargo, es imposible obviar el papel de las ROS como moléculas de señalización. Una de las más recientes perspectivas asume que las ROS juegan un importante papel en mediar

una respuesta de estrés ante el daño causado por el envejecimiento, al aumentar la edad del organismo, las ROS aumentan demasiado y agravan este deterioro (Hekimi, Lapointe et al. 2011).

1.3.3 Daño oxidativo a las biomoléculas

1.3.3.1 Lípidos

Los lípidos, y en concreto los ácidos grasos poliinsaturados, son muy susceptibles al ataque de los radicales libres, en especial los radicales hidroxilo e hidroperoxilo. Este proceso, conocido como peroxidación lipídica, comienza cuando un radical libre contacta con un carbono en la cadena alifática de un ácido graso. Esta reacción se produce generalmente en los carbonos continuos a un doble enlace en los ácidos grasos poliinsaturados, que estabiliza los radicales libres formados. Estos radicales pueden reaccionar con cadenas cercanas de otros ácidos grasos poliinsaturados, tomando un hidrógeno y comenzando la reacción en cadena (Ayala, Muñoz et al. 2014).

El ataque de un radical libre genera varios subproductos, como aldehídos, isoprostanos, 4-hidroxinonenal, etano y pentano. Estos productos también pueden ser una fuente de daño para otras biomoléculas y pueden usarse como marcadores del daño oxidativo, uno de los más usados para determinar la peroxidación lipídica es el malondialdehído (MDA) (Esterbauer and Cheeseman 1990).

1.3.3.2 Proteínas

Los aminoácidos de las proteínas contienen residuos que pueden ser atacados por los radicales libres, el principal es el radical hidroxilo. El daño que provocan los radicales libres en las proteínas puede llevar a cambios en su estructura, que a su vez llevarán a una pérdida o modificación de su función. Estas proteínas son

normalmente recicladas por el proceso de autofagia celular, pero a medida que avanza el envejecimiento estos sistemas de reciclaje funcionan peor y comienzan a acumularse proteínas disfuncionales, que pueden ser perjudiciales para la célula (Berlett and Stadtman 1997).

Algunos aminoácidos como la prolina, lisina y arginina, al ser oxidados por un radical libre, forman grupos carbonilo. La determinación de los grupos carbonilo es un buen indicador de la cantidad de oxidación presente en las proteínas (Stadtman 1992, Fedorova, Bollineni et al. 2014).

1.3.3.3 Ácidos nucleicos

Cuando el ADN sufre un daño oxidativo, se forman una serie de subproductos, uno de los más estudiados es la oxidación de la 2-deoxiguanosina a 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-oxo-dG), este subproducto tiene un gran efecto mutagénico, ya que durante la replicación produce transformaciones en las purinas (Kasai and Nishimura 1984). El daño oxidativo al ADN se encuentra muy correlacionado con el daño al resto de estructuras, ya que por ejemplo la oxidación de enzimas de reparación del ADN amplifica el daño al propio ADN (Breen and Murphy 1995).

El ADN mitocondrial presenta mayores niveles de daño oxidativo que el nuclear (Richter, Park et al. 1988), esto es causado por varios mecanismos que lo hacen más susceptible a este tipo de daño. El ADN mitocondrial no presenta histonas que reciban parte del daño oxidativo, la reparación es menos efectiva, y se encuentra muy cerca de la cadena de transporte de electrones, que produce grandes cantidades de ROS (Giulivi and Davies 1993, Suter and Richter 1999). Otro factor distintivo es que el ADN mitocondrial no presenta intrones, por lo que las modificaciones en las bases tienen generalmente un impacto mayor (Ames, Shigenaga et al. 1993).

1.4 Telómeros

1.4.1 Definición

En los cromosomas eucariotas existen unas secuencias de ADN especializadas que forman los telómeros, palabra que significa “el final de un cromosoma”, y que como este nombre indica, son secuencias de nucleótidos específicas que se encuentran al final de la secuencia génica de un cromosoma. Los telómeros contienen secuencias de nucleótidos repetidas que permiten su replicación efectiva, y junto a las estructuras proteicas que forman el telómero se encargan de proteger el final del cromosoma y evitar que la maquinaria celular lo confunda con una molécula rota de ADN que necesita reparación. La secuencia repetida es similar a lo largo de todas las especies eucariotas, siendo en el humano la secuencia TTAGGG, que se repite miles de veces en cada telómero. Estas secuencias son reconocidas por una serie de proteínas específicas que atraen a la zona de replicación una enzima llamada telomerasa, que se encarga de restaurar estas secuencias cada vez que una célula se divide (Figura 5) (Alberts, Johnson et al. 2002).

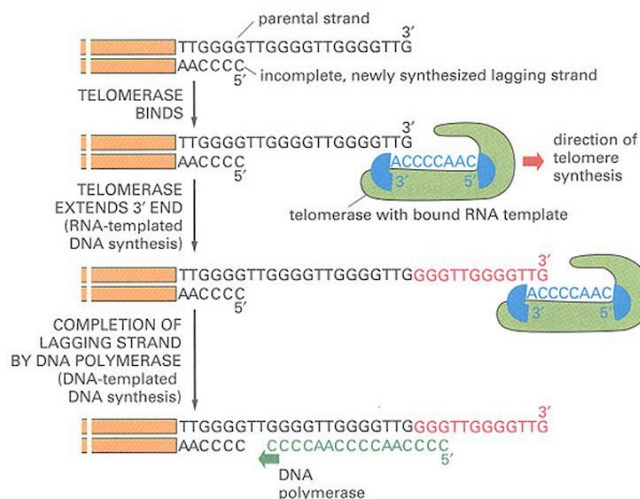


Figura 5: Replicación de los telómeros por la telomerasa.

Tomado de (Alberts, Johnson et al. 2002).

1.4.2 Papel de los telómeros en el envejecimiento

La acumulación de daño al ADN con la edad parece afectar de manera particular a determinadas regiones del genoma como los telómeros. Las ADN polimerasas convencionales no son capaces de replicar completamente el final de la molécula de ADN de un cromosoma, solamente existe una enzima capaz de hacerlo conocida como telomerasa (Blackburn, Greider et al. 2006). La principal causa del acortamiento de los telómeros durante el envejecimiento es que la mayoría de las células somáticas de los mamíferos no expresan la telomerasa, lo que causa un acortamiento progresivo de los telómeros con cada división celular, llevando tras un número de divisiones a una inestabilidad genómica que hace imposible la proliferación, dirigiendo a las células hacia la apoptosis o la senescencia (Blasco 2007). Esto queda ejemplificado en el límite de Hayflick, conocido también como senescencia replicativa (Hayflick 1965), que se observa en las células cultivadas *in vitro*, que presentan una capacidad proliferativa limitada. De hecho, la expresión de la telomerasa en estas células mediante ingeniería genética consigue inmortalizar la línea celular llevando a las células a una proliferación virtualmente infinita (Bodnar, Ouellette et al. 1998).

En los humanos y otros mamíferos se observa un acortamiento de los telómeros en la mayoría de los tejidos a medida que envejecen. Existen enfermedades humanas asociadas a una deficiencia de telomerasa, como la fibrosis pulmonar, la disqueratosis congénita o la anemia aplásica, que tienen como punto en común la pérdida de capacidad regenerativa de estos tejidos (Armanios and Blackburn 2012). En modelos animales genéticamente modificados se demuestra esta importancia de los telómeros en el envejecimiento, ya que los ratones con telómeros más cortos o más largos muestran una menor o mayor longevidad, respectivamente (Blasco, Lee et al. 1997, Herrera, Samper et al. 1999, Tomás-Loba, Flores et al. 2008, Armanios, Alder et al. 2009). Si atendemos a estudios en animales con un envejecimiento fisiológico, se demuestra que la inducción de la expresión de telomerasa consigue

retrasar el envejecimiento sin aumentar la probabilidad de cáncer (Bernardes de Jesus, Vera et al. 2012).

No solo es importante la longitud de los telómeros, sino también la acumulación de daño en esta porción del ADN. En la mayoría de las células, al carecer de la maquinaria necesaria para la reparación de estos extremos, la acumulación de daño genómico durante el envejecimiento en esta zona es mayor. Esto afecta de manera muy llamativa a la capacidad proliferativa y de regeneración de las células que presentan un daño importante al ADN telomérico, incluso con una longitud normal (Fumagalli, Rossiello et al. 2012).

1.5 Epigenética

1.5.1 Definición

La epigenética se trata de un término que engloba todos los mecanismos de regulación de la expresión génica que no dependen de la secuencia de ADN. Estos mecanismos incluyen la metilación, acetilación, fosforilación o ubiquitinación. A través de la modificación del ADN o de la maquinaria reguladora de la expresión génica, como las histonas o la cromatina, las células consiguen regular muy estrechamente qué genes se expresan en cada momento y en qué medida (Alberts, Johnson et al. 2002). No es objetivo de este trabajo analizar exhaustivamente los procesos epigenéticos, pero sí introducir brevemente cómo se afectan durante el envejecimiento.

1.5.2 Alteraciones epigenéticas durante el envejecimiento

Durante el envejecimiento se suceden una serie de cambios a nivel epigenético, como alteraciones en los patrones de metilación del ADN, modificaciones postraduccionales de las histonas y remodelado de la cromatina (Talens, Christensen et al. 2012).

Los patrones de metilación del ADN durante el envejecimiento han sido estudiados en varias especies, observándose en primer lugar una hipometilación global del genoma. Estudios realizados más tarde dejaron claro que existen varios *loci* sujetos a una hipermetilación en el envejecimiento, como por ejemplo *loci* asociados a genes supresores de tumores (Maegawa, Hinkal et al. 2010). Las células provenientes de humanos o ratones con progeria muestran patrones de metilación similares a los encontrados en organismos envejecidos (Osorio, Varela et al. 2010).

En cuanto a los cambios que suceden en las histonas a medida que un organismo envejece encontramos un aumento en la acetilación de la histona H4K16, una mayor metilación de las histonas H3K4 y H4K20, o una menor metilación de la histona H3K9 (Fraga and Esteller 2007). Además, la modificación genética de estas histonas o sus proteínas reguladoras como las deacetilasas aumentan la longevidad en diferentes modelos animales (Greer, Maures et al. 2010, Jin, Li et al. 2011).

A nivel de la cromatina, el envejecimiento causa un cambio en su arquitectura, con una pérdida global de la heterocromatina (Oberdoerffer and Sinclair 2007). Los factores que se encargan del remodelado de la cromatina, como el grupo Polycomb, se encuentran disminuidos en células envejecidas, sugiriendo una pérdida de la plasticidad de la cromatina con el envejecimiento (Pegoraro, Kubben et al. 2009, Pollina and Brunet 2011).

1.5.3 Relojes epigenéticos

Encontrar un buen biomarcador de la edad biológica de una célula, tejido o individuo ha sido una de las grandes metas del estudio del envejecimiento, todavía queda mucho por investigar en este campo, pero probablemente el marcador más robusto de edad biológica en la actualidad sea el reloj epigenético (Horvath and Raj 2018, Mozhui, T. Lu et al. 2021). Existen varios relojes epigenéticos y todos ellos se basan en los patrones de metilación del ADN que suceden con la edad en las diferentes células y tejidos de un organismo. En 2013, Steve Horvath publicó el que sería el primer trabajo que desarrolla un reloj epigenético con una alta correlación entre la edad epigenética y la edad biológica de diferentes células y tejidos (Horvath 2013). Este reloj se basa en un tipo particular de mecanismo epigenético: la metilación de la citosina-5 en las islas CpG. Durante el envejecimiento se da una hipermetilación del genoma principalmente en estas islas. Mediante el análisis epigenético de miles de muestras de diferentes edades obtuvo un patrón de metilación de 353 islas CpG que se correlaciona de manera muy exacta con la edad

de cada tejido, bautizado como el reloj de Horvath. La edad epigenética estimada por este reloj está muy cercana a cero en las células madre embrionarias y en las células madre pluripotentes inducidas, se correlaciona con el número de pases en las células cultivadas *in vitro* y puede medirse en un gran número de tejidos y especies. Es importante destacar que la edad epigenética no se correlaciona con la edad mitótica, ya que esta edad aumenta de manera similar tanto en tejidos con un alto nivel replicativo como en los tejidos post-mitóticos. Tampoco es un marcador de senescencia, ya que la edad epigenética aumenta tanto en líneas celulares inmortalizadas como en células con elevado porcentaje de senescencia. Después de este primer reloj se han desarrollado varios relojes basados en el patrón de metilación del ADN, obteniendo diferentes relojes que utilizan distintas islas CpG (Hannum, Guinney et al. 2013, Weidner, Lin et al. 2014, Galkin, Mamoshina et al. 2021). Todos ellos son unos excelentes marcadores de edad biológica en distintas especies y su uso ha crecido exponencialmente en el campo del envejecimiento, aportando grandes avances en el estudio básico de la biología de este proceso. Otro de sus usos más destacados es como biomarcador de la eficacia de las intervenciones para modular el envejecimiento.

1.6 Regeneración tisular

1.6.1 Células madre

Las células madre son células con la capacidad de dividirse de forma asimétrica, esto quiere decir que pueden dar lugar a una copia de sí mismas y a una célula que comenzará a diferenciarse hacia alguno de los tipos celulares que derivan de esa estirpe en concreto. Las células madre se forman durante la formación del embrión y dan lugar a todos los tejidos del organismo. Parte de estas células quedan en nichos específicos durante la edad adulta, siendo necesarias para la homeostasis. Dentro de los diferentes tejidos existen poblaciones celulares que se encuentran en continua división para mantener la homeostasis del tejido, como por ejemplo en el colon, en la piel o en la médula ósea. Existen otros tejidos como el riñón o el músculo que presentan células en estado quiescente y solamente comienzan a dividirse y repoblar el tejido cuando este ha sufrido un daño. Por último, existen tejidos cuya reparación tras un daño mediante la repoblación de las células que han muerto no es posible, como las neuronas del cerebro o los cardiomiocitos del corazón (Zakrzewski, Dobrzyński et al. 2019).

De acuerdo con su capacidad de diferenciación en distintos tejidos, las células madre pueden dividirse en (Figura 6):

- Totipotentes: Pueden dar lugar a todos los tejidos del organismo, incluyendo a tejidos extraembrionarios como la placenta. La única célula totipotente es el cigoto, que se forma a partir de la unión de un espermatozoide y un óvulo.
- Pluripotentes: Son capaces de formar todos los tejidos de las tres capas germinales, pero no a tejidos extraembrionarios. En este grupo encontramos a las células madre embrionarias, que dan lugar a los tejidos durante la embriogénesis.
- Multipotentes: Pueden dar lugar a tejidos de una capa germinal: mesodermo, endodermo o ectodermo.

- Unipotentes: Solamente pueden dar lugar a un tipo celular determinado. En estos dos últimos grupos encontramos a las células madre adultas, que forman parte de los nichos específicos de cada tejido y se encargan de repoblarlos (Jaenisch and Young 2008).

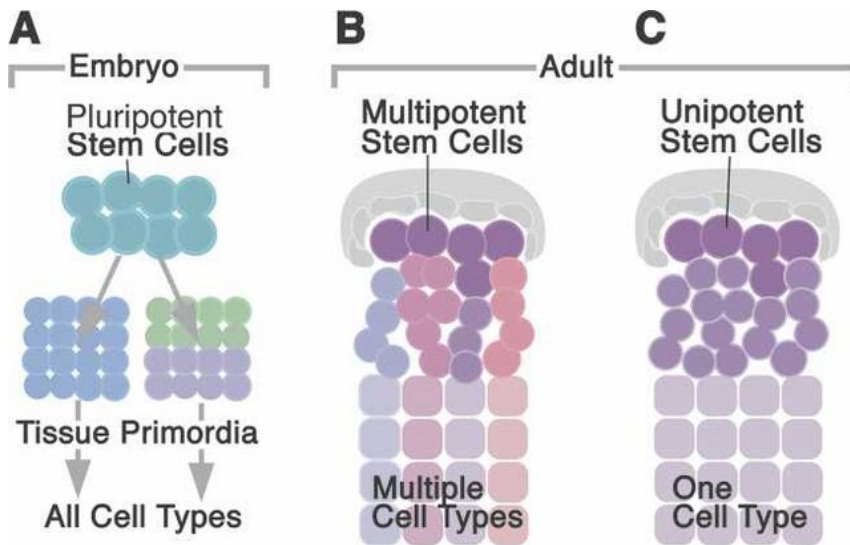


Figura 6: Clasificación de las células madre según su potencia.

Tomado de (Martinez-Agosto, Mikkola et al. 2007)

1.6.1.1 Células madre adultas

Llamamos células madre adultas a las células madre que tras la embriogénesis y formación de los órganos y tejidos quedan en nichos específicos durante toda la vida del organismo. Estas células se encargan de dar lugar a las células maduras que forman un tejido, generalmente estas células madre generan células progenitoras intermedias antes de llegar a las células completamente diferenciadas. Las células madre adultas se dividen en tres grupos atendiendo a la capa germinal de la que se originan: mesodermo, ectodermo y endodermo.

De las tres capas germinales, las células madre mesenquimales son las más estudiadas y las más aplicadas en medicina regenerativa. Fue en 1970 cuando estas células fueron aisladas por primera vez (Friedenstein, Chailakhjan et al. 1970), desde entonces se han conseguido aislar de múltiples tejidos adultos, como la pulpa dental, el periostio, el músculo, el hueso o el tejido adiposo (Nakahara, Goldberg et al. 1991, Bosch, Musgrave et al. 2000, Gronthos, Mankani et al. 2000, Zuk, Zhu et al. 2002, Tuli, Tuli et al. 2003). Estas células pueden diferenciarse hacia múltiples linajes, como el músculo, la grasa, el cartílago o el hueso. De hecho, estas células son capaces de diferenciarse *in vitro* hacia linajes fuera del mesodermo, como células neurales que provienen del ectodermo (Song and Tuan 2004). Una de las principales ventajas de estas células en su uso en medicina regenerativa es que son muy poco inmunogénicas, ya que no presentan algunos péptidos del complejo mayor de histocompatibilidad, lo que hace menos probable su rechazo (Le Blanc, Tammik et al. 2003).

1.6.1.2 Células madre derivadas de tejido adiposo (CMTAs)

Formando parte del tejido adiposo adulto existen un grupo de células madre multipotentes, que son capaces de formar tejidos del mesodermo, como tejido óseo, muscular o adiposo. Estas células fueron identificadas y aisladas por primera vez en 2002, desde entonces las CMTAs se han convertido en una fuente muy usada en medicina regenerativa (Zuk, Zhu et al. 2002). Las CMTAs presentan ventajas respecto a otras células madre mesenquimales provenientes de otros tejidos. Por ejemplo, las CMTAs son sencillas de obtener mediante técnicas poco invasivas, en proporción, la cantidad de células obtenidas es mayor que en el resto de los tejidos, pueden ser diferenciadas a tejidos de las tres capas germinales *in vitro* y presentan escasa inmunogenicidad. Además, estas células liberan al medio extracelular factores tróficos y reguladores con un gran potencial regenerativo (Frese, Dijkman et al. 2016).

1.6.2 Pérdida de la capacidad regenerativa

Una de las características que se hace más patente a medida que un organismo envejece es la pérdida en el potencial regenerativo de los diferentes tejidos. Todos los nichos de células madre que encontramos en un organismo adulto pierden capacidad regenerativa con el envejecimiento, pudiendo realizar un menor número de divisiones y en un tiempo más prolongado (Gruber, Koch et al. 2006, Molofsky, Slutsky et al. 2006, Conboy and Rando 2012, López-Otín, Blasco et al. 2013). A medida que el envejecimiento avanza, las células encargadas de repoblar los tejidos dañados sufren cambios moleculares que dificultan su replicación, como por ejemplo la acumulación de daño al ADN, el acortamiento de los telómeros o la senescencia (Rossi, Bryder et al. 2007).

Pese a que una disminución en la proliferación de las células progenitoras influye de manera negativa en el mantenimiento de la homeostasis del organismo, una replicación excesiva de estas células también puede ser perjudicial ya que acelera el agotamiento de estos nichos. Es importante por tanto mantener la quiescencia en determinados tipos de células madre para evitar su agotamiento, por ejemplo, la proliferación excesiva de las células madre intestinales de *Drosophila melanogaster* conlleva un envejecimiento prematuro (Rera, Bahadorani et al. 2011). En ratones, la inhibición de p21^{Cip/Waf}, proteína encargada de inhibir el ciclo celular, causa un agotamiento precoz de las células madre hematopoyéticas por una proliferación excesiva de éstas (Cheng, Rodrigues et al. 2000). En el músculo, un aumento de la señalización mediada por FGF2 resulta en una pérdida de la quiescencia de las células satélite y su entrada en el ciclo celular, que finalmente termina por reducir el número de estas células y la capacidad de regeneración muscular (Chakkalakal, Jones et al. 2012). De manera análoga, la restricción calórica, que mejora múltiples parámetros relacionados con el envejecimiento, inhibe la proliferación excesiva en los nichos de células madre y mejora la capacidad regenerativa de los organismos envejecidos (Cerletti, Jang et al. 2012, Yilmaz, Katajisto et al. 2012).

Por tanto, existe un equilibrio entre quiescencia y proliferación dentro de los compartimentos celulares que llevan a cabo la tarea de regenerar los tejidos, que debe mantenerse para evitar la pérdida de capacidad regenerativa. Eventualmente, a medida que el organismo envejece, este equilibrio se va perdiendo y las células madre agotándose, tanto por factores celulares intrínsecos como extrínsecos (Villeda, Luo et al. 2011). La deficiencia en la regeneración tisular es por tanto causa y consecuencia del proceso de envejecimiento de un organismo, resultando en la pérdida de función que lo acompaña.

1.7 Comunicación intercelular

1.7.1 Definición

Para que un organismo multicelular funcione correctamente, es necesario que las células que lo forman se comuniquen entre ellas e influyan el comportamiento de las demás, incluso en organismos unicelulares como las bacterias o las levaduras, es necesaria una comunicación entre células vecinas para que la colonia prospere. Existen miles de moléculas que median la señalización entre las células; proteínas, péptidos, aminoácidos, nucleótidos, esteroides, retinoides, ácidos grasos e incluso gases disueltos como el óxido nítrico o el monóxido de carbono. Estas moléculas son liberadas al espacio extracelular mediante exocitosis, por difusión a través de la membrana, a través de uniones entre células o utilizando vesículas extracelulares como vehículo (Alberts, Johnson et al. 2002, Mittelbrunn and Sánchez-Madrid 2012).

Las células diana responden a estas señales extracelulares mediante receptores, que pueden ser de membrana, intracelulares o intranucleares, y se unen específicamente a la molécula de señalización, para después generar una respuesta en la célula mediante una cascada de señales intracelulares que modifican el comportamiento de la célula. Existe un gran número de vías de señalización descritas y todas están basadas en este binomio molécula señalizadora-receptor.

Clásicamente, los diferentes tipos de comunicación intercelular se han clasificado atendiendo a la distancia que existe entre las células emisoras y receptoras, de esta forma encontramos cuatro formas de comunicación intercelular:

- Autocrina: Se trata de la señalización que ocurre cuando la célula emisora y la receptora son la misma célula, de manera que la célula secreta factores al espacio extracelular y al encontrarse con sus propios receptores activan cascadas de señalización intracelular.

- **Paracrina:** Hace referencia a las moléculas señalizadoras que actúan sobre las células que se encuentran en un entorno cercano a la célula emisora, difundiendo a través del espacio y la matriz extracelular. Para conseguir esta actuación local, generalmente los ligandos se degradan por enzimas o son eliminados por las células cercanas.
- **Endocrina:** Cuando las células emisoras y receptoras se encuentran en un punto alejado del organismo, lo llamamos señalización endocrina. Estas moléculas son liberadas desde células endocrinas y generalmente tienen un efecto más duradero en las células diana que el resto de los tipos de comunicación. Las hormonas son las moléculas características de este tipo de comunicación, y según el concepto clásico son las glándulas endocrinas (tiroides, páncreas, hipotálamo, etc.) las que se encargan de liberar estas moléculas. Sin embargo, más recientemente se ha descubierto que la mayoría de los tejidos liberan en mayor o menor medida factores que sirven como señalizadores para tejidos distantes.
- **Yuxtacrina:** Se trata de un tipo de comunicación que ocurre entre células adyacentes, en la cual la molécula señalizadora se mantiene asociada a la membrana plasmática de la célula que envía la señal.

1.7.2 Alteración de la comunicación intercelular en el envejecimiento

Además de las alteraciones intrínsecas a las células, el envejecimiento provoca cambios negativos en la comunicación entre las células. Por ejemplo, existe una desregulación en la señalización neuroendocrina (eje renina-angiotensina, vía de la insulina-IGF1) durante el envejecimiento. A medida que un individuo envejece, las reacciones proinflamatorias se ven incrementadas, la vigilancia inmunológica disminuye, y en general existe un cambio en la composición del entorno extracelular, afectando de manera a la función de los tejidos (Russell and Kahn 2007).

La alteración más estudiada de la comunicación intercelular en el envejecimiento es el llamado “inflammaging”, que hace referencia al fenotipo que acompaña a los individuos durante el envejecimiento, caracterizado por un estado sistémico proinflamatorio (Franceschi, Bonafè et al. 2000). Las causas que llevan a este estado son múltiples, como la acumulación de señales inflamatorias en los tejidos dañados por el proceso de envejecimiento, la incapacidad de un sistema inmune disfuncionante de eliminar los patógenos y las células dañadas, la propensión de las células senescentes de secretar citoquinas y factores proinflamatorios o la pérdida de función de las vías de la autofagia en distintos tipos celulares. Todas estas alteraciones resultan en una activación de varias vías moleculares proinflamatorias, como el inflamasoma, que lleva a una mayor producción de IL-1, IL-6, TNF y distintos interferones. Esta inflamación sistémica está muy relacionada con enfermedades que acompañan al envejecimiento, como la diabetes tipo 2 o la aterosclerosis, y también contribuye a la pérdida de capacidad regenerativa en algunos tejidos como la piel (Franceschi, Bonafè et al. 2000, Franceschi and Campisi 2014).

De forma paralela a este “inflammaging”, el sistema inmune también funciona peor a medida que envejecemos, esta “inmunosenescencia” agrava a su vez el fenotipo del envejecimiento, ya que para el sistema inmune es cada vez más difícil eliminar patógenos, células malignas y premalignas, células infectadas o dañadas y células senescentes (Deeks 2011).

Una de las vías que consistentemente muestra una activación durante el envejecimiento es la de NF- κ B (Adler, Sinha et al. 2007), que se encarga de la transcripción de múltiples factores proinflamatorios. De hecho, al inhibir esta vía en la piel de ratones envejecidos, causa el rejuvenecimiento de este tejido, tanto a nivel fenotípico como molecular. De la misma forma, la inhibición de esta vía en ratones envejecidos prematuramente restaura parte de los signos del envejecimiento (Osorio, Bárcena et al. 2012). Otra de las vías moleculares implicadas en el proceso de la

inflamación es el factor AUF1, que está implicado en la inhibición de la respuesta inflamatoria al degradar el ARN mensajero de diferentes citoquinas. Los ratones que presentan una menor expresión de AUF1 envejecen prematuramente, y al restaurar la expresión de este factor se consigue revertir este fenotipo de envejecimiento acelerado (Pont, Sadri et al. 2012). Como hemos explicado previamente, esta inflamación sistémica se encuentra estrechamente relacionada con la senescencia celular a través del SASP. La acumulación de células senescentes que liberan mediadores pro-inflamatorios contribuye a agravar la inflamación sistémica que caracteriza al envejecimiento (Coppé, Desprez et al. 2010).

Además de la inflamación sistémica que acompaña al envejecimiento, varios estudios muestran que los cambios relacionados con el envejecimiento que ocurren en un tejido son capaces de producir cambios similares en otros tejidos distantes que llevan al deterioro de estos últimos. Por ejemplo, un microambiente envejecido contribuye a la disfunción de los linfocitos T CD4 (Lefebvre, Maue et al. 2012), en la misma línea, la pérdida de función renal que provoca el envejecimiento provoca un aumento del riesgo de presentar enfermedades cardiovasculares (Sarnak, Levey et al. 2003). Por otro lado, las intervenciones sobre distintos procesos del envejecimiento dirigidas a un tejido específico pueden retrasar el envejecimiento en tejidos distantes (Tomás-Loba, Flores et al. 2008, Durieux, Wolff et al. 2011, Lavasani, Robinson et al. 2012).

1.7.2.1 Parabiosis

Una de las estrategias desarrolladas para actuar sobre el deterioro de la comunicación intercelular durante el envejecimiento es la parabiosis, que consiste en la unión anatómica de los vasos de dos animales, de manera que comparten el sistema circulatorio. Los experimentos de parabiosis realizados en la Universidad de Stanford, basados en el trabajo previo de McCay y colaboradores (McCay, Pope et al. 1957), demostraron la importancia de la comunicación intercelular y el

microambiente en el envejecimiento (Conboy, Conboy et al. 2005, Loffredo, Steinhauser et al. 2013). En estos estudios se unían dos ratones singénicos de distinta edad, uno joven y otro viejo, de manera que no se provocaba un rechazo inmunológico. Tras llevar un tiempo unidos, se evidenció una mejoría en varios parámetros asociados al envejecimiento en los ratones viejos que habían sido conectados a ratones jóvenes. Esto sugería la presencia de factores en el plasma de los ratones jóvenes que podían ser beneficiosos para distintas funciones deterioradas en el envejecimiento. De manera paralela, los ratones jóvenes sometidos a este procedimiento mostraban un envejecimiento acelerado (Figura 7).

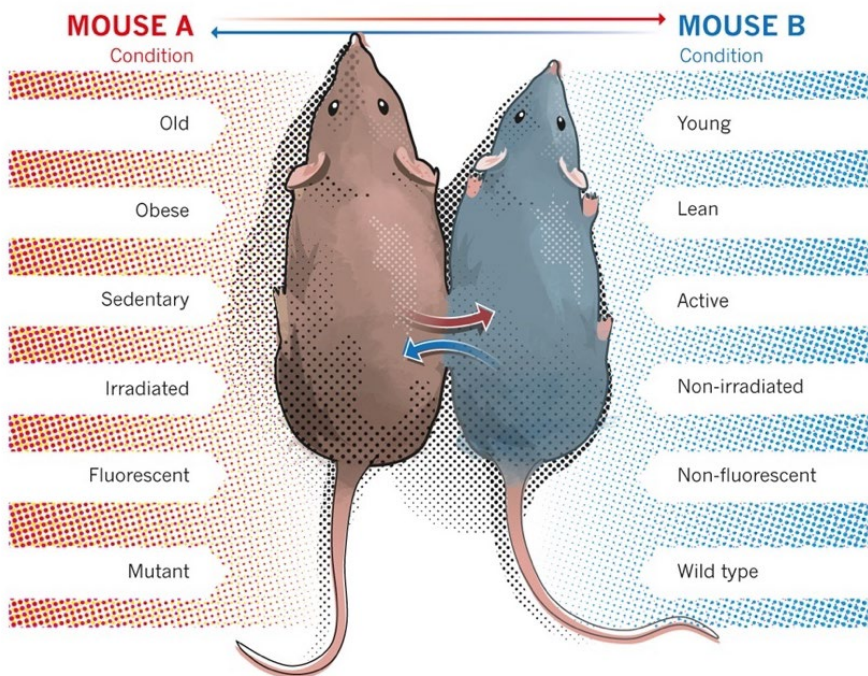


Figura 7: Efecto de la parbiosis en ratones.

Tomado de (Scudellari 2015).

1.8 Vesículas extracelulares

1.8.1 Definición

En las últimas tres décadas se ha comenzado a estudiar en profundidad un nuevo mecanismo de comunicación intercelular basado en la liberación al medio extracelular de vesículas rodeadas de una bicapa lipídica por las diferentes células que componen un organismo. La primera mención a estas vesículas aparece en 1967 cuando Peter Wolf definió como polvo plaquetario el sedimento que se obtenía al ultracentrifugar el plasma libre de plaquetas (Wolf 1967). Más tarde, se describieron los cuerpos apoptóticos, que son vesículas liberadas durante el proceso de apoptosis, capaces de funcionar como partículas señalizadoras para las células del sistema inmune (Hristov, Erl et al. 2004). En los últimos años se ha hecho evidente que prácticamente todas las células, sanas o no, liberan al medio extracelular diferentes tipos de vesículas que median la comunicación intercelular. Los diferentes tipos de vesículas han recibido varias nomenclaturas según su tamaño y célula que las libera: microvesículas, exosomas, ectosomas, endosomas, oncosomas, micropartículas, etc (Raposo and Stoorvogel 2013).

Las vesículas extracelulares sirven como vehículos para la transferencia de distintas moléculas entre las células (proteínas, lípidos, ADN, ARN, microARNs, etc.) y se encuentran implicadas en numerosos procesos fisiológicos y patológicos tales como eliminación de proteínas no deseadas, presentación de antígenos, intercambio genético, respuesta inmune, angiogénesis, inflamación, metástasis tumoral y diseminación de patógenos u oncogenes (Théry, Ostrowski et al. 2009, Zöller 2009, Raposo and Stoorvogel 2013). En concreto, el tejido adiposo ha demostrado ser una fuente importante de vesículas circulantes, que pueden modificar la expresión génica en tejidos lejanos a través de distintos microARNs (Thomou, Mori et al. 2017).

Los tipos de VEs que más se han estudiado son los exosomas y las microvesículas (MVs). Los exosomas son más pequeños, ya que presentan un tamaño de entre 50 y 200nm, se forman en el interior de la célula y se acumulan en los cuerpos multivesiculares (CMVs), más tarde estos exosomas son liberados por la fusión de los CMVs con la membrana plasmática. Por otro lado, las MVs presentan un tamaño mayor, de hasta 1000nm, aunque también se pueden encontrar MVs más pequeñas, llegando a 100nm en alguna ocasión. Las MVs se forman directamente a partir de la membrana plasmática, por lo que teóricamente la membrana de estas VEs presenta la misma composición que la de la célula de origen (Figura 8) (Raposo and Stoorvogel 2013). Esta nomenclatura sin embargo no completamente exacta desde el punto de vista experimental, ya que la mayoría de los métodos de aislamiento de vesículas se basan en el tamaño de estas, lo que no permite diferenciar entre el origen de estas. Más recientemente, desde la ISEV (International Society of Extracellular Vesicles) se ha propuesto una nomenclatura basada en el tamaño de las vesículas: vesículas extracelulares pequeñas (small EVs en inglés) para las VEs que tradicionalmente se nombraban como exosomas (diámetro de hasta 200nm) y vesículas extracelulares grandes (large EVs en inglés) para las que se nombraban como microvesículas (diámetro entre 200-1000nm) (Théry, Witwer et al. 2018). Este límite que define las VEs pequeñas ha ido variando en la última década entre 100 y 200nm.

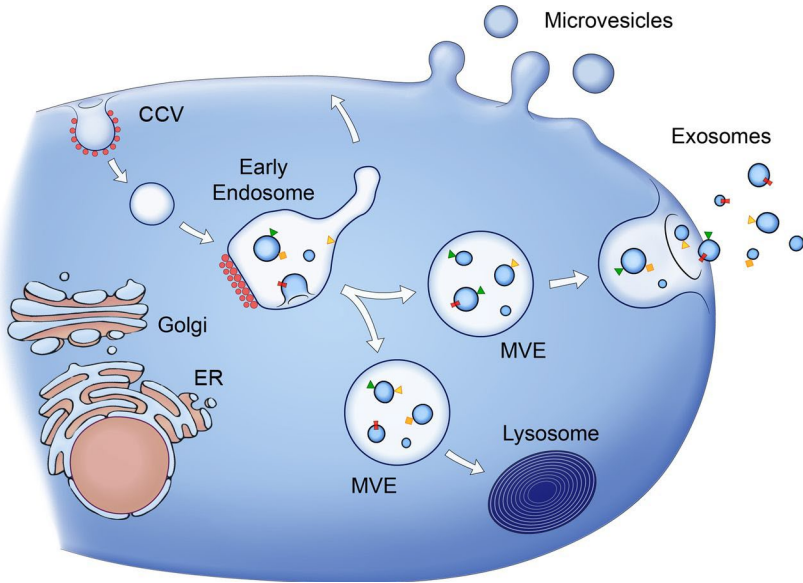


Figura 8: Liberación de distintos tipos de VEs.

Liberación de MVs y exosomas. Las MVs se forman directamente de la membrana plasmática. Los exosomas se forman por invaginación de la membrana de los CMVs, para luego ser excretados al exterior de la célula. Tomado de (Raposo and Stoorvogel 2013).

1.8.2 Aislamiento y caracterización de las VEs

Una de las mayores dificultades que ha tenido el campo de estudio de las VEs es la estandarización de los métodos para aislar y caracterizar estas vesículas. Actualmente el método más usado es la ultracentrifugación diferencial que permite separar las vesículas grandes de las pequeñas. Este método se ha usado en líquidos biológicos como el plasma, LCR, orina o líquido pleural, así como en medio de cultivo celular sin suero (para evitar aislar vesículas del suero exógeno). Se han desarrollado otros métodos como el gradiente de densidad en ultracentrifugación, que permite separar más específicamente las VEs de los agregados proteicos, la filtración diferencial, la citometría de alta resolución, la cromatografía de exclusión

por tamaño o la precipitación con polímeros como el polietilenglicol. Todos estos métodos presentan ventajas e inconvenientes, debido a su pequeño tamaño, es difícil obtener un aislamiento “puro” de VEs, en la mayoría de los métodos de extracción, a medida que se consiguen mayores cantidades de VEs se pierde pureza y al contrario (Théry, Amigorena et al. 2006).

En cuanto a la caracterización de las vesículas los métodos más generalizados son la demostración de la presencia de alguna proteína específica de las VEs, ya sea de membrana o citosólica. Las más usadas son las proteínas de membrana de la familia de las tetraspaninas (CD9, CD63 y CD81), que pueden ser determinadas mediante western blot, citometría de flujo, proteómica o mediante marcaje con oro en microscopía electrónica (Zöller 2009, Théry, Witwer et al. 2018). Otra parte importante de la caracterización es la determinación del tamaño y forma de las VEs, para observar las VEs se necesita un microscopio electrónico, ya sea de transmisión, de barrido o crio-microscopía. En su medio natural las VEs son perfectamente esféricas, pero cuando se realiza una precipitación para observarlas con el microscopio electrónico de transmisión, estas se secan y adquieren una morfología de copa que tradicionalmente se consideró típica de los exosomas (Raposo, Nijman et al. 1996).

Para cuantificar la cantidad de VEs en una muestra y poder realizar experimentos reproducibles se han desarrollado varios métodos. Se puede utilizar el análisis de rastreo de nanopartículas, la citometría de flujo de alta resolución, la cuantificación de proteínas, ARN y lípidos o la cuantificación de moléculas asociadas como la acetilcolinesterasa. Los métodos generalmente más usados son el análisis de nanopartículas, que se basa en el movimiento browniano de las VEs en solución y permite estimar el número de VEs por volumen de muestra, y la cuantificación de proteínas, que, si bien puede sobreestimar la cantidad de vesículas por aislamiento de agregados proteicos, es el método más sencillo de usar ya que no precisa de un equipamiento específico (Théry, Amigorena et al. 2006, Théry, Witwer et al. 2018).

1.8.3 Potencial regenerativo de las VEs

La terapia con células madre ha sido una de las grandes promesas de la medicina regenerativa. Debido a su capacidad de división, las células madre deberían ser capaces de regenerar distintos tejidos tras un daño. Las células madre mesenquimales (CMMs), debido a su fácil aislamiento, cultivo, y a su baja inmunogenicidad, han sido las células más estudiadas para su aplicación en medicina regenerativa. Tradicionalmente, la principal hipótesis era que las células madre podían ser capaces de integrarse en el tejido dañado y regenerarlo a través de la división asimétrica. Sin embargo, recientes estudios han demostrado que las CMMs tienen un potencial de integración limitado, y que generalmente menos del 1% sobrevive más de una semana en el organismo (Müller-Ehmsen, Whittaker et al. 2002, Lee, Pulin et al. 2009, Toma, Wagner et al. 2009, Eggenhofer, Benseler et al. 2012). A pesar de estos hechos, las terapias con CMMs han demostrado ser beneficiosas para multitud de condiciones, así como ser capaces de promover la regeneración de distintos tejidos, sugiriendo que los principales efectos de estas células están mediados por mecanismos paracrinos (Chen, Tredget et al. 2008, Maguire 2013). Por ello, el secretoma de las CMMs ha comenzado a posicionarse como una potencial terapia para la reparación y regeneración tisular.

Las CMMs cultivadas *in vitro* liberan multitud de factores al medio de cultivo. Dentro de estos encontramos las VEs, que pueden aislarse del medio de cultivo y han demostrado ser capaces de mejorar la regeneración de distintos tejidos en estudios *in vitro* e *in vivo* (Tabla 2).

Órgano	Modelo	Efecto de las VEs	Referencia
Riñón	Daño inducido por glicerol (ratón)	Mejora de la función renal, regeneración de las células tubulares, inhibición de la apoptosis	(Bruno, Grange et al. 2009, Bruno, Tapparo et al. 2017)
	Nefrectomía (ratón)	Reducción de la fibrosis y de la atrofia tubular	(He, Wang et al. 2012)
Hígado	Fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono (ratón)	Disminución de la fibrosis y mayor supervivencia de los hepatocitos	(Li, Yan et al. 2013)
	Fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono (ratón)	Disminución del daño oxidativo y la apoptosis a través de la activación de glutatión peroxidasa	(Yan, Jiang et al. 2017)
Corazón	Daño por isquemia-reperfusión (ratón)	Reducción del área de infarto	(Lai, Arslan et al. 2010)
	Infarto agudo de miocardio (ratón y rata)	Reducción del área de infarto, aumento de los niveles de ATP, mejora de la función cardíaca	(Arslan, Lai et al. 2013, Bian, Zhang et al. 2014)
Cerebro	Infarto cerebral (ratón y rata)	Mejor función cognitiva, mayor angiogénesis.	(Xin, Li et al. 2013, Doeppner, Herz et al. 2015)
	Daño cerebral traumático (rata)	Aumento de la neurogénesis y la angiogénesis, reducción de la inflamación	(Zhang, Chopp et al. 2015)

Tabla 2: Efecto regenerativo de las VEs derivadas de CMMs en distintos tejidos.

1.8.4 Vesículas extracelulares y envejecimiento

Dentro del campo del envejecimiento, el papel de los exosomas y otras VEs ha comenzado a estudiarse en los últimos 5 años. Varios estudios *in vitro* han demostrado el efecto de las VEs derivadas de distintos tipos de células madre sobre parámetros relacionados con el envejecimiento, estas VEs han demostrado mejorar la proliferación, reducir la senescencia, la apoptosis, el daño oxidativo o el daño al ADN en distintos modelos celulares (Grigorian-Shamagian, Liu et al. 2017, Chen, Rao et al. 2018, Kulkarni, Bajaj et al. 2018, Oh, Lee et al. 2018, Liu, Mahairaki et al. 2019, Ma, Fu et al. 2019).

A pesar de que el número de estudios *in vivo* es mucho más reducido, éstos indican que las VEs podrían tener efecto sobre el envejecimiento de un organismo. Por ejemplo, las VEs derivadas del suero de ratones jóvenes consiguen revertir la expresión de moléculas asociadas al envejecimiento y reducir la inflamación sistémica cuando son inyectados a ratones envejecidos (Lee, Kim et al. 2018, Wang, Wang et al. 2018). En uno de los estudios pioneros en este campo, Zhang y colaboradores demostraron que las células madre hipotalámicas son capaces de controlar la velocidad de envejecimiento de todo el organismo a través de la liberación de exosomas al líquido cefalorraquídeo (Zhang, Kim et al. 2017). Esto nos indica que las VEs de una pequeña población celular pueden conseguir efectos a nivel sistémico relacionados con el envejecimiento.

2 OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

2.1 Objetivo general

Nuestro principal objetivo es analizar el efecto del tratamiento con VEs obtenidas de CMTAs jóvenes en distintos parámetros relacionados con el envejecimiento en ratones envejecidos.

2.1.1 Objetivos específicos

-Analizar el efecto de las VEs derivadas de CMTAs jóvenes sobre la función física y la fragilidad, la función renal y la regeneración del pelaje de ratones envejecidos.

-Evaluar el efecto de las VEs derivadas de CMTAs jóvenes sobre la estructura del tejido renal y muscular de ratones envejecidos.

-Evaluar el efecto de las VEs derivadas de CMTAs jóvenes sobre los marcadores moleculares asociados al envejecimiento en el tejido renal y muscular de ratones envejecidos.

-Evaluar el efecto de las VEs derivadas de CMTAs jóvenes en un modelo *in vitro* de senescencia celular.

-Estudiar el epigenoma y la edad epigenética del tejido renal, muscular, hepático y esplénico de los ratones viejos tratados con VEs derivadas de CMTAs.

-Analizar el contenido en microARNs de las VEs derivadas de CMTAs jóvenes y compararlo con el de las VEs del plasma de ratones viejos.

2.2 Justificación del estudio

La aparición de una comunicación intercelular alterada es un rasgo propio del envejecimiento, y la actuación sobre este factor es una de las estrategias emergentes en el campo del envejecimiento y sus enfermedades asociadas (López-Otín, Blasco et al. 2013, Conese, Carbone et al. 2017).

Por un lado, la búsqueda de factores que consigan paliar los efectos deletéreos del envejecimiento se ha intensificado desde los primeros experimentos de parabiosis en ratones (McCay, Pope et al. 1957, Conboy, Conboy et al. 2005, Villeda, Luo et al. 2011, Loffredo, Steinhauser et al. 2013, Sinha, Jang et al. 2014). Estos estudios demostraron que existían factores en la sangre de los animales jóvenes que eran beneficiosos en los organismos envejecidos. Desde entonces se han propuesto numerosos factores como posibles causantes de este efecto, no obstante, es difícil pensar que sea un solo factor el que consiga el efecto beneficioso. Dada la reciente demostración del papel de las VEs en la comunicación intercelular (Raposo and Stoorvogel 2013), planteamos que estas VEs sean uno de los factores circulantes más importantes en el efecto de la parabiosis en animales envejecidos.

Por otra parte, las células madre mesenquimales son una terapia emergente en medicina regenerativa, ya que son capaces de mejorar la regeneración tisular (Conboy and Rando 2005). La concepción clásica es que las células madre son capaces de integrarse en un tejido dañado y repoblarlo. Sin embargo, un bajo porcentaje de células madre se mantienen vivas en el receptor durante un largo período de tiempo, además, una gran cantidad de estas células se integra en tejidos distantes (Müller-Ehmsen, Whittaker et al. 2002, Lee, Pulin et al. 2009, Toma, Wagner et al. 2009, Eggenhofer, Benseler et al. 2012). Por tanto, actualmente se cree que estas células madre actúan preferentemente de manera paracrina, liberando factores circulantes que mejoran la capacidad intrínseca de regeneración de los

distintos tejidos (Chen, Tredget et al. 2008, Maguire 2013). Dentro de estos factores se encuentran las VEs, que ya han demostrado ser capaces de mejorar la capacidad regenerativa ante un daño tisular (Bruno, Grange et al. 2009, He, Wang et al. 2012, Collino, Bruno et al. 2015).

Tomando estos dos factores en cuenta, existe un gran interés en el uso de las VEs derivadas de células madre como factores pro-regenerativos. Y dado que una de las claves del envejecimiento es la pérdida de la capacidad de regeneración tisular, planteamos el tratamiento con VEs derivadas de células madre para mejorar distintas funciones deterioradas con el envejecimiento.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo se exponen los materiales junto con los métodos.

3.1 Obtención y caracterización de las células madre mesenquimales y sus VEs

3.1.1 Modelo animal

Los animales utilizados fueron ratones del tipo *wild type* cuya cepa de origen es C57BL/6J. Los animales fueron comprados a los laboratorios Jackson (Estados Unidos), (<http://jaxmice.jax.org/strain/004462.html>) y han sido criados en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universitat de València.

La colonia se mantuvo cruzando ratones *wild type*. Se estabularon machos y hembras por separado, excepto en los casos en que debían estar en cruce para mantenimiento de la colonia. Vivieron con un ciclo circadiano de 12 horas de luz 8:00-20:00 y 12 de oscuridad 20:00-08:00. Los ratones disponían de agua y comida *ad libitum*.

El diseño de los experimentos ha sido presentado y aprobado por el comité de ética de la Universitat de València y por la Conselleria correspondiente, con los códigos A1490612630929 y A1508582840889.

3.1.2 Aislamiento de células madre mesenquimales del tejido adiposo de ratón (CMTAs)

3.1.2.1 Descripción

El cultivo celular se refiere a la obtención de distintos tipos celulares y su mantenimiento en un medio artificial controlado. En este caso se trata de un cultivo celular primario, es decir, que las células han sido obtenidas directamente de un organismo y sembradas en un frasco de cultivo. Las células madre mesenquimales son células que se adhieren a las placas de cultivo, por lo que una vez ocupan toda su superficie es necesario transferirlas a una superficie más grande mediante “pases” sucesivos.

En el presente trabajo nos basamos en el trabajo de Zuk y colaboradores para aislar las células madre (Zuk, Zhu et al. 2001). Para realizar el cultivo primario de células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo se utilizaron ratones jóvenes (3-6 meses).

3.1.2.2 Procedimiento

1. Obtención del tejido adiposo: Los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se procedió a la extracción de los panículos adiposos inguinales en un ambiente estéril a través de la apertura de la pared abdominal con unas tijeras estériles (Figura 9). El tejido adiposo fue recogido en un tubo plástico estéril con PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Biowest #X0515-500), a continuación se procedió a su disgregación y digestión.

2. Disgregación y digestión del tejido:
 - a) El tejido adiposo obtenido se colocó en una placa Petri, se eliminó el PBS sobrante con una pipeta, y con la ayuda de unas tijeras, previamente esterilizadas, se procedió a la disgregación mecánica del tejido.
 - b) Para la digestión enzimática se utilizó una solución de Colagenasa tipo I, que consiste en una solución de PBS con 1% de BSA (Albúmina de suero bovino, Sigma), 0,1% de Colagenasa tipo I (Sigma #C0130-1G) y 2 mM de CaCl₂. Los fragmentos obtenidos se mezclaron con la Colagenasa en un tubo estéril en una proporción 1:1 en volumen y la mezcla fue situada en un baño agitador a 37°C durante 1 hora.

3. Siembra de las células:

- a) Tras la digestión del tejido se realizó una centrifugación a 300g durante 5 minutos a temperatura ambiente, separando los adipocitos (fase flotante) de la fracción estromal vascular (precipitado), que contiene las células madre. Se realizó una agitación del tubo para terminar de separar el tejido y se centrifugó de nuevo a 300g durante 5 minutos.
- b) Con la ayuda de una pipeta se eliminó la fase flotante que contiene los adipocitos y el resto de sobrenadante, se resuspendió el precipitado en medio de cultivo DMEM *High glucose* (Biowest L0104-500) con un 10% de suero bovino fetal (SBF, Invitrogen) y 1% de Penicilina/Estreptomicina (P/S, Gibco).
- c) Se hizo pasar la suspensión por un filtro de nylon de 40µm, eliminando el resto de las células diferenciadas más grandes (adipocitos).
- d) Finalmente, las células provenientes de un ratón se sembraron en un frasco de cultivo T75 (75cm²).

4. Cultivo de las células: El cultivo fue realizado en una cabina de hipoxia (Whitley H35 Hypoxystation) con una atmósfera controlada que contenía un 3% de O₂, 5% de CO₂, y 92% de N₂, con una humedad del 70% y una temperatura de 37°C. El medio usado fue DMEM *High glucose*, suplementado con un 10% de SBF y un 1% de P/S, y se cambió cada 48h, el volumen de medio usado en cada frasco fue de 1mL/5cm². Cuando las células llegaron a un 80-90% de confluencia fueron separadas del frasco de cultivo con tripsina/EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (Biowest #X0930-100) y sembradas en nuevos frascos de cultivo. Se empleó células de pase 2-3 para todos los experimentos de este estudio.

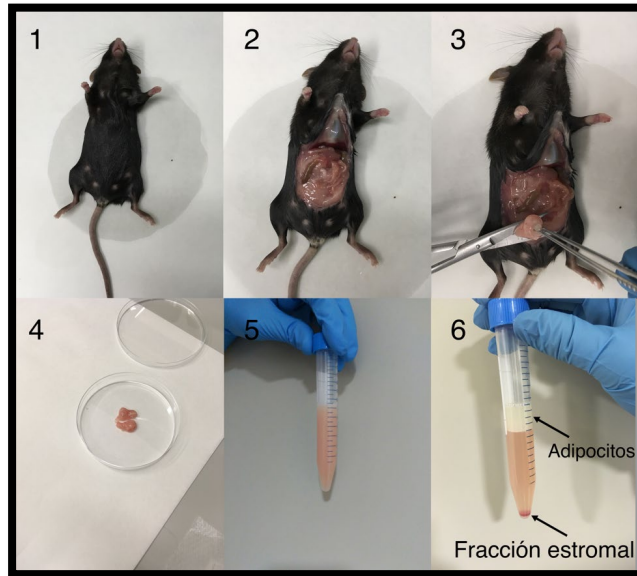


Figura 9: Aislamiento de la fracción estromal del tejido adiposo.

3.1.3 Caracterización de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo por citometría de flujo

3.1.3.1 Descripción

Un citómetro de flujo es un instrumento analítico en el que se hace pasar una suspensión de partículas no agregadas, para permitir su paso a través de las columnas de flujo del instrumento, en este caso las partículas analizadas serán células madre obtenidas de los frascos de cultivo. Típicamente los citómetros de flujo son capaces de medir dos señales ópticas que provienen de una partícula: la dispersión de la luz y la fluorescencia.

1. Dispersión de la luz: Cuando un haz de luz incide sobre una célula, la luz se dispersa como resultado de esta interacción, el citómetro mide dos tipos de dispersión, frontal y lateral. La dispersión frontal se mide a 180° con relación al haz de luz que impacta la célula y se correlaciona con el tamaño celular. La dispersión lateral se mide a 90° con relación al haz de luz que impacta la célula,

y se correlaciona con la granularidad celular y la composición de la membrana celular.

2. Fluorescencia: La fluorescencia ocurre en ciertas moléculas cuando son excitadas por ciertas longitudes de onda y como consecuencia emiten luz con otra longitud de onda. El citómetro es capaz de medir la intensidad de longitudes de onda específicas emitidas por una partícula, además, posee láseres con distintas longitudes de onda que permiten excitar las moléculas presentes en las partículas que fluyen. El poder de la técnica reside en la capacidad de medir numerosas señales de fluorescencia en una partícula.

Los aspectos de una célula que se miden mediante citometría de flujo se denominan parámetros. La dispersión frontal (tamaño) y lateral (granularidad) son intrínsecos a cada célula y pueden medirse directamente en el citómetro, en cambio, para medir la fluorescencia es necesario usar moléculas específicas como por ejemplo anticuerpos unidos a un fluoróforo.

Un citómetro de flujo posee tres sistemas separados que nos permiten obtener datos visualizables. El sistema de flujo permite el transporte de las partículas hacia el punto de análisis donde se encuentra el sistema óptico. El sistema óptico consiste en dos partes: el sistema de iluminación, que permite dirigir la luz y los láseres de distintos colores hacia las partículas, y el sistema de recopilación, que está formado por distintos detectores que captan la luz emitida por las partículas. Por último, el sistema electrónico transforma las señales de los detectores en señales electrónicas y permite hacerlas entendibles e interpretables (Figura 10).

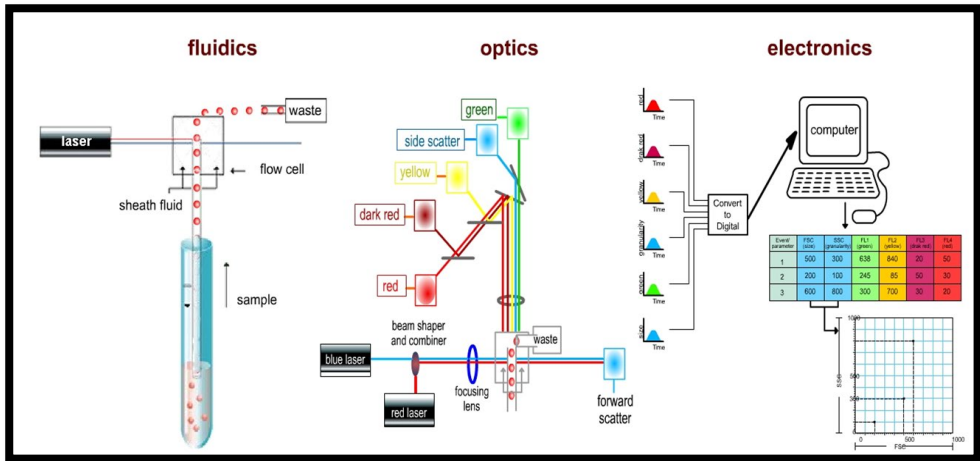


Figura 10: Componentes de un citómetro de flujo.

Los datos obtenidos se presentan en histogramas (x e y) en los que se puede seleccionar qué parámetros se comparan, por ejemplo, dispersión frontal en el eje x y dispersión lateral en el eje y.

En este caso, para la caracterización de las células madre se usaron CMTAs en fase 2-3, al igual que en el resto de los experimentos. En ellas se estudió la expresión de distintos marcadores de superficie generalmente presentes en CMTAs; CD29, CD44, CD90 y CD105, así como otros marcadores que se encuentran en células que podrían contaminar el cultivo como células sanguíneas o endoteliales (CD45 y CD31) (Zuk, Zhu et al. 2002). Para ello usamos anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente a cada marcador de superficie, estos anticuerpos llevan unidas diferentes moléculas que se excitan a una determinada longitud de onda y emiten en otra, conocidos como fluoróforos. Estos fluoróforos poseen un espectro de absorción, que se refiere al rango de longitudes de onda a las cuales puede excitarse, y un espectro de emisión, que se trata del rango de longitudes de onda emitidas.

El citómetro usado fue el FACSAria III (BD Biosciences) y los reactivos usados para la caracterización de las células madre fueron los siguientes:

- a) Anti-CD45 PE: Biolegend #147711.
- b) Anti-CD31 PE: Biolegend #102407.
- c) Anti-CD29 PE/Cy7: Biolegend #102221.
- d) Anti-CD44 Alexa 488: Biolegend #103015.
- e) Anti-CD90.2 FITC: Biolegend #105305.
- f) Anti-CD105 APC: Biolegend #120413.
- g) DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol): Biolegend #422801

En la siguiente tabla se muestran los distintos fluoróforos usados y la longitud de onda que corresponde al pico de excitación y emisión, así como la luz usada para excitarlos y el color que emite cada uno.

Fluoróforo	Excitación	Emisión
PE (phycoerythrin)	546nm (verde)	578nm (amarillo)
PE/Cy7 (phycoerythrin/cyanine7)	546nm (verde)	785nm (infrarrojo)
Alexa 488	495nm (azul)	519nm (verde)
FITC (fluor isothiocianate)	490nm (azul)	525nm (verde)
APC (allophycocyanin)	650nm (rojo)	661nm (rojo)
DAPI	358nm (ultravioleta)	461nm (azul)

Tabla 3: Fluoróforos usados en citometría de flujo.

3.1.3.2 Procedimiento

1. Una vez las células se encontraban a un 100% de confluencia fueron extraídas del frasco de cultivo mediante Tripsina/EDTA y resuspendidas.
2. La suspensión de células fue centrifugada durante 2 minutos a 1000g y resuspendida en 1mL de tampón de citometría (PBS con un 10% de SBF y 1% de azida de sodio).

3. Se contaron las células con un hemocitómetro y se distribuyeron 100.000 células en tubos eppendorf.
4. Se añadió un anticuerpo monoclonal distinto a cada tubo, dejando uno sin anticuerpo que sirvió como control de la autofluorescencia celular. Esto es necesario ya que dependiendo del tipo las células pueden emitir espontáneamente fluorescencia que enmascara la del propio anticuerpo. La concentración final de cada anticuerpo fue de 1µg/mL.
5. Se dejaron incubar durante 30 minutos en oscuridad a 4°C.
6. A continuación, los tubos se incubaron con DAPI (Biolegend #422801) a una concentración final de 3µM. Este fluoróforo penetra la membrana plasmática de las células muertas, permitiendo separar y cuantificar el porcentaje de células muertas en el cultivo.
7. Los tubos se introdujeron en un citómetro para obtener el porcentaje de células positivas para un determinado marcador de superficie.

3.1.4 Aislamiento de VEs derivadas de células madre de tejido adiposo por ultracentrifugación diferencial

3.1.4.1 Descripción

Una ultracentrífuga es esencialmente una centrífuga preparada para generar y soportar grandes fuerzas de rotación, con aceleraciones que llegan a 800.000-1.000.000g. Los métodos de centrifugación diferencial se basan en la separación de las diferentes partículas presentes en una solución en base al coeficiente de sedimentación de cada una de ellas, este coeficiente depende entre otras cosas del tamaño de las partículas. Es de especial interés su uso para la separación de VEs, ya que mediante sucesivas centrifugaciones a distintas velocidades se consigue separar por tamaño las vesículas y obtener un preparado enriquecido en vesículas de un determinado tamaño.

3.1.4.2 Procedimiento

1. Para el aislamiento de VEs del medio de cultivo de las CMTAs se utilizaron células en pase 2-3. Cuando las células alcanzaron un 80% de confluencia se cambió el medio de cultivo a un medio específico que contenía suero deplecionado de VEs (DMEM *High glucose* con 1% P/S y 2% de SBF sin VEs (Gibco #A2720803). Posteriormente, las células se incubaron en ese medio durante 48 horas.
2. Pasadas 48 horas se recogió el medio de cultivo en tubos estériles y se centrifugó a 300g durante 10 minutos a 4°C para sedimentar las células vivas, se recogió el sobrenadante en nuevos tubos.
3. Se realizó una centrifugación a 2.000g durante 10 minutos a 4°C para sedimentar las células muerta y otros restos celulares y se recogió el sobrenadante en nuevos tubos.
4. Se centrifugó a 20.000g durante 30 minutos a 4°C para sedimentar restos celulares, cuerpos apoptóticos y VEs más grandes como las MVs. El sobrenadante se recogió en tubos de ultracentrífuga con tapa para mantener la esterilidad (Beckman Coulter #355530).
5. Se realizó una ultracentrifugación a 100.000g durante 70 minutos a 4°C para que sedimenten las VEs. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se diluyó en 6 mL de PBS estéril.
6. Para eliminar agregados proteicos que suelen sedimentar en la primera ultracentrifugación se realizó una nueva ultracentrifugación de la suspensión de PBS con VEs a 100.000g durante 70 minutos a 4°C.
7. El precipitado resultante se resuspendió en PBS estéril a 4°C o en el tampón requerido para los subsiguientes estudios.

3.1.5 Estudio de las muestras de VEs por citometría de flujo

3.1.5.1 Descripción

Antes de proseguir con los experimentos es necesario asegurarse de que efectivamente se consiguen aislar VEs del medio de cultivo. Para caracterizar los VEs derivados de células madre de tejido adiposo aislados por ultracentrifugación diferencial, realizamos dos técnicas, en primer lugar, una citometría de flujo para determinar la presencia de CD63 en las vesículas aisladas, que se trata una proteína de membrana presente en los VEs. Después se realizó una preparación de estos VEs para visualizar en el microscopio electrónico de transmisión.

En la membrana de los VEs encontramos varias proteínas que pueden servirnos para identificar la presencia de VEs en nuestra muestra, las más usadas son las tetraspaninas, familia de proteínas a la que pertenece CD63. Para demostrar su presencia utilizamos la técnica de citometría de flujo de alta resolución, tiñendo nuestras muestras con anticuerpos monoclonales frente a CD63 unidos a un fluoróforo.

3.1.5.2 Procedimiento

1. Tras el aislamiento de VEs por ultracentrifugación diferencial se resuspendieron en 100 μ L de PBS estéril.
2. Se añadió un anticuerpo monoclonal dirigido a CD63 unido a APC (Biolegend #143905) a cada tubo a una concentración de 4 μ g/mL dejando incubar durante 30 minutos a 4°C en oscuridad.
3. Se usaron dos grupos como control negativo: un grupo con VEs sin anticuerpo y un grupo sin VEs, solamente PBS y el anticuerpo a una concentración de 4 μ g/mL, para estudiar la señal inespecífica del anticuerpo.
4. Una vez en el citómetro, antes de pasar nuestras muestras fue necesario calibrarlo con partículas fluorescentes de tamaño estandarizado (Spherotech Nano Fluorescent Particle Size Standard Kit #NFPPS-52-4K), esto nos

permite asegurar que el citómetro puede distinguir partículas del tamaño de una VEs.

5. Se introdujo cada tubo en el citómetro para comprobar el marcaje con CD63.

3.1.6 Análisis de la preparación de VEs mediante microscopía electrónica de transmisión

3.1.6.1 Descripción

Cualquier microscopio óptico ordinario consta de cuatro partes importantes: una fuente de luz, una muestra que permita el paso de esta luz, las lentes que permiten ampliar la vista de la muestra y la imagen que nosotros vemos. En el caso de un microscopio electrónico, estas cuatro cosas son algo distintas: la luz es sustituida por un haz de electrones; la muestra necesita una preparación específica que permita el paso de los electrones y debe encontrarse en una cámara de vacío, ya que los electrones no viajan bien a través del aire; las lentes se sustituyen por una serie de detectores electromagnéticos que recogen la información del haz de electrones; por último, la imagen se muestra como una fotografía que se forma al llegar el haz de electrones a una pantalla fluorescente en la base del microscopio. Esta descripción se adecúa al funcionamiento de la microscopía electrónica de transmisión (MET), aunque también existen más técnicas de microscopía electrónica, como el microscopio electrónico de barrido, en el cuál las imágenes se forman por la reflexión de los electrones al impactar con la muestra, no la atraviesan, por lo que sirven para estudiar las superficies de las muestras.

Una vez obtenemos la imagen de MET podremos diferenciar las estructuras de las muestras biológicas gracias a una propiedad que conocemos como electrodensidad, que se basa en la capacidad que tienen las distintas moléculas para “atrapar” el haz de electrones, de modo que, si el haz no es capaz de atravesar una estructura, ésta se

mostrará como una figura electrodensa y la veremos en negro. Los VEs se muestran generalmente como estructuras redondeadas con una membrana electrodensa y un contenido heterogéneo.

El microscopio utilizado fue el microscopio electrónico de transmisión de 100kV con cámara digital AMT RX80 (8Mpx) JEM-1010 (JEOL), propiedad del Servicio central de apoyo a la investigación experimental de la Universitat de València.

3.1.6.2 Procedimiento

1. Una vez realizado el aislamiento de VEs por ultracentrifugación diferencial siguiendo el método descrito se suspendió el precipitado que contiene los VEs en 0,5 mL de agar al 0,4% a 37°C.
2. Se realizó una ultracentrifugación a 100.000g durante 70 minutos a 4°C.
3. Se recogió el agar solidificado que contiene los VEs y se fijó en glutaraldeído al 2,5%.
4. Se realizó una tinción de la muestra con acetato de uranilo durante 5 minutos a pH 7.
5. Se realizaron varios cortes de 60 nm de la muestra con un ultramicrotomo.

3.1.7 Determinación de la dosis de VEs para los estudios funcionales

3.1.7.1 Descripción

Debido al reciente auge de los estudios sobre la funcionalidad de las VEs se han desarrollado varias formas de medir la cantidad de vesículas que contiene una muestra, para intentar de alguna forma unificar las dosis usadas y mejorar la reproductibilidad de los estudios. Pese a ello todavía no existe un “gold standard” en este aspecto, tal vez el contaje de vesículas mediante Análisis de Seguimiento de Nanopartículas con instrumental específico sea lo que más información pueda

aportar sobre la concentración de vesículas en una solución. Sin embargo, debido a la imposibilidad de muchos grupos de investigación de contar con uno de estos aparatos, añadido a la necesidad de usar las vesículas lo más rápido posible para evitar la degradación de estas, se suelen utilizar métodos indirectos para determinar la dosis de vesículas, como por ejemplo la determinación de la concentración proteica en la muestra, usando la cantidad de proteínas como una medida indirecta de la cantidad de vesículas.

En el caso del presente estudio, la determinación de la concentración proteica se realizó mediante el método de Lowry (Lowry, Rosenbrough et al. 1951), este método se basa en la reacción de Biuret, en la que los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el cobre en condiciones alcalinas para producir Cu^+ , a esto sigue la reacción de Folin-Ciocalteu, en la cual el reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico) es reducido a azul de molibdeno, mediante la reacción de oxidación catalizada por el cobre de los aminoácidos aromáticos. Esta reacción se traduce en una solución azul oscuro, cuya absorbancia a 660 nm se correlaciona con la cantidad de aminoácidos aromáticos, y por tanto proteínas, en la solución. Este método permite medir concentraciones de proteínas entre 0,01-10 mg/mL.

3.1.7.2 Procedimiento

Método de Lowry:

1. Se preparan las siguientes soluciones:
 - a) Reactivo de Lowry: Se prepara añadiendo 40mL de agua desionizada al polvo de Lowry (Sigma-Aldrich) y mezclando durante 30 minutos, siguiendo las instrucciones del fabricante.
 - b) Reactivo de Folin: Se prepara añadiendo 90mL de agua desionizada a 18mL de Folin-Ciocalteu phenol (Sigma-Aldrich) 2M, siguiendo las instrucciones del fabricante.

- c) Solución estandarizada de BSA: Se pesa una cantidad de BSA y se diluye en agua destilada para preparar una concentración final de 10 mg/mL, posteriormente se realizan diluciones seriadas para obtener una curva estándar con la que comparar las absorbancias obtenidas en las muestras de interés: 0 – 0,01 – 0,1 – 0,5 – 1 – 2,5 – 5 – 10 mg/mL.
2. Tras preparar las soluciones se mezclan 490 μ L de agua destilada y 10 μ L de muestra o de solución de BSA.
 3. Se añaden 500 μ L de reactivo de Lowry, se mezcla bien y se deja incubando 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
 4. Se añaden 250 μ L de reactivo de Folin, se mezcla bien y se deja incubando 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
 5. Se transfiere cada solución a cubetas de espectrofotometría y se mide la absorbancia a 660 nm, siempre usando una muestra sin proteínas como blanco.
 6. La concentración de proteínas fue determinada con el método de Lowry.

Para obtener la concentración de proteínas en cada muestra se hace uso de la ley de Lambert-Beer, que demuestra que la absorbancia (A) de una sustancia es directamente proporcional a su concentración (c), a la longitud que atraviesa la luz (grosor de la solución) y a una constante llamada coeficiente de extinción, que es característica de cada sustancia a una determinada longitud de onda.

$$A = \epsilon \times l \times c$$

Una vez medimos la absorbancia de cada solución de BSA de concentración conocida, tratadas de la misma manera que nuestra muestra de interés, podemos construir una gráfica que muestre la absorbancia de cada solución en función de su concentración, debido a que el método de Lowry sigue la concentración de Lambert-Beer, se obtiene una línea recta que pasa cerca del origen del gráfico. Por último, se

realiza una regresión lineal de la parte recta que permite calcular la concentración de nuestras muestras de interés a partir de su absorbancia.

Determinación de la concentración proteica en muestras de VEs:

1. La muestra de VEs obtenida tras la ultracentrifugación diferencial se suspendió en 105 μ L de PBS estéril a 4°C.
2. Se separaron 5 μ L de la muestra y se mezclaron con 5 μ L de tampón Tris/SDS/glicerol (0,250M Tris, 40% glicerol, 8% SDS), este tampón nos permite romper la membrana de los VEs principalmente gracias al dodecilsulfato sódico (SDS), que se trata de un detergente aniónico.
3. La muestra fue sonicada en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos para terminar de romper las membranas.
4. La concentración de proteínas fue determinada con el método de Lowry.
5. Para poder utilizar la misma dosis entre experimentos se cuantificó la cantidad de proteína que había en los 100 μ L de PBS de cada muestra.

3.2 Estudios *in vivo*

3.2.1 Inyección intravenosa del tratamiento

Todos los animales empleados para los estudios *in vivo* tenían una edad de entre 22 y 24 meses, ya que a esta edad generalmente son considerados animales viejos. La inyección intravenosa del tratamiento se realizó en la vena lateral de la cola con una aguja de 27G a la misma hora en todos los experimentos. La dosis de VEs fue de 20 µg para el grupo tratado y para determinarla se utilizó el procedimiento descrito en el apartado “Determinación de la dosis de VEs para los estudios funcionales”. Todos los animales fueron inyectados con 100 µL, bien de 20 µg de VEs en PBS (grupo tratado) o PBS (grupo control). Los animales recibieron 2 dosis de VEs/PBS, la primera en el día 0 del experimento y la segunda el día 7. Todo el experimento se realizó siguiendo el método de doble ciego, ya que el experimentador no conocía el grupo al que pertenecía cada animal.

3.2.2 Extracción de muestras de plasma

3.2.2.1 Descripción

El plasma hace referencia a la porción líquida de la sangre, donde se encuentran circulando los distintos tipos celulares que la forman. El plasma se obtiene mediante centrifugación de una muestra de sangre, esto permite a las células sedimentar en el fondo del tubo, mientras que el plasma queda como sobrenadante. La diferencia del plasma y el suero es que para obtener el plasma es necesario recoger la sangre en un tubo con anticoagulante, esto impide la formación del coágulo, en cambio, para obtener suero es necesario dejar que la sangre coagule de forma espontánea y después realizar la centrifugación.

3.2.2.2 Procedimiento

1. Con la ayuda de una aguja de 27G de grosor se realizó una pequeña incisión en la vena safena de la pata trasera derecha del ratón.
2. Con la ayuda de una jeringa se recogieron 100 μL de sangre de cada ratón en un eppendorf con 10 μL de EDTA como anticoagulante.
3. La sangre fue centrifugada a 1500g durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante, que corresponde al plasma sanguíneo, con la ayuda de una pipeta con filtro.
5. La recogida de muestras de plasma se realizó siempre a la misma hora por personal experimentado del animalario de la Facultad de Medicina de la UV. Las muestras fueron recogidas en tubos de eppendorf estériles y almacenadas a -80°C hasta su uso.

3.2.3 Estudio de la función física en ratones envejecidos

3.2.3.1 Descripción

La pérdida de capacidad física progresiva con la edad es evidente en los humanos y esto es común a muchos otros animales, en concreto, en los ratones C57BL/6J. A medida que envejecen puede observarse una pérdida de actividad y de capacidad para realizar diversas pruebas físicas (fuerza, coordinación, fatiga, entre otros). Estas pérdidas también ocurren en los humanos, por lo que el ratón se considera un buen modelo para estudiar el descenso en la capacidad física que ocurre con el envejecimiento. Se han desarrollado multitud de pruebas para medir la función física en ratones de laboratorio. Gracias a la amplia experiencia del grupo de investigación en este campo, decidimos determinar parámetros relacionados con la fuerza, la coordinación motora y la resistencia a la fatiga. Existen pruebas cuantitativas estandarizadas que además se correlacionan con el envejecimiento humano,

permitiéndonos así estudiar uno de los parámetros más relacionados con la pérdida de función física: la fragilidad, definición que se aborda en el apartado de Introducción de este trabajo.

3.2.3.2 Procedimiento

Determinación de la fuerza de agarre:

Para estudiar la fuerza usamos la prueba de fuerza de agarre, para ello utilizamos un dinamómetro (Grip Strength Meter, Panlab) adaptado a roedores. Durante el procedimiento el ratón se encontraba suspendido por la cola y se midió la fuerza en gramos de las patas delanteras (Figura 11). El procedimiento usado fue el siguiente:

1. Se pesa el animal en una báscula para normalizar la fuerza al peso.
2. Se sujeta el animal por la cola y se coloca en el dinamómetro permitiendo que se agarre con las patas delanteras, quedando el cuerpo del animal paralelo al suelo.
3. El animal se deja agarrado durante 20 segundos, anotando la fuerza máxima que ha realizado el ratón.

Este procedimiento se realiza 3 veces con cada animal, dejando 10 minutos de descanso entre determinaciones, después se anotó la fuerza máxima de las 3 pruebas.

Para adaptar a los ratones a la prueba se realizó todo el procedimiento sin anotar datos un día antes de la toma de datos para permitir la adaptación de los animales a la prueba.



Figura 11: Prueba de fuerza de agarre.

Determinación de la coordinación motora:

Para el estudio de la coordinación motora de los ratones se usó el equipo Rota Rod (Panlab, Harvard Apparatus #76-0772). El Rota Rod es un aparato formado por una barra de 3 mm de diámetro, separada en 4 espacios para 4 animales, sobre la que se colocan los animales. El aparato gira a una velocidad constante al principio (5 rpm) y cuando comienza la prueba la velocidad va aumentando 1 rpm cada 8 segundos. (Figura 12). El procedimiento usado fue el siguiente:

1. Se posa al animal sobre la barra giratoria, asegurándose de que no se cae. colocando hasta 4 ratones por prueba.
2. Cuando todos están subidos en la barra y llevan al menos 10 segundos sin caerse se da comienzo a la prueba.
3. Cuando el animal cae se anota el tiempo que se ha mantenido arriba y la velocidad que ha alcanzado el aparato en rpm.

Este procedimiento se realizó 3 veces con cada animal, dejando un descanso mínimo de 10 minutos a cada animal. Se realizó todo el procedimiento con todos los ratones

tres veces durante tres días antes de la toma de datos para permitir la adaptación de los animales a la prueba.

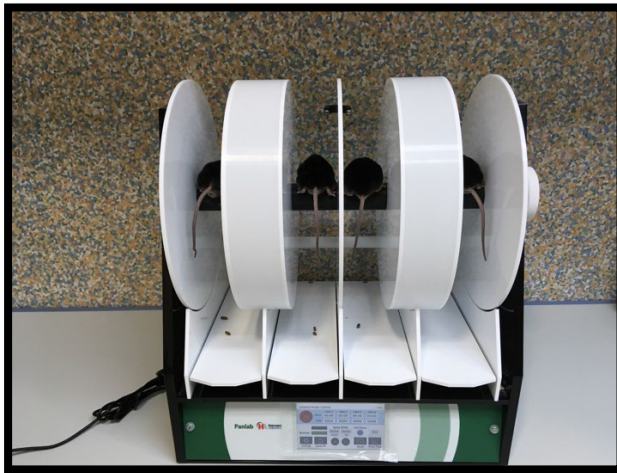


Figura 12: Prueba de coordinación motora.

Determinación de la resistencia a la fatiga:

Para el estudio de la resistencia a la fatiga de los ratones utilizamos el equipo Treadmill Control LE 8710 (Panlab, Harvard Apparatus). Se trata de una cinta giratoria que va modificando la velocidad de movimiento, dividida en 5 carriles de 38x5cm, en los cuales se sitúan los animales. En cada carril hay una zona metálica que da un choque eléctrico cuando el animal lo toca, impidiendo que pueda parar de correr hasta encontrarse exhausto. Se registra la distancia, el tiempo, la velocidad y el número de veces que el animal recibe un choque eléctrico (Figura 13). Para esta prueba usamos el siguiente procedimiento:

1. Durante dos días previos a la prueba es necesario que los animales se adapten al equipo, esto se consigue con una carrera de adaptación de 10 minutos cada día, que consiste en:

- a. 6 minutos a 10cm/s.
 - b. Los siguientes 4 minutos a 14cm/s.
2. El día de la prueba se realiza una carrera con aumento gradual de la velocidad. La prueba termina cuando se considera que ha llegado al máximo de fatiga, que se alcanza cuando el animal recibe 3 choques eléctricos en 5 segundos.
3. Los primeros 4 minutos los animales corren a 10cm/s.
4. A partir de este momento se aumenta la velocidad en 4cm/s cada 2 minutos.

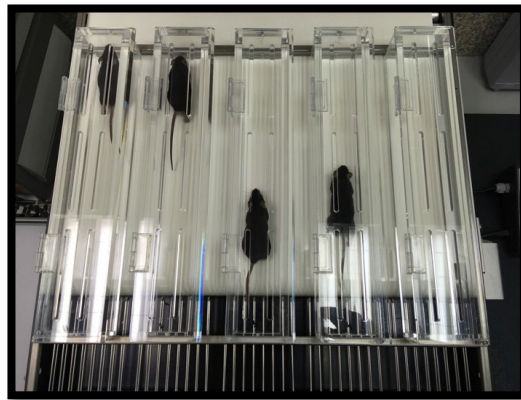


Figura 13: Prueba de resistencia a la fatiga.

Determinación de la fragilidad:

Para cuantificar la fragilidad en los ratones usamos un “score” adaptado a roedores, desarrollado por nuestro grupo de investigación y basado en el fenotipo clínico de fragilidad en humanos (Gomez-Cabrera, Garcia-Valles et al. 2017). Consiste en cinco criterios de fragilidad que se extraen a partir de las pruebas físicas realizadas a los animales y de la pérdida de peso. A partir de 3 criterios se considera un animal frágil, de forma que podemos identificar a los ratones frágiles en distintos puntos temporales. Para el análisis los animales fueron divididos en machos y hembras

debido a la discordancia en las pruebas físicas entre sexos. Los criterios de fragilidad en ratones son:

1. Pérdida de más del 5% de peso de forma espontánea.
2. Fuerza máxima dividida por el peso del ratón en gramos por debajo del percentil 20 de la población estudiada.
3. Tiempo máximo sin caer del Rota Rod en segundos por debajo del percentil 20 de la población estudiada.
4. Velocidad (cm/s) alcanzada en la prueba Treadmill por debajo del percentil 20 de la población estudiada.
5. Tiempo alcanzado en la prueba Treadmill en segundos por debajo del percentil 20 de la población estudiada.

3.2.4 Estudio de la regeneración del pelaje

3.2.4.1 Descripción

El pelaje de los animales se forma a partir de los folículos pilosos presentes en la dermis, que presentan una importante población de células madre que deben proliferar para formar el pelo. Una vez depilado con cera el pelo, el tiempo que tarda en volver a crecer se puede usar como una medida de la capacidad de regeneración de este tejido. Para ello se han desarrollado pruebas que permiten medir esta regeneración, en este estudio se estudió el tiempo que tardaban los animales en regenerar un área de pelaje tras ser depilada.

3.2.4.2 Procedimiento

Para el estudio de la regeneración del pelaje, justo antes de recibir la inyección de VEs, se depiló un cuadrado de 1x1 cm en la zona dorsal a cada animal con la ayuda de cera depilatoria. El día del tratamiento y 14 días después, se realizaron fotografías

digitales a la zona depilada de cada animal (Figura 14). Para el análisis de las fotografías de una manera semicuantitativa, dos investigadores independientes al estudio puntuaron cada fotografía del día 14 con un número del 1 al 4, cada número correspondía a un estadio de regeneración distinto:

1. Regeneración nula (0-25% de pelaje recuperado).
2. Regeneración leve (25-50% de pelaje recuperado).
3. Regeneración moderada (50-75% de pelaje recuperado).
4. Regeneración completa (75-100% de pelaje recuperado).

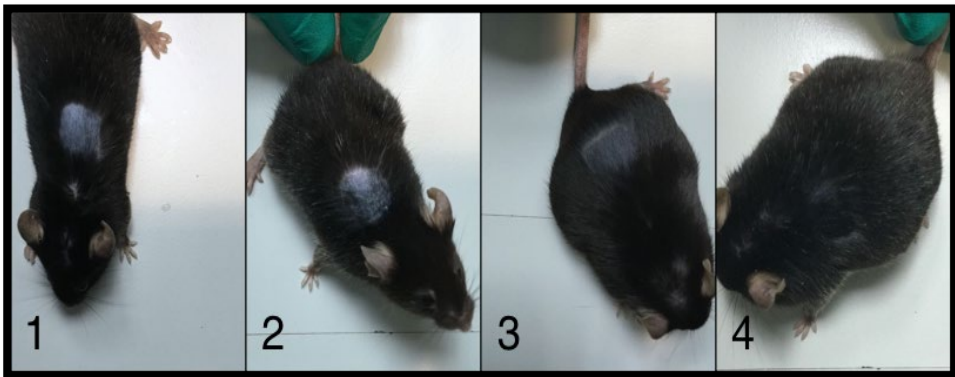


Figura 14: Regeneración del pelaje.

3.2.5 Determinación de la concentración de urea plasmática

3.2.5.1 Descripción

La urea es un producto final del catabolismo proteico en animales, se produce en el hígado de los animales ureotélicos, es decir, que excretan el nitrógeno amínico de los productos nitrogenados (aminoácidos) en forma de urea. Gracias al ciclo de la urea se obtiene urea como producto final a partir de NH_4 , esta urea viaja por el torrente sanguíneo y es filtrada por los riñones, de manera que su concentración

aumenta en el plasma en caso de un descenso del filtrado glomerular. Existen muchas pruebas que permiten medir la concentración de urea en el plasma, por su facilidad de uso las pruebas colorimétricas son las más usadas.

En el presente trabajo usamos el kit comercial QuantiChrom Urea Assay Kit (Gentaur #DIUR-500), este kit se basa en el método de Jung, aunque usando otro cromógeno. El método de Jung consiste en la adición de o-ftalaldehído a la solución de urea, este es capaz de unirse a la urea y formar un complejo que da color a la solución, la medida de la absorbancia a una longitud de onda específica para cada cromógeno permite obtener la concentración de urea en la muestra, siguiendo la ley de Lambert-Beer (explicada en Método de Lowry). En el kit comercial se mide la absorbancia a 520 nm y se compara su medida con una solución estándar de 50 mg/dL de urea, la curva de concentraciones detectables es lineal entre 0,006 mg/dL y 100 mg/dL por lo que es necesario comprobar que las muestras de interés se encuentran en ese rango, en caso contrario sería necesario diluir/concentrar la muestra.

3.2.5.2 Procedimiento

1. Los reactivos del kit deben sacarse de la nevera y dejar que alcancen la temperatura ambiente.
2. Todas las muestras y estándares deben medirse por duplicado.
3. Mezclar el reactivo A y el reactivo B a partes iguales, preparando volumen suficiente según la cantidad de muestras a medir.
4. En una placa plana de 96 pocillos, añadir 5 μ L de agua destilada como blanco, 5 μ L de solución estándar de urea (50 mg/dL) y 5 μ L de cada una de las muestras.
5. Añadir 200 μ L de la mezcla de reactivos A y B a cada pocillo.
6. Dejar incubar 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
7. Medir la absorbancia a 520nm en un espectrofotómetro.

8. La concentración de urea en mg/dL es directamente proporcional a la absorbancia obtenida mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{A(\text{muestra})-A(\text{blanco})}{A(\text{estándar})-A(\text{blanco})} \times 50$$

3.2.6 Sacrificio de los animales

Los animales se sacrificaron entre las 10:00 y 12:00 horas de la mañana del día correspondiente. El método de sacrificio fue la dislocación cervical, sin utilizar ningún fármaco.

Una vez sacrificado el animal, se procedió a la recogida de la mayor cantidad posible de sangre en un tubo con EDTA para la extracción posterior de plasma.

El volumen de sangre recogido se centrifugó a 1500g durante 10 minutos a temperatura ambiente para obtener el plasma. Seguidamente, se congeló en fracciones a -80 °C.

A continuación, se procedió a la apertura del cráneo, para la extracción del cerebro y cerebelo. Posteriormente se abrió la cavidad abdominal para extraer el hígado, bazo y riñones. Después se procedió a la apertura de la cavidad torácica para extraer el corazón, los pulmones y la aorta. Por último, se extrajo el músculo gastrocnemio de la pata trasera derecha. Los órganos se congelaron en nitrógeno líquido a -189 °C para su posterior conservación en un congelador a -80 °C. Un lóbulo hepático, el músculo gastrocnemio izquierdo, un hemisferio cerebral y un riñón se guardaron en tubos con 4% de paraformaldeído (PFA, 48 horas después se guardaron en una solución de 30% de sacarosa para su posterior análisis histológico.

3.2.7 Estudio histológico del músculo y riñón de ratones envejecidos

3.2.7.1 Descripción

El estudio anatómico de los diferentes órganos y tejidos que componen un organismo consta de dos partes: la anatomía macroscópica, que involucra las estructuras que podemos ver a simple vista y la histología, que es la ciencia que estudia las estructuras microscópicas que solamente podemos ver bajo un microscopio. La histología nace como una disciplina de propio derecho alrededor de mitad del siglo XIV, dentro de la biología y la medicina, aunque el estudio de los tejidos con gafas de aumento se remonta a Marcello Malpighi (1628-1694), del que podríamos decir que fue el fundador de la anatomía microscópica. Malpighi describió la presencia de pequeños “sacos” en los pulmones, que hoy conocemos como alvéolos.

Para realizar un estudio histológico se necesitan dos cosas: una muestra y un microscopio. La muestra debe tener el grosor necesario para dejar pasar la luz y el microscopio la suficiente resolución y aumento para permitir observar la estructura deseada. Los pasos básicos para la preparación de la muestra consisten en la fijación del tejido, corte, montaje y tinción, desde que comenzó el desarrollo de la disciplina han ido apareciendo numerosos instrumentos, tintes y microscopios cada vez más potentes que han permitido estudiar la práctica totalidad de los tejidos de un gran número de seres vivos, aunque siempre quedan nuevas cosas por descubrir.

Por tanto, antes de poder teñir la muestra son necesarios tres pasos para obtener un corte de tejido apropiado:

1. Fijación del tejido:

Para conseguir la fijación del tejido se utilizan dos métodos dependiendo de la naturaleza del fijador: físicos y químicos. Los fijadores físicos se basan en una congelación muy rápida del tejido o bien en la aplicación de un calor muy

elevado, esta última no se suele utilizar en histología, puesto que tiene un efecto muy destructor sobre la estructura tisular. Existen multitud de agentes químicos que son utilizados para fijar el tejido, la fijación tiene por objetivo conservar la estructura del tejido y evitar su degradación, inhibiendo la autólisis celular, provocada principalmente por las enzimas contenidas en los lisosomas. Estos se pueden clasificar en agentes coagulantes/deshidratantes y en aquellos que establecen enlaces cruzados.

- a) Agentes coagulantes/deshidratantes: son el etanol, metanol o la acetona, que consiguen fijar el tejido por deshidratación y coagulación de las proteínas, el principal problema que presentan es la inducción de retracción en el tejido y la mala preservación de los lípidos.
- b) Agentes que establecen enlaces cruzados: en este grupo encontramos el fijador más usado, el formaldehído, que provoca la formación de puentes entre los grupos amino (NH_2) de las proteínas, intercalando las moléculas aldehídicas. Puede usarse en forma de paraformaldehído, que es esencialmente formaldehído polimerizado. La principal ventaja es que produce poca retracción tisular y es compatible con la mayoría de tinciones, conservando adecuadamente proteínas, lípidos y carbohidratos. También se encuentra en este grupo el glutaraldehído, otro de los fijadores más usados, presenta una capacidad de fijación mayor que el formaldehído, ya que contiene dos grupos aldehído, por ello se usa en microscopía electrónica para observar la ultraestructura del tejido. La principal desventaja es que tiene una velocidad de penetración mucho más lenta que el formaldehído al ser una molécula más grande.

2. Corte del tejido:

Además de preservar la muestra, el fijador también consigue la turgencia necesaria para que el tejido pueda ser cortado a un grosor que permita el paso de la luz para observarlo al microscopio. El corte del tejido se consigue con un microtomo, se trata de un instrumento de corte que consta de una cuchilla, que puede ser de distintos materiales según lo que se vaya a cortar, y un mecanismo de engranajes que permiten ajustar el grosor de corte. El grosor de las secciones usadas en histología convencional generalmente se encuentra entre 2 y 50 μm . En caso de que el tejido sea fijado mediante congelación puede usarse un criotomo/criostato (SLEE MNT), que esencialmente es un micrótopo que permite mantener el tejido y la cuchilla a una temperatura específica, que varía dependiendo del tejido a cortar, generalmente entre -20 y -25°C .

3. Montaje de las secciones:

Una vez se ha obtenido una sección del grosor deseado, esta puede colocarse en un portaobjetos para su posterior tinción, los portaobjetos generalmente están fabricados con vidrio y existen múltiples agentes adherentes que facilitan la unión de la muestra al vidrio, como la gelatina o la albúmina, también existen portaobjetos ya tratados que presentan una carga positiva en su superficie y mejoran la adherencia del tejido. En ocasiones, cuando las secciones son teñidas mientras flotan en una solución, el montaje es posterior a la tinción.

Cada tipo de tinción necesita de un protocolo específico para poder visualizar adecuadamente la muestra de interés, en este trabajo se usaron dos tinciones histológicas distintas en secciones obtenidas de músculo y riñón: hematoxilina/eosina y Sirius red. La tinción hematoxilina/eosina se trata de la tinción más utilizada en histología, contiene dos colorantes distintos que le dan el nombre. La hematoxilina posee un color morado y es un colorante catiónico (electropositivo),

por lo que tiene afinidad por las estructuras ácidas, como el núcleo celular (por su contenido en ácidos nucleicos). Para teñir necesita un metal que actúa como mordiente, además, la hematoxilina debe estar en su forma oxidada (hemateína) para poder teñir el tejido. La eosina se muestra con un color rosado y se trata de un colorante hidrófobo y aniónico (electronegativo) por lo que se unirá a las estructuras cargadas positivamente, principalmente marcando el citoplasma. La tinción Sirius red consiste en un colorante ácido que se une con cierta afinidad a las moléculas de aminoácidos básicos presentes en las fibras de colágeno, coloreándolas de un color rojo que muestra birrefringencia en un microscopio con luz polarizada.

3.2.7.2 Procedimiento

Una vez sacrificado el ratón, se extrajeron los riñones y gastrocnemios y fueron sumergidos en PFA 4% (preparado en PBS) durante 48 horas, pasado ese tiempo se guardaron en una solución de sacarosa al 30% (preparada en PBS) para criopreservarlos. Más tarde fueron trasladados al Servicio central de apoyo a la investigación experimental de la Universitat de València donde fueron congelados a -80°C . Con la ayuda de un criostato (SLEE MNT) se realizaron múltiples secciones de los tejidos con un grosor de $10\ \mu\text{m}$ y fueron montadas en portaobjetos gelatinizados.

Tinción Hematoxilina/eosina:

1. Las secciones fueron sumergidas en agua destilada durante 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Se introdujeron en medio de tinción con hematoxilina de Mayer $1\ \text{g/L}$ (Sigma MHS32) durante 10 minutos.
3. Se realizó un paso de diferenciación, destiñendo progresivamente las secciones con agua corriente.
4. Se lavaron dos veces con agua destilada durante 1 minuto.

5. Las secciones se tiñeron con eosina (Sigma E4009) al 0,2% en agua destilada durante 1 minuto.
6. Se realizó un paso de diferenciación, calentando las muestras a 70°C.
7. Se realizó un lavado de 20 segundos en etanol 96°.
8. Se lavaron las secciones durante 3 minutos en etanol 100°.
9. Se aplicaron unas gotas de medio de montaje y las secciones se cubrieron con un cubreobjetos, se usó laca de uñas para sellar los portaobjetos.

Tinción Sirius red:

1. Las secciones fueron sumergidas en agua destilada durante 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Se introdujeron en medio de tinción con Sirius red (Sigma, 365548) durante 1 hora.
3. Se realizó un paso de diferenciación, destiñendo progresivamente las secciones con agua corriente.
4. Se lavaron dos veces con agua destilada durante 1 minuto.
5. Se realizó un lavado de 20 segundos en etanol 96°.
6. Se lavaron las secciones durante 3 minutos en etanol 100°.
7. Se aplicaron unas gotas de medio de montaje y las secciones se cubrieron con un cubreobjetos, se usó laca de uñas para sellar los portaobjetos.

Análisis morfométrico:

Para el análisis de la estructura de los tejidos se obtuvieron 3 imágenes de cada sección del riñón y del músculo. El análisis de imagen se realizó con el programa ImageJ V1.49u. Cada imagen se ajustó siguiendo la siguiente escala: 40 aumentos = 0,623 $\mu\text{m}/\text{píxel}$; 100 aumentos = 1,5633 $\mu\text{m}/\text{píxel}$; 200 aumentos = 3,1266 $\mu\text{m}/\text{píxel}$.

1. Riñón:

Se obtuvieron imágenes de la corteza renal en las secciones teñidas con Hematoxilina/eosina y se determinó la densidad glomerular, densidad y la dilatación tubulares. En las secciones teñidas con Sirius red se determinó el porcentaje de área teñida.

- a) Densidad glomerular: se obtuvo una imagen a 40 aumentos de cada ratón, se dibujó un cuadrado de 1 mm de lado (área 1 mm²) en 2 partes de la imagen (superiores e inferior) y manualmente se registró el número de glomérulos por cuadrado.
- b) Densidad tubular: se obtuvieron 3 imágenes a 100 aumentos de cada ratón, se dibujó un cuadrado de 200 μm de lado (área 0,4 mm²) en 5 partes de la imagen (esquinas superiores e inferiores y centro) y manualmente se registró el número de túbulos por cuadrado.
- c) Dilatación tubular: para el cálculo de la dilatación tubular se obtuvieron 3 imágenes a 100 aumentos de cada ratón y se midió el diámetro en μm de 30 túbulos por imagen.
- d) Porcentaje de área teñida con Sirius red: se obtuvieron 3 imágenes a 200 aumentos de cada ratón con luz polarizada, posteriormente, con el programa ImageJ se ajustó el umbral en rojo y se calculó el porcentaje de área teñida comparada con el área total de la imagen.

2. Músculo:

Las imágenes se obtuvieron de las secciones transversales de la parte media del gastrocnemio teñidas con Hematoxilina/eosina y se determinó el área media de las fibras musculares (área de sección transversal).

- a) Área de sección transversal: se obtuvieron 3 imágenes a 100 aumentos de cada ratón, con la ayuda de la herramienta “varita” del programa ImageJ se midió el área de cada fibra individualmente, midiendo 50 fibras por imagen.

3.2.8 Estudio de la presencia de proteínas específicas mediante inmunofluorescencia

3.2.8.1 Descripción

Dentro del estudio de la histología encontramos numerosas subespecialidades que se han ido desarrollando conforme han aparecido nuevos avances tecnológicos. La histología convencional nos permite visualizar la estructura de los tejidos, pero si queremos estudiar la presencia y distribución de macromoléculas que no son distinguibles con un microscopio común debemos servirnos de diferentes técnicas como la inmunofluorescencia. Esta técnica se basa en la detección de proteínas específicas mediante anticuerpos dirigidos, estos anticuerpos van unidos a un fluoróforo que absorbe y emite luz a una determinada longitud de onda, de la misma manera que en la citometría de flujo, técnica explicada anteriormente. De hecho, la mayoría de fluoróforos pueden ser usados en ambas técnicas. Esto permite, no solo demostrar la presencia de la proteína de interés en la muestra, si no estudiar su distribución a lo largo del tejido y la cantidad relativa. La técnica nació en 1942 de la mano del Dr. Albert Coons, que junto a sus colaboradores demostraron la

presencia de antígenos neumocócicos en diferentes tejidos, haciendo uso de un anticuerpo marcado con fluoresceína (Albert H. Coons 1942).

Para realizar la técnica debemos realizar los mismos pasos explicados para la histología convencional, solo que se sustituye la parte de tinción por la de incubación con un anticuerpo específico, además, si la proteína de interés se encuentra normalmente en el interior celular, será necesario permeabilizar previamente la muestra con un detergente para permitir el paso del anticuerpo, ya que se trata de una molécula relativamente grande. Los anticuerpos dirigidos contra una proteína (primario) pueden tener unidos directamente un fluoróforo (inmunofluorescencia directa) o no llevarlo, en este último caso, es necesario el uso de otro anticuerpo al que llamaremos secundario, que va dirigido al anticuerpo primario y tiene unido un fluoróforo (inmunofluorescencia indirecta). Los anticuerpos secundarios van dirigidos a la especie donde se ha generado el primario, por lo que si se quiere realizar un doble marcaje (estudiar dos proteínas distintas en la misma sección), es necesario que los anticuerpos primarios provengan de especies distintas y cada uno de los secundarios lleve unido un fluoróforo que emita luz en una longitud de onda distinta.

Una vez se tienen las secciones de tejido con los anticuerpos unidos, es necesario un microscopio de fluorescencia para poder observarlas, se trata de un tipo especial de microscopio cuyo sistema óptico permite excitar los fluoróforos y observar determinadas longitudes de onda. Posee un sistema de iluminación con una lámpara que emite luz de una alta intensidad, estas lámparas pueden ser de varios materiales, siendo las de mercurio las más frecuentemente usadas. Esta luz pasa a través de unos filtros que solo permiten el paso de un determinado rango de longitudes de onda (filtro de excitación), que se deben seleccionar según el fluoróforo que se use, de esta manera se consigue excitar el fluoróforo y que emita luz en otra longitud de onda. Para poder observar la muestra es necesario un filtro de emisión, que solo dejará pasar la luz en un rango de longitudes de onda donde emite el fluoróforo

usado, así se consigue visualizar el marcaje a través del microscopio. De igual forma que en la citometría de flujo, los tejidos emitirán fluorescencia de fondo que debe ser considerada a la hora de analizar las imágenes.

Una de las mejoras introducidas en la microscopía de fluorescencia es el desarrollo del microscopio confocal, se trata de un microscopio de fluorescencia que permite reconstruir imágenes en 3D y mejorar el contraste. Este tipo de microscopio posee un colimador espacial “pinhole”, esto es básicamente un diafragma que permite captar solamente la luz proveniente del plano focal de la muestra que se está observando. En un microscopio de fluorescencia convencional se ilumina y se recibe la luz de toda la muestra, esté enfocada o no, lo que hace perder nitidez a la imagen, mientras que en el confocal se selecciona solamente la luz proveniente del plano focal. Además, el microscopio confocal se acompaña de una computadora y normalmente cuenta con varios láseres, lo que permite visualizar en tiempo real imágenes con varias longitudes de onda.

El microscopio usado fue el FLUOVIEW FV1000 (Olympus), propiedad del Servicio central de apoyo a la investigación experimental de la Universitat de València, y los reactivos, diluciones y anticuerpos usados fueron los siguientes:

- a) Rabbit Anti-Ki67 1:1000: ThermoFisher #PA5-19462
- b) Rabbit Anti-Laminin 1:1000: ThermoFisher #PA1-16730
- c) Rabbit Anti-Lamin B1 (LMNB1) 1:100: Proteintech #12987-1-AP
- d) Alexa 647 Goat Anti-Rabbit 1:1000: Abcam #ab150079
- e) Alexa 488 Goat Anti-Rabbit 1:1000: Abcam #ab150077
- f) Hoechst 33342 1:1000: Invitrogen #H3570

En la siguiente tabla (Tabla 4) se muestran los distintos fluoróforos usados y la longitud de onda que corresponde al pico de excitación y emisión, así como la luz usada para excitarlos y el color que emite cada uno.

Fluoróforo	Excitación	Emisión
Alexa 488	495nm (azul)	519nm (verde)
Alexa 647	650nm (rojo)	665nm (rojo)
Hoechst	350nm (ultravioleta)	461nm (azul)

Tabla 4: Fluoróforos usados en inmunofluorescencia.

3.2.8.2 Procedimiento

Las secciones se obtuvieron de la misma forma que la expuesta en el punto anterior (estudio histológico). Una vez montadas en los portaobjetos, se procedió con el marcaje.

1. Las secciones se sumergieron durante 30 minutos a 95°C en tampón Tris-EDTA (Tris 10mM, EDTA 1mM, Tween 0,05%, pH 9) para realizar un desenmascaramiento de los antígenos. Según el método de fijación y la proteína que se quiera estudiar es necesario realizar este desenmascaramiento, en los tejidos fijados con aldehídos es necesario realizarlo para muchas proteínas, ya que, al establecer los puentes cruzados entre moléculas, los antígenos pierden su conformación nativa, haciendo más difícil la unión del anticuerpo.
2. Se dejaron enfriar las muestras durante 1 hora a temperatura ambiente.
3. Las secciones fueron sometidas a una permeabilización de las membranas celulares, se usó un determinado detergente dependiendo de donde se encuentre el antígeno de interés, siempre incubando las muestras a temperatura ambiente:
 - a) Proteína nuclear (Ki67): 0,1% Tritón X-100 durante 10 minutos.

- b) Proteína citoplasmática: 0,1% Tritón X-100 durante 10 minutos.
 - c) Proteína en membrana (LMNB1): 0,1% Tween durante 10 minutos (el Tritón X-100 rompe las membranas).
 - d) Proteína extracelular (Laminina): No es necesario permeabilizar, aunque se realizó un lavado con 0,1% Tween durante 10 minutos.
4. Se pintó el exterior de los portaobjetos con un bolígrafo hidrofóbico, esto permite gastar menos reactivos para cubrir las secciones (300 μ L por portaobjetos).
 5. Se añadió una solución de bloqueo a las secciones compuesta por 0,1% Tween en PBS con un 10% de suero de cabra y se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. La solución de bloqueo permite reducir la unión inespecífica de los anticuerpos a otras proteínas del tejido que no son la de interés. Lo ideal es usar el suero de la especie donde se han generado los anticuerpos secundarios que van a usarse, ya que este suero contiene anticuerpos que se unirán a sitios de unión no específicos.
 6. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C, el anticuerpo fue diluido en la misma solución de bloqueo (0,1% Tween en PBS con un 10% de suero de cabra).
 7. Se realizaron 3 lavados simple en cubeta con 0,1% Tween en PBS.
 8. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad, el anticuerpo fue diluido en la misma solución de bloqueo.
 9. Se realizaron 3 lavados simples en cubeta con 0,1% Tween en PBS.
 10. Las secciones fueron incubadas con Hoechst diluido 1:1000 en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente. El Hoechst es un fluoróforo que se une al ADN, permitiendo distinguir los núcleos en las preparaciones.
 11. Se realizaron 3 lavados simples en cubeta con PBS.
 12. Se secaron las secciones por decantación y se colocaron dos gotas de medio de montaje acuoso (Dako) justo antes de colocar el cubreobjetos.
 13. Finalmente se sellaron las preparaciones con laca de uñas.

3.2.9 Determinación de malondialdehído mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

3.2.9.1 Descripción

La cromatografía es una técnica que se basa en la separación de los distintos componentes que forman una solución, lo que permite su identificación, así como determinar la cantidad del analito a estudio. Dentro de este campo encontramos varios tipos de cromatografía: en papel, en capa fina, de líquidos o de gases. En el presente trabajo se utilizó la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés), que es la técnica de cromatografía más usada en la actualidad. La HPLC se basa en el paso de una fase móvil, que incluye la muestra a analizar, a través de una columna que contiene la fase estacionaria. Al pasar a través de la columna el analito que desea analizarse interacciona con la fase estacionaria, de modo que el tiempo que tarda en eluirse de la columna es característico de cada compuesto y se denomina tiempo de retención. Para cuantificar la cantidad de analito que contiene una muestra, el instrumento de HPLC se acompaña normalmente de un espectrofotómetro, al que se envía la fracción del compuesto eluido. Esto permite medir la absorbancia de cada muestra, para luego extrapolarla a una curva patrón de concentraciones de analito conocidas, de manera similar al método de Lowry.

Los componentes de un sistema de cromatografía tipo HPLC se muestran en el diagrama de la siguiente figura (Figura 15).

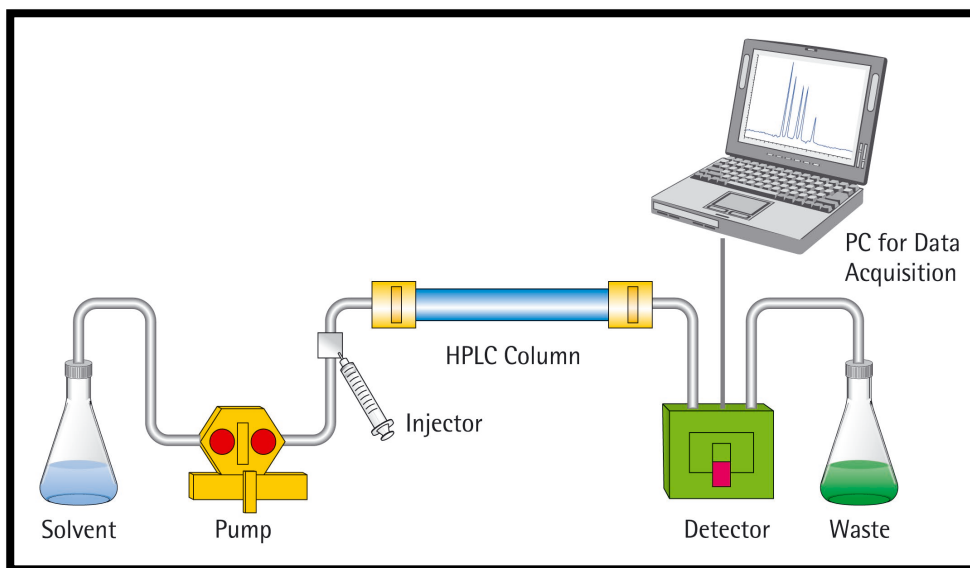


Figura 15: Componentes de un HPLC.

El solvente (fase móvil) se encuentra en un reservorio, este es introducido en una bomba de presión que genera un flujo específico de la fase móvil, generalmente en mililitros por minuto. El inyector introduce la muestra de interés en el flujo de fase móvil hacia la columna de HPLC. La columna contiene el material de cromatografía necesario para la separación (fase estacionaria), que se encuentra fija en el interior de la columna. Una vez los componentes de la mezcla han sido separados pasan al detector espectrofotométrico, donde se registra la absorbancia de cada muestra.

Para detectar y cuantificar el malondialdehído (MDA), un producto de peroxidación lipídica, se siguió el método de Wong (Wong, Knight et al. 1987). Este método se basa en la hidrólisis de los lipoperóxidos y la posterior formación de un aducto entre el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) y el MDA, este aducto (TBA-MDA₂) presenta un pico de absorbancia en 532-535nm, que puede ser medido en un instrumento de HPLC.

3.2.9.2 Procedimiento

1. Los tejidos o células a analizar se homogeneizaron en una solución KPi-EDTA, consistente en una solución de 50 mM β /50 mM KH_2PO_4 4:1 en volumen a pH 7,4 a la que se añade 0,1 mM de EDTA. Debe determinarse la concentración de proteínas de cada muestra para relativizar la concentración de MDA.
2. Se preparó una curva de concentraciones estándar de MDA: 0,781 – 1,562 – 3,125 – 6,25 – 12,5 – 25 – 50 nmol/mL.
3. Se mezclaron 20 μL de cada muestra o estándar con 500 μL de tampón TBA, preparado con 0,2% de TBA en una solución 2 M de acetato de sodio a pH 6,8.
4. Se incubaron las mezclas durante 1 hora a 95°C.
5. Se centrifugaron las muestras a 13.000g durante 5 minutos a 4°C.
6. Se recogieron 200 μL de sobrenadante para ser analizados por HPLC.
7. Las muestras y estándares se introdujeron en el cromatógrafo con las siguientes condiciones: Flujo de 1 mL/minuto, detección de la absorbancia a 532 nm, columna de fase reversa C8.
8. Cada muestra tardó 30 minutos en ser analizada con la siguiente secuencia:
 - a) 12 minutos de elución de la muestra con la fase móvil, compuesta por 50 mM KH_2PO_4 -acetonitrilo (83:17 en volumen) a pH 6,8.
 - b) 10 minutos de lavado de la columna con una fase compuesta por acetonitrilo al 70% y agua destilada.
 - c) 8 minutos de restauración de la columna con la fase móvil. Todas las soluciones fueron filtradas con un filtro de 0,22 μm y desgasificadas con un sonicador antes de usarlas.
9. Una vez se obtuvo el cromatograma de cada muestra, se midió el área bajo la curva correspondiente al aducto TBA-MDA2 y se calculó la

concentración a partir de la curva estándar. Los resultados obtenidos se normalizaron con la concentración de proteínas de cada muestra, quedando por tanto en nmol de MDA / mg proteína.

3.2.10 Estudio de los niveles de proteínas específicas mediante western blot

3.2.10.1 Descripción

El western blot es probablemente la técnica analítica para el estudio de proteínas más usada a lo largo de la historia en biología molecular. Esta técnica fue desarrollada por Harry Towbin y W. Neal Burnette entre 1979 y 1981 (Towbin, Staehelin et al. 1979, Burnette 1981), básicamente consiste en la realización de una electroforesis en gel que separa las proteínas por peso molecular, transfiriéndolas después a una membrana donde pueden detectarse mediante anticuerpos específicos.

1. Electroforesis en gel: La electroforesis es el transporte de moléculas bajo la acción de un campo eléctrico, para la separación de proteínas se utiliza un gel con una matriz de poliacrilamida con SDS. Para realizar esta técnica es necesario que las proteínas se encuentren totalmente desnaturalizadas, esto se consigue con la acción del SDS, un detergente aniónico, y del 2-mercapto-etanol, un agente reductor que causa la ruptura de los puentes disulfuro. De esta forma se consigue obtener proteínas en su estructura primaria. En presencia de una concentración de SDS superior a 8 mM, las proteínas se unen al SDS en una relación de 1,4 g de SDS por gramo de proteína, esto equivale a la unión de una molécula de SDS por cada dos aminoácidos. El SDS enmascara las cargas eléctricas de las proteínas, como cada molécula de SDS confiere una carga negativa, la relación carga-masa de las proteínas se hace uniforme, de manera que al realizar la electroforesis en gel la mezcla de proteínas se separa dependiendo del peso molecular de cada proteína.

2. Transferencia a una membrana: Una vez las proteínas han sido separadas en el gel, es necesario transferirlas a una membrana para continuar con la técnica. Las más usadas son las de nitrocelulosa y las de fluoruro de polivinilideno. Como las proteínas en el gel presentan carga negativa, la transferencia consiste en la aplicación de un campo eléctrico en el cual las proteínas avanzan hacia el polo positivo donde se encuentra la membrana.

3. Tinción de proteínas totales: Este paso permite comprobar que la transferencia ha transcurrido adecuadamente, además puede servir como control de carga (normalizador). Se utilizan tintes que se unen inespecíficamente a las proteínas permitiendo visualizar la separación a lo largo de la membrana, el más comúnmente usado es el rojo Ponceau (Sigma, P7170).

4. Detección mediante anticuerpos específicos: De la misma forma que en la inmunofluorescencia, la detección se realiza mediante un anticuerpo primario que va dirigido a la proteína de interés, a este se le une un anticuerpo secundario que generalmente lleva unido una molécula de peroxidasa de rábano. Más tarde se añade un sustrato sobre el que actúa la peroxidasa y produce quimioluminiscencia. Esta luminiscencia se correlaciona con la cantidad de proteína, ya que a mayor anticuerpo unido habrá más peroxidasa que catalice la reacción. En este estudio se utilizaron los siguientes anticuerpos y diluciones:
 - a) Rat Anti-Il6 1:1000 (Abcam, ab229381).
 - b) Anti Rat (conjugado con peroxidasa de rábano) 1:2000 (Cell Signalling, 70745).

3.2.10.2 Procedimiento

1. Preparación de muestras: En primer lugar, se homogeneizaron los tejidos/células en un tampón de lisis consistente en Tris/SDS/Glicerol, inhibidores de proteasas, azul de bromofenol y 2-mercaptoetanol. El glicerol le proporciona densidad a la muestra y el azul de bromofenol color para facilitar su introducción en el pocillo del gel. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry, esto permite cargar en cada pocillo del gel la misma cantidad de proteína total.

2. Electroforesis:
 - a) Se prepararon los geles con un 12,5% de acrilamida (Acrilamide/bisacrilamide 40% p/v, 29:1, Sigma A3574), 0,5 M Tris pH 6,8, 1,5 M Tris pH 8,8, agua bidestilada, 10% SDS, 10% APS y TEMED.
 - b) Se cargaron 30 µg de muestra en cada pocillo del gel. Es necesario cargar un patrón de pesos moleculares, que nos indicará el lugar en el que debe aparecer nuestra proteína de interés en el revelado.
 - c) Se realizó una electroforesis a un voltaje constante de 100V en un tampón de electroforesis consistente en 25 mM Tris, 200 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3. La electroforesis se terminó cuando el frente llegó al final del gel.

3. Transferencia:
 - a) El gel se colocó en un “sándwich” de electroforesis en contacto con una membrana de nitrocelulosa.
 - b) La transferencia se realizó a 4°C en una cubeta con tampón de transferencia consistente en 25 mM Tris, 192 mM glicina, 10% metanol (v/v), pH 8,3. La duración fue de 3-4 horas con un amperaje de 200mA.

- c) Una vez terminada se procedió a la tinción con rojo Ponceau para comprobar la correcta transferencia de las proteínas y se obtuvo una imagen con escáner para la posterior normalización de los resultados.

4. Detección:

- a) Se incubó la membrana con una solución de bloqueo para reducir los sitios de unión inespecíficos de los anticuerpos, durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Esta solución consiste en un 5% de BSA con TBS-t (0,1% Tween en TBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6).
- b) Se introdujo el anticuerpo primario en la solución de bloqueo y se dejó durante toda la noche a 4°C en agitación.
- c) Se lavó la membrana 3 veces durante 10 minutos en agitación a temperatura ambiente con TBS-t.
- d) Se diluyó el anticuerpo secundario en solución de bloqueo y se incubó la membrana durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.
- e) Se lavó la membrana como en el paso c).
- f) La membrana se colocó en un plástico transparente y se añadió el agente quimioluminiscente (Luminata Classico Western HRP Substrate, Millipore).
- g) Se dejó un minuto en oscuridad y se procedió al revelado en el instrumento apropiado (ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare), que consiste en una cámara detectora de distintos tipos de luminiscencia.

5. Análisis de imagen: Las imágenes obtenidas en formato “.tif” se analizaron mediante el software ImageJ. Se calculó la densidad relativa de negro de cada banda correspondiente a la proteína de interés, estos valores se

dividieron entre los obtenidos en la densidad relativa de la tinción con rojo Ponceau. De esta manera se obtiene un nivel de proteína relativo a la cantidad de proteínas totales en esa muestra.

3.2.11 Determinación de la carbonilación proteica mediante western blot

3.2.11.1 Descripción

Uno de los métodos usados para la detección de la acción oxidativa sobre las proteínas de las especies reactivas del oxígeno es la detección de los grupos carbonilos, estos son introducidos en las cadenas laterales de las proteínas como consecuencia de la modificación oxidativa. Existe un procedimiento que permite detectar los grupos carbonilos, mediante la reacción de estos grupos con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), que forma 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP-hidrazona). Tras esta reacción, las proteínas son sometidas a un western blot con un anticuerpo primario dirigido a la DNP-hidrazona, permitiendo cuantificar los niveles de carbonilación/oxidación proteica en la muestra. Para la realización de este procedimiento se utilizó el kit comercial OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit (Millipore S7150), que incluye todos los reactivos necesarios.

3.2.11.2 Procedimiento

1. Se extrajeron las proteínas de la muestra mediante la homogeneización de los tejidos/células con un tampón de lisis consistente en Tris/SDS/Glicerol, inhibidores de proteasas y 2-mercaptoetanol.
2. Se midió la concentración de proteínas de cada muestra mediante el método de Lowry y se diluyó cada muestra para obtener 20 μg de proteína en 5 μL de solución.
3. Se mezclaron 5 μL de muestra con 5 μL de SDS al 12% para desnaturalizar las proteínas.

4. Se derivatizaron las muestras añadiendo 10 μ L de solución de DNPH.
5. Se agitaron las muestras y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente.
6. Se añadieron 7 μ L de solución neutralizadora (Millipore) para detener la reacción.
7. Por último, con las muestras derivatizadas se realizó un western blot de la misma manera que la indicada en el anterior punto de este mismo capítulo.
8. Se usaron los anticuerpos presentes en el kit:
 - a) Anticuerpo primario: Rabbit Anti-DNP-hydrazone 1:150.
 - b) Anticuerpo secundario: Goat Anti-Rabbit IgG (conjugado con peroxidasa de rábano) 1:300.

3.2.12 Aislamiento de ARN de las muestras de VEs

3.2.12.1 Descripción

Las técnicas de extracción y purificación de ARN se basan en la lisis de las células o tejidos de los que se desea extraer el ARN y su posterior separación del resto de componentes celulares (ADN, proteínas, lípidos, sales). Esto puede conseguirse mediante la adición de agentes que degraden estos componentes, como ADNasas y proteinasas, también existe la opción de realizar una extracción orgánica usando fenol y cloroformo, que permite separar el ARN (fase acuosa) del resto de componentes celulares (fase orgánica). Durante el proceso es necesario prevenir la degradación del ARN por ARNasas presentes en la solución, para ello se utilizan agentes caotrópicos como el fenol, el cloroformo o el tiocianato de guanidinio, que impiden la acción enzimática. Por último, para obtener el ARN purificado suele usarse una precipitación por centrifugación, típicamente con alcohol isopropílico, aunque existen más métodos y en el caso del presente trabajo se realizó un aislamiento mediante un sistema de columnas con filtro de fibra de vidrio.

Para obtener el RNA total de las muestras de VEs se utilizó el kit comercial “Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit” (ThermoFisher #4478545), este kit se basa en una primera extracción de ARN con fenol:cloroformo seguida de una purificación a través de un filtro de fibra de vidrio. El etanol añadido a las muestras fija el ARN al filtro y más tarde se eluye el ARN con una solución de baja fuerza iónica.

3.2.12.2 Procedimiento

1. Las muestras de VEs del medio de cultivo de las CMTAs y del plasma de ratones envejecidos fueron aisladas mediante ultracentrifugación diferencial siguiendo los pasos indicados previamente en este capítulo. Los VEs se resuspendieron en 200 μ L de PBS estéril.
2. En un tubo eppendorf estéril se añadieron 200 μ L de “2X denaturing solution”.
3. Se dejaron incubar 5 minutos a 4°C.
4. Se añadieron 400 μ L de la solución de fenol:cloroformo. Mezclando bien cada muestra durante 30 segundos.
5. Se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 10.000g a temperatura ambiente, esto permite separar la muestra en una fase acuosa (ARN), una interfase (proteínas) y una fase orgánica (resto de componentes celulares).
6. Se anotaron los volúmenes de fase acuosa obtenidos en cada muestra.
7. Se añadieron 1,25 volúmenes de etanol absoluto a cada muestra.
8. Se añadieron 700 μ L de muestra sobre el filtro de cada tubo (collection tubes).
9. Se centrifugaron las muestras durante 15 segundos a 10.000g a temperatura ambiente, desechando los 700 μ L una vez atravesado el filtro, de esta forma el ARN se queda fijado al filtro.
10. Se añadieron 700 μ L de “Wash solution 1” a cada filtro y se centrifugaron durante 15 segundos a 10.000 g a temperatura ambiente, desechando al terminar los 700 μ L de solución.

11. Se añadieron 500 μL de “Wash solution 2/3” y se centrifugaron durante 15 segundos a 10.000g a temperatura ambiente, desechando al terminar los 700 μL de solución. Este paso se repitió una vez más.
12. Cada filtro fue sacado del tubo en el que estaba y fue colocado en un tubo nuevo (collection tubes).
13. Se añadieron 30 μL de agua libre de ARNasas (incluida en el kit) a 95°C al centro del filtro.
14. Se centrifugaron los tubos durante 30 segundos a 10.000g a temperatura ambiente, recogiendo los 30 μL obtenidos en un tubo estéril libre de ARNasas. Repitiendo este paso una vez más para un volumen final de 60 μL .
15. Las muestras fueron conservadas a -20°C en todo momento hasta su análisis.

3.2.13 Estudio de los microARNs contenidos en las VEs mediante array

El perfilado de la expresión de microARNs aislados de las VEs fue realizado en un Array de Affymetrix (Santa Clara, CA) del tipo “GeneChip miRNA 4.0”.

3.2.13.1 Procedimiento

1. En primer lugar, se marcaron 130 ng de ARN total (determinado por Nanodrop) con biotina mediante el kit comercial “FlashTag Biotin HSR RNA labelling kit” (Genisphere).
2. La muestra obtenida a partir del marcaje fue hibridada en una estufa de hibridación Affymetrix 645 a 48°C durante 18 horas.
3. Los arrays fueron teñidos usando la estación “Fluidics Station 450” usando el script FS450_0002 (Affymetrix).
4. Para el escaneo se utilizó el escáner “GeneChip Scanner 3000 7G” (Affymetrix), utilizando la consola “GeneChip Command Console Software” (Affymetrix) para realizar el análisis de la expresión génica.

5. El análisis de los valores extremos, los controles de calidad, así como la normalización y síntesis de los datos obtenidos fueron llevados a cabo usando la herramienta web miRNA QC Tool (Affymetrix).
6. Los niveles de expresión génica comparando entre diferentes grupos de muestras fueron analizados con el software “Transcriptome Analysis Suite” (Thermofisher). Los archivos CEL fueron analizados y normalizados usando el algoritmo RMA (robust multi-array average).
7. Para estudiar la diferencia en la expresión de microARNs entre distintos grupos se utilizó un análisis de la varianza y se identificaron los microARNs con un valor de $p=0,01$ o menor.
8. Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de componentes principales para evaluar las posibles fuentes de variabilidad.

3.2.14 Análisis de la regulación de vías de señalización y procesos biológicos por microARNs

3.2.14.1 Descripción

Debido a la existencia de miles de microARNs y la complejidad de demostrar experimentalmente las dianas moleculares de todos ellos, se han desarrollado algoritmos que permiten predecir con cierta seguridad los genes diana de cada microARN. Una vez se obtienen las dianas predichas, mediante herramientas bioinformáticas puede estudiarse el papel que tienen estos genes en la biología, es decir, puede estudiarse en que vías moleculares y procesos están implicados. Para la realización de este trabajo se hizo uso de la herramienta “PANTHER Classification System”, este sistema hace uso de la ontología génica (GO), una iniciativa bioinformática desarrollada por un consorcio de investigadores que clasifica cada gen según sus funciones moleculares, localización celular, procesos y vías en los que participa, etc. PANTHER nos permite estudiar la sobrerrepresentación de una lista de genes respecto a una lista común de vías de señalización y procesos biológicos

basada en la ontología génica. Esto se consigue mediante una prueba observado/esperado, de manera que si por ejemplo al estudiar nuestra lista de genes diana introducimos 15 genes relacionados con el desarrollo del corazón (observado) y proporcionalmente se esperaba que solo introdujéramos 5 (esperado), existiría una razón de sobrerrepresentación de 3 (O/E, 15/5).

3.2.14.2 Procedimiento

De los 25 microARNs sobreexpresados en los VEs derivados de CTMAs, comparando con los VEs derivados del plasma de ratones envejecidos, seleccionamos los 6 microARNs conservados entre las especies para continuar con el análisis: hsa-let-7c-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-135a-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-214-3p. Los microARNs fueron introducidos en mirDIP, un algoritmo que permite predecir las dianas de los microARNs, y se obtuvieron 5379 genes diana únicos con un alto nivel de confianza (percentil 99 de confianza). Estos genes fueron introducidos en PANTHER para identificar vías de señalización y procesos biológicos enriquecidos con una prueba de sobrerrepresentación. Para el análisis estadístico se usó la prueba de Fisher con la corrección False Discovery Rate. Se consideró un p-valor $< 0,01$ como estadísticamente significativo y en el análisis de procesos biológicos se consideraron como enriquecidos aquellos con una razón de sobrerrepresentación mayor de 2.

3.3 Modelo *in vitro* de senescencia celular

3.3.1.1 Descripción

Para el estudio de la senescencia celular en un modelo *in vitro* se utilizó la línea celular establecida de mioblastos provenientes de ratón C2C12 (ATCC CRL-1772). El medio de cultivo usado para la expansión y mantenimiento de la línea celular fue “DMEM *High glucose*” con un 10% de SBF y un 1% de P/S, cambiándolo cada 48 horas. Las células fueron mantenidas a 37°C en un incubador humidificado con un 5% de CO₂. Para la inducción de la senescencia en las células se empleó Palbociclib, se trata de un fármaco utilizado para el tratamiento de varios tipos de cáncer; su acción se basa en la inhibición de las ciclinas CDK 4/6, impidiendo que las células prosigan el ciclo celular y entren en estado de senescencia. El Palbociclib podría considerarse un análogo molecular de p16, ya que inhibe sus mismas dianas, p16 es una de las principales proteínas implicadas en el proceso de senescencia celular.

3.3.1.2 Procedimiento

1. Los mioblastos fueron sembrados a una densidad de 10.000 células por cm² en placas de cultivo de 6 pocillos.
2. 24 horas después, se introdujo el medio una concentración de 5 μM de Palbociclib.
3. 96 horas más tarde, se realizaron dos lavados consecutivos de 1 hora con medio normal sin Palbociclib, para permitir eliminar el Palbociclib de las células.
4. Tras esto, las células fueron tratadas con 5 μg/mL de VEs durante 48 horas.
5. Pasadas estas 48 horas, las células fueron recogidas con el tampón de citometría para continuar con el análisis.

3.3.2 Análisis de la senescencia en el modelo de senescencia celular

3.3.2.1 Descripción

Para analizar la senescencia y apoptosis de los mioblastos tratados con Palbociclib y VEs se utilizó un kit comercial (FluoReporter lacZ Flow Cytometry kit, Invitrogen) que mide la actividad beta-galactosidasa de las células, un marcador robusto de senescencia celular. Así como una tinción con yoduro de propidio que permite distinguir las células muertas.

3.3.2.2 Procedimiento

1. Se obtuvieron las células C2C12 tras el tratamiento con Palbociclib y VEs o PBS como control y se diluyeron hasta una concentración de 1000 células/ μL en el tampón de unión específico.
2. Se añadió un volumen igual al de la dilución de células de fluorescein di- β -D-galactopiranosido (FDG) atemperado a una concentración de 2 mM.
3. Las células fueron incubadas durante un minuto a 37°C.
4. A continuación, se añadieron 1,8 mL de medio de tinción con 1,5 μM de yoduro de propidio a 4°C.
5. Se determinó el porcentaje de células senescentes mediante un citómetro de flujo FACS-Verse (BDBiosciences) en al menos 10000 eventos.

3.3.3 Análisis de la apoptosis en el modelo de senescencia celular

3.3.3.1 Descripción

Para determinar la apoptosis celular se utilizó un kit comercial (Annexin V FITC Apoptosis detection kit, Immunostep) basado en la detección de la proteína Anexina V marcada con un fluoróforo, esta proteína se une con gran afinidad a la

fosfatidilserina, que se encuentra en la parte extracelular de la membrana plasmática al inicio del proceso de apoptosis.

3.3.3.2 Procedimiento

1. Se obtuvieron las células C2C12 tras el tratamiento con Palbociclib y VEs o PBS como control y se diluyeron hasta una concentración de 1000 células/ μL en el tampón de unión específico.
2. Se mezclaron 100 μL de la dilución de células con 5 μL de Annexin V-FITC y 5 μL de yoduro de propidio 1,5 μM .
3. La mezcla se incubó durante 15 minutos a 37°C en oscuridad. Pasado el tiempo se añadieron 400 μL de tampón de unión.
4. Se determinó el porcentaje de células apoptóticas mediante un citómetro de flujo FACS-Verse (BDBiosciences) en al menos 10000 eventos.

3.4 Determinación de la longitud telomérica y el daño al telómero

3.4.1 Descripción

Estas determinaciones se llevaron a cabo gracias a una colaboración establecida con el grupo de Telómeros y Telomerasa, dirigido por la Dra. María Blasco en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas de Madrid. Las muestras fueron preparadas en nuestro laboratorio y enviadas para la determinación experimental de la longitud y el daño al telómero, estos ensayos fueron realizadas por parte de Ana Guío-Carrión y Aksinya Derevyanko. Para determinar la longitud se realizó una hibridación in situ (FISH) con sondas teloméricas para determinar la longitud mediante su visualización con un microscopio confocal. Para determinar el daño al telómero se realizó un marcaje mediante inmunofluorescencia de la proteína de unión a p53 (53BP1), determinando la colocalización con las sondas teloméricas, esto permite marcar sitios activos de daño específico al ADN telomérico.

3.4.2 Procedimiento

1. Con la ayuda de un criostato (SLEE MNT) se realizaron múltiples secciones de los tejidos renal y muscular previamente fijados con 4% de PFA con un grosor de 7 μ m y fueron montadas en portaobjetos gelatinizados.
2. Se permeabilizaron las secciones con 0,5% de Triton X-100.
3. Se realizaron 3 lavados simples en PBS.
4. Las secciones se bloquearon con 5% de BSA en PBS durante una hora a temperatura ambiente.
5. Se incubaron con un anticuerpo primario dirigido a 53BP1 (Novus, NB100-304) a 4°C durante toda la noche.
6. Se realizaron 3 lavados simples en PBS.

7. Se incubaron las secciones con anticuerpo secundario anti-rabbit Alexa 488 (Invitrogen, A21206) durante 1 hora a temperatura ambiente y lavados nuevamente en PBS.
8. Los tejidos se fijaron en formaldehído al 4% durante 20 minutos y fueron deshidratados con concentraciones secuenciales de etanol (70%-90%-100%).
9. Se incubaron con 30µl de “telomere probe mix” (10mM TrisCl pH7, 25mM MgCl₂, 9mM Ácido cítrico, 82 mM Na₂HPO₄, 50% Formamida (Ambion AM9342), 0.25% agente de bloqueo (Roche 11096176001), y 0.5µg/ml de sonda telomérica PNA-Cy3 (Panagene) durante 3 minutos a 85°C y después 2 horas a temperatura ambiente.
10. Se lavaron durante 30 minutos con 10mM TrisCl pH7, 0,1% BSA en 50% de formamida.
11. Se realizaron 3 lavados en PBS.
12. Las secciones se montaron en un portaobjetos Vectashield con DAPI (VectorTM H-1200-10).
13. Se adquirieron las imágenes con un microscopio confocal Leica SP5-MP.
14. La intensidad de la señal telomérica se cuantificó utilizando el Software Definiens.
15. Se cuantificaron manualmente los sitios de colocación de la sonda telomérica y 53BP1.

3.5 Estimación de la edad epigenética mediante relojes epigenéticos

3.5.1 Descripción

La determinación de la edad epigenética de los diferentes tejidos fue posible gracias a la colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Steve Horvath en el Departamento de Bioestadística y Genética Humana de la Universidad de California, Los Angeles. Las determinaciones y análisis fueron realizados por Juozas Gordevicius y Robert T. Brooke, ambos miembros de la fundación “Epigenetic Clock Development” en Torrance, California. Desde nuestro laboratorio se prepararon las muestras de ADN a partir de los diferentes tejidos, y fueron enviadas para su análisis. Los relojes epigenéticos se han desarrollado recientemente y están basados en los patrones de metilación de distintas islas CpG que se modifican con el envejecimiento, consiguiendo mediante un algoritmo, la obtención de una edad epigenética que se correlaciona con la edad biológica y cronológica. Estos relojes pueden ser aplicados a multitud de especies y tejidos (Horvath 2013). Además, las intervenciones que han demostrado ser efectivas en el proceso de envejecimiento, como la restricción calórica, han demostrado también disminuir la edad epigenética (Petkovich, Podolskiy et al. 2017, Sziráki, Tyshkovskiy et al. 2018).

3.5.2 Procedimiento

3.5.2.1 Aislamiento del ADN de los tejidos

1. Se utilizaron 10 mg de tejido renal, muscular, hepático y esplénico, que previamente había sido congelado a -80°C .
2. Los tejidos se añadieron a 180 μL de tampón ATL del kit comercial DNeasy (Qiagen, 69504).
3. Se añadieron 20 μL de Proteinasa K, se mezcló la muestra por agitación y se incubó a 56°C hasta que el tejido estaba completamente lisado.

4. Se añadieron 200 μ L de tampón AL y 200 μ L de etanol al 100% a las muestras, mezclando después por agitación.
5. La mezcla obtenida se colocó en la columna DNeasy Mini spin y en un tubo de eppendorf de 2 mL.
6. Se centrifugaron las muestras durante un minuto a 6000g, el tubo de eppendorf se desechó y la columna fue colocada en un nuevo tubo limpio.
7. Se añadieron 500 μ L de tampón AW1 y se centrifugaron nuevamente a 6000g durante un minuto.
8. Se desechó nuevamente el tubo y la columna se colocó en un nuevo tubo limpio.
9. Se añadieron 500 μ L de tampón AW2 y se centrifugaron a 20000g durante 3 minutos.
10. Se desechó el tubo y la columna se colocó en un tubo de eppendorf de 1,5 mL.
11. Se añadieron 200 μ L de tampón AE directamente en la columna, se dejó incubar durante un minuto a temperatura ambiente y se realizó una centrifugación a 6000g durante un minuto.
12. Las muestras fueron congeladas a -80°C y preparadas para el envío.

3.5.2.2 Array de metilación y análisis

1. El estudio de metilación del ADN se realizó en un array Illumina 850K (Illumina Infinium Mouse Methylation BeadChip), al que se añadieron 250 ng de ADN obtenido de los tejidos
2. Los arrays fueron escaneados con un sistema Illumina HiScan.
3. Los datos obtenidos fueron procesados en un entorno R con el paquete sesame versión 1.3.0.
4. Los valores beta se obtuvieron usando unos parámetros de nondetection.mask y quality.mask en FALSE

5. Las citosinas diferencialmente metiladas se detectaron usando una regresión lineal en un entorno R con el paquete limma. Esto se realizó de manera separada para cada tejido.
6. El efecto de la variable tratamiento con VEs se ajustó por la edad y el sexo del ratón.
7. Los p-valores obtenidos se corrigieron usando el procedimiento “False Discovery Rate”, y aquellos con un $FDR < 0,05$ se consideraron significativos.
8. El análisis de enriquecimiento de procesos biológicos se realizó con g:profiler en un entorno R, asociando cada *loci* de cada citosina al gen más cercano.
9. Se utilizaron múltiples predictores de la edad epigenética. Los relojes se entrenaron en una muestra diferente a la empleada en este estudio. Los relojes de generales se entrenaron en ratones de diferentes edades a lo largo de varios tejidos (sangre, hígado, cerebro, cerebelo, corteza, fibroblastos, corazón, riñón, músculo, piel, cuerpo estriado y cola). En los relojes de intervención se usaron los mismos tejidos y animales, pero los *loci* usados para el entrenamiento se basan en *loci* que cambian con intervenciones clásicas en el envejecimiento (restricción calórica e inhibición de mTOR).
10. El efecto del tratamiento con VEs se estimó mediante un modelo estadístico de efectos mixtos para cada tejido donde la edad cronológica, el sexo y el grupo de tratamiento fueron variables fijas y el nombre del reloj una variable aleatoria. La edad predicha por el modelo fue la variable de respuesta. La significación estadística de cada variable fija se evaluó utilizando el método de Satterthwaite en el paquete ImerTest de R.

3.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el programa Graphpad Prism V9, tomando un nivel de significación de 0,05 para aceptar que hay una diferencia estadísticamente significativa. Los datos en las pruebas físicas y los valores plasmáticos de urea tras el tratamiento con VEs comparados con el valor basal antes del tratamiento fueron determinados y representados como un porcentaje de cambio respecto al basal, definido como 0%. Todos los grupos fueron examinados para determinar la presencia de valores extremos mediante el método ROUT (Q=2%). Para analizar la normalidad de cada grupo en cada comparación se utilizó la prueba de Saphiro-Wilk. Para comparar las medias entre dos muestras independientes que cumpliesen la normalidad se utilizó la prueba T de Student, comprobando la igualdad de varianzas previamente con la prueba de Levene, en caso de que algún grupo no fuese normal, se utilizó la prueba de Mann-Whitney. Para los estudios *in vitro* se utilizó la prueba ANOVA con la prueba de Tukey post-hoc. Para comparar la distribución de las puntuaciones en las imágenes de la prueba de regeneración del pelaje y el número de ratones frágiles se utilizó la prueba de Fisher.

4 RESULTADOS

4.1 Las CMTAs obtenidas de ratones jóvenes liberan VEs al medio de cultivo

Para comprobar que las células aisladas de los panículos adiposos de los animales y cultivadas eran células madre mesenquimales, utilizamos el marcaje mediante citometría de flujo con anticuerpos dirigidos a proteínas de superficie descritas en la literatura características de células mesenquimales, en concreto CD29, CD44, CD90 y CD105 (Zuk, Zhu et al. 2002). El resultado obtenido fue una fuerte expresión de estos marcadores en nuestras células, siendo un 99,37% positivas para CD29, un 80,01% para CD44, un 85,66% para CD90 y un 77,09% para CD105 (Figura 16). La contaminación de los cultivos con otro tipo celular es frecuente, concretamente las células endoteliales y hematopoyéticas son contaminantes habituales de los cultivos de CMTAs, por lo que utilizamos el mismo tipo de marcaje de proteínas de superficie que no están presentes en las CMTAs y sí en células de la estirpe endotelial (CD31) y hematopoyética (CD45) (Zuk, Zhu et al. 2001). En nuestro cultivo celular solamente un 0,69% de células eran positivas para CD31 o CD45, de lo que se deduce que fuimos capaces de obtener un cultivo purificado de CMTAs de estirpe mesenquimal.

Para continuar con el trabajo era necesario comprobar que podíamos aislar correctamente VEs del medio de cultivo de las CMTAs, para lo cual empleamos dos estrategias. En primer lugar, utilizamos el marcaje de una proteína de superficie presente en estas VEs (CD63) mediante un citómetro de flujo adaptado a partículas de muy pequeño tamaño. Encontramos que las partículas presentes en la muestra obtenida mediante ultracentrifugación diferencial del medio de cultivo de las CMTAs presentaban un 89,04% de positividad para CD63 (Figura 16). En segundo lugar, nos servimos de la microscopía electrónica de transmisión para cuantificar el tamaño y la morfología de las partículas obtenidas. Como se observa en la Figura 17, las partículas presentaban un tamaño en torno a los 50-200 nm, con una hendidura en el centro provocada por el procesado, descrita como típica de las VEs (Chuo, Chien et al. 2018). Además, realizamos una tinción específica de CD63

mediante anticuerpos monoclonales marcados con oro, que nos permiten visualizar en el microscopio electrónico las proteínas marcadas mediante un pequeño acúmulo de partículas electrodensas, como se puede observar en la Figura 17 las VEs aisladas presentaban en su superficie esta proteína. Con estos datos pudimos asegurar que las partículas aisladas del medio de cultivo eran efectivamente VEs derivadas de CMTAs.

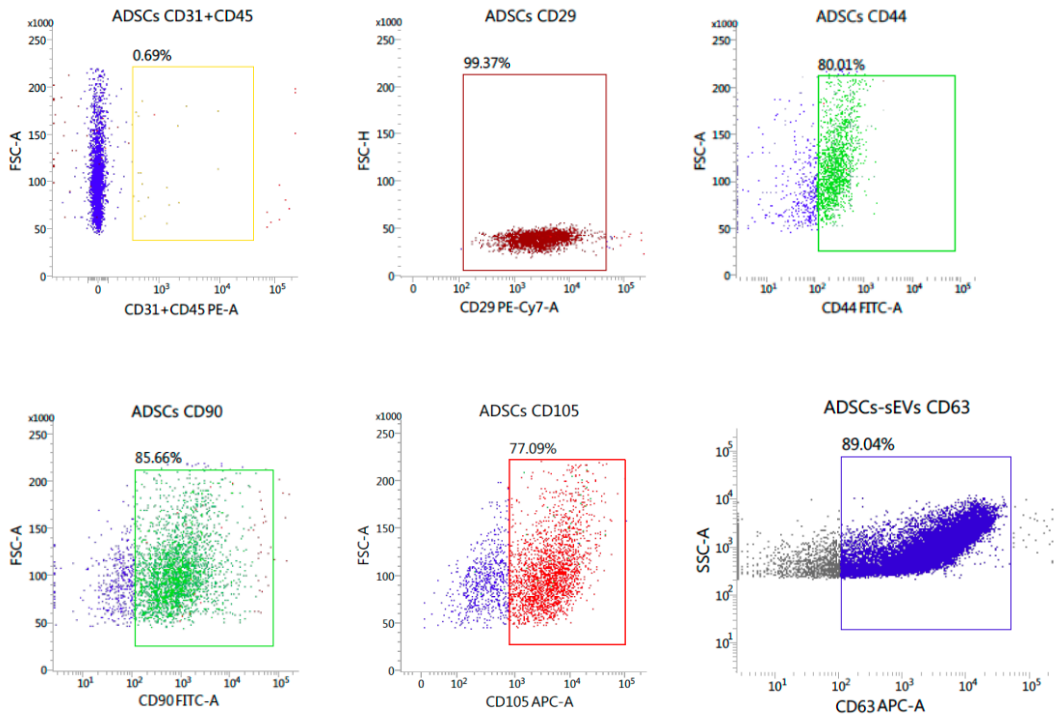


Figura 16: Citometría de flujo de marcadores de superficie de CMTAs y de sus VEs.

Los datos se muestran como el porcentaje de células positivas para cada uno de los marcadores de superficie descritos.

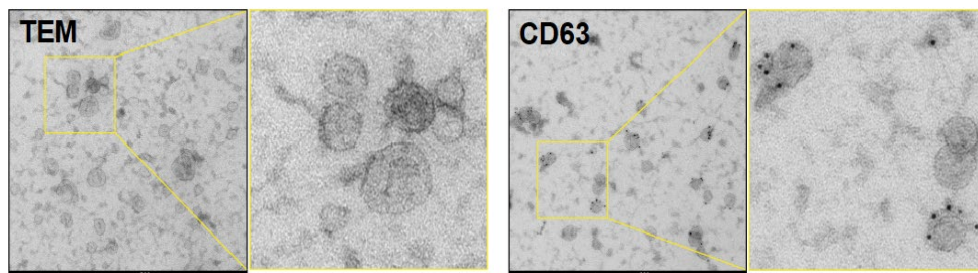


Figura 17: Microscopía electrónica de transmisión y marcaje de CD63 con inmuno-oro de VEs derivadas de CMTAs.

4.2 El tratamiento con VEs derivadas de CMTAs de ratones jóvenes mejora la salud y disminuye la fragilidad de ratones viejos

4.2.1 Efecto del tratamiento sobre parámetros de estado físico y fragilidad

Conforme los organismos envejecen, muestran una disminución en múltiples de sus funciones, típicamente el envejecimiento lleva a una pérdida de la condición física y un riesgo muy aumentado de fragilidad (WR, JP et al. 1998, Fried, Tangen et al. 2001). Para evaluar el efecto del tratamiento con VEs derivadas de CMTAs jóvenes en estos parámetros diseñamos un experimento con ratones envejecidos de entre 22-24 meses. En el día previo al tratamiento con VEs, cuantificamos el peso corporal, la fuerza de agarre, la coordinación motora y la resistencia a la fatiga de ratones envejecidos, para después usar estos datos como valores basales y compararlos con los resultados tras el tratamiento con VEs en las mismas pruebas que se repitieron 14 y 30 días después de la primera dosis de VEs.

En cuanto al peso corporal, observamos una pérdida de peso de entre un 5-10% tras el tratamiento, tanto en el grupo control (PBS) como en el grupo tratado con VEs, a los 14 y a los 30 días después del tratamiento. En el grupo tratado la pérdida de peso fue menor (alrededor de un 2% menos de pérdida de peso) en ambos días, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Figura 18).

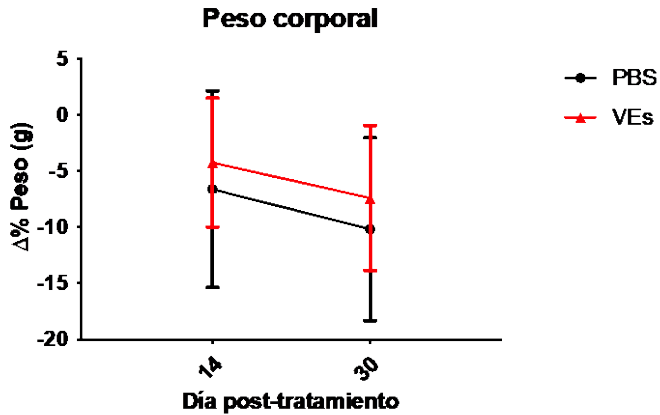


Figura 18: Cambio en el peso corporal de ratones viejos tras el tratamiento con VEs derivadas de CMTAs.

Los datos se muestran como el cambio en el porcentaje respecto al peso basal en el día previo al tratamiento con VEs. PBS día 14 $n=12$, día 30 $n=12$, VEs día 14 $n=14$, día 30 $n=15$.

La fuerza de agarre de los ratones tratados con VEs derivadas de CMTAs jóvenes aumentó tras el tratamiento, a los 14 días se observó un incremento del 15% y a los 30 días del 20%, siendo ambas comparaciones con los ratones control tratados con PBS estadísticamente significativas (Figura 19). La coordinación motora de los ratones medida a través de la prueba de Rota Rod se vio incrementada un 27% y un 72% 14 y 30 días después del tratamiento con VEs, respectivamente, siendo la comparación con el grupo control estadísticamente significativa solamente en el día 30 (Figura 20). Así mismo, la resistencia a la fatiga de los ratones incluidos en el grupo control 14 y 30 días tras el tratamiento se vio disminuida un 4% y un 16% respectivamente, mientras que en el grupo de tratamiento con VEs aumentó ligeramente, un 1,4% y un 1,3%, siendo la comparación estadísticamente significativa en el día 30 (Figura 21).

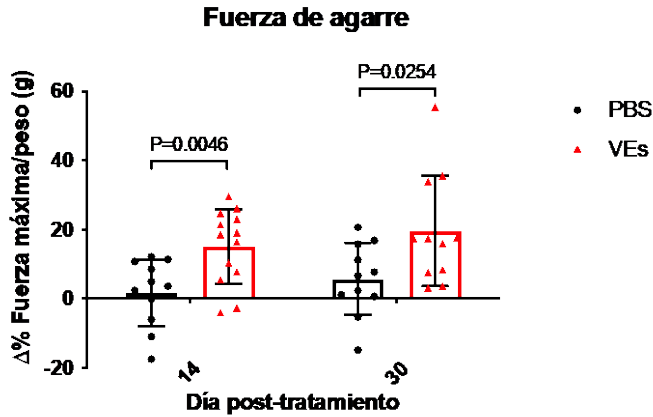


Figura 19: Cambio en la fuerza de agarre respecto al peso de ratones viejos tras el tratamiento con VEs derivadas de CMTAs.

Los datos se muestran como el cambio en el porcentaje respecto a la fuerza basal en el día previo al tratamiento con VEs. PBS día 14 n=11, día 30 n=11, VEs día 14 n=13, día 30 n=11.

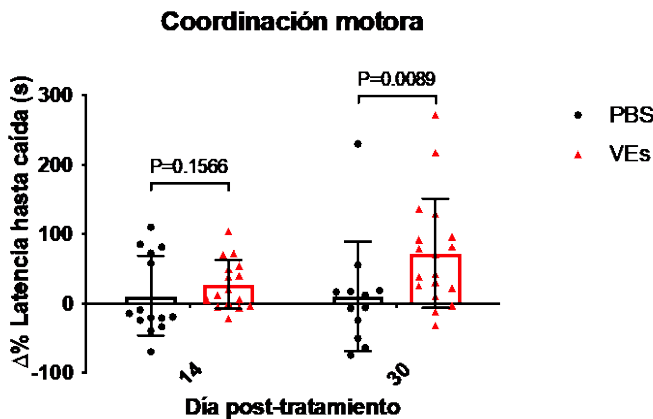


Figura 20: Cambio en la coordinación motora de ratones viejos tras el tratamiento con VEs derivadas de CMTAs.

Los datos se muestran como el cambio en el porcentaje respecto a la coordinación motora basal en el día previo al tratamiento con VEs. PBS día 14 n=14, día 30 n=12, VEs día 14 n=16, día 30 n=18.

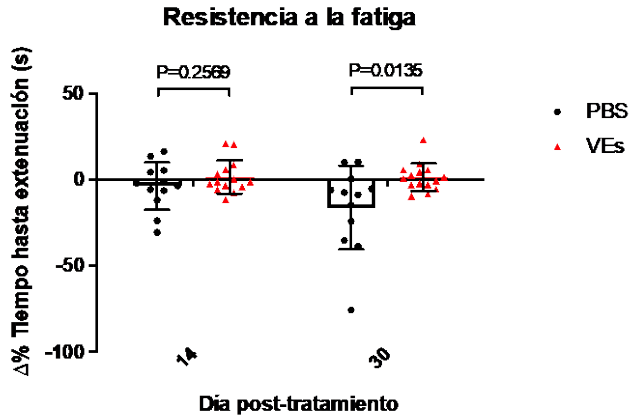


Figura 21: Cambio en la resistencia a la fatiga de ratones viejos tras el tratamiento con VEs derivadas de CMTAs.

Los datos se muestran como el cambio en el porcentaje respecto a la resistencia a la fatiga basal en el día previo al tratamiento con VEs. PBS día 14 n=12, día 30 n=12, VEs día 14 n=14, día 30 n=15.

A partir de estos resultados concluimos que el efecto del tratamiento con VEs sobre las pruebas físicas de los animales fue mayor 30 días después de la primera inyección. Para comprobar si este efecto era más duradero en el tiempo realizamos un estudio con pruebas físicas en ratones 60 días después del tratamiento con VEs derivadas de CMTAs o PBS como control, observando que no existían diferencias significativas en ninguna de las pruebas físicas 60 días tras la primera inyección con VEs/PBS (Tabla 5), sugiriendo por tanto un efecto transitorio.

Prueba (día 60)	PBS	VEs	PBS vs VEs
Fuerza de agarre	+1,7%	+2,09%	ns
Coordinación motora	-12%	+11%	ns
Resistencia a la fatiga	-27,08%	-25,07%	ns

Tabla 5: Datos comparativos de las pruebas físicas 60 días después del tratamiento con VEs derivadas de CMTAs.

Para realizar un estudio cuantitativo de la fragilidad de los ratones nos basamos en una puntuación de fragilidad basada en el fenotipo clínico de la fragilidad en humanos, desarrollado previamente por nuestro grupo (Gomez-Cabrera, Garcia-Valles et al. 2017). Esta puntuación, basada en 5 criterios, nos permite clasificar como frágiles a los ratones que cumplen al menos 3 criterios, y al resto como no frágiles. Como se muestra en la figura 22, no existían diferencias significativas en el día previo al tratamiento, habiendo un 16,6% de ratones frágiles en el grupo control y un 6,6% en el grupo tratado con VEs. Sin embargo, 30 días después del tratamiento se puede observar una gran diferencia entre ambos grupos, siendo un 41,6% de los ratones control frágiles y ninguno de los incluidos en el grupo tratado con VEs.

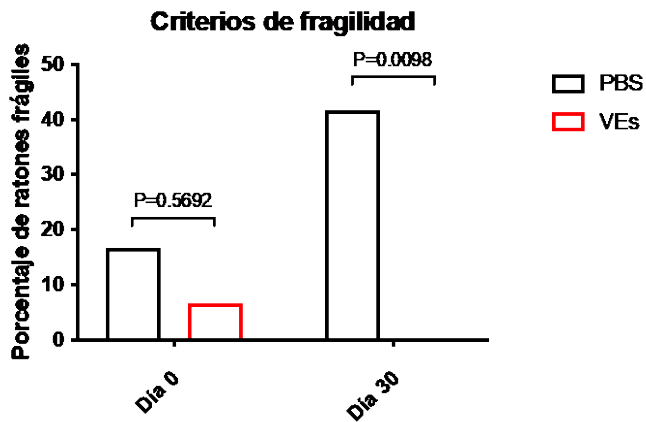


Figura 22: Cuantificación de la fragilidad en los animales antes y 30 días después del tratamiento con VEs derivadas de CMTAs.

Los datos se muestran como el porcentaje de ratones que cumplían 3 o más criterios de fragilidad. PBS día 0 n=12, día 30 n=12, VEs día 14 n=15, día 30 n=15.

4.2.2 Efecto del tratamiento sobre la función renal

Para determinar posibles cambios en la función renal con el tiempo, ya que es una de las funciones que se deteriora más rápidamente a medida que el organismo envejece (Khan, Singer et al. 2017) utilizamos los valores de urea plasmática, un marcador clásico de la función renal, que varía de manera inversa al filtrado glomerular. Para ello obtuvimos muestras del plasma de los ratones en el día previo al tratamiento, 14 y 30 días después, de manera similar a las pruebas físicas, y cuantificamos los niveles de urea en esas muestras. Los valores obtenidos el día previo fueron empleados como valores basales y comparados con los resultados tras el tratamiento con VEs. Los resultados obtenidos fueron una menor concentración de urea plasmática en los ratones tratados con VEs, tanto 14 como 30 días después del tratamiento, siendo estas diferencias estadísticamente significativas en ambos días. Como se puede observar en la Figura 23, 30 días después de la inyección del tratamiento, los ratones del grupo control vieron incrementados sus niveles basales de urea en un 50%, mientras que, en el grupo de ratones tratados con VEs, estos niveles se mantuvieron prácticamente sin cambios.

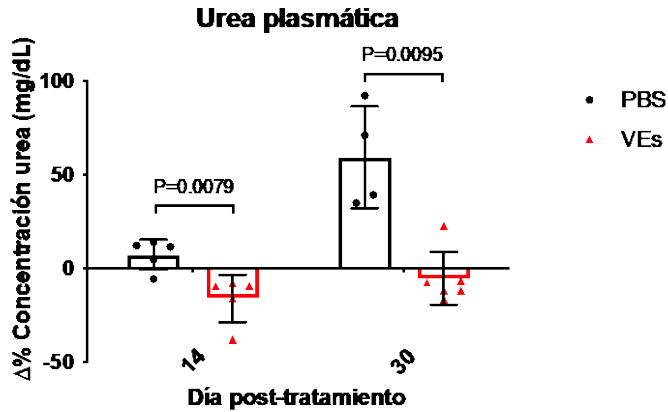


Figura 23: Cambios en la urea plasmática de ratones viejos tratados con VEs derivadas de CMTAs.

Los datos se muestran como el cambio en porcentaje respecto a la urea plasmática basal en el día previo al tratamiento con VEs. PBS día 14 n=5, día 30 n=4, VEs día 14 n=5, día 30 n=6.

4.2.3 Efecto del tratamiento sobre la regeneración del pelaje

En los ratones, la densidad del pelaje y la capacidad de regenerarlo se ven reducidas a medida que envejecen (Matheu, Maraver et al. 2007). Para estudiar el efecto del tratamiento con VEs derivadas de CMTAs en la regeneración del pelaje, depilamos con cera un cuadrado de pelaje de 1cm de lado en el dorso de los ratones el mismo día del tratamiento con VEs o PBS como control. Catorce días después, la mayoría de los ratones tratados con VEs habían regenerado la totalidad del área depilada, mientras que los ratones control presentaban una capacidad mucho menor de regenerar el pelaje (Figura 24). Además de este hecho, de manera subjetiva, observamos una coloración más oscura del pelaje en los ratones tratados con VEs.

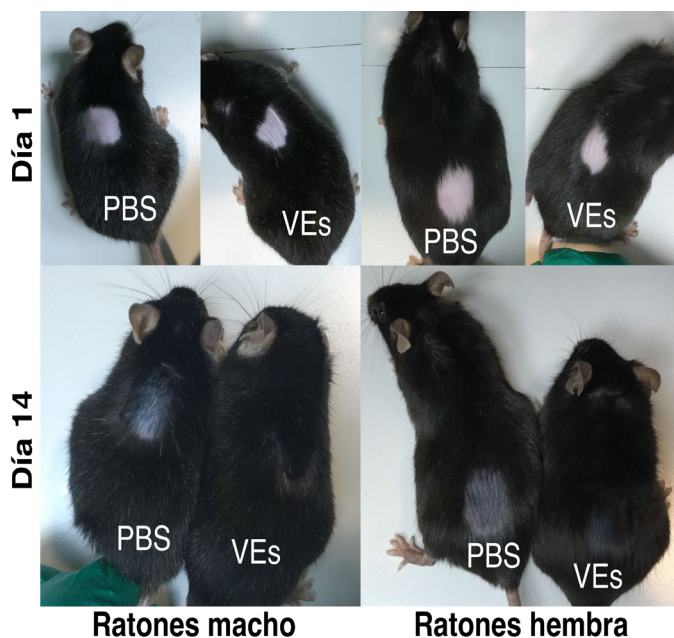
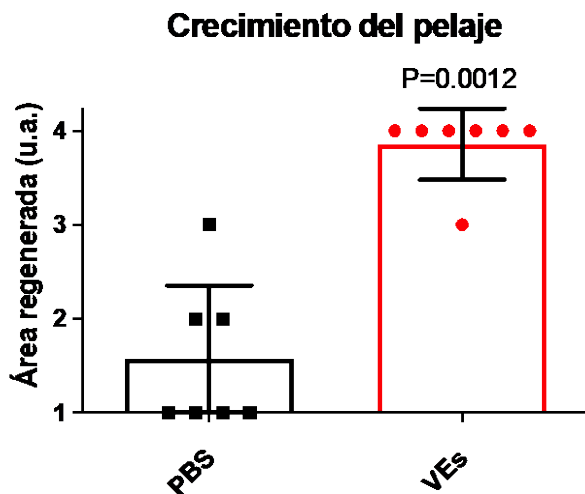


Figura 24: Cuantificación e imagen representativa de la capacidad de regeneración del pelaje dorsal en ratones viejos tratados con VEs derivadas de CMTAs.

Los datos se muestran como el área regenerada en unidades arbitrarias del 1 al 4, siendo el 4 una regeneración de la totalidad del área depilada y el 1 una regeneración menor del 25%. PBS n=7, VEs n=7.

4.3 El tratamiento con VEs derivadas de CMTAs de ratones jóvenes revierte los cambios estructurales relacionados con el envejecimiento en ratones viejos

4.3.1 Efecto del tratamiento sobre la estructura de la corteza renal

A medida que un organismo envejece, sus tejidos sufren varios cambios estructurales que son negativos para la función normal del tejido, como la pérdida de capacidad regenerativa o la fibrosis (Conboy and Rando 2005, López-Otín, Blasco et al. 2013). Para estudiar estos cambios en los animales tratados con VEs, realizamos un estudio histológico en corteza renal mediante la tinción de hematoxilina/eosina con muestras de riñón obtenidas 30 días después del tratamiento con VEs o PBS como control, ya que es el día en el que más cambios funcionales observamos a todos los niveles. Principalmente nos centramos en estudiar la presencia de atrofia tubular y fibrosis intersticial, dos cambios distintivos asociados al envejecimiento que llevan a la pérdida de función renal (Denic, Glassock et al. 2016).

La corteza renal de los ratones control mostró una atrofia tubular generalizada, definida como una menor densidad tubular y una mayor dilatación de los túbulos. En cambio, la densidad tubular era mayor en los ratones tratados con VEs derivadas de CMTAs, presentando también una menor dilatación de los túbulos. En cuanto a la densidad de glomérulos en la corteza renal, no observamos diferencias (Figura 25).

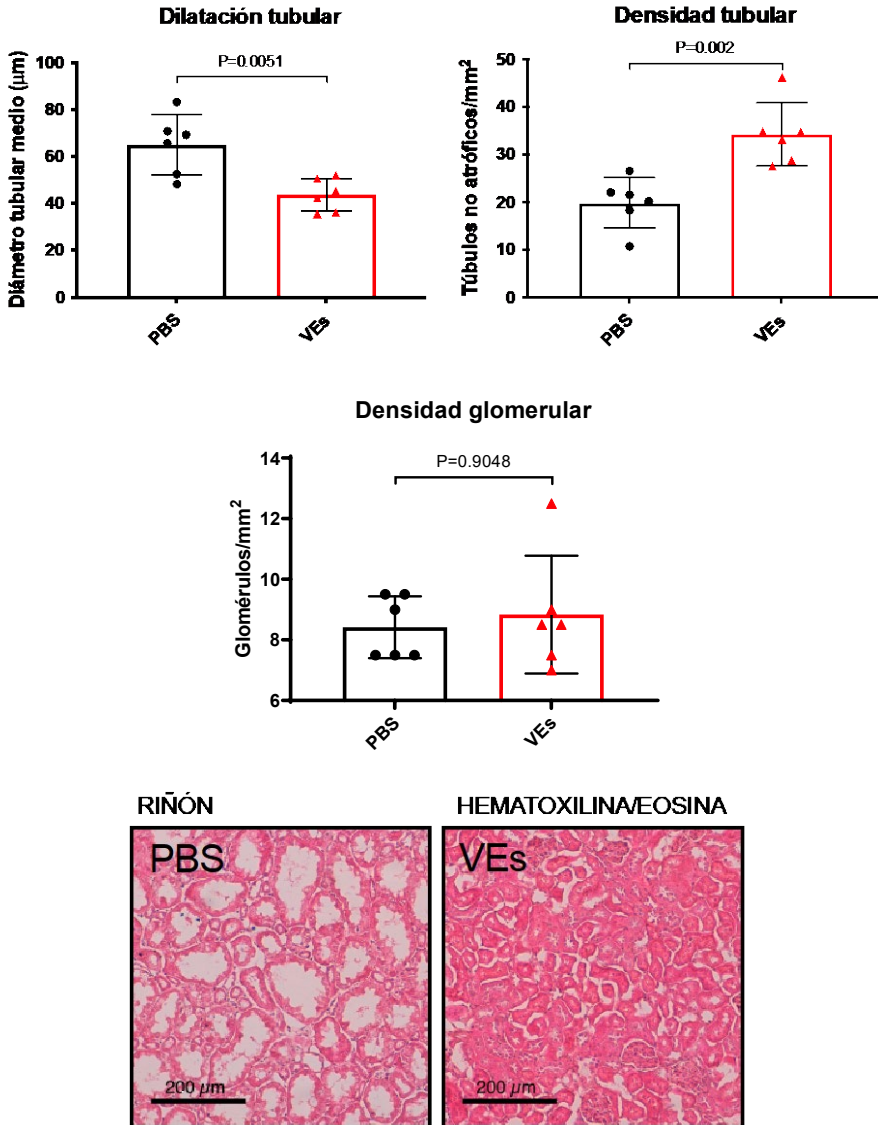


Figura 25: Cambios histológicos en la corteza renal de ratones viejos tratados con VEs derivadas de CMTAs.

La dilatación de los túbulos se muestra como el diámetro tubular medio, la densidad tubular como el número de túbulos no atróficos por mm² y la densidad glomerular como el número de glomerulos por mm². PBS n=6, VEs n=6.

Para determinar el grado de fibrosis intersticial que presentaban los riñones, realizamos una tinción específica de colágeno (empleando el marcador Sirius Red), la principal proteína de depósito en la fibrosis. Los riñones de los ratones tratados con VEs derivadas de CMTAs mostraron una disminución en la deposición de colágeno en el intersticio, siendo del 9% en los controles y del 3,5% en los del grupo tratamiento. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 26).

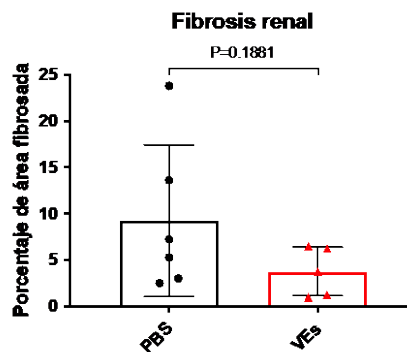


Figura 26: Cuantificación de la fibrosis presente en la corteza renal de ratones viejos tratados con VEs derivadas de CMTAs.

Los datos se muestran como el porcentaje del área con fibrosis, determinada por la tinción histológica Sirius Red. PBS n=6, VEs n=6.

Estos resultados sugieren que las VEs derivadas de CMTAs jóvenes podrían inducir la regeneración de los túbulos renales promoviendo la proliferación de las células tubulares, ya que estas células mantienen la capacidad de dividirse y repoblar los túbulos renales tras un daño (Berger, Bangen et al. 2014). Para demostrarlo utilizamos el marcador de proliferación Ki67, una proteína que se encuentra solamente en el núcleo de las células que presentan un ciclo celular activo, pudiendo cuantificar mediante inmunofluorescencia las células que están proliferando. Encontramos unos niveles muy bajos de proliferación en las células tubulares de los ratones control, en cambio, en el grupo de ratones tratados con VEs pudimos

identificar una evidente población de células positivas para Ki67, que indicaban una proliferación activa en los túbulos renales de estos ratones (Figura 27).

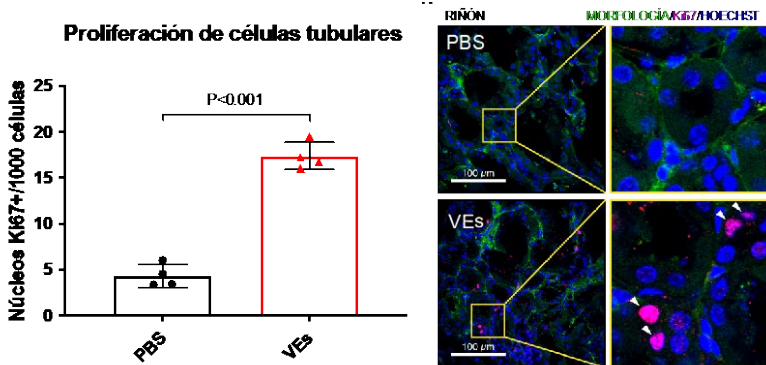


Figura 27: Cuantificación e imagen representativa de la proliferación de células tubulares en la corteza renal de ratones viejos tratados con VEs derivadas de CMTAs.

Los datos se muestran como el número de núcleos positivos para Ki67 por cada 1000 células. PBS n=4, VEs n=4.

4.3.2 Efecto del tratamiento sobre la estructura muscular

La atrofia y la pérdida de función del músculo lleva a la disfunción global del organismo a medida que envejece, ya que el sistema musculoesquelético es esencial para las actividades básicas de la vida diaria. Tanto humanos como en otros animales, como los ratones, la prevalencia de la sarcopenia aumenta drásticamente con la edad (Cruz-Jentoft, Landi et al. 2014). Para investigar el efecto de las VEs derivadas de CMTAs en el tejido muscular de los ratones viejos realizamos una tinción de hematoxilina/eosina en los músculos. Tras esto, medimos el área de sección transversal de las fibras musculares, un parámetro estrechamente relacionado con la atrofia y la pérdida de fuerza. Los ratones del grupo tratamiento mostraron un área de sección transversal media mayor, además de una mayor

concentración de proteínas por peso de tejido seco (Figura 28). Estos datos obtenidos en el músculo se correlacionan adecuadamente con los resultados obtenidos en las pruebas físicas de los ratones.

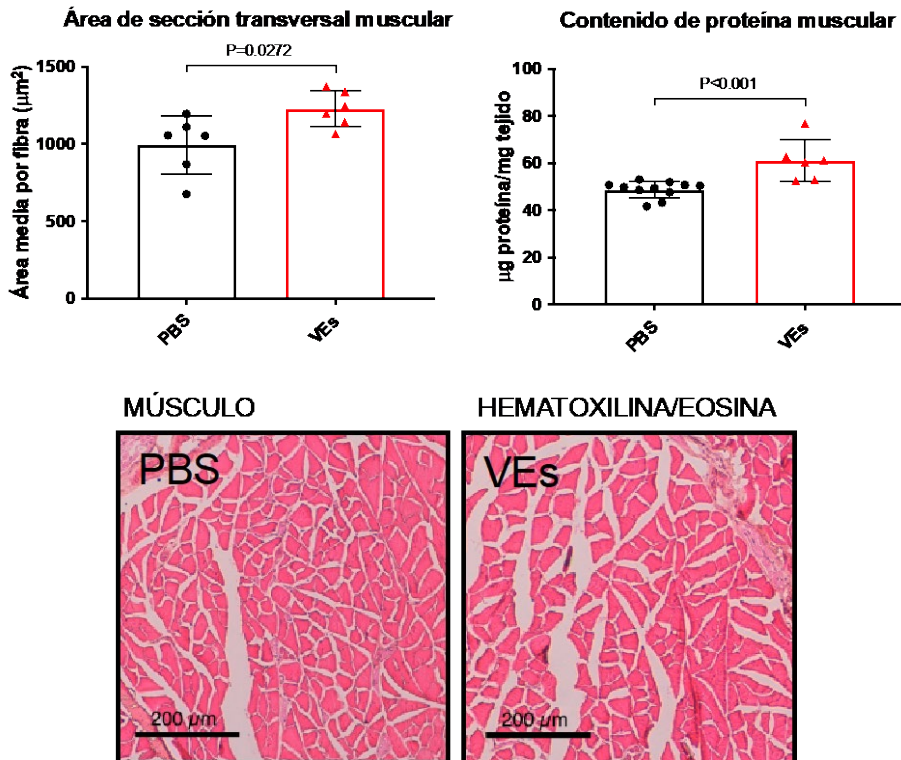


Figura 28: Cuantificación e imagen representativa del área transversal de las fibras musculares y contenido proteico del músculo de ratones viejos tratados con VEs derivadas de CMTAs.

Los datos se muestran como el área media de las fibras musculares en cada individuo. Área de sección transversal, PBS n=6, VEs n=6. En el caso del contenido proteico, se cuantificó la cantidad de µg de proteína por cada mg de tejido muscular. Contenido de proteína muscular. PBS n=11, VEs n=6.

4.4 Las VEs derivadas de CMTAs de ratones jóvenes mitigan los rasgos moleculares asociados con el envejecimiento en el tejido renal y muscular de ratones viejos

4.4.1 Efecto del tratamiento sobre el estrés oxidativo

Para evaluar el efecto del tratamiento con VEs derivadas de CMTAs sobre el estrés oxidativo, recogimos los riñones y músculos de ratones viejos 30 días después del tratamiento. Examinamos los niveles de oxidación en dos macromoléculas: lípidos y proteínas. En cuanto a los lípidos, utilizamos el malondialdehído (MDA), un marcador muy expandido en la literatura de peroxidación lipídica en el tejido (Tsikas 2017). Observamos una disminución de los niveles de MDA en el tejido muscular de los ratones viejos tratados con VEs, mientras que no encontramos cambios en el tejido renal (Figura 29). Para determinar los niveles de oxidación en las proteínas, cuantificamos la presencia de grupos carbonilo en las mismas, ya que la oxidación de las proteínas provoca la formación de estos grupos (Akagawa 2021). Encontramos unos resultados similares a los obtenidos en lípidos, ya que el tejido muscular de los ratones tratados con VEs presentaba una tasa menor de carbonilación proteica, mientras que no observamos cambios en el tejido renal de estos ratones (Figura 29).

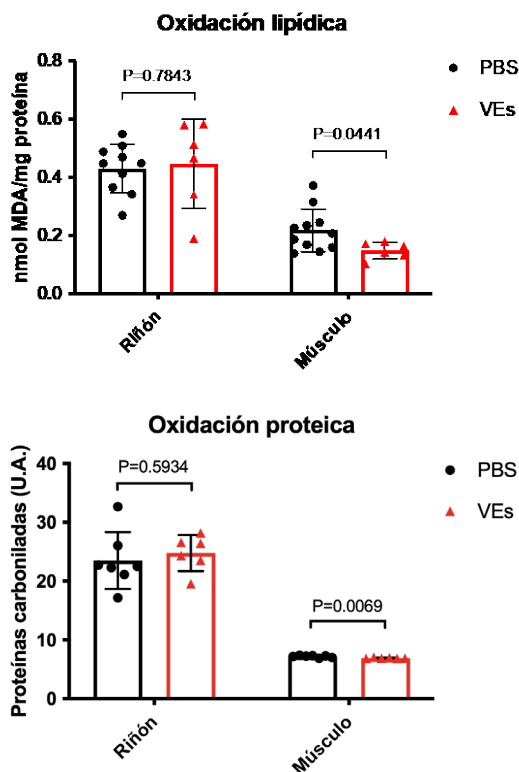


Figura 29: Efecto del tratamiento con VEs derivadas de CMTAs en la oxidación de lípidos y proteínas del tejido renal y muscular de ratones viejos.

En la oxidación lipídica los datos se muestran como la cantidad de nanomoles de MDA por mg de proteína tisular. Oxidación lipídica: PBS riñón n=10, PBS músculo n=11, VEs riñón n=6, VEs músculo n=6. En el caso de la oxidación de las proteínas se muestran como unidades arbitrarias obtenidas de la densitometría del Western Blot. Oxidación proteica: PBS riñón n=7, PBS músculo n=7, VEs riñón n=6, VEs músculo n=6.

4.4.2 Efecto del tratamiento sobre los telómeros

El acortamiento y el daño a los telómeros son dos de los factores más estudiados que llevan a la inestabilidad del genoma celular y la pérdida de la capacidad proliferativa. El acortamiento de los telómeros se observa en la mayoría de las especies animales durante el envejecimiento normal, y los telómeros excesivamente cortos se asocian

a varias condiciones como la fibrosis pulmonar, la disqueratosis congénita o la anemia aplásica (Blasco 2007). Para explorar el efecto de las VEs derivadas de CMTAs en los telómeros, cuantificamos la longitud telomérica media y los *foci* inductores de disfunción telomérica (TIFs), que marcan zonas de daño al ADN telomérico a través de la detección de la proteína de unión a p53, mediante inmunofluorescencia en el tejido renal y muscular de ratones viejos 30 días después del tratamiento con VEs derivadas de CMTAs. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos en ninguno de los parámetros estudiados (Figura 30).

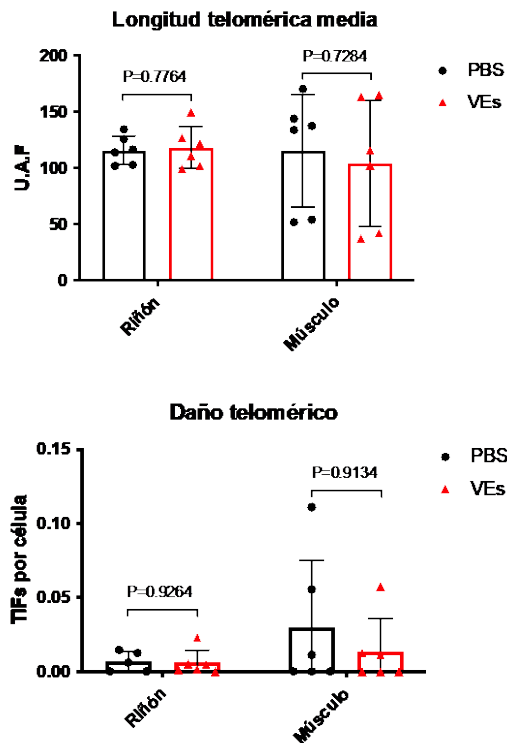


Figura 30: Efecto del tratamiento con VEs derivadas de CMTAs en la longitud y el daño a los telómeros del tejido renal y muscular de ratones viejos.

Para la longitud telomérica media los datos se muestran como unidades arbitrarias de fluorescencia, obtenida a partir del análisis de la fluorescencia de la hibridación *in situ*. Longitud telomérica: PBS riñón n=6, PBS músculo n=6, VEs riñón n=6, VEs

músculo n=6. En el caso del daño al telómero se muestran como el número de foci de daño al telómero por célula. Daño telomérico: PBS riñón n=5, PBS músculo n=5, VEs riñón n=6, VEs músculo n=6.

4.4.3 Efecto del tratamiento sobre la senescencia celular

Las células senescentes se acumulan en la mayoría de los tejidos a medida que el organismo envejece, ejerciendo un efecto negativo sobre la función tisular, ya que estas células no pueden proliferar. Además, estas células liberan numerosos factores (SASP) que actúan en las células vecinas y a distancia, contribuyendo al desarrollo de las condiciones asociadas al envejecimiento (Coppé, Desprez et al. 2010, van Deursen 2014). Para cuantificar la presencia de células senescentes en el tejido renal y muscular, obtuvimos los órganos de los ratones viejos 30 días después del tratamiento con VEs. Realizamos un marcaje mediante inmunofluorescencia de Lamina B1 (LMNB1), una proteína de la membrana nuclear cuya expresión se pierde en las células senescentes (Freund, Laberge et al. 2012). Como se puede observar en la Figura 31, encontramos un importante descenso en el número de células senescentes (~50%) en ambos tejidos de los ratones tratados con VEs derivadas de CMTAs.

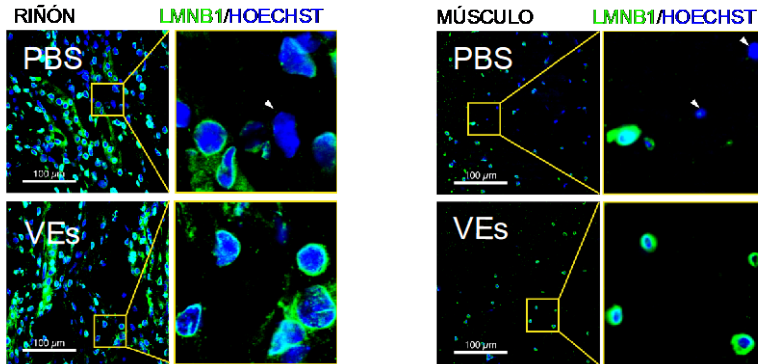
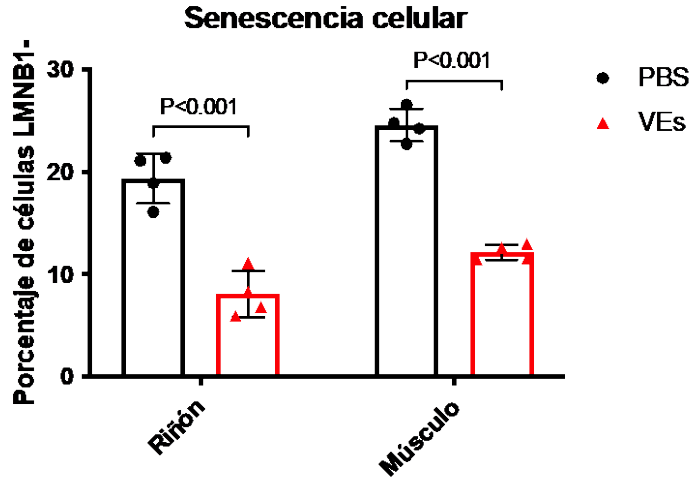


Figura 31: Efecto del tratamiento con VEs derivadas de CMTAs en la senescencia celular del tejido renal y muscular de ratones viejos.

Los datos se muestran como el porcentaje de células sin marcaje perinuclear de la proteína Lamina B1, tanto en tejido renal como muscular. PBS riñón n=4, PBS músculo n=4, VEs riñón n=4, VEs músculo n=4.

4.4.4 Efecto del tratamiento sobre la inflamación muscular

La inflamación crónica es un proceso estrechamente relacionado con el envejecimiento y la senescencia celular, el aumento de citocinas proinflamatorias en los tejidos se ha relacionado con el envejecimiento, la fragilidad y otras enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Franceschi and Campisi 2014). IL-6 es una de las citocinas más estudiadas en este aspecto y forma parte del SASP. Por tanto, cuantificamos la presencia de IL-6 mediante Western Blot en el tejido muscular de los ratones viejos 30 días después del tratamiento con VEs derivadas de CMTAs, observando un descenso de los niveles de esta proteína en los ratones que recibieron el tratamiento (Figura 32).

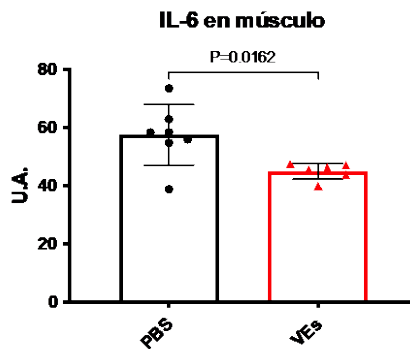


Figura 32: Cuantificación de IL-6 en el tejido muscular de ratones viejos tratados con VEs derivadas de CMTAs.

Los datos se muestran como unidades arbitrarias obtenidas a partir de la densitometría del Western Blot. PBS n=7, VEs n=6.

4.5 Las VEs derivadas de CMTAs disminuyen la senescencia y apoptosis en un modelo *in vitro* de senescencia celular

Dado que observamos un importante efecto sobre la senescencia celular en los ratones, para comprobar el efecto de las VEs en un entorno más controlado desarrollamos un modelo *in vitro* de senescencia celular con células musculares progenitoras (mioblastos C2C12). Para inducir la senescencia de estas células usamos un tratamiento con Palbociclib, un inhibidor del ciclo celular que provoca senescencia. Para determinar la senescencia utilizamos la Beta Galactosidasa, un marcador clásico de senescencia y para la apoptosis la Anexina V, ambas por citometría de flujo.

Como se observa en la Figura 33, los mioblastos sin tratamiento con VEs ni Palbociclib presentaban unos niveles de senescencia y apoptosis muy bajos. Al añadir Palbociclib al medio de cultivo la senescencia aumentaba al 20% y la apoptosis al 7%. En línea con los resultados obtenidos *in vivo*, la senescencia se redujo a un 5% en los mioblastos tratados con Palbociclib y después con VEs. En cuanto a la apoptosis, encontramos una reducción importante en el grupo tratado con VEs, encontrando muy pocas células en apoptosis, de forma similar al grupo control sin Palbociclib.

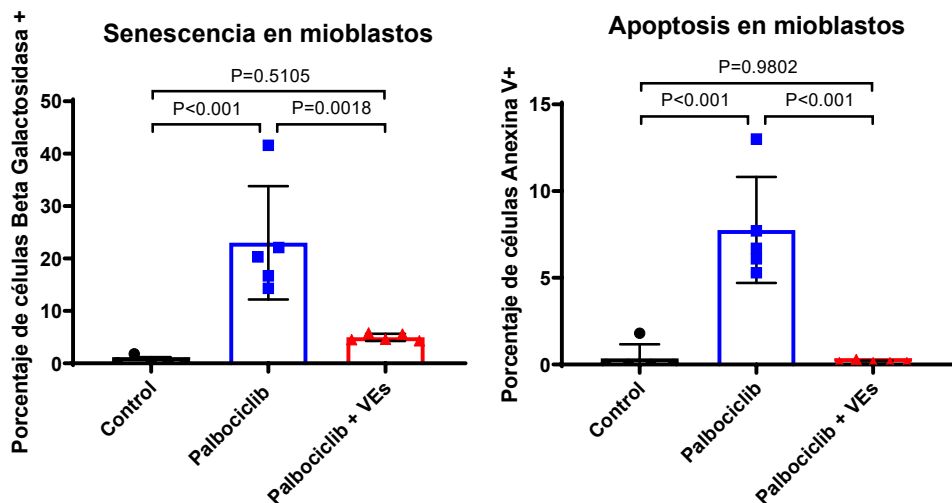


Figura 33: Efecto del tratamiento con VEs derivadas de CMTAs en la senescencia y apoptosis de un cultivo de mioblastos senescentes.

Los datos se muestran como el porcentaje de mioblastos positivos para Beta Galactosidasa en el caso de la senescencia y para Anexina V en el caso de la apoptosis. Control n=5, Palbociclib n=5, Palbociclib + VEs n=5.

4.6 Las VEs derivadas de CMTAs reducen la edad epigenética de los tejidos y actúan sobre procesos biológicos relacionados con el envejecimiento

4.6.1 Efectos del tratamiento sobre la edad epigenética

Para estimar la edad epigenética de un tejido se han desarrollado recientemente “relojes epigenéticos”, estos se basan en funciones matemáticas derivadas del análisis de la metilación de cientos de dinucleótidos CpG, entrenados con miles de muestras de tejidos de diferentes edades, permitiendo estimar la edad biológica de un tejido u organismo concreto. Estos relojes se han desarrollado para múltiples especies animales, siendo la humana y la murina las especies más utilizadas y con mayor evidencia (Horvath 2013, Horvath and Raj 2018).

En nuestro estudio utilizamos múltiples relojes epigenéticos de ratón entrenados en diferentes tejidos para estimar la edad de los ratones tratados con VEs y control. Agrupamos los relojes en dos grupos, los relojes generales fueron entrenados en un amplio rango de animales, mientras que los relojes de intervención se entrenaron en animales tratados con intervenciones que ralentizan la velocidad de envejecimiento, como la restricción calórica o la inhibición de mTOR. Utilizamos un modelo estadístico de efectos mixtos para discernir una tendencia entre los múltiples relojes. En las muestras de tejido renal, la edad estimada de los ratones tratados con VEs derivadas de CMTAs fue significativamente menor tanto en los relojes generales como en los de intervención. De forma similar, las muestras de tejido hepático derivadas de ratones tratados con VEs, ambos relojes mostraron una reducción de la edad estimada, siendo estadísticamente significativo en el caso de los relojes de intervención. En el caso del tejido muscular y el bazo, no se observaron diferencias entre ratones tratados con VEs y control (Figura 34).

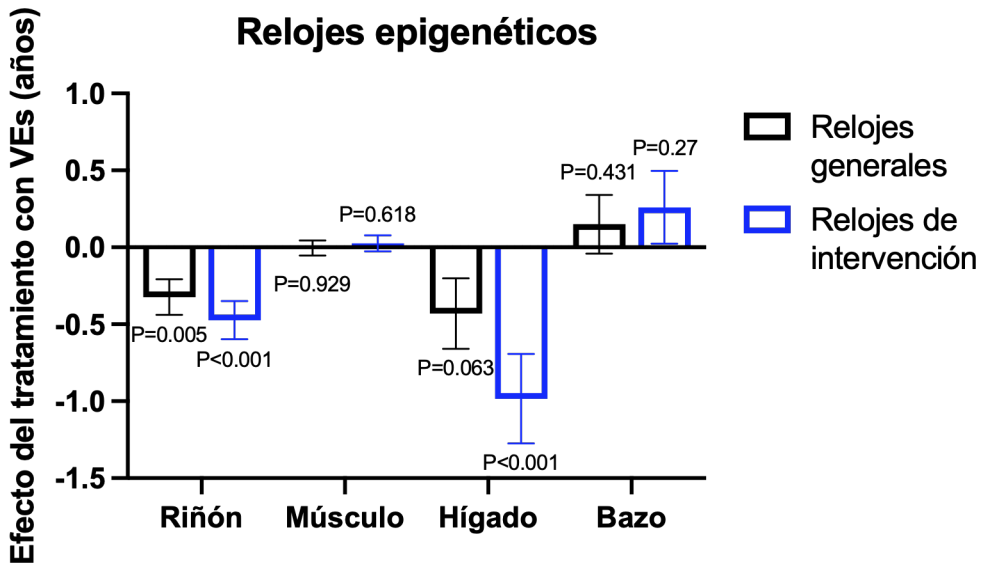


Figura 34: Efecto del tratamiento con VEs derivadas de CMTAs en la edad epigenética estimada mediante relojes epigenéticos en varios tejidos de ratones viejos.

Los datos se muestran como el efecto de la variable tratamiento con VEs sobre la edad epigenética de los distintos tejidos determinada a partir del algoritmo de relojes generales (negro) y de intervención (azul), la magnitud del efecto se muestra en años. Los datos se obtuvieron a partir de un análisis de efectos mixtos. PBS n=6, VEs n=6.

4.6.2 Análisis de enriquecimiento de procesos biológicos basado en la metilación de islas CpG en distintos tejidos de ratones viejos tratados con VEs

A partir del análisis del reloj epigenético de los distintos tejidos se puede obtener las metilaciones de las islas CpG concretas y los genes adyacentes a estas. Para estudiar más a fondo qué genes estaban siendo afectados por el tratamiento con VEs derivadas de CMTAs realizamos un análisis de los *foci* con diferencias estadísticamente significativas (FDR $q < 0,05$) entre los grupos de ratones tratados con VEs y control. El análisis mediante una regresión lineal mostró multitud de *foci*

modificados en los tejidos de ratones tratados: 5546, 36163, 7247 y 11092 en bazo, hígado, riñón y músculo, respectivamente. Asignamos a cada *locus* el gen más cercano y realizamos un análisis de enriquecimiento del conjunto de genes para cada tejido, obteniendo los procesos biológicos más representados (Raudvere, Kolberg et al. 2019).

Los procesos biológicos modificados por el tratamiento con VEs derivadas de CMTAs fueron distintos entre los tejidos, sin embargo, se puede observar una clara tendencia hacia los procesos biológicos relacionados con la proliferación y desarrollo de distintos tejidos, la diferenciación celular, y las vías de desarrollo neuronal y sinápticas, así como la regulación de las uniones celulares (Figura 35)

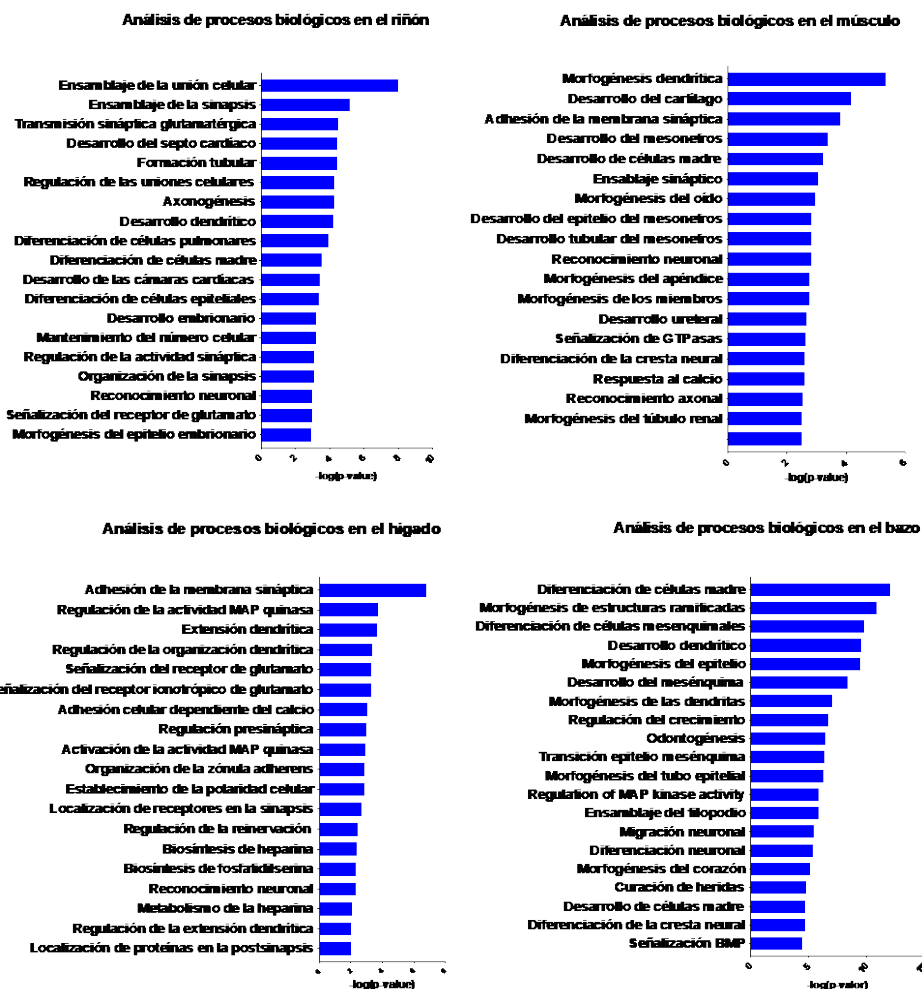


Figura 35: Análisis de enriquecimiento de procesos biológicos a partir de las diferentes citosinas metiladas en el riñón, músculo, hígado y bazo de ratones viejos tratados con VEs derivadas de CMTAs.

Los datos se muestran como los procesos biológicos significativamente enriquecidos a partir de la metilación de las diferentes islas CpG, comparando ambos grupos de tratamiento en los diferentes tejidos, los procesos se encuentran ordenados en base al valor absoluto del logaritmo del p-valor. PBS n=6, VEs n=6.

4.7 El análisis del contenido en microARNs en las VEs revela que los microARNs sobreexpresados en las VEs derivadas de CMTAs jóvenes regulan el desarrollo y la regeneración de los tejidos

Motivados por los resultados obtenidos con el tratamiento con VEs derivadas de CMTAs jóvenes, nos propusimos investigar potenciales factores dentro de las vesículas que estuvieran causando este efecto. De entre todos los factores que se encuentran en las VEs, probablemente los más estudiados sean los microARNs, que además han demostrado ser capaces de regular la transcripción génica en tejidos a distancia (Thomou, Mori et al. 2017).

Para el estudio del contenido en microARNs en las VEs utilizamos un *array* específico de microARNs (Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 Array). Obtuvimos VEs de tres condiciones distintas: del medio de cultivo de CMTAs jóvenes y viejas, y del plasma de ratones viejos. En el análisis, los microARNs con un incremento o disminución en la expresión del 100% y con un p valor menor de 0,01 fueron definidos como diferentes entre los grupos. En total fueron analizados 3196 microARNs.

En primer lugar, realizamos un análisis de componentes principales no dirigido para asegurar que los tres grupos se diferenciaban adecuadamente, este mostró tres grupos bien diferenciados de muestras, que coincidían con las tres condiciones previamente descritas (Figura 36). A partir del análisis del contenido en las VEs derivadas de CMTAs jóvenes obtuvimos varios microARNs con diferencias en su expresión, tanto cuando las comparamos con VEs derivadas de CMTAs viejas (9 microARNs sobreexpresados, 1 infraexpresado), como con VEs derivadas del plasma de ratones viejos (25 microARNs sobreexpresados, 4 infraexpresados) (Figuras 37 y 38). En todas las comparaciones, las VEs derivadas de CMTAs jóvenes mostraban un perfil de expresión de microARNs con una clara tendencia hacia la sobreexpresión de diferentes microARNs.

Análisis de componentes principales

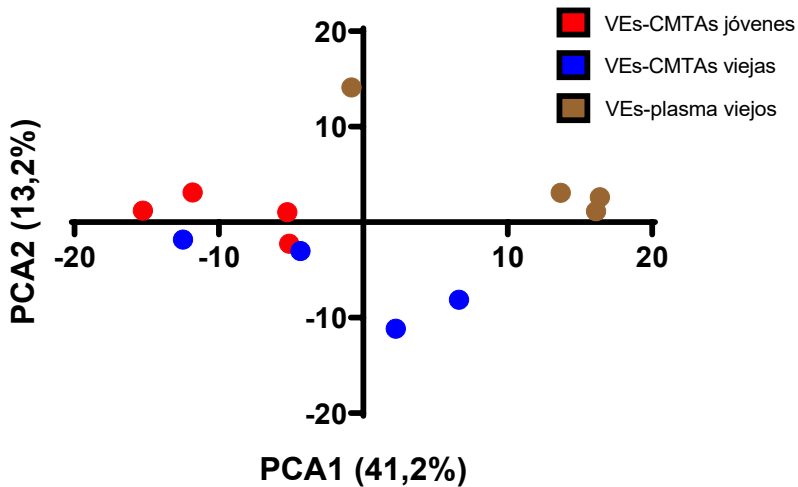


Figura 36: Análisis de componentes principales de los microARNs contenidos en las VEs derivadas de CMTAs jóvenes, CMTAs envejecidas y plasma de ratones viejos.

Los datos se muestran como un análisis de componentes principales no dirigido en dos dimensiones. CMTAs jóvenes $n=4$, CMTAs envejecidas $n=4$, plasma de ratones viejos $n=4$.

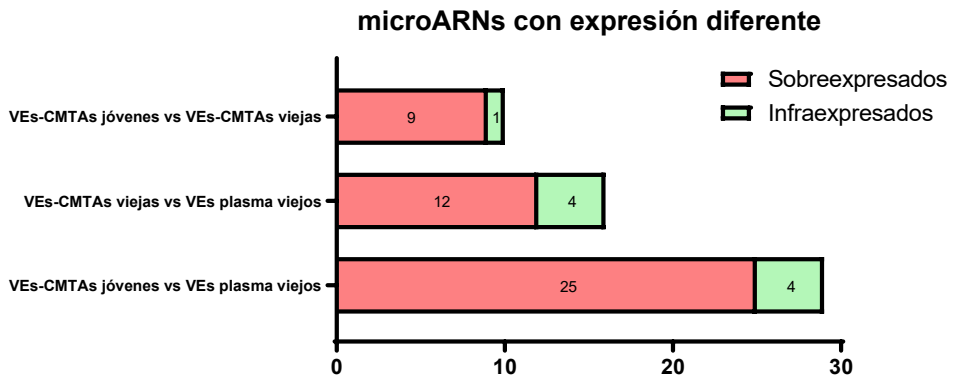


Figura 37: Síntesis de la comparación entre los microARNs con diferente expresión en las VEs derivadas de CMTAs jóvenes, CMTAs envejecidas y plasma de ratones viejos.

Los datos se muestran como el número de microARNs significativamente diferentes entre los grupos de comparación. CMTAs jóvenes n=4, CMTAs envejecidas n=4, plasma de ratones viejos n=4.

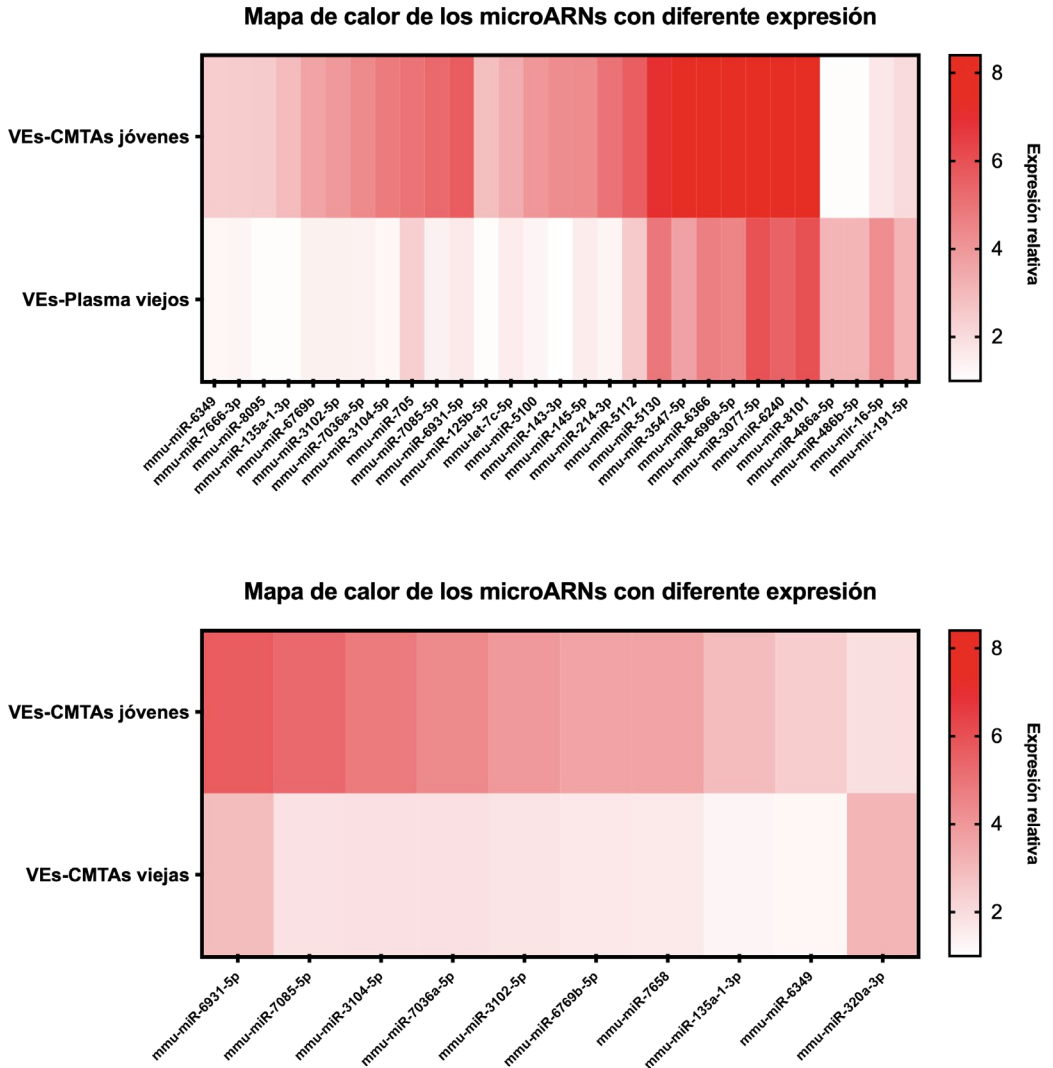


Figura 38: Mapas de calor de los microARNs con diferente expresión entre VEs derivadas de CMTAs jóvenes, CMTAs envejecidas y plasma de ratones viejos.

Los datos se muestran como un mapa de calor de expresión relativa en rojo, siendo lo más cercano al rojo la mayor expresión y lo más cercano al blanco la menor. CMTAs jóvenes n=4, CMTAs envejecidas n=4, plasma de ratones viejos n=4.

Como el tratamiento de este estudio consiste en la inyección intravenosa de VEs en ratones viejos, razonamos que los microARNs sobreexpresados en las VEs derivadas de CMTAs jóvenes y con bajos niveles de expresión en las VEs del plasma de ratones viejos podrían ser, al menos en parte, responsables de los efectos beneficiosos sobre el envejecimiento de las VEs. Por tanto, nos centramos en esta comparación para proseguir con el análisis, usando los 25 microARNs sobreexpresados en las VEs derivadas de CMTAs jóvenes al compararlas con las VEs del plasma de ratones viejos. Para ello exploramos los genes diana de estos 25 microARNs, mediante un algoritmo predictor basado en la secuencia de nucleótidos de los microARNs y la secuencia de ARNm de todos los genes del genoma murino (miRDIP). Nos encontramos con un número demasiado alto de dianas predichas para estos 25 microARNs, por lo que decidimos seleccionar y estudiar los 6 microARNs (destacados en rojo en la Figura 39) más relevantes en sentido biológico, al ser los únicos de los 25 que comparten toda su secuencia de nucleótidos entre las especies animales, incluyendo al humano. La principal razón por la que decidimos utilizar esta clasificación arbitraria de los microARNs es que el envejecimiento y gran parte de los mecanismos moleculares que lo componen se encuentran muy conservados a través de las especies (Smith, Tsuchiya et al. 2008), por lo que dedujimos que, si algún microARN tenía un efecto importante sobre el envejecimiento, debería estar evolutivamente conservado.

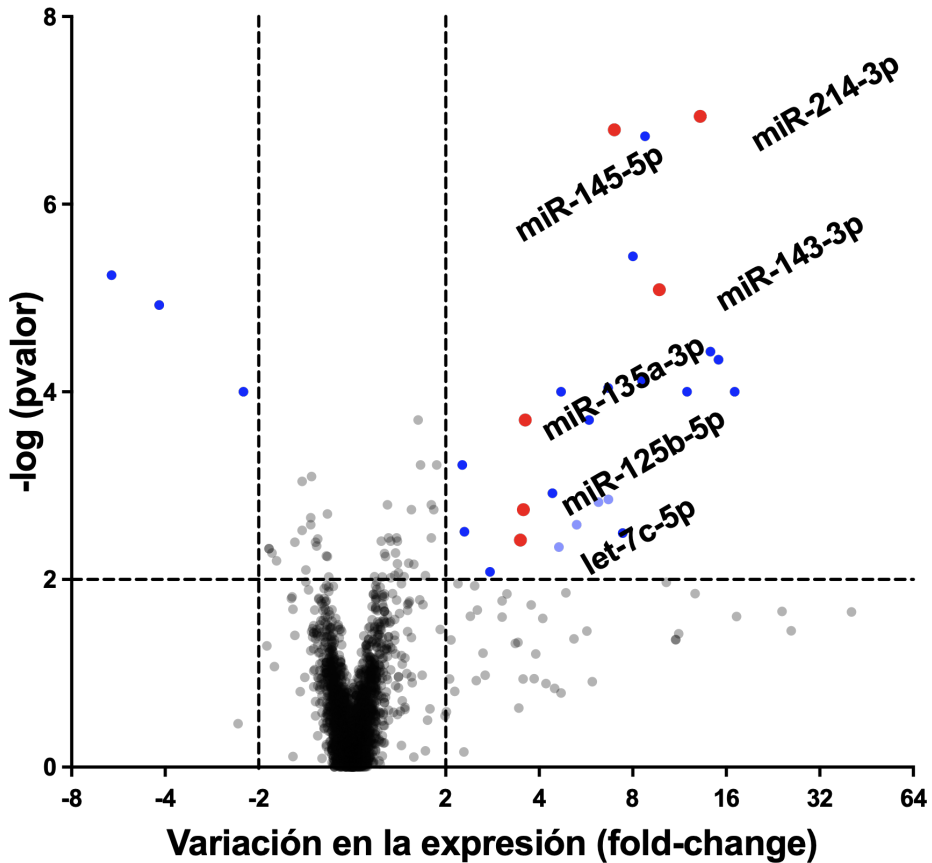


Figura 39: Gráfico volcán de los microARNs con diferente expresión entre las VEs derivadas de CMTAs jóvenes y el plasma de ratones viejos.

En este gráfico el eje de abscisas sitúa cada microARN individual en función de la variación en la expresión entre ambos grupos de comparación, a la izquierda menor expresión en las VEs de CMTAs jóvenes y a la derecha mayor expresión, en comparación con las VEs del plasma de ratones viejos. El eje de ordenadas los sitúa en función del valor absoluto del logaritmo del p-valor (más arriba indica un p-valor menor). Los microARNs con coloración son los que presentan una diferencia en la expresión de al menos 2 o -2 y un p valor menor a 0,01. CMTAs jóvenes n=4, plasma de ratones viejos n=4.

En conjunto, estos 6 microARNs tenían como diana predicha un total de 5379 genes (con muy alta fiabilidad, en el percentil 99 de confianza, presentes en al menos 5 bases de datos seleccionadas por miRDIP). Para estudiar en qué procesos y vías de señalización estaban implicados estos genes, realizamos un análisis de enriquecimiento con PANTHER (Mi, Muruganujan et al. 2013). El resultado obtenido fue que gran parte de los genes diana de nuestros microARNs seleccionados estaban involucrados en la proliferación celular, desarrollo, crecimiento y regeneración de los tejidos, así como vías de desarrollo neuronal y sinápticas. En cuanto a las vías moleculares, estos microARNs regulan importantes vías relacionadas con regeneración tisular, fibrosis e inflamación, como la angiogénesis, vía de Wnt, PDGF, FGF, TGF- β , interleucinas e interferones. Más destacable si cabe, es que estos microARNs tienen como diana vías moleculares críticas dentro del proceso de envejecimiento, como la apoptosis, la vía de p53, la vía de p38, la respuesta al estrés oxidativo y la vía de la insulina/IGF (Figura 40).

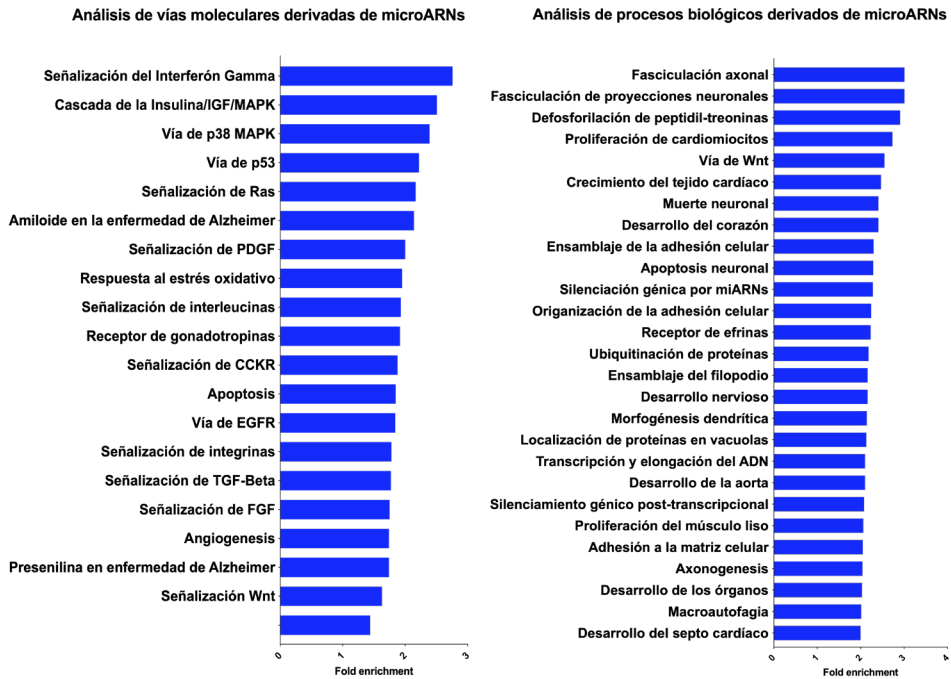


Figura 40: Análisis de vías moleculares y procesos biológicos de los 6 microARNs seleccionados en la comparación entre VEs derivadas de CMTAs jóvenes y plasma de ratones viejos.

Los datos se muestran como las vías moleculares y los procesos biológicos significativamente enriquecidos a partir de las dianas predichas de los microARNs seleccionados, las vías y procesos se encuentran ordenados en base al nivel de enriquecimiento calculado a partir de un análisis de observado/esperado en PANTHER (fold enrichment).

5 DISCUSIÓN

5.1 La restauración de la comunicación intercelular con EVs de ratones jóvenes mejora funciones fisiológicas alteradas con el envejecimiento

Nuestro entendimiento del proceso de envejecimiento ha crecido exponencialmente en las últimas décadas, actualmente conocemos multitud de procesos moleculares y celulares que llevan a un organismo a envejecer (López-Otín, Blasco et al. 2013, Kennedy, Berger et al. 2014). Uno de estos procesos es la alteración de la comunicación entre las células; a medida que un organismo envejece, sus células comienzan a comunicarse peor y a liberar distintos mediadores que contribuyen al envejecimiento, como por ejemplo los factores proinflamatorios (Franceschi, Bonafè et al. 2000, Franceschi and Campisi 2014). De hecho, las modificaciones genéticas que consiguen retrasar o acelerar el envejecimiento de un solo órgano, tienen consecuencias en órganos distantes, retrasando o acelerando el envejecimiento de estos (Tomás-Loba, Flores et al. 2008, Durieux, Wolff et al. 2011, Lavasani, Robinson et al. 2012).

Restaurar la comunicación intercelular defectiva se ha propuesto como una estrategia para contrarrestar los efectos del envejecimiento. La función de las células no solamente depende de factores intrínsecos, si no que existen multitud de factores en el medio extracelular que pueden influir en la quiescencia, diferenciación o senescencia de una célula. Este hecho quedó demostrado mediante los experimentos de parabiosis realizados en animales, en los que se demostró que existían factores en la sangre de los animales jóvenes capaces de mejorar funciones fisiológicas deterioradas en animales envejecidos, como la capacidad de ejercicio o la función cognitiva (Conboy, Conboy et al. 2005, Conboy and Rando 2012). Entre los factores estudiados destacan la proteína GDF11 (miembro de la familia TGF- β) y la oxitocina, que se encuentran disminuidos en el plasma de los animales envejecidos (Loffredo, Steinhauser et al. 2013, Sinha, Jang et al. 2014). Los efectos rejuvenecedores de estos factores han sido estudiados, aunque todavía con resultados

contradictorios, indicando que probablemente el efecto observado en los experimentos de parabiosis dependa de una gran multitud de factores.

La principal hipótesis que explica los efectos beneficiosos de la parabiosis es que la modificación del entorno extracelular en que se encuentran las células progenitoras de los distintos tejidos mejora la función y la capacidad regenerativa de estas. Con el envejecimiento esta capacidad disminuye, antes se creía que solamente eran factores intrínsecos a las células progenitoras lo que causaba este deterioro, como el acortamiento de los telómeros o el daño al ADN. Sin embargo, cuando se implantan células satélite (células progenitoras musculares) provenientes de un organismo envejecido en un organismo joven, estas células son capaces de proliferar y regenerar el tejido (Conboy, Conboy et al. 2005). Al contrario, cuando implantamos células madre jóvenes en un tejido envejecido, su capacidad regenerativa disminuye drásticamente (Villeda, Luo et al. 2011, Chakkalakal, Jones et al. 2012).

Al comienzo del estudio planteamos la hipótesis de que uno de los factores que podrían ser responsables del efecto beneficioso de la parabiosis eran las vesículas extracelulares. Como hemos relatado en la Introducción, estas VEs se encuentran muy implicadas en la comunicación entre las células (Ludwig and Giebel 2012), por lo que probablemente en el fenómeno de la parabiosis exista un intercambio de VEs entre los animales jóvenes y viejos. En el presente estudio, utilizando VEs derivadas de CMTAs de animales jóvenes, encontramos resultados similares a los obtenidos en los experimentos clásicos de parabiosis, mejorando parámetros afectados por el envejecimiento como la fuerza muscular, la coordinación motora, la función renal o la regeneración del pelaje, consiguiendo una menor fragilidad de los animales tratados. El mayor cambio lo encontramos en la coordinación motora, donde observamos una mejoría del 72% en el tiempo de la prueba 30 días tras el tratamiento con VEs, en el resto de los parámetros físicos observamos diferencias más modestas, aunque significativas. En cuanto a la función renal, más que un efecto de mejoría del filtrado renal, encontramos un efecto de protección, ya que los animales del grupo

control mostraban un empeoramiento progresivo de la función renal, mientras que el grupo tratado mantenía los mismos niveles que al comienzo del experimento. Atendiendo al pelaje, a parte de una mayor velocidad y área de regeneración en los animales tratados con VEs, encontramos un efecto no cuantificado en cuanto a la coloración de este pelaje. Los animales tratados con VEs mostraban una pigmentación del pelaje más oscura en comparación con los animales control, que presentaban una mayor pérdida de la pigmentación. El efecto observado sobre la regeneración del pelaje confirma los resultados obtenidos en 2010 por Won y colaboradores, donde demostraron que las CMTAs son capaces de mejorar la regeneración del pelaje de manera paracrina, sin identificar los factores responsables (Won, Yoo et al. 2010). En nuestro estudio hemos comprobado que las VEs derivadas de estas células son capaces de mejorar la regeneración por sí mismas. Por tanto, demostramos que parte del efecto beneficioso del fenómeno de parabiosis, podría ser debido a las VEs, que son un elemento mucho más concreto que la sangre entera.

La fragilidad es una entidad clínica que en humanos se basa principalmente en las aptitudes físicas. Se han desarrollado multitud de modelos de fragilidad basándose en parámetros físicos y otros como los psicológicos. La fragilidad fue definida por Linda Fried en 2001 como un fenotipo que predecía un alto riesgo de caídas, dependencia, hospitalización y muerte (Fried, Tangen et al. 2001). En nuestro grupo se desarrolló previamente una prueba adaptada para ratones basada en 5 criterios, y es la que utilizamos para estimar el porcentaje de ratones frágiles en cada grupo de estudio (Gomez-Cabrera, Garcia-Valles et al. 2017). De todos los ratones tratados con VEs, ninguno cumplía 3 o más criterios de fragilidad, que es lo que define a un animal como frágil, mientras que el 40% de los animales del grupo control eran frágiles. Estos resultados están en concordancia con estudios previos realizados con ratones de edad avanzada, en los que se observó un porcentaje similar de fragilidad (Arc-Chagnaud, Salvador-Pascual et al. 2021).

Para valorar un posible efecto tóxico del tratamiento con VEs, nos basamos en un aspecto cuantitativo como es la pérdida de peso tras el tratamiento. Dado que el experimento conlleva la inyección intravenosa de las VEs, la depilación de una zona del pelaje y la realización de pruebas físicas, tanto el grupo control como el grupo de estudio perdieron peso desde el comienzo. No encontramos diferencias significativas en la pérdida de peso entre ambos grupos, siendo ligeramente menor en el grupo tratado con VEs. Tampoco encontramos diferencias cualitativas en el número de tumores que presentaban los ratones tras el sacrificio. En cuanto a un posible rechazo de las vesículas, no observamos ninguna reacción tras la inyección, aunque al cultivar las células con suero procedente de otra especie, parece importante realizar un adecuado lavado de las VEs previo a la inyección.

Aunque las VEs utilizadas en este estudio provienen de un solo tipo celular de un organismo joven (las CMTAs), conseguimos una mejora de las funciones fisiológicas de los ratones, lo que estrecha el círculo en cuanto a las posibles moléculas que están causando el efecto beneficioso. En los estudios previos había que analizar todo el contenido del plasma para buscar posibles factores “rejuvenecedores” (Loffredo, Steinhauser et al. 2013), mientras que en nuestro estudio nos centramos únicamente en las VEs provenientes de un tipo celular concreto. Este resultado cobra más sentido si atendemos al estudio publicado por Thomou et al. en 2017, en el que describen al tejido adiposo como una fuente muy importante de VEs circulantes en el plasma, capaces de regular la expresión génica en tejidos distantes como el hígado, mediante la liberación de microARNs en las VEs (Thomou, Mori et al. 2017).

La edad del organismo del que se obtienen las CMTAs es crucial para el efecto beneficioso de las VEs, esto queda demostrado en un estudio piloto que realizamos, en el cual inyectamos VEs derivadas de CMTAs obtenidas de animales envejecidos. Estas células, al provenir de un organismo ya envejecido, liberaban VEs que no eran capaces de promover el mismo efecto beneficioso sobre el estado físico de los

ratones que las VEs jóvenes. Estos resultados concuerdan con los estudios previos sobre parabiosis, donde al conectar dos organismos de similar edad, no se encontraba ningún efecto en el envejecimiento (Conese, Carbone et al. 2017).

En cuanto a la temporalidad del efecto de las VEs, nuestros resultados demuestran que es algo finito. Los efectos comienzan a observarse a las dos semanas del tratamiento con VEs, donde encontramos la mejoría en la regeneración del pelaje, función renal y fuerza de agarre. A los 30 días es donde encontramos el mayor efecto, con una diferencia significativa en todas las pruebas físicas y en la función renal, por lo que decidimos analizar los tejidos en profundidad justo 30 días después de la primera inyección de VEs. Sin embargo, dejamos sin sacrificar algunos de los animales tratados con VEs, para estudiar la duración máxima del efecto. Encontramos una pérdida del efecto beneficioso en las pruebas físicas 60 días después del tratamiento, indicando un límite temporal en el efecto de las VEs. Estos resultados se encuentran en línea con otros estudios relacionados con la parabiosis, donde dependiendo de la duración de esta, el efecto observado es mayor o menor y su duración se ve alterada (Conboy and Rando 2012, Lever, Yang et al. 2018).

Por tanto, restaurar la comunicación intercelular mediante factores circulantes externos, en este caso las VEs derivadas de CMTAs, consigue prevenir la fragilidad y mejorar múltiples funciones fisiológicas que se afectan en el envejecimiento.

5.2 Las VEs derivadas de CMTAs promueven la regeneración tisular en el envejecimiento

Una de las características de los organismos envejecidos es la pérdida de la capacidad regenerativa de los diferentes tejidos (Khan, Singer et al. 2017). Conseguir una mejor regeneración tisular ha sido uno de los principales objetivos tanto del estudio del envejecimiento como de multitud de enfermedades que cursan con un deterioro de los tejidos. La utilización de células madre o progenitoras, por su capacidad de división asimétrica, ha sido muy estudiada en medicina regenerativa, ya que somos capaces de extraerlas, cultivarlas, y más tarde implantarlas en un órgano o tejido para conseguir repoblarlo. De hecho, estas células madre, en especial las hematopoyéticas, se utilizan hoy en día para tratar algunas afecciones como la anemia aplásica o las leucemias (Copelan 2006).

Existen varios problemas a la hora de aplicar la terapia con células madre en los humanos, el principal es el riesgo de aneuploidía y posterior formación de tumores, otros factores son el rechazo, la dosificación o la conservación de las células (Caplan and Correa 2011). Esto no ha impedido descubrir, en modelos animales y también en algún ensayo con humanos, que las células madre tienen efectos beneficiosos sobre la regeneración tisular. Cuando inyectamos células madre mesenquimales en un organismo, mejora la regeneración de diferentes tejidos (Chen, Tredget et al. 2008, Caplan and Correa 2011, Tompkins, DiFede et al. 2017). Anteriormente se creía que las células se dirigían al órgano dañado y conseguían diferenciarse y repoblar ese tejido, sin embargo, estudios posteriores demostraron que tras la inyección de células madre, solamente un pequeño porcentaje (1-2%) siguen vivas tras una semana, y que estas células no tienen una especial predilección por ningún tejido concreto (Müller-Ehmsen, Whittaker et al. 2002, Toma, Wagner et al. 2009, Eggenhofer, Benseler et al. 2012).

Estos hallazgos hicieron pensar que de alguna forma las células madre liberaban factores sistémicos que asistían a las células madre del huésped y mejoraban la capacidad regenerativa intrínseca. Uno de estos factores son las VEs, y de hecho se ha demostrado que las VEs derivadas de distintos tipos de células madre son capaces de mejorar la regeneración tisular tras un daño (Linero and Chaparro 2014, Tan, Lai et al. 2014, Doeppner, Herz et al. 2015, Hu, Wang et al. 2016, Choi, Seo et al. 2018). No obstante, el efecto de estas VEs sobre la regeneración de órganos y tejidos envejecidos fisiológicamente no estaba clara.

En este trabajo hemos podido observar que las VEs derivadas de CMTAs jóvenes son capaces de promover la regeneración tisular en dos órganos muy importantes en el envejecimiento, como son el riñón y el músculo.

5.2.1 Efectos sobre el tejido renal

El riñón es un órgano muy afectado durante el envejecimiento, entre otras razones, porque su unidad funcional, la nefrona, no puede regenerarse por completo. El número de nefronas funcionales con el que nacemos va disminuyendo con la edad. Además, la fibrosis del espacio intersticial va aumentando con la edad, contribuyendo de manera negativa a la función renal (Denic, Glasscock et al. 2016). Dentro de una nefrona encontramos los glomérulos y los túbulos, los glomérulos no pueden regenerarse tras un daño, el epitelio de los túbulos sí. Tras un daño tubular, existen poblaciones de células renales que son capaces de dividirse y regenerar los túbulos dañados (Berger, Bangen et al. 2014).

Al estudiar la estructura histológica de los riñones de los animales tratados con VEs, descubrimos que los ratones tratados presentaban una densidad tubular mucho mayor, así como una menor dilatación tubular. Los ratones control mostraban una atrofia tubular con dilatación tubular generalizada, algo característico del envejecimiento del tejido renal (Denic, Glasscock et al. 2016, Khan, Singer et al.

2017). Mientras que no encontramos cambios en la densidad glomerular, algo que era esperable, ya que los animales adultos no pueden crear nuevos glomérulos.

Pensamos por tanto que las vesículas inducían la proliferación de las células del túbulo renal, algo que confirmamos con un marcaje con Ki67, una proteína presente en el núcleo de células en división. Los túbulos de los ratones tratados con VEs mostraban una población de células en división que no estaba presente en los túbulos de los ratones control. La proliferación en los ratones control era similar a estudios previos en animales envejecidos, en los que las células en división en los túbulos son un porcentaje muy bajo del total (Baar, Brandt et al. 2017).

Esta mejora en la regeneración del tejido renal mediante VEs derivadas de distintos tipos de células madre se ha descrito en modelos animales de daño renal agudo (como la isquemia-reperfusión) (Collino, Bruno et al. 2015, Bruno, Tapparo et al. 2017), sin embargo, nunca se había demostrado una mejora en la regeneración del tejido renal en animales envejecidos fisiológicamente. Este hecho cobra sentido si entendemos el envejecimiento como una acumulación de distintos tipos de daño, que no consiguen repararse totalmente.

Al cuantificar la fibrosis del espacio intersticial renal, encontramos una disminución no significativa en el grupo de ratones tratados, esta fibrosis acompaña al envejecimiento en diferentes tejidos, entre ellos el riñón. La principal limitación en el estudio de la fibrosis es que en nuestro caso los animales del grupo control ya presentaban niveles bajos de fibrosis intersticial, con lo que era difícil mejorar la cantidad de fibrosis con las VEs, aunque sí se ha descrito un papel anti-fibrótico, tanto de las células madre mesenquimales, como de las VEs que liberan (He, Wang et al. 2012, Li, Yan et al. 2013, Grigorian-Shamagian, Liu et al. 2017).

5.2.2 Efectos sobre el tejido muscular esquelético

Otro de los tejidos que más afecta a la funcionalidad del individuo durante el envejecimiento es el músculo, tanto la fragilidad como la sarcopenia son entidades que afectan en una gran medida a las personas más envejecidas (Doherty 2003, Lauretani, Russo et al. 2003). De hecho, la fuerza de agarre es uno de los mejores predictores de mortalidad y dependencia en humanos (Sasaki, Kasagi et al. 2007). Dado que durante el estudio habíamos encontrado una importante mejora en el estado físico de los ratones, quisimos comprobar si las VEs inducían algún cambio estructural en el músculo. Para ello obtuvimos el gastrocnemio de los ratones y medimos el área media de las fibras musculares en cortes histológicos transversales, obteniendo un área media mayor en los ratones tratados con VEs. Este área es un buen marcador de la masa muscular de los animales, y va disminuyendo con la edad (Lauretani, Russo et al. 2003). Además, medimos la cantidad de proteínas en el tejido muscular por peso seco total, obteniendo una mayor concentración proteica en los músculos de los animales tratados con VEs. Este es un marcador mucho menos utilizado, pero la principal hipótesis es que los ratones tratados, al tener una mayor masa muscular, podrían presentar una distribución tisular diferente, a favor de tejido muscular y en contra del adiposo, que presenta menor densidad proteica y se acumula con el envejecimiento y el desuso (Lauretani, Russo et al. 2003, Siu, Pistilli et al. 2008).

El músculo es un tejido que presenta una población de células progenitoras, conocidas como células satélite, que se activan tras un daño y son capaces de regenerar algunas fibras, sin embargo, la principal fuente de crecimiento muscular es la hipertrofia sin hiperplasia. Nuestra principal hipótesis es que las VEs aumentan la masa muscular de los ratones tratados por varios motivos. En primer lugar, como en el riñón, las VEs probablemente asistan en la regeneración tisular promoviendo su crecimiento. En segundo lugar, incluimos el posible sesgo de la actividad física, ya que hemos observado que subjetivamente los ratones tratados presentan mayor

movilidad espontánea, lo que podría contribuir a una mayor masa muscular por un mayor uso del sistema musculoesquelético. Estos resultados son similares a los obtenidos en modelos de isquemia-reperfusión en otros tejidos, en los que las VEs mejoran la regeneración tisular (Zhang, Chopp et al. 2015), aunque en ninguno de los estudios previos con VEs se había observado un beneficio estructural en el tejido muscular de animales envejecidos fisiológicamente.

En términos generales, en este estudio demostramos que las VEs derivadas de CMTAs jóvenes inducen una regeneración en el tejido renal y muscular de animales envejecidos, revirtiendo los cambios estructurales asociados al envejecimiento en esos tejidos.

5.3 Los rasgos moleculares del envejecimiento disminuyen en el tejido renal y muscular de los ratones tratados con VEs

Tras hallar un beneficio en las funciones fisiológicas y en la estructura de los tejidos de los animales tratados con VEs, quisimos investigar si estos cambios se acompañaban de una mejoría en los marcadores moleculares típicamente asociados al envejecimiento. Dentro de estos marcadores estudiamos el estrés oxidativo, los telómeros y la senescencia celular (López-Otín, Blasco et al. 2013).

5.3.1 El estrés oxidativo disminuye en el músculo de los ratones tratados con VEs

El estrés oxidativo fue una de las primeras propuestas como causa fundamental del envejecimiento, con multitud de trabajos corroborando el hecho de que el estrés oxidativo aumenta con la edad y causa un daño a las macromoléculas, que, de no ser reparado, se acumula dando lugar a múltiples condiciones que se asocian al envejecimiento (Harman 1956, Sies 1985). En las últimas dos décadas esta teoría ha sufrido cambios, principalmente debido a los estudios que mostraban un aumento de la longevidad con el aumento de las ROS en levaduras y *C. Elegans* (Doonan, McElwee et al. 2008, Van Raamsdonk and Hekimi 2009, Mesquita, Weinberger et al. 2010). También se han realizado estudios en ratones modificados genéticamente en los que un aumento de las ROS mitocondriales no acelera el envejecimiento, y de la misma forma, animales con defensas antioxidantes aumentadas no presentan una longevidad mayor (Van Remmen, Ikeno et al. 2003, Zhang, Ikeno et al. 2009). Estos resultados se explican en parte si entendemos que las ROS tienen un rol fundamental en la señalización intracelular, siendo necesarias para la respuesta ante estímulos fisiológicos y en situaciones de estrés. Teniendo todo esto en cuenta, sí que queda claro que, en el envejecimiento, una vez el estrés oxidativo sobrepasa las defensas del organismo, agrava el daño a las macromoléculas y va en detrimento de la función celular y tisular.

Para estudiar como afectaba el tratamiento con VEs al daño oxidativo en los tejidos, cuantificamos los niveles de oxidación en dos macromoléculas: lípidos y proteínas. El daño oxidativo a los lípidos parece contribuir al envejecimiento de los tejidos ya que disminuye la fluidez de las membranas celulares, formadas en gran parte por lípidos, afectando a su función. Como hemos explicado previamente, el MDA es un producto formado tras la peroxidación de distintos lípidos, en especial los poliinsaturados. En nuestro estudio, encontramos una disminución en los niveles de MDA en el músculo de los animales tratados con VEs en comparación con los controles, sin encontrar diferencias en los niveles de MDA en el tejido renal. Existe un mayor número de trabajos en los que se correlaciona un aumento más o menos lineal de los niveles de MDA en el músculo con el envejecimiento y la atrofia por desuso (Yagi 1987, Marzani, Felzani et al. 2005, Siu, Pistilli et al. 2008), existiendo datos contradictorios en el tejido renal (Gomes, Simão et al. 2009, Alabarse, Salomon et al. 2011, Li, Chen et al. 2012, Uzun, Korkmaz et al. 2013). En la orina, la concentración de MDA aumenta con la edad, probablemente como mecanismo de defensa de las células tubulares, que de esta forma evitan la acumulación de lípidos oxidados en el interior celular (Gomes, Simão et al. 2009, Small, Coombes et al. 2012). Esto podría explicar la diferencia en el efecto de las VEs sobre los parámetros de peroxidación lipídica entre ambos tejidos.

En segundo lugar, estudiamos la oxidación de las proteínas mediante la cuantificación de los grupos carbonilos, que se forman tras la oxidación proteica. En este caso encontramos resultados superponibles a los obtenidos en peroxidación lipídica, observando un descenso de la oxidación proteica en el músculo de los animales tratados con VEs, y sin diferencias en el tejido renal. De igual forma, encontramos numerosos trabajos en los que se describe un aumento de la oxidación proteica en el músculo con la edad y la atrofia (Lourenço Dos Santos, Baraibar et al. 2015, Barreiro 2016). En el tejido renal existe controversia, ya que existen estudios en los que la oxidación proteica no solo no aumenta con la edad si no que disminuye,

los autores proponen una menor tasa de consumo de oxígeno en el tejido renal atrófico como causa de este efecto (Alabarse, Salomon et al. 2011, Melchiorretto, Zeni et al. 2020). Por tanto, en nuestro estudio encontramos un efecto de disminución del daño oxidativo en el músculo de los animales tratados con VEs, mientras que no encontramos diferencias en cuanto a estos marcadores en el tejido renal. La principal explicación a este fenómeno es que tanto la peroxidación lipídica como la oxidación proteica no se comportan de una manera lineal con el envejecimiento en el riñón, mientras que parecen seguir un patrón más lineal en el músculo.

5.3.2 La longitud y el daño a los telómeros no se ven modificados en los tejidos de los ratones tratados con VEs

Otro de los cambios moleculares que se suceden con el envejecimiento es la alteración de los telómeros, en especial el acortamiento y el daño a los mismos (Blasco 2007). Por su incapacidad para replicarse en la mayoría de las células adultas debido a la ausencia de telomerasa, estos extremos de los cromosomas son particularmente susceptibles a distintos tipos de daño. Además, el acortamiento progresivo de los telómeros es una de las claves del envejecimiento en multitud de especies, ya que, en cada división, las células acortan los telómeros, que, llegado un límite, llevan a la muerte celular o a la senescencia (Herrera, Samper et al. 1999, Blasco 2007). En colaboración con el laboratorio de la Dra. María A. Blasco, quisimos estudiar el efecto en la longitud y el daño a los telómeros del tratamiento con VEs en el tejido renal y muscular de los ratones, como posible mediador del efecto beneficioso sobre la función del tejido. Como hemos mostrado, no encontramos diferencias entre los ratones tratados con VEs en cuanto a la longitud y el daño a los telómeros. Por tanto, pensamos que el efecto de las VEs no está relacionado con un aumento de la longitud telomérica. Estos resultados están de acuerdo con otros experimentos previos de parabiosis, en los que tampoco encontraban efecto sobre la longitud telomérica en los animales sometidos a este proceso, encontrando múltiples beneficios en otros parámetros (Zhang, Zhao et al.

2018). Una de las posibles explicaciones a este fenómeno es que, al cuantificar la longitud de todas las células del tejido, se pierda el efecto sobre las células donde más actúan las VEs: las células madre y progenitoras. Esto abre la posibilidad de explorar más adelante el efecto de las VEs en los telómeros de las células madre.

Otra posible explicación es que la longitud telomérica medida en un punto temporal concreto no es el mejor marcador de la edad biológica de un tejido. De hecho, no es la longitud del telómero lo que predice una longevidad mayor en una especie, ya que por ejemplo los ratones poseen telómeros más largos que los humanos y viven mucho menos tiempo. Es la velocidad a la que los telómeros se acortan y no su longitud lo que determina la longevidad de una especie (Whittemore, Vera et al. 2019). Por tanto, un estudio longitudinal en el que se mida la longitud telomérica antes y después del tratamiento con VEs, podría ser más aclaratorio en cuanto al efecto de las VEs sobre los telómeros.

Por otro lado, encontramos el efecto neutro de las VEs sobre el daño al telómero, en este caso, en nuestro estudio encontramos niveles basales de daño al telómero muy bajos tanto en el tejido renal como muscular. Creemos que, al estudiar animales con un envejecimiento fisiológicos, no sometidos a un estrés adicional, es difícil encontrar diferencias en cuanto al daño al telómero. Probablemente serían necesarios estudios con un estrés adicional que provoque un mayor daño a los telómeros para poder observar el efecto de las VEs.

5.3.3 El tratamiento con VEs disminuye la senescencia celular en el tejido renal y muscular mediante un efecto senomórfico

Las células senescentes se acumulan en los tejidos a medida que un organismo envejece por distintos mecanismos, entre ellos una mayor formación de estas células por distintos daños a macromoléculas, pero también existe una menor eliminación de estas, ya que el sistema inmune encargado de esta tarea comienza a funcionar

peor en el envejecimiento (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007, Wang, Jurk et al. 2009, Campisi 2013). Desde el nacimiento encontramos células senescentes en un organismo, teniendo una función importante en el desarrollo, la reparación tisular y la respuesta inmune (Kuilman, Michaloglou et al. 2010). La acumulación excesiva de estas células es la que contribuye en muchos aspectos al deterioro de la función observado durante el envejecimiento normal. Por un lado, las células senescentes son células que han perdido la capacidad de proliferar y por tanto no contribuyen a la regeneración tisular, por otro, estas células liberan multitud de factores al medio extracelular (término acuñado como SASP por sus siglas en inglés) que agravan el fenotipo asociado al envejecimiento, causando una mayor inflamación crónica, una senescencia paracrina y aumentando el riesgo de desarrollo de tumores (Coppé, Desprez et al. 2010). Como hemos explicado en la introducción, se están desarrollando moléculas que consiguen eliminar específicamente estas células senescentes del organismo, mediante la inducción de la apoptosis (Zhu, Tchkonja et al. 2015). Estos fármacos senolíticos han conseguido mejorar multitud de parámetros asociados al envejecimiento y en la actualidad son probablemente las moléculas más prometedoras para tratar las enfermedades asociadas al envejecimiento (Kim and Kim 2019).

Existen varios marcadores de senescencia que identifican concretamente a estas células, entre ellos la enzima β -galactosidasa es el marcador más usado (Dimri, Lee et al. 1995). El problema es que, al depender de una actividad enzimática, es difícil de cuantificar en cortes histológicos de tejidos, especialmente si estos han sido fijados. Para solventar este problema se han desarrollado otros marcadores de senescencia, en este trabajo utilizamos la proteína Lamina B1, una proteína que forma parte de la membrana nuclear y que su expresión se reduce al mínimo cuando una célula entra en estado de senescencia (Freund, Laberge et al. 2012). Por tanto, las células cuya membrana nuclear carece de Lamina B1, pueden ser identificadas como senescentes. En este estudio observamos una importante reducción en el número de células senescentes tanto en el riñón como en el músculo de los animales

tratados con VEs, algo que se había demostrado en otros tejidos con VEs provenientes de fibroblastos (Fafián-Labora, Rodríguez-Navarro et al. 2020). Esto se acompañaba de un descenso en IL-6 en el músculo, una de las proteínas más importantes del SASP.

Las VEs contienen una gran cantidad de factores y el efecto sobre la senescencia probablemente sea multifactorial, actuando sobre varias vías moleculares. Para tratar de aclarar cuál era el papel de las VEs sobre la senescencia diseñamos un experimento *in vitro* con células progenitoras musculares (mioblastos C2C12). En primer lugar, provocamos la senescencia del cultivo de mioblastos con Palbociclib, un fármaco inhibidor del ciclo celular que causa senescencia mediante la inhibición de CDKN2A. Después tratamos las células con VEs derivadas de CMTAs jóvenes y observamos un efecto similar al obtenido *in vivo*, el tratamiento con VEs reducía de manera importante la senescencia de las células progenitoras musculares.

Dado que los fármacos senolíticos actúan promoviendo la apoptosis de las células senescentes, cuantificamos la apoptosis en el cultivo celular para estudiar si las VEs actuaban como senolíticos. Sin embargo, descubrimos una reducción importante de la apoptosis en el cultivo, lo cual nos confirmaba que las VEs no tienen un efecto senolítico y deben reducir la senescencia por otro mecanismo. La principal hipótesis es que las VEs tienen un efecto senomórfico, este término recientemente descrito hace referencia a la capacidad de algunos factores de reducir la senescencia sin causar la muerte por apoptosis de las células senescentes (Kim and Kim 2019). Probablemente mediante un mecanismo que consiste en el cambio en los factores del espacio extracelular, que de alguna forma inhiben el SASP, consiguiendo una menor senescencia paracrina, que a su vez reduce el número de células senescentes. Este mecanismo de acción ya ha sido propuesto para las VEs (Dorronsoro, Santiago et al. 2021). Por otra parte, como pudimos observar en el tejido renal, las VEs inducen la regeneración tisular, lo que contribuye a tener un mayor porcentaje de células con el ciclo celular activo y reducir el porcentaje de células senescentes.

En resumen, encontramos un efecto muy marcado de las VEs sobre la senescencia celular, reduciendo el número de estas células tanto en el estudio *in vivo* como *in vitro*. Las VEs no tienen efecto senolítico, ya que no inducen la apoptosis selectiva de las células senescentes, si no que el efecto es probablemente senomórfico, disminuyendo la liberación de factores nocivos asociados a la senescencia al espacio extracelular (SASP), consiguiendo una menor acumulación de estas células.

5.4 El tratamiento con VEs modifica el epigenoma de los tejidos y reduce su edad epigenética

Una vez habíamos descubierto que las VEs tenían un efecto beneficioso en la función, estructura y marcadores moleculares del tejido renal y muscular, quisimos estudiar el efecto global de estas VEs mediante una aproximación basada en el uso de los relojes epigenéticos. Los relojes epigenéticos se basan en modelos matemáticos entrenados con miles de muestras de tejidos de distintas edades, en los que se estudia la metilación del ADN en las islas CpG (Horvath 2013, Weidner, Lin et al. 2014). El cambio en la metilación parece seguir un patrón más o menos lineal en los tejidos, y mediante el análisis de la metilación global del ADN, se puede deducir la edad epigenética de ese tejido o célula, correlacionándose muy bien con la edad cronológica. El primer reloj que se desarrolló fue el descrito por Steve Horvath en 2013, basado en la metilación de 353 islas CpG, y es el más utilizado en la actualidad (Horvath 2013, Horvath and Raj 2018). Desde su desarrollo, este reloj se ha usado en multitud de estudios relacionados con el envejecimiento, y varias intervenciones clásicas como la inhibición de mTOR o la restricción calórica han demostrado disminuir la edad epigenética de los tejidos (Wang, Tsui et al. 2017). Además, la edad epigenética parece correlacionarse con la edad biológica, ya que este reloj puede predecir el desarrollo de distintas enfermedades asociadas al envejecimiento e incluso la mortalidad (Fransquet, Wrigglesworth et al. 2019). Inicialmente el reloj epigenético se desarrolló para su uso en tejidos humanos, pero dada la necesidad de uso de modelos preclínicos, se han desarrollado para múltiples especies, entre ellas, la más usada es *Mus musculus* (Petkovich, Podolskiy et al. 2017).

En este estudio realizamos un análisis en colaboración con el Dr. Steve Horvath de la metilación del ADN en cuatro tejidos diferentes: riñón, músculo, hígado y bazo. Estos cuatro tejidos poseen relojes epigenéticos bien establecidos en ratones (Petkovich, Podolskiy et al. 2017). Obtuvimos resultados estadísticamente

significativos en dos de estos tejidos, el riñón y el músculo, observando una disminución de la edad epigenética de estos tejidos. Estos resultados indican un efecto pleiotrópico de las VEs, ya que para modificar el reloj epigenético es necesario cambiar el patrón de metilación de cientos de genes.

Utilizamos dos tipos de relojes epigenéticos, uno general, que describe la edad epigenética en base a un algoritmo basado únicamente en la edad cronológica, y otro de intervenciones (“Interventions Clock”). Este último reloj se basa en un algoritmo modificado por el propio Horvath atendiendo a intervenciones que ya han demostrado ser capaces de actuar sobre el envejecimiento, como la restricción calórica o la inhibición de mTOR, con lo que se consigue un reloj mucho más sensible a los cambios en el epigenoma inducidos por intervenciones basadas en la biología del envejecimiento. La disminución de la edad epigenética fue más marcada si usamos estos últimos relojes de intervención, tanto en el hígado como en el riñón, sugiriendo un efecto similar de las VEs al de otras intervenciones en el envejecimiento. Estos resultados se encuentran en línea con los obtenidos en cuanto a la función, estructura y marcadores moleculares, especialmente en el riñón.

Cuantitativamente hablando, los datos en ambos tejidos son de una magnitud muy importante, ya que la edad epigenética de riñón disminuye unos 6 meses con el tratamiento en ambos tipos de reloj epigenético, si tenemos en cuenta que los ratones viven unos 24 meses, la disminución de la edad epigenética es de una cuarta parte de la vida de un ratón. En cuanto al hígado, si nos fijamos en el reloj de intervenciones, el cambio en la edad epigenética es de un año, es decir, alrededor de la mitad de la vida de un ratón, esto indica un efecto muy potente del tratamiento con VEs en la edad epigenética de determinados tejidos. Estos resultados son similares a los obtenidos con otras intervenciones clásicas en el envejecimiento, como la restricción calórica (Hahn, Grönke et al. 2017, Sziráki, Tyshkovskiy et al. 2018) o la inhibición de mTOR (Horvath, Lu et al. 2019, Horvath, Zoller et al. 2021). Además, datos no publicados han mostrado una reducción muy similar en el hígado

de ratas envejecidas que habían sido tratadas con el plasma de individuos jóvenes (Horvath et al 2020 (bioRxiv)).

Atendiendo a los demás tejidos, la edad epigenética en el músculo de los animales tratados con VEs no varía en comparación con los controles, tampoco encontramos cambios en el bazo. Esto tiene varias explicaciones plausibles, el músculo esquelético es un tejido con un patrón de metilación del ADN diferente al resto de tejidos, ya que en el reloj de Horvath, la edad epigenética del músculo no varía apenas con la edad, lo que hace difícil encontrar diferencias en las intervenciones dirigidas a este tejido (Horvath 2013). En cuanto al bazo, no observamos cambios en la edad epigenética, esto puede deberse a que las VEs, a pesar de actuar sobre múltiples procesos, no tengan un efecto igual en todos los órganos. A pesar de ser un excelente marcador, todavía no sabemos cómo se correlaciona la edad epigenética con los distintos procesos moleculares y celulares asociados al envejecimiento. Por esta razón, no siempre un descenso en la senescencia o un alargamiento de los telómeros se acompaña de un descenso en la edad epigenética, se trata de marcadores complementarios.

En cuanto al epigenoma global, sin centrarnos en las islas CpG características del reloj epigenético, encontramos cambios de gran magnitud en la metilación del ADN de todos los tejidos. En los animales tratados con VEs, los tejidos presentaban diferencias significativas en miles de *loci*, siendo las diferencias más acusadas en el hígado y en el músculo (5546, 36163, 7247, 11092 en bazo, hígado, riñón y músculo respectivamente). Esto indica que el tratamiento con VEs modifica profundamente la expresión génica de los tejidos. Para tratar de aclarar cuál es la función de estos *loci* diferentes entre grupos, realizamos un análisis de enriquecimiento de procesos biológicos de los genes regulados por estos *loci*. Descubrimos que estos genes regulan procesos muy importantes para la regeneración tisular y el envejecimiento, como son el desarrollo de órganos y tejidos, la diferenciación tisular, y más específicamente el desarrollo neural y la organización de la sinapsis. En un estudio

reciente, la restricción calórica ha demostrado modificar el epigenoma en el cerebro de ratones envejecidos, regulando procesos biológicos muy similares a los descritos en nuestro trabajo (Yin, Guo et al. 2022).

Hasta la fecha, es la primera vez que se demuestra un efecto de las VEs sobre la edad epigenética de distintos tejidos. Este hecho añade una evidencia muy importante al posible uso de las VEs o los factores contenidos en ellas como tratamiento para múltiples enfermedades asociadas al envejecimiento. No solamente promoviendo la regeneración tisular, algo que ya se había demostrado en modelos de daño a distintos tejidos, sino actuando directamente sobre el proceso del envejecimiento.

5.5 El desarrollo y la regeneración tisular son las principales dianas de los microARNs contenidos en las VEs de CMTAs jóvenes

Para finalizar el trabajo, una vez demostramos los efectos beneficiosos de las VEs sobre distintos parámetros de funcionalidad, celulares y moleculares, nos propusimos encontrar factores presentes en las VEs que pudieran ser los responsables del efecto encontrado. Nos centramos en los microARNs, estos son los factores contenidos en las VEs más estudiados actualmente, ya que han demostrado ser capaces de modificar la expresión génica en tejidos distantes y cada microARN es capaz de modular una gran cantidad de vías moleculares (Thomou, Mori et al. 2017, Zhang, Kim et al. 2017, Ferguson, Wang et al. 2018). Más recientemente, se ha formado una controversia alrededor del papel de los microARNs contenidos en las VEs, ya que ciertos estudios han demostrado un número muy bajo de microARNs en las VEs, así como una escasa entrada de este material génico en las células diana (Chevillet, Kang et al. 2014, Albanese, Chen et al. 2021). Por tanto, todavía está por demostrar la verdadera relevancia de los microARNs en la comunicación intercelular mediada por VEs.

Aun así, con este objetivo en mente realizamos un estudio de transcriptómica en el que analizamos la expresión de miles de microARNs aislados de las VEs obtenidas de distintas fuentes. Para esto utilizamos VEs obtenidas del medio de cultivo de CMTAs de animales jóvenes, CMTAs de animales viejos y VEs del plasma de animales viejos.

En el análisis de componentes principales del transcriptoma observamos 3 grupos bien definidos, siendo los grupos de VEs derivadas de CMTAs jóvenes y viejas los más parecidos entre sí, algo que tiene lógica ya que estamos trabajando con VEs de un mismo tipo celular. Las VEs derivadas del plasma de animales viejos fueron por tanto las más diferentes a nivel de contenido en microRNAs de los tres grupos.

Para continuar el análisis, definimos los microARNs como diferentes entre grupos atendiendo a su expresión y al p-valor, siendo clasificados como diferentes cuando la expresión fuese de dos veces menos o más y el p-valor menor a 0,01. En todas las comparaciones, en las VEs derivadas de CMTAs jóvenes, encontramos una sobreexpresión de microARNs. Creemos que esto indica una menor expresión de microARNs en las VEs con el envejecimiento, probablemente debido a una menor expresión de la maquinaria reguladora de la biosíntesis de microARNs en los individuos envejecidos, algo que ya se había propuesto en nuestro grupo previamente (Serna, Gambini et al. 2012, Borrás, Serna et al. 2017).

En este trabajo inyectamos en el sistema circulatorio de animales viejos las VEs de CMTAs jóvenes. Por tanto, hipotetizamos que los microARNs con una expresión elevada en las VEs de CMTAs jóvenes y con una baja expresión en las VEs del plasma de animales viejos, serían buenos candidatos como factores responsables del efecto beneficioso de las VEs. Teníamos por tanto 25 microARNs candidatos, ya que este es el número de microARNs sobreexpresados en las VEs de CMTAs jóvenes en comparación con las del plasma de animales viejos. Para encontrar cuáles eran los procesos biológicos y las vías moleculares en los que estaban implicados estos microARNs, primero realizamos un análisis de dianas predichas. En este análisis, se compara la secuencia de nucleótidos de los microARNs con la secuencia de ARN mensajero de todo el genoma, obteniendo los genes que virtualmente son diana de nuestros microARNs de interés. Este análisis ha sido utilizado en numerosas ocasiones y existen múltiples softwares web que permiten la predicción de dianas de los microARNs (Ferguson, Wang et al. 2018).

Tras analizar las dianas de los 25 microARNs obtuvimos un número de dianas predichas demasiado grande, que no permitía continuar con el análisis, por lo que decidimos reducir el número de microARNs a estudiar. Para esto nos centramos en los microARNs que comparten secuencia en todas las especies, ya que el envejecimiento es un proceso biológico altamente conservado entre las especies

(Kim 2007). Esto nos aportaba dos ventajas, en primer lugar, si un factor es beneficioso para el envejecimiento, es más probable que sea algo que se ha conservado a lo largo de toda la evolución. En segundo lugar, si en un futuro queremos tratar de aplicar estos microARNs en los humanos, el poseer una misma secuencia en los distintos modelos preclínicos facilita la aplicabilidad.

Obtuvimos 6 microARNs que compartían la secuencia entre especies: miR-214-3p, miR-145-5p, miR-143-3p, miR-135a-3p, miR-125b-5p y let7c-5p. En conjunto, estos 6 microARNs tenían como diana 5379 genes. Para encontrar qué procesos biológicos y vías moleculares eran las más moduladas por estos microARNs realizamos un análisis de enriquecimiento con las dianas. Este análisis se basa en comparar el genoma al completo con los 5379 genes, dando un número de coincidencias entre estas dos listas esperadas por puro azar en una lista de procesos biológicos y vías moleculares basadas en Gene Ontology. Esto se compara con las coincidencias observadas, dando una tasa de observado/esperado, cuanto mayor sea esta tasa, mayor es la probabilidad de que los microARNs estén regulando un proceso en concreto. Curiosamente, los procesos más representados estaban relacionados con la proliferación celular y el crecimiento, desarrollo y regeneración tisular. Estos resultados concuerdan perfectamente con los resultados obtenidos en el tejido renal y muscular, así como en los resultados del epigenoma de los diferentes tejidos tratados, ya que muchos de los procesos diana de los microARNs se encuentran modificados en el análisis epigenético de los tejidos tratados.

En cuanto a las vías moleculares, los microARNs regulaban vías moleculares muy importantes en el proceso de envejecimiento, algunas de las cuales se han postulado previamente como dianas para modular el envejecimiento (Matheu, Maraver et al. 2007, Harrison, Strong et al. 2009). Entre estas vías encontramos la vía de GnRH, apoptosis, p53, p38, respuesta al estrés oxidativo o insulina/IGF. También modulaban vías moleculares relacionadas con la regeneración tisular, la inflamación

o la fibrosis, como por ejemplo la angiogénesis, la vía de Wnt, PDGF, FGF TGF- β , interleuquinas e interferones.

De entre estos microARNs, uno de los más interesantes es el miR-214-3p, microARN ha demostrado tener un papel importante en la senescencia celular, y ha demostrado ser capaz de mejorar la regeneración tisular en el pulmón tras un daño por radioterapia (van Balkom, de Jong et al. 2013, Lei, He et al. 2020). Este microARN parece disminuir la senescencia celular y la activación del SASP mediante la regulación de la vía ATM/p53/p21, vía muy implicada en la reparación del ADN y la senescencia (Lei, He et al. 2020). Por tanto, es un candidato para estudiar con más detalle en próximos estudios en nuestro laboratorio.

5.6 Perspectiva general: VEs como terapia para el deterioro tisular en el envejecimiento

Tras la exposición de este trabajo, queda claro que las VEs derivadas de células madre, de tejido adiposo en este caso, pero probablemente de muchos más tipos de células progenitoras, son capaces de mejorar múltiples funciones en animales envejecidos. Esta mejora se hace patente en la capacidad física de los ratones, que además de mejorar, se traduce en una reducción drástica de la fragilidad. Esto se acompaña de una mejor función renal, algo que se deteriora muy frecuentemente durante el envejecimiento. En general, tras el tratamiento con VEs observamos una mayor vitalidad de los ratones, estos presentan una mayor movilidad espontánea y un pelaje más denso y oscuro.

Todas estas mejoras en las funciones fisiológicas se acompañan de cambios en la estructura del tejido renal y muscular, observando una regeneración de los tejidos de los animales tratados, acercándose más a un tejido de un animal joven. A este cambio estructural se añaden a su vez múltiples cambios moleculares en varias de las claves del envejecimiento. Se observa un menor estrés oxidativo, una menor senescencia e inflamación, así como una menor edad epigenética de los tejidos, en los animales tratados con VEs. En cuanto a los telómeros, no evidenciamos cambios con el tratamiento. Uno de los mecanismos propuestos es que estas VEs actúen como senomórficos, es decir, moléculas que disminuyen la senescencia tisular mediante la modificación del medio extracelular, sin inducir directamente la muerte de estas.

Es importante continuar investigando las moléculas contenidas en las VEs, en este trabajo analizamos los microARNs, y descubrimos que los microARNs contenidos en las VEs de CMTAs jóvenes se encargan de regular múltiples procesos y vías moleculares afectadas en el envejecimiento. Se necesitan más estudios que confirmen estos resultados y que exploren otros factores derivados de las células madre capaces de mejorar la regeneración tisular y actuar sobre el envejecimiento.

Esto tendría un enorme impacto en procesos asociados al envejecimiento, como la fragilidad o la insuficiencia renal.

Para finalizar, este estudio nos confirma algo que ya se había propuesto, y es que el envejecimiento, a pesar de deberse en parte a cambios celulares intrínsecos, es un proceso modificable por factores extrínsecos, entre ellos los provenientes de organismos más jóvenes. El tratamiento con VEs derivadas de células madre parece ser una terapia segura y efectiva, que consigue mejorar la regeneración tisular y actuar sobre la alteración en la comunicación intercelular que acompaña al envejecimiento, disminuyendo los marcadores clásicos asociados a este proceso (Figura 41).

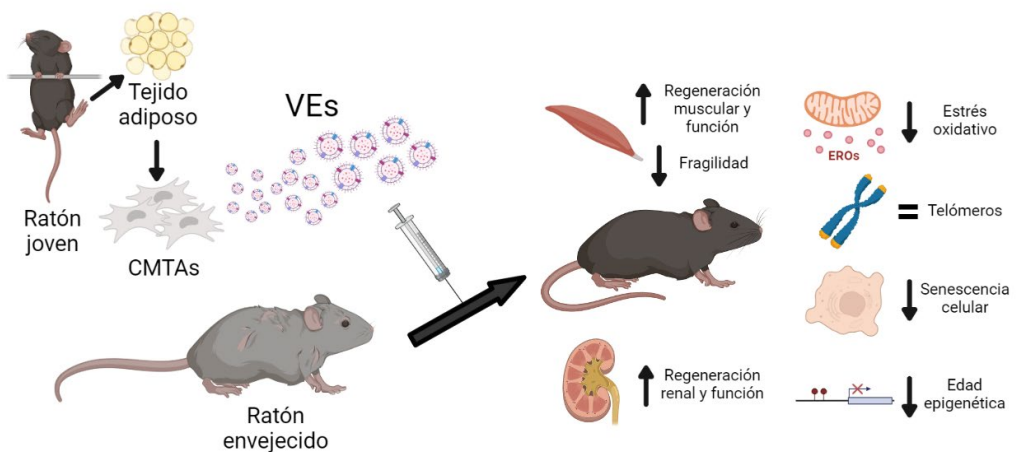


Figura 41: Resumen gráfico del estudio.

5.7 Limitaciones del estudio

Como cualquier estudio, el realizado en esta tesis tiene sus limitaciones. En primer lugar, la principal limitación es que se trata de un estudio principalmente descriptivo. A pesar de demostrar el efecto de las VEs, no hemos descrito un mecanismo de acción claro y específico, por lo que todavía queda camino por recorrer para descubrir cómo actúan las VEs, lo que seguramente será un mecanismo multifactorial implicando un gran número de moléculas. El campo de las vesículas extracelulares es todavía joven y aún no se han descrito con claridad los mecanismos por los que las vesículas se encargan de la comunicación entre las células. Por ejemplo, aún hay debate en cuanto al papel de las distintas macromoléculas contenidas o en la superficie de las vesículas en la señalización (Albanese, Chen et al. 2021). Otra de las limitaciones en este estudio es que no hemos analizado la biodistribución de las VEs, por lo que no sabemos a qué tejidos se dirigen una vez inyectadas. Esto hace patente una limitación de este campo de estudio, y es que el mecanismo de acción de las VEs todavía no está claramente descrito. Recientemente se ha descubierto que no todas las VEs se internalizan en las células y que, además, el contenido de las VEs internalizadas no siempre realiza una función concreta en la célula, ya que este contenido puede ser degradado, reciclado e incluso liberado de nuevo intacto al medio extracelular (O'Brien, Ughetto et al. 2022, van Niel, Carter et al. 2022).

El método de aislamiento de las VEs induce cierto grado de imprecisión en los estudios, ya que la ultracentrifugación diferencial no consigue separar del todo las VEs de otros agregados proteicos que sedimentan junto a ellas. Esto hace que pese a inyectar una solución enriquecida en VEs, existen otros factores externos a estas que podrían ser parcialmente responsables del efecto observado.

Probablemente el grupo control más correcto para el estudio hubiera sido usar VEs derivadas de CMTAs viejas, sin embargo, era difícil en cuanto a la logística del

experimento, ya que hay que sacrificar a los animales para obtener el tejido adiposo, y no contábamos con un gran número de ratones viejos que nos permitiesen obtener suficientes CMTAs. Otro grupo control interesante hubiese sido el de ratones jóvenes tratados con VEs de CMTAs jóvenes, para estudiar si el efecto beneficioso de las VEs puede darse también en animales jóvenes y no depende tanto de la edad del receptor de las VEs.

En cuanto a la inflamación tisular, podríamos haber medido un mayor número de factores pro y antiinflamatorios, ya que la única determinación de IL-6 probablemente no sea suficiente para evidenciar una menor inflamación tisular.

Para añadir evidencia al mecanismo senomórfico de las VEs, podríamos haber realizado más determinaciones en el modelo *in vitro* de senescencia celular. Por ejemplo, podríamos haber medido los distintos factores del SASP antes y después del tratamiento con VEs, o haber realizado un análisis molecular más exhaustivo de alguna vía que se modifique con el envejecimiento y la senescencia.

A pesar de las limitaciones, creemos que las conclusiones extraídas del estudio están en concordancia con los resultados obtenidos.

6 CONCLUSIONES

6.1 Conclusión general

El tratamiento de ratones envejecidos con VEs obtenidas de CMTAs jóvenes mejora su salud, disminuye su fragilidad y revierte la alteración de distintos parámetros celulares y moleculares relacionados con el envejecimiento.

6.1.1 Conclusiones específicas

-Las VEs derivadas de CMTAs jóvenes mejoran la capacidad física, disminuyen la fragilidad, mejoran la función renal y la regeneración del pelaje de ratones envejecidos.

-Las VEs derivadas de CMTAs jóvenes inducen un efecto pro-regenerativo en el tejido renal y muscular de ratones envejecidos.

-Las VEs derivadas de CMTAs jóvenes disminuyen los marcadores moleculares asociados al envejecimiento en el tejido renal y muscular de ratones envejecidos.

-Las VEs derivadas de CMTAs jóvenes disminuyen la senescencia y la apoptosis en un modelo *in vitro* de senescencia celular.

-El tratamiento con VEs derivadas de CMTAs jóvenes disminuye la edad epigenética del tejido renal y hepático de los ratones envejecidos, induciendo un cambio en el epigenoma del tejido renal, muscular, hepático y esplénico.

-Los microARNs enriquecidos en las VEs de CMTAs jóvenes están implicados en múltiples vías moleculares y procesos biológicos relacionados con la regeneración tisular y el envejecimiento.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abizanda, P., et al. (2011). "Prevalence of frailty in a Spanish elderly population: the Frailty and Dependence in Albacete study." J Am Geriatr Soc **59**(7): 1356-1359.
- Adler, A. S., et al. (2007). "Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kappaB activity." Genes Dev **21**(24): 3244-3257.
- Akagawa, M. (2021). "Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches." Free Radic Res **55**(4): 307-320.
- Alabarse, P. V., et al. (2011). "Oxidative stress in the kidney of reproductive male rats during aging." Exp Gerontol **46**(10): 773-780.
- Albanese, M., et al. (2021). "MicroRNAs are minor constituents of extracellular vesicles that are rarely delivered to target cells." PLoS Genet **17**(12): e1009951.
- Albert H. Coons , H. J. C., R. Norman Jones and Ernst Berliner (1942). "The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody." The Journal of Immunology **45**(3): 159-170.
- Alberts, B., et al. (2002). Molecular Biology of the Cell (6th ed.). New York, Garland Science.
- Ames, B. N., et al. (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(17): 7915-7922.
- Anisimov, V. N., et al. (2008). "Metformin slows down aging and extends life span of female SHR mice." Cell Cycle **7**(17): 2769-2773.
- Arc-Chagnaud, C., et al. (2021). "Glucose 6-P dehydrogenase delays the onset of frailty by protecting against muscle damage." J Cachexia Sarcopenia Muscle **12**(6): 1879-1896.
- Armanios, M., et al. (2009). "Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging." Am J Hum Genet **85**(6): 823-832.
- Armanios, M. and E. H. Blackburn (2012). "The telomere syndromes." Nat Rev Genet **13**(10): 693-704.
- Arslan, F., et al. (2013). "Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury." Stem Cell Res **10**(3): 301-312.

- Ayala, A., et al. (2014). "Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal." Oxid Med Cell Longev **2014**: 360438.
- Baar, M. P., et al. (2017). "Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging." Cell **169**(1): 132-147.e116.
- Baker, D. J., et al. (2011). "Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders." Nature **479**(7372): 232-236.
- Balaban, R. S., et al. (2005). "Mitochondria, oxidants, and aging." Cell **120**(4): 483-495.
- Barreiro, E. (2016). "Role of Protein Carbonylation in Skeletal Muscle Mass Loss Associated with Chronic Conditions." Proteomes **4**(2).
- Beard, J. R., et al. (2016). "The World report on ageing and health: a policy framework for healthy ageing." Lancet **387**(10033): 2145-2154.
- Berger, K., et al. (2014). "Origin of regenerating tubular cells after acute kidney injury." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(4): 1533-1538.
- Berlett, B. S. and E. R. Stadtman (1997). "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress." J Biol Chem **272**(33): 20313-20316.
- Bernardes de Jesus, B., et al. (2012). "Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer." EMBO Mol Med **4**(8): 691-704.
- Bian, S., et al. (2014). "Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model." J Mol Med (Berl) **92**(4): 387-397.
- Blackburn, E. H., et al. (2006). "Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging." Nat Med **12**(10): 1133-1138.
- Blasco, M. A. (2007). "Telomere length, stem cells and aging." Nat Chem Biol **3**(10): 640-649.
- Blasco, M. A., et al. (1997). "Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA." Cell **91**(1): 25-34.
- Blüher, M., et al. (2003). "Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue." Science **299**(5606): 572-574.

Bodnar, A. G., et al. (1998). "Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells." Science **279**(5349): 349-352.

Borghesan, M., et al. (2019). "Small Extracellular Vesicles Are Key Regulators of Non-cell Autonomous Intercellular Communication in Senescence via the Interferon Protein IFITM3." Cell Rep **27**(13): 3956-3971.e3956.

Borras, C., et al. (2016). "Human exceptional longevity: transcriptome from centenarians is distinct from septuagenarians and reveals a role of Bcl-xL in successful aging." Aging (Albany NY) **8**(12): 3185-3208.

Borras, C., et al. (2020). "Centenarians: An excellent example of resilience for successful ageing." Mech Ageing Dev **186**: 111199.

Borrás, C., et al. (2020). "BCL-xL, a Mitochondrial Protein Involved in Successful Aging: From." Int J Mol Sci **21**(2).

Borrás, C., et al. (2017). "Centenarians maintain miRNA biogenesis pathway while it is impaired in octogenarians." Mech Ageing Dev **168**: 54-57.

Bortz, W. M. (2002). "A conceptual framework of frailty: a review." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **57**(5): M283-288.

Bosch, P., et al. (2000). "Osteoprogenitor cells within skeletal muscle." J Orthop Res **18**(6): 933-944.

Breen, A. P. and J. A. Murphy (1995). "Reactions of oxyl radicals with DNA." Free Radic Biol Med **18**(6): 1033-1077.

Brown-Borg, H. M., et al. (1996). "Dwarf mice and the ageing process." Nature **384**(6604): 33.

Bruno, S., et al. (2009). "Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury." J Am Soc Nephrol **20**(5): 1053-1067.

Bruno, S., et al. (2017). "Renal Regenerative Potential of Different Extracellular Vesicle Populations Derived from Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells." Tissue Eng Part A **23**(21-22): 1262-1273.

Burnette, W. N. (1981). ""Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem **112**(2): 195-203.

- Campbell, A. J. and D. M. Buchner (1997). "Unstable disability and the fluctuations of frailty." Age Ageing **26**(4): 315-318.
- Campisi, J. (1997). "Aging and cancer: the double-edged sword of replicative senescence." J Am Geriatr Soc **45**(4): 482-488.
- Campisi, J. (2013). "Aging, cellular senescence, and cancer." Annu Rev Physiol **75**: 685-705.
- Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(9): 729-740.
- Caplan, A. I. and D. Correa (2011). "The MSC: an injury drugstore." Cell Stem Cell **9**(1): 11-15.
- Carney, B. (2008). Oxidative Damage in Fish Used as Biomarkers in Field and Laboratory Studies, Gothenburg University
- Cerletti, M., et al. (2012). "Short-term calorie restriction enhances skeletal muscle stem cell function." Cell Stem Cell **10**(5): 515-519.
- Chakkalakal, J. V., et al. (2012). "The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence." Nature **490**(7420): 355-360.
- Chang, J., et al. (2016). "Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice." Nat Med **22**(1): 78-83.
- Chen, C. Y., et al. (2018). "Exosomal DMBT1 from human urine-derived stem cells facilitates diabetic wound repair by promoting angiogenesis." Theranostics **8**(6): 1607-1623.
- Chen, H., et al. (2014). "Age-associated loss of lamin-B leads to systemic inflammation and gut hyperplasia." Cell **159**(4): 829-843.
- Chen, L., et al. (2008). "Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing." PLoS One **3**(4): e1886.
- Chen, X., et al. (2014). "Frailty syndrome: an overview." Clin Interv Aging **9**: 433-441.

Cheng, T., et al. (2000). "Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1." Science **287**(5459): 1804-1808.

Chevillet, J. R., et al. (2014). "Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(41): 14888-14893.

Choi, E. W., et al. (2018). "Exosomes from human adipose-derived stem cells promote proliferation and migration of skin fibroblasts." Exp Dermatol **27**(10): 1170-1172.

Chuo, S. T., et al. (2018). "Imaging extracellular vesicles: current and emerging methods." J Biomed Sci **25**(1): 91.

Collado, M., et al. (2007). "Cellular senescence in cancer and aging." Cell **130**(2): 223-233.

Collard, R. M., et al. (2012). "Prevalence of frailty in community-dwelling older persons: a systematic review." J Am Geriatr Soc **60**(8): 1487-1492.

Collino, F., et al. (2015). "AKI Recovery Induced by Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Carrying MicroRNAs." J Am Soc Nephrol **26**(10): 2349-2360.

Conboy, I. M., et al. (2005). "Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment." Nature **433**(7027): 760-764.

Conboy, I. M. and T. A. Rando (2005). "Aging, stem cells and tissue regeneration: lessons from muscle." Cell Cycle **4**(3): 407-410.

Conboy, I. M. and T. A. Rando (2012). "Heterochronic parabiosis for the study of the effects of aging on stem cells and their niches." Cell Cycle **11**(12): 2260-2267.

Conese, M., et al. (2017). "The Fountain of Youth: A Tale of Parabiosis, Stem Cells, and Rejuvenation." Open Med (Wars) **12**: 376-383.

Copelan, E. A. (2006). "Hematopoietic stem-cell transplantation." N Engl J Med **354**(17): 1813-1826.

Coppé, J. P., et al. (2010). "The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression." Annu Rev Pathol **5**: 99-118.

Coppé, J. P., et al. (2008). "Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor." PLoS Biol **6**(12): 2853-2868.

- Crimmins, E. M. (2015). "Lifespan and Healthspan: Past, Present, and Promise." Gerontologist **55**(6): 901-911.
- Cruz-Jentoft, A. J., et al. (2014). "Prevalence of and interventions for sarcopenia in ageing adults: a systematic review. Report of the International Sarcopenia Initiative (EWGSOP and IWGS)." Age Ageing **43**(6): 748-759.
- Deeks, S. G. (2011). "HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging." Annu Rev Med **62**: 141-155.
- Denic, A., et al. (2016). "Structural and Functional Changes With the Aging Kidney." Adv Chronic Kidney Dis **23**(1): 19-28.
- Dimri, G. P., et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9363-9367.
- Doepfner, T. R., et al. (2015). "Extracellular Vesicles Improve Post-Stroke Neuroregeneration and Prevent Postischemic Immunosuppression." Stem Cells Transl Med **4**(10): 1131-1143.
- Doherty, T. J. (2003). "Invited review: Aging and sarcopenia." J Appl Physiol (1985) **95**(4): 1717-1727.
- Dong, X., et al. (2016). "Evidence for a limit to human lifespan." Nature **538**(7624): 257-259.
- Doonan, R., et al. (2008). "Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans*." Genes Dev **22**(23): 3236-3241.
- Dorronsoro, A., et al. (2021). "Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles reduce senescence and extend health span in mouse models of aging." Aging Cell **20**(4): e13337.
- Dreesen, O., et al. (2013). "Lamin B1 fluctuations have differential effects on cellular proliferation and senescence." J Cell Biol **200**(5): 605-617.
- Durieux, J., et al. (2011). "The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity." Cell **144**(1): 79-91.
- Eggenhofer, E., et al. (2012). "Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion." Front Immunol **3**: 297.

- Esterbauer, H. and K. H. Cheeseman (1990). "Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal." Methods Enzymol **186**: 407-421.
- Fafián-Labora, J. A., et al. (2020). "Small Extracellular Vesicles Have GST Activity and Ameliorate Senescence-Related Tissue Damage." Cell Metab **32**(1): 71-86.e75.
- Fedorova, M., et al. (2014). "Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies." Mass Spectrom Rev **33**(2): 79-97.
- Ferguson, S. W., et al. (2018). "The microRNA regulatory landscape of MSC-derived exosomes: a systems view." Sci Rep **8**(1): 1419.
- Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature **408**(6809): 239-247.
- Fraga, M. F. and M. Esteller (2007). "Epigenetics and aging: the targets and the marks." Trends Genet **23**(8): 413-418.
- Franceschi, C., et al. (2000). "Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence." Ann N Y Acad Sci **908**: 244-254.
- Franceschi, C. and J. Campisi (2014). "Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **69 Suppl 1**: S4-9.
- Fransquet, P. D., et al. (2019). "The epigenetic clock as a predictor of disease and mortality risk: a systematic review and meta-analysis." Clin Epigenetics **11**(1): 62.
- Frese, L., et al. (2016). "Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine." Transfus Med Hemother **43**(4): 268-274.
- Freund, A., et al. (2012). "Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker." Mol Biol Cell **23**(11): 2066-2075.
- Fridovich, I. (1978). "The biology of oxygen radicals." Science **201**(4359): 875-880.
- Fried, L. P., et al. (2001). "Frailty in older adults: evidence for a phenotype." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **56**(3): M146-156.
- Friedenstein, A. J., et al. (1970). "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells." Cell Tissue Kinet **3**(4): 393-403.

- Friedman, D. B. and T. E. Johnson (1988). "Three mutants that extend both mean and maximum life span of the nematode, *Caenorhabditis elegans*, define the age-1 gene." J Gerontol **43**(4): B102-109.
- Fries, J. F. (1980). "Aging, natural death, and the compression of morbidity." N Engl J Med **303**(3): 130-135.
- Fumagalli, M., et al. (2012). "Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation." Nat Cell Biol **14**(4): 355-365.
- Fuster, J. J. and K. Walsh (2014). "The good, the bad, and the ugly of interleukin-6 signaling." EMBO J **33**(13): 1425-1427.
- Galkin, F., et al. (2021). "DeepMAge: A Methylation Aging Clock Developed with Deep Learning." Aging Dis **12**(5): 1252-1262.
- Giulivi, C. and K. J. Davies (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." J Biol Chem **268**(12): 8752-8759.
- Gomes, P., et al. (2009). "Aging increases oxidative stress and renal expression of oxidant and antioxidant enzymes that are associated with an increased trend in systolic blood pressure." Oxid Med Cell Longev **2**(3): 138-145.
- Gomez-Cabrera, M. C., et al. (2017). "A New Frailty Score for Experimental Animals Based on the Clinical Phenotype: Inactivity as a Model of Frailty." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **72**(7): 885-891.
- Greer, E. L., et al. (2010). "Members of the H3K4 trimethylation complex regulate lifespan in a germline-dependent manner in *C. elegans*." Nature **466**(7304): 383-387.
- Grigorian-Shamagian, L., et al. (2017). "Cardiac and systemic rejuvenation after cardiosphere-derived cell therapy in senescent rats." Eur Heart J **38**(39): 2957-2967.
- Gronthos, S., et al. (2000). "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13625-13630.
- Gruber, R., et al. (2006). "Fracture healing in the elderly patient." Exp Gerontol **41**(11): 1080-1093.
- Hahn, O., et al. (2017). "Dietary restriction protects from age-associated DNA methylation and induces epigenetic reprogramming of lipid metabolism." Genome Biol **18**(1): 56.

- Halliwell, B. (1996). "Antioxidants in human health and disease." Annu Rev Nutr **16**: 33-50.
- Hampel, B., et al. (2004). "Differential regulation of apoptotic cell death in senescent human cells." Exp Gerontol **39**(11-12): 1713-1721.
- Hannum, G., et al. (2013). "Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates." Mol Cell **49**(2): 359-367.
- Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." J Gerontol **11**(3): 298-300.
- Harrington, L. A. and C. B. Harley (1988). "Effect of vitamin E on lifespan and reproduction in *Caenorhabditis elegans*." Mech Ageing Dev **43**(1): 71-78.
- Harrison, D. E., et al. (2009). "Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice." Nature **460**(7253): 392-395.
- Hayflick, L. (1965). "The limited in vitro lifespan of human diploid cell strains." Exp Cell Res **37**: 614-636.
- Hayflick, L. (2007). "Entropy explains aging, genetic determinism explains longevity, and undefined terminology explains misunderstanding both." PLoS Genet **3**(12): e220.
- Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." Exp Cell Res **25**: 585-621.
- He, J., et al. (2012). "Bone marrow stem cells-derived microvesicles protect against renal injury in the mouse remnant kidney model." Nephrology (Carlton) **17**(5): 493-500.
- Hekimi, S., et al. (2011). "Taking a "good" look at free radicals in the aging process." Trends Cell Biol **21**(10): 569-576.
- Herbig, U., et al. (2004). "Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a)." Mol Cell **14**(4): 501-513.
- Herrera, E., et al. (1999). "Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres." EMBO J **18**(11): 2950-2960.

Hickson, L. J., et al. (2019). "Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease." EBioMedicine **47**: 446-456.

Holzenberger, M., et al. (2003). "IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice." Nature **421**(6919): 182-187.

Horvath, S. (2013). "DNA methylation age of human tissues and cell types." Genome Biol **14**(10): R115.

Horvath, S., et al. (2019). "Rapamycin retards epigenetic ageing of keratinocytes independently of its effects on replicative senescence, proliferation and differentiation." Aging (Albany NY) **11**(10): 3238-3249.

Horvath, S. and K. Raj (2018). "DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing." Nat Rev Genet **19**(6): 371-384.

Horvath, S., et al. (2021). "DNA methylation age analysis of rapamycin in common marmosets." Geroscience **43**(5): 2413-2425.

Hristov, M., et al. (2004). "Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro." Blood **104**(9): 2761-2766.

Hu, L., et al. (2016). "Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts." Sci Rep **6**: 32993.

Jaenisch, R. and R. Young (2008). "Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming." Cell **132**(4): 567-582.

Jin, C., et al. (2011). "Histone demethylase UTX-1 regulates *C. elegans* life span by targeting the insulin/IGF-1 signaling pathway." Cell Metab **14**(2): 161-172.

Johnson, T. E. and W. B. Wood (1982). "Genetic analysis of life-span in *Caenorhabditis elegans*." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(21): 6603-6607.

Jones, O. R., et al. (2014). "Diversity of ageing across the tree of life." Nature **505**(7482): 169-173.

Kasai, H. and S. Nishimura (1984). "Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents." Nucleic Acids Res **12**(4): 2137-2145.

- Kennedy, B. K., et al. (1995). "Mutation in the silencing gene SIR4 can delay aging in *S. cerevisiae*." Cell **80**(3): 485-496.
- Kennedy, B. K., et al. (2014). "Geroscience: linking aging to chronic disease." Cell **159**(4): 709-713.
- Khan, S. S., et al. (2017). "Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans." Aging Cell **16**(4): 624-633.
- Kim, E. C. and J. R. Kim (2019). "Senotherapeutics: emerging strategy for healthy aging and age-related disease." BMB Rep **52**(1): 47-55.
- Kim, S. K. (2007). "Common aging pathways in worms, flies, mice and humans." J Exp Biol **210**(Pt 9): 1607-1612.
- Klass, M. R. (1977). "Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and environmental factors influencing life span." Mech Ageing Dev **6**(6): 413-429.
- Klass, M. R. (1983). "A method for the isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* and initial results." Mech Ageing Dev **22**(3-4): 279-286.
- Kontis, V., et al. (2017). "Future life expectancy in 35 industrialised countries: projections with a Bayesian model ensemble." Lancet **389**(10076): 1323-1335.
- Koopman, G., et al. (1994). "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis." Blood **84**(5): 1415-1420.
- Kuilman, T., et al. (2010). "The essence of senescence." Genes Dev **24**(22): 2463-2479.
- Kuilman, T., et al. (2008). "Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network." Cell **133**(6): 1019-1031.
- Kuilman, T. and D. S. Peeper (2009). "Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress." Nat Rev Cancer **9**(2): 81-94.
- Kulkarni, R., et al. (2018). "Intercellular Transfer of Microvesicles from Young Mesenchymal Stromal Cells Rejuvenates Aged Murine Hematopoietic Stem Cells." Stem Cells **36**(3): 420-433.

- Kurz, D. J., et al. (2000). "Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells." J Cell Sci **113** (Pt **20**): 3613-3622.
- Lai, R. C., et al. (2010). "Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury." Stem Cell Res **4**(3): 214-222.
- Lang, T., et al. (2010). "Sarcopenia: etiology, clinical consequences, intervention, and assessment." Osteoporos Int **21**(4): 543-559.
- Larsen, P. L., et al. (1995). "Genes that regulate both development and longevity in *Caenorhabditis elegans*." Genetics **139**(4): 1567-1583.
- Larsson, L., et al. (2019). "Sarcopenia: Aging-Related Loss of Muscle Mass and Function." Physiol Rev **99**(1): 427-511.
- Latres, E., et al. (2000). "Limited overlapping roles of P15(INK4b) and P18(INK4c) cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis." EMBO J **19**(13): 3496-3506.
- Lauretani, F., et al. (2003). "Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility: an operational diagnosis of sarcopenia." J Appl Physiol (1985) **95**(5): 1851-1860.
- Lavasani, M., et al. (2012). "Muscle-derived stem/progenitor cell dysfunction limits healthspan and lifespan in a murine progeria model." Nat Commun **3**: 608.
- Le Blanc, K., et al. (2003). "HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells." Exp Hematol **31**(10): 890-896.
- Lee, B. R., et al. (2018). "Effect of young exosomes injected in aged mice." Int J Nanomedicine **13**: 5335-5345.
- Lee, R. H., et al. (2009). "Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6." Cell Stem Cell **5**(1): 54-63.
- Lefebvre, J. S., et al. (2012). "The aged microenvironment contributes to the age-related functional defects of CD4 T cells in mice." Aging Cell **11**(5): 732-740.
- Lei, X., et al. (2020). "Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Attenuate Radiation-Induced Lung Injury." Antioxid Redox Signal.

- Lever, J. M., et al. (2018). "Parabiosis reveals leukocyte dynamics in the kidney." Lab Invest **98**(3): 391-402.
- Li, G., et al. (2012). "Association between age-related decline of kidney function and plasma malondialdehyde." Rejuvenation Res **15**(3): 257-264.
- Li, T., et al. (2013). "Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis." Stem Cells Dev **22**(6): 845-854.
- Linero, I. and O. Chaparro (2014). "Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration." PLoS One **9**(9): e107001.
- Liu, H., et al. (2014). "Clinically relevant frailty index for mice." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **69**(12): 1485-1491.
- Liu, S., et al. (2019). "Highly Purified Human Extracellular Vesicles Produced by Stem Cells Alleviate Aging Cellular Phenotypes of Senescent Human Cells." Stem Cells.
- Loffredo, F. S., et al. (2013). "Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy." Cell **153**(4): 828-839.
- Lourenço Dos Santos, S., et al. (2015). "Oxidative proteome alterations during skeletal muscle ageing." Redox Biol **5**: 267-274.
- Lowry, O. H., et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.
- Ludwig, A. K. and B. Giebel (2012). "Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication." Int J Biochem Cell Biol **44**(1): 11-15.
- López-Otín, C., et al. (2013). "The hallmarks of aging." Cell **153**(6): 1194-1217.
- Ma, T., et al. (2019). "Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes promote cell proliferation, migration, and inhibit cell apoptosis via Wnt/ β -catenin signaling in cutaneous wound healing." J Cell Biochem.
- Maegawa, S., et al. (2010). "Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice." Genome Res **20**(3): 332-340.
- Maguire, G. (2013). "Stem cell therapy without the cells." Commun Integr Biol **6**(6): e26631.

- Mahmoudi, S. and A. Brunet (2012). "Aging and reprogramming: a two-way street." Curr Opin Cell Biol **24**(6): 744-756.
- Martinez-Agosto, J. A., et al. (2007). "The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view." Genes Dev **21**(23): 3044-3060.
- Martín Lesende, I., et al. (2010). "[The frail elderly. Detection and management in Primary Care]." Aten Primaria **42**(7): 388-393.
- Marzani, B., et al. (2005). "Human muscle aging: ROS-mediated alterations in rectus abdominis and vastus lateralis muscles." Exp Gerontol **40**(12): 959-965.
- Matheu, A., et al. (2007). "Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway." Nature **448**(7151): 375-379.
- Matsunaga, H., et al. (1999). "Beta-galactosidase histochemistry and telomere loss in senescent retinal pigment epithelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(1): 197-202.
- McCay, C. M., et al. (1989). "The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935." Nutrition **5**(3): 155-171; discussion 172.
- McCay, C. M., et al. (1957). "Parabiosis between old and young rats." Gerontologia **1**(1): 7-17.
- Melchiorretto, E. F., et al. (2020). "Stereological study and analysis of oxidative stress during renal aging in rats." Acta Cir Bras **35**(11): e351106.
- Melov, S., et al. (2000). "Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics." Science **289**(5484): 1567-1569.
- Mesquita, A., et al. (2010). "Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H₂O₂ and superoxide dismutase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(34): 15123-15128.
- Mi, H., et al. (2013). "Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system." Nat Protoc **8**(8): 1551-1566.
- Miquel, J. and A. C. Economos (1979). "Favorable effects of the antioxidants sodium and magnesium thiazolidine carboxylate on the vitality and life span of *Drosophila* and mice." Exp Gerontol **14**(5): 279-285.

- Mirzayans, R., et al. (2012). "Role of p16(INK4A) in Replicative Senescence and DNA Damage-Induced Premature Senescence in p53-Deficient Human Cells." Biochem Res Int **2012**: 951574.
- Mishima, K., et al. (1999). "Senescence-associated beta-galactosidase histochemistry for the primate eye." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(7): 1590-1593.
- Mitnitski, A. B., et al. (2002). "The accumulation of deficits with age and possible invariants of aging." ScientificWorldJournal **2**: 1816-1822.
- Mittelbrunn, M. and F. Sánchez-Madrid (2012). "Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(5): 328-335.
- Molofsky, A. V., et al. (2006). "Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing." Nature **443**(7110): 448-452.
- Mozhui, K., et al. (2021). Genetic Analyses of Epigenetic Predictors that Estimate Aging, Metabolic Traits, and Lifespan. bioRxiv.
- Müller-Ehmsen, J., et al. (2002). "Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium." J Mol Cell Cardiol **34**(2): 107-116.
- Nakahara, H., et al. (1991). "Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo." J Orthop Res **9**(4): 465-476.
- Narita, M., et al. (2003). "Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence." Cell **113**(6): 703-716.
- O'Brien, K., et al. (2022). "Uptake, functionality, and re-release of extracellular vesicle-encapsulated cargo." Cell Rep **39**(2): 110651.
- Oberdoerffer, P. and D. A. Sinclair (2007). "The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(9): 692-702.
- Oh, M., et al. (2018). "Exosomes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells Ameliorate the Aging of Skin Fibroblasts." Int J Mol Sci **19**(6).
- Olshansky, S. J. (2018). "From Lifespan to Healthspan." JAMA **320**(13): 1323-1324.

Orr, W. C. and R. S. Sohal (1994). "Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*." Science **263**(5150): 1128-1130.

Osorio, F. G., et al. (2012). "Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF- κ B activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response." Genes Dev **26**(20): 2311-2324.

Osorio, F. G., et al. (2010). "Nuclear envelope alterations generate an aging-like epigenetic pattern in mice deficient in *Zmpste24* metalloprotease." Aging Cell **9**(6): 947-957.

Pantoja, C. and M. Serrano (1999). "Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras." Oncogene **18**(35): 4974-4982.

Parks, R. J., et al. (2012). "A procedure for creating a frailty index based on deficit accumulation in aging mice." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **67**(3): 217-227.

Pascual-Fernández, J., et al. (2020). "Sarcopenia: Molecular Pathways and Potential Targets for Intervention." Int J Mol Sci **21**(22).

Pegoraro, G., et al. (2009). "Ageing-related chromatin defects through loss of the NURD complex." Nat Cell Biol **11**(10): 1261-1267.

Pendergrass, W. R., et al. (1999). "Cellular proliferation potential during aging and caloric restriction in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*)." J Cell Physiol **180**(1): 123-130.

Petkovich, D. A., et al. (2017). "Using DNA Methylation Profiling to Evaluate Biological Age and Longevity Interventions." Cell Metab **25**(4): 954-960.e956.

Phillips, J. P., et al. (1989). "Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in *Drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(8): 2761-2765.

Plenchette, S., et al. (2004). Analyzing Markers of Apoptosis In vitro. Methods in Molecular Biology, Humana Press.

Pollina, E. A. and A. Brunet (2011). "Epigenetic regulation of aging stem cells." Oncogene **30**(28): 3105-3126.

- Pont, A. R., et al. (2012). "mRNA decay factor AUF1 maintains normal aging, telomere maintenance, and suppression of senescence by activation of telomerase transcription." Mol Cell **47**(1): 5-15.
- Pérez, V. I., et al. (2009). "The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice." Aging Cell **8**(1): 73-75.
- Quelle, D. E., et al. (1995). "Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest." Cell **83**(6): 993-1000.
- Raposo, G., et al. (1996). "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles." J Exp Med **183**(3): 1161-1172.
- Raposo, G. and W. Stoorvogel (2013). "Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends." J Cell Biol **200**(4): 373-383.
- Raudvere, U., et al. (2019). "g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update)." Nucleic Acids Res **47**(W1): W191-W198.
- Rera, M., et al. (2011). "Modulation of longevity and tissue homeostasis by the Drosophila PGC-1 homolog." Cell Metab **14**(5): 623-634.
- Reznikoff, C. A., et al. (1996). "Elevated p16 at senescence and loss of p16 at immortalization in human papillomavirus 16 E6, but not E7, transformed human uroepithelial cells." Cancer Res **56**(13): 2886-2890.
- Richter, C., et al. (1988). "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(17): 6465-6467.
- Rockwood, K. and A. Mitnitski (2007). "Frailty in relation to the accumulation of deficits." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **62**(7): 722-727.
- Rockwood, K., et al. (2005). "A global clinical measure of fitness and frailty in elderly people." CMAJ **173**(5): 489-495.
- Rockwood, K., et al. (1999). "A brief clinical instrument to classify frailty in elderly people." Lancet **353**(9148): 205-206.
- Rodier, F. and J. Campisi (2011). "Four faces of cellular senescence." J Cell Biol **192**(4): 547-556.

Rodier, F., et al. (2009). "Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion." Nat Cell Biol **11**(8): 973-979.

Rossi, D. J., et al. (2007). "Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age." Nature **447**(7145): 725-729.

Rozing, M. P., et al. (2017). "Is there evidence for a limit to human lifespan?" Nature **546**(7660): E11-E12.

Russell, S. J. and C. R. Kahn (2007). "Endocrine regulation of ageing." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(9): 681-691.

Sarnak, M. J., et al. (2003). "Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention." Circulation **108**(17): 2154-2169.

Sasaki, H., et al. (2007). "Grip strength predicts cause-specific mortality in middle-aged and elderly persons." Am J Med **120**(4): 337-342.

Scudellari, M. (2015). "Ageing research: Blood to blood." Nature **517**(7535): 426-429.

Seals, D. R. and S. Melov (2014). "Translational geroscience: emphasizing function to achieve optimal longevity." Aging (Albany NY) **6**(9): 718-730.

Sena, L. A. and N. S. Chandel (2012). "Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species." Mol Cell **48**(2): 158-167.

Serna, E., et al. (2012). "Centenarians, but not octogenarians, up-regulate the expression of microRNAs." Sci Rep **2**: 961.

Serrano, M., et al. (1993). "A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4." Nature **366**(6456): 704-707.

Serrano, M., et al. (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." Cell **88**(5): 593-602.

Shah, P. P., et al. (2013). "Lamin B1 depletion in senescent cells triggers large-scale changes in gene expression and the chromatin landscape." Genes Dev **27**(16): 1787-1799.

Shamliyan, T., et al. (2013). "Association of frailty with survival: a systematic literature review." Ageing Res Rev **12**(2): 719-736.

- Shefferson, R., et al. (2017). The Evolution of Senescence in the Tree of Life, Cambridge: Cambridge university press.
- Shelton, D. N., et al. (1999). "Microarray analysis of replicative senescence." Curr Biol **9**(17): 939-945.
- Sherr, C. J. (1995). "D-type cyclins." Trends Biochem Sci **20**(5): 187-190.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1995). "Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases." Genes Dev **9**(10): 1149-1163.
- Sies, H. (1985). Oxidative stress: Introductory remarks. Oxidative stress. London, Academic Press.
- Sigal, S. H., et al. (1999). "Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events." Am J Physiol **276**(5): G1260-1272.
- Simic, M. G., et al. (1989). "Generation of oxy radicals in biosystems." Mutat Res **214**(1): 3-12.
- Simic, M. G. and K. A. Taylor (1988). "Introduction to peroxidation and antioxidation mechanisms." Basic Life Sci **49**: 1-10.
- Sinha, M., et al. (2014). "Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle." Science **344**(6184): 649-652.
- Siu, P. M., et al. (2008). "Age-dependent increase in oxidative stress in gastrocnemius muscle with unloading." J Appl Physiol (1985) **105**(6): 1695-1705.
- Slater, T. F. (1984). "Free-radical mechanisms in tissue injury." Biochem J **222**(1): 1-15.
- Small, D. M., et al. (2012). "Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease." Nephrology (Carlton) **17**(4): 311-321.
- Smith, E. D., et al. (2008). "Quantitative evidence for conserved longevity pathways between divergent eukaryotic species." Genome Res **18**(4): 564-570.
- Song, L. and R. S. Tuan (2004). "Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow." FASEB J **18**(9): 980-982.

- Stadtman, E. R. (1992). "Protein oxidation and aging." Science **257**(5074): 1220-1224.
- Suter, M. and C. Richter (1999). "Fragmented mitochondrial DNA is the predominant carrier of oxidized DNA bases." Biochemistry **38**(1): 459-464.
- Sziráki, A., et al. (2018). "Global remodeling of the mouse DNA methylome during aging and in response to calorie restriction." Aging Cell **17**(3): e12738.
- Talens, R. P., et al. (2012). "Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs." Aging Cell **11**(4): 694-703.
- Tan, C. Y., et al. (2014). "Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models." Stem Cell Res Ther **5**(3): 76.
- Tchkonia, T., et al. (2013). "Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities." J Clin Invest **123**(3): 966-972.
- Thomou, T., et al. (2017). "Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues." Nature **542**(7642): 450-455.
- Théry, C., et al. (2006). "Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids." Curr Protoc Cell Biol **Chapter 3**: Unit 3.22.
- Théry, C., et al. (2009). "Membrane vesicles as conveyors of immune responses." Nat Rev Immunol **9**(8): 581-593.
- Théry, C., et al. (2018). "Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines." J Extracell Vesicles **7**(1): 1535750.
- Tissenbaum, H. A. and L. Guarente (2001). "Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*." Nature **410**(6825): 227-230.
- Toma, C., et al. (2009). "Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observations of cell kinetics." Circ Res **104**(3): 398-402.
- Tompkins, B. A., et al. (2017). "Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Aging Frailty: A Phase II Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **72**(11): 1513-1522.

Tomás-Loba, A., et al. (2008). "Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice." Cell **135**(4): 609-622.

Towbin, H., et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.

Tsikas, D. (2017). "Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges." Anal Biochem **524**: 13-30.

Tuli, R., et al. (2003). "Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone." Stem Cells **21**(6): 681-693.

Uzun, D., et al. (2013). "Oxidative damage parameters in renal tissues of aged and young rats based on gender." Clin Interv Aging **8**: 809-815.

van Balkom, B. W., et al. (2013). "Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells." Blood **121**(19): 3997-4006, S3991-3915.

van der Loo, B., et al. (1998). "Cytochemical detection of a senescence-associated beta-galactosidase in endothelial and smooth muscle cells from human and rabbit blood vessels." Exp Cell Res **241**(2): 309-315.

van Deursen, J. M. (2014). "The role of senescent cells in ageing." Nature **509**(7501): 439-446.

van Niel, G., et al. (2022). "Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles." Nat Rev Mol Cell Biol **23**(5): 369-382.

Van Raamsdonk, J. M. and S. Hekimi (2009). "Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*." PLoS Genet **5**(2): e1000361.

Van Remmen, H., et al. (2003). "Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging." Physiol Genomics **16**(1): 29-37.

Vaupel, J. W., et al. (2004). "The case for negative senescence." Theor Popul Biol **65**(4): 339-351.

Vaupel, J. W., et al. (1998). "Biodemographic trajectories of longevity." Science **280**(5365): 855-860.

- Vellai, T., et al. (2003). "Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*." Nature **426**(6967): 620.
- Vellas, B. J., et al. (1997). "Fear of falling and restriction of mobility in elderly fallers." Age Ageing **26**(3): 189-193.
- Villeda, S. A., et al. (2011). "The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function." Nature **477**(7362): 90-94.
- Walston, J., et al. (2008). "The physical and biological characterization of a frail mouse model." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **63**(4): 391-398.
- Wang, A. S., et al. (2017). "Loss of lamin B1 is a biomarker to quantify cellular senescence in photoaged skin." Sci Rep **7**(1): 15678.
- Wang, C., et al. (2009). "DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice." Aging Cell **8**(3): 311-323.
- Wang, E. (1995). "Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved." Cancer Res **55**(11): 2284-2292.
- Wang, T., et al. (2017). "Epigenetic aging signatures in mice livers are slowed by dwarfism, calorie restriction and rapamycin treatment." Genome Biol **18**(1): 57.
- Wang, W., et al. (2018). "Extracellular vesicles extracted from young donor serum attenuate inflammaging via partially rejuvenating aged T-cell immunotolerance." FASEB J: fj201800059R.
- Weidner, C. I., et al. (2014). "Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites." Genome Biol **15**(2): R24.
- Whitehead, J. C., et al. (2014). "A clinical frailty index in aging mice: comparisons with frailty index data in humans." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **69**(6): 621-632.
- Whittemore, K., et al. (2019). "Telomere shortening rate predicts species life span." Proc Natl Acad Sci U S A **116**(30): 15122-15127.
- Wolf, P. (1967). "The nature and significance of platelet products in human plasma." Br J Haematol **13**(3): 269-288.
- Won, C. H., et al. (2010). "Hair growth promoting effects of adipose tissue-derived stem cells." J Dermatol Sci **57**(2): 134-137.

Wong, S. H., et al. (1987). "Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct." Clin Chem **33**(2 Pt 1): 214-220.

WR, H., et al. (1998). Principles of Geriatric Medicine and Gerontology. Frailty and failure to thrive. F. L. W. J. New York, McGraw Hill: 1387-1402.

Xin, H., et al. (2013). "Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats." J Cereb Blood Flow Metab **33**(11): 1711-1715.

Yagi, K. (1987). "Lipid peroxides and human diseases." Chem Phys Lipids **45**(2-4): 337-351.

Yan, Y., et al. (2017). "hucMSC Exosome-Derived GPX1 Is Required for the Recovery of Hepatic Oxidant Injury." Mol Ther **25**(2): 465-479.

Yilmaz, Ö., et al. (2012). "mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake." Nature **486**(7404): 490-495.

Yin, Z., et al. (2022). "Dietary Restriction and Rapamycin Affect Brain Aging in Mice by Attenuating Age-Related DNA Methylation Changes." Genes (Basel) **13**(4).

Yosef, R., et al. (2016). "Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL." Nat Commun **7**: 11190.

Zainabadi, K. (2018). "A brief history of modern aging research." Exp Gerontol **104**: 35-42.

Zakrzewski, W., et al. (2019). "Stem cells: past, present, and future." Stem Cell Res Ther **10**(1): 68.

Zhang, M. W., et al. (2018). "Tissue iron is negatively correlated with TERC or TERT mRNA expression: A heterochronic parabiosis study in mice." Aging (Albany NY) **10**(12): 3834-3850.

Zhang, W. G., et al. (2010). "SIRT1 variants are associated with aging in a healthy Han Chinese population." Clin Chim Acta **411**(21-22): 1679-1683.

Zhang, Y., et al. (2015). "Effect of exosomes derived from multipotential mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury." J Neurosurg **122**(4): 856-867.

Zhang, Y., et al. (2009). "Mice deficient in both Mn superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 have increased oxidative damage and a greater incidence of pathology but no reduction in longevity." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **64**(12): 1212-1220.

Zhang, Y., et al. (2017). "Hypothalamic stem cells control ageing speed partly through exosomal miRNAs." Nature **548**(7665): 52-57.

Zhu, Y., et al. (2016). "Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors." Aging Cell **15**(3): 428-435.

Zhu, Y., et al. (2015). "The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs." Aging Cell **14**(4): 644-658.

Zuk, P. A., et al. (2002). "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells." Mol Biol Cell **13**(12): 4279-4295.

Zuk, P. A., et al. (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." Tissue Eng **7**(2): 211-228.

Zöller, M. (2009). "Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis." Nat Rev Cancer **9**(1): 40-55.

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1: Datos del análisis de los microARNs con diferente expresión entre las VEs derivadas de CMTAs jóvenes y viejas

CMTAs jóvenes (media log2)	CMTAs viejas (media log2)	Cambio en la expresión	P-valor	ID	Secuencia	microARN
4,36	1,87	5,62	3,56E-05	MIMAT0027976	AGCGGGGUUCGGU GGGGAAGAGA	mmu-mir-7036a-5p
3,62	1,63	3,98	0,0002	MIMAT0028040	CCUGGUGGGUGGG GAAGAGC	mm-miR-6769b-5p
5,3	1,83	11,09	0,0004	MIMAT0028076	CAGUGGGGGCAGG CCAGCAGGA	mmu-miR-7085-5p
2,9	1,26	3,12	0,0005	MIMAT0004531	UAUAGGGAUUGGA GCCGUGGCG	mmu-miR-135a-1-3p
4,81	1,86	7,72	0,0008	MIMAT0014939	UAGGGGGCAGGAG CCGGAGCCUCU	mmu-miR-3104-5p
1,93	3,11	-2,26	0,0008	MIMAT0000666	AAAAGCUGGGUUG AGAGGGCGA	mmu-miR-320a-3p
2,4	1,21	2,28	0,0009	MIMAT0025092	UGGAAUGUGGGAG GGGCAUGCG	mmu-miR-6349
3,62	1,6	4,06	0,001	MIMAT0029822	UGUGGGCGUGGCG GUGCUGG	mmumiR-7658
5,69	2,88	6,99	0,0015	MIMAT0027762	UGGGGUGGGGAGU GGGGGACU	mmu-miR-6931-5p
3,93	1,77	4,44	0,0025	MIMAT0014933	GUGAGUGCCAGG GUGGGGUCUG	mmu-miR-3102-5p

8.2 Anexo 2: Datos del análisis de los microARNs con diferente expresión entre las VEs derivadas de CMTAs viejas y del plasma de ratones viejos.

CMTAs jóvenes (media log2)	CMTAs viejas (media log2)	Cambio en la expresión	P-valor	ID	Secuencia	microARN
4,87	1,51	10,29	1,42E-08	MIMAT000157	GUCCAGUUUUCCC AGGAAUCCCU	mmu-miR-145-5p
4,7	1,29	10,6	8,38E-08	MIMAT000661	ACAGCAGGCACAG ACAGGCAGU	mmu-miR-214-3p
4,69	1	12,95	1,03E-06	MIMAT000247	UGAGAUGAAGCAC UGUAGCUC	mmu-miR-143-3p
5,18	2,52	6,31	1,08E-06	MIMAT0020620	UAGCUCAGCGGGA GAGCAC	mmu-miR-5112
1,02	3,11	-4,26	7,80E-06	MIMAT0003130	UCCUGUACUGAGC UGCCCCGAG	mmu-miR-486a-5p
1,02	3,11	-4,26	7,80E-06	MIMAT0014943	UCCUGUACUGAGC UGCCCCGAG	mmu-miR-486b-5p
3,11	1,48	3,1	1,58E-05	MIMAT000666	AAAAGCUGGGUUG AGAGGGCGA	mmu-miR-320-3p
1,71	4,25	-5,79	4,19E-05	MIMAT000527	UAGCAGCACGUAA AUAUUGGCG	mmu-miR-16-5p
4,8	1,55	9,5	0,0001	MIMAT000523	UGAGGUAGUAGGU UGUAUGGUU	mmu-let7c-5p
4,92	1,26	12,66	0,0002	MIMAT0020607	UCGAAUCCAGCG GUGCCUCU	mmu-miR-5100
2,04	3,19	-2,23	0,0006	MIMAT000221	CAACGGAAUCCCA AAAGCAGCUG	mmu-miR-191-5p
3,27	1,03	4,73	0,0006	MIMAT000136	UCCUGAGACCCUA ACUUGUGA	mmu-miR-125b-5p
6,76	4,51	4,76	0,0011	MIMAT0027838	AGGGGGCGAGGGG GCCUGUGG	mmu-miR-6968-5p
4,73	1,7	8,19	0,0012	MIMAT000522	UGAGGUAGUAGGU UGUGUGGUU	mmu-let-7b-5p
6,14	1,32	28,14	0,0015	MIMAT0003499	GGAGGCAGAGGCA GGAGGA	mmu-miR-709
6,03	3,69	5,06	0,0029	MIMAT0027832	GUGGGAAGAGGGG UGGGGCCCGGGA	mmu-miR-3547-5p

8.3 Anexo 3: Datos del análisis de los microARNs con diferente expresión entre las VEs derivadas de CMTAs jóvenes y del plasma de ratones viejos.

CMTAs jóvenes (media log2)	CMTAs viejas (media log2)	Cambio en la expresión	P-valor	ID	Secuencia	microARN
5,01	1,29	13,2	1,16E-07	MIMAT000661	ACAGCAGGCACAG ACAGGCAGU	mmu-miR-214-3p
4,32	1,51	6,98	1,61E-07	MIMAT000157	GUCCAGUUUUCCCA GGAAUCCCU	mmu-miR-145-5p
5,66	2,52	8,76	1,88E-07	MIMAT0020620	UAGCUCAGCGGGA GAGCAC	mmu-miR-5112
4,36	1,36	8,02	3,60E-06	MIMAT0027976	AGCGGGGUUCGGU GGGAAGAGA	mmu-mir-7036a-5p
1,67	4,25	-5,95	5,70E-06	MIMAT0000527	UAGCAGCAGGUAA AUAUUGGCG	mmu-miR-16-5p
4,28	1	9,74	8,14E-06	MIMAT0000247	UGAGAUGAAGCAC UGUAGCUC	mmu-miR-143-3p
1,05	3,11	-4,18	1,19E-05	MIMAT0003130	UCCUGUACUGAGC UGCCCCGAG	mmu-miR-486a-5p
1,05	3,11	-4,18	1,19E-05	MIMAT0014943	UCCUGUACUGAGC UGCCCCGAG	mmu-miR-486b-5p
7,52	3,69	14,23	3,73E-05	MIMAT0027832	GUGGGAAGAGGGG UGGGGCCCGGGA	mmu-miR-3547-5p
5,3	1,38	15,12	4,53E-05	MIMAT0028076	CAGUGGGGCAGG CCAGCAGGA	mmu-miR-7085-5p
7,61	4,51	8,57	7,65E-05	MIMAT0027838	AGGGGGCGAGGGG GCCUGUGG	mmu-miR-6968-5p
4	1,26	6,67	9,06E-05	MIMAT0020607	UCGAAUCCCAGCGG UGCCUCU	mmu-miR-5100
4,81	1,23	11,96	0,0001	MIMAT0014939	UAGGGGGCAGGAG CCGGAGCCUCU	mmu-miR-3104-5p
2,03	3,19	-2,24	0,0001	MIMAT0000221	CAACGGAAUCCCAA AAGCAGCUG	mmu-miR-191-5p
3,62	1,39	4,7	0,0001	MIMAT0028040	CCUGGUGGGUGGG GAAGAGC	mmu-miR-6769b

5,69	1,6	17,03	0,0001	MIMAT0 027762	UGGGGUGGGGAGU GGGGGACU	mmu-miR-6931-5p
2,9	1,05	3,61	0,0002	MIMAT0 004531	UAUAGGGAUUGGA GCCGUGGCG	mmu-miR-135a-1- 3p
3,93	1,39	5,79	0,0002	MIMAT0 014933	GUGAGUGGCCAGG GUGGGGUCUG	mmu-miR-3102-5p
2,4	1,22	2,26	0,0006	MIMAT0 025092	UGGAAUGUGGGAG GGCAUGCG	mmu-miR-6349
7,02	4,88	4,41	0,0012	MIMAT0 020641	CUGGAGCGCGCGG GCGAGGCAGGC	mmu-miR-5130
8,22	5,48	6,68	0,0014	MIMAT0 024861	CCAAAGCAUCGCGA AGGCCACGCGC	mmu-miR-6240
4,99	2,36	6,21	0,0015	MIMAT0 003495	GGUGGGAGGUGGG GUGGGCA	mmu-miR-705
2,86	1,03	3,56	0,0018	MIMAT0 000136	UCCUGAGACCCUA ACUUGUGA	mmu-miR-125b-5p
8,4	6	5,28	0,0026	MIMAT0 031405	GGCGAGCGGAGCC GGAGGAGCC	mmu-miR-8101
2,48	1,28	2,3	0,0031	MIMAT0 029839	GAUGCAGGCACG GGCGAG	mmu-miR-7666-3p
7,56	4,66	7,43	0,0032	MIMAT0 025110	AGCUAAGGGGCC GGGGAGCCA	mmu-miR-6366
3,35	1,55	3,48	0,0038	MIMAT0 000523	UGAGGUAGUAGGU UGUAUGGUU	mmu-let-7c-5p
8,18	5,97	4,63	0,0045	MIMAT0 014862	CUGCGGACGGGUG GGCGGGCAGGCC	mmu-miR-3077-5p
2,51	1,03	2,78	0,0083	MIMAT0 031396	AAAGGAUUCUGCU GUCUGUCCC	mmu-miR-8095