

## PROYECTO DE INICIACIÓN A LA INVESTIGACIÓN

Apellidos y nombre de la solicitante de la ayuda: GARCÍA DOMÍNGUEZ, ESTHER  
DNI: 18451974V

Datos del director del proyecto:

Apellidos y nombre: VIÑA RIBES, JOSÉ

DNI: 19454510Y

Cargo: Catedrático de Universidad

Departamento: Fisiología (Facultad de Medicina, Universitat de València)

Línea de investigación a la que se vincula el proyecto: INVESTIGACIÓN EN EJERCICIO FÍSICO Y ENVEJECIMIENTO.

Título del proyecto de investigación: MODULACIÓN DEL BALANCE REDOX COMO ESTRATEGIA PARA UN ENVEJECIMIENTO COGNITIVO SALUDABLE.

Descripción del proyecto

### **ANTECEDENTES**

La población española ha envejecido progresivamente en las últimas décadas. Este fenómeno demográfico se debe principalmente a un aumento significativo de la esperanza de vida y a una disminución importante de la fecundidad. La expectativa de vida en occidente ha incrementado más en los últimos 100 años que en los 2000 previos<sup>1</sup>. Así, las previsiones epidemiológicas sitúan la población mayor de 65 años para el año 2050 en un porcentaje superior al 30%, suponiendo más de 2000 millones de personas mayores a nivel mundial<sup>2</sup>.

El envejecimiento supone un reto para los sistemas de salud actuales, pues la población mayor de 65 años contribuye muy significativamente al gasto sanitario<sup>3</sup>. A medida que la expectativa de vida aumenta, también lo hacen las enfermedades asociadas al envejecimiento<sup>4</sup>. En este contexto surge el concepto "Healthspan" (calidad de vida). Somos muchos los investigadores y profesionales de la salud que consideramos que los esfuerzos por alargar la vida a expensas de provocar una discapacidad física o psíquica severa son erróneos<sup>5,6</sup> y, por el contrario, debemos centrarnos en alargar la parte de la vida durante la cual somos capaces de mantener la autonomía, independencia, productividad y bienestar<sup>6</sup>. Tras años intentando mejorar la expectativa de vida, debemos esforzarnos en prolongar la calidad de vida.

Se considera que la expresión más problemática del envejecimiento poblacional es la condición clínica de la fragilidad porque una parte importante del colectivo de personas mayores presenta criterios de fragilidad<sup>1</sup>. Se estima que un cuarto de personas mayores de 85 años es frágil<sup>7</sup>. La fragilidad es un síndrome geriátrico caracterizado por un aumento de la vulnerabilidad a las agresiones externas, resultado de la alteración de las reservas fisiológicas de múltiples sistemas, que origina dificultades para mantener la homeostasis<sup>8</sup>.

El síndrome de fragilidad cursa con una disminución de masa magra, fuerza muscular, resistencia, velocidad de la marcha, y actividad física<sup>8</sup>. La fragilidad dificulta la adaptación del anciano a su entorno e incrementa su vulnerabilidad a traumas y/o enfermedades agudas, incrementando la incidencia de caídas y el riesgo de discapacidad, institucionalización, hospitalización y muerte<sup>9</sup>.

La evidencia de la importancia de la fragilidad en ancianos deriva de un influyente estudio prospectivo de diez años de duración<sup>10</sup>, donde la principal causa de muerte fue la fragilidad (28%); el resto fueron fallo orgánico (21%), cáncer (19%), demencia (14%), y otras causas (15%). El papel de la fragilidad como predictora de muerte y discapacidad es el que otorga a este síndrome un papel fundamental en la investigación básica y clínica<sup>11,12</sup>.

En geriatría se considera que la discapacidad empeora la calidad de vida del paciente mucho más que la enfermedad<sup>6,9</sup>. Además, la mayor parte del gasto sanitario se emplea en atender a la discapacidad ya que puede desembocar en dependencia<sup>13</sup>. El gasto sanitario se multiplica por cuatro cuando el nivel de dependencia de una persona mayor pasa de ser leve a muy grave<sup>9</sup> y se mantiene hasta la muerte del sujeto (Ver Figura 1). La fragilidad tiene un componente cognitivo muy relevante porque está relacionada con las probabilidades de desarrollar demencia tipo Alzheimer. Esto tiene implicaciones para el manejo clínico, pues los individuos frágiles podrían estar en riesgo de demencia.

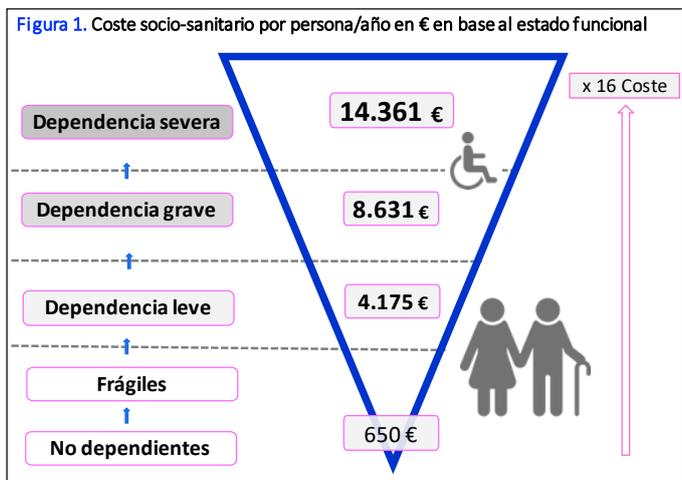
Por ello, el desarrollo de intervenciones para reducir la prevalencia o severidad de la fragilidad va a reportar importantes beneficios tanto para el individuo y sus familiares como para la sociedad<sup>14</sup>.

Los componentes de la fragilidad son una combinación de factores psicológicos, fisiológicos, sociales y ambientales. En este sentido, la sarcopenia (pérdida de masa muscular asociada a la edad) y el deterioro funcional y cognitivo condicionan el desarrollo del síndrome<sup>15</sup>. Asimismo, el estado nutricional y la inactividad física son dos factores muy importantes en el desarrollo de fragilidad<sup>16,17</sup>.

En la presente solicitud de ayuda pretendemos estudiar los pilares más relevantes de la fragilidad para profundizar en el estudio de las bases moleculares de este síndrome geriátrico, así como establecer biomarcadores específicos para su detección precoz.

Nuestro grupo de investigación lleva años estudiando la asociación entre estrés oxidativo y envejecimiento<sup>18,19</sup>. Recientemente, hemos demostrado que el daño oxidativo se asocia no sólo con envejecimiento, sino con fragilidad<sup>1</sup>. Se han encontrado evidencias a favor de esta asociación: los modelos animales deficientes en enzimas antioxidantes tienen una mayor susceptibilidad a las enfermedades asociadas al envejecimiento, mientras que quienes las sobre-expresan aumentan su esperanza de vida en salud o calidad de vida<sup>20</sup>. Se ha demostrado que los animales deficientes en la enzima antioxidante superóxido dismutasa son más frágiles que sus respectivos controles<sup>21</sup>.

Nuestro grupo dispone de una colonia de animales que sobre-expresan la enzima antioxidante glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (Tg-G6PD). En colaboración con el CNIO comprobamos que estos animales mantienen su masa magra a medida que envejecen, tienen menor daño oxidativo, mayor vida media y mayor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina que los animales controles (Wt)<sup>22</sup>. Sin embargo, su papel en la prevención de la fragilidad lo desconocemos. Nuestro razonamiento es que el aumento del NADPH por la sobre-expresión de G6PD potencia las defensas antioxidantes endógenas generando un ambiente reducido en las células del animal transgénico. Nuestra hipótesis apoya el desarrollo de intervenciones nutricionales destinadas a incrementar los niveles de NADPH como nueva estrategia para conseguir un envejecimiento saludable. Esto se



puede conseguir por la activación de las vías implicadas en la producción de NADPH mediante la sobre-expresión de G6PD (tal y como hicimos en nuestro trabajo) o a través de la suplementación de precursores de NADH tales como el Ribósido de Nicotinamida (RN). La suplementación con RN reduce la pérdida de células madres adultas musculares durante el envejecimiento, la senescencia en células madre neurales adultas y la disfunción en un modelo de distrofia muscular en animales<sup>23</sup>. Sin embargo, se desconoce su posible papel en la prevención o tratamiento de la fragilidad.

## OBJETIVOS

El envejecimiento de la población impone la necesidad de buscar una longevidad saludable. Clínicamente, se trata de prevenir la fragilidad funcional y cognitiva y su paso a la dependencia.

Planteamos como **OBJETIVO GENERAL** estudiar los mecanismos moleculares responsables de la fragilidad y las posibles intervenciones que eviten, o retrasen, su aparición. Asimismo, nos planteamos la identificación de biomarcadores precoces de fragilidad con utilidad para detectarla de forma temprana, ayudando a su diagnóstico clínico (Ver Figura 2).

### **OBJETIVO 1: ESTUDIAR SI LA SOBRE-EXPRESIÓN DE LA ENZIMA G6PD RETRASA LA FRAGILIDAD EN ANIMALES VIEJOS (MACHOS Y HEMBRAS).**

Los objetivos concretos son:

**1.1** Medición de la fragilidad en animales viejos (Tg-G6PD y Wt) de distintas edades (18, 20, 23, 25 meses) utilizando un test de fragilidad, desarrollado y validado por nuestro grupo, específico para ratones<sup>8,24</sup>.

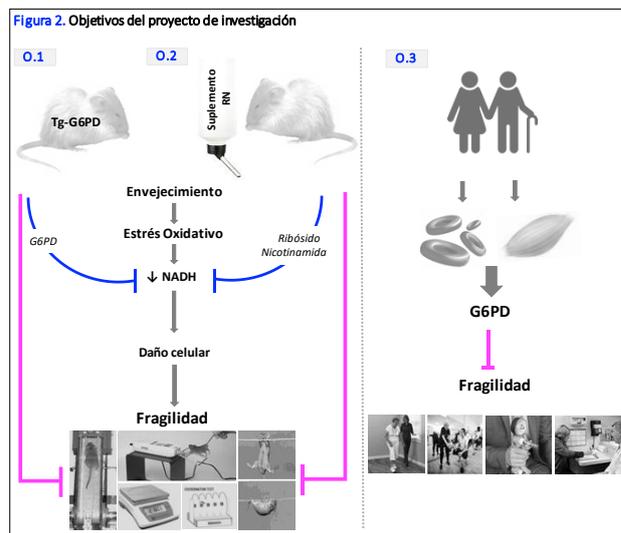
**1.2** Determinación de parámetros de estrés oxidativo (GSH, GSSG y carbonilación de proteínas) y de la actividad G6PD en músculo esquelético y sangre de animales viejos (Tg-G6PD y Wt) en las distintas edades propuestas en el objetivo 1.1.

**1.3** Estudio de la expresión génica diferencial a través de biochips de oligonucleótidos, a nivel muscular, en animales viejos de 23 meses, Tg-6PD y Wt.

Determinación de la capacidad regenerativa de las células satélite (madre) musculares en animales de 25 meses (Tg-G6PD y Wt).

*Para ello inyectaremos un agente mionecrótico (cardiotoxina) para medir en los músculos regenerados:*

- *Síntesis de proteínas (método SUnSET).*
- *Expresión de la miosina embrionaria (eMHC).*
- *Distribución en tipo de fibras musculares y cuantificación de su tamaño.*
- *Frecuencia de distribución del área de sección transversal.*
- *Porcentaje de fibras con núcleos centrales.*



**OBJETIVO 2. ESTUDIAR SI LA SUPLEMENTACIÓN CON RIBÓSIDO DE NICOTINAMIDA RETRASA LA FRAGILIDAD EN ANIMALES VIEJOS (MACHOS Y HEMBRAS).**

Los objetivos concretos son:

**2.1** Medición de la fragilidad en animales viejos, de 23 meses, suplementados con una dosis diaria de 400 mgxKg<sup>-1</sup> de peso de RN, administrada en el agua de bebida durante 6 semanas.

*Mismos estudios planteados en el objetivo 1.1.*

**2.2** Estudio del estrés oxidativo y la expresión génica diferencial muscular en animales viejos de 23 meses, suplementados durante 6 semanas con RN.

*Mismos estudios planteados en los objetivos 1.2 y 1.3.*

**2.3** Determinación de la capacidad regenerativa de las células satélite (madre) musculares de los animales de 23 meses tratados durante 6 semanas con RN.

*Mismos estudios planteados en el objetivo 1.4.*

Compararemos los datos obtenidos en los animales tratados con RN con animales control de misma edad.

**OBJETIVO 3. ESTUDIAR SI LA FRAGILIDAD EN HUMANOS SE ASOCIA CON UNA DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD G6PD EN SANGRE Y EN MÚSCULO ESQUELÉTICO.**

Este objetivo lo desarrollaremos íntegramente en humanos (hombres y mujeres). Pretendemos conocer si la actividad G6PD en sangre puede ser considerada un biomarcador precoz de fragilidad con utilidad clínica. Los objetivos concretos son:

**3.1** Reclutamiento de tres grupos de adultos mayores: robustos (n=20), pre-frágiles (n=20) y frágiles (n=20) y determinación de su actividad G6PD en sangre.

**3.2** Determinación de la composición corporal en el grupo de pacientes frágiles utilizando Absorciometría de Rayos X de Doble Energía (DEXA) y estudiaremos la posible correlación entre masa muscular y actividad en sangre de la G6PD.

**3.3** Comparación de la actividad G6PD en sangre y en músculo (glúteo mayor) de un grupo de pacientes mayores (80-85 años) sometidos a cirugía de cadera.

**3.4** Comparación de las modificaciones en la actividad G6PD con otros biomarcadores de fragilidad establecidos por nuestro grupo de investigación: malondialdehído, BDNF, proteínas carboniladas y agrina.

**Tareas a realizar durante las 225 horas**

La concesión de esta ayuda me permitirá aplicar de forma práctica los contenidos teóricos aprendidos durante el curso del Máster Universitario en Investigación e Intervención en Ciencias de la Actividad Física y del Deporte. Asimismo, constituye una oportunidad para iniciarme en tareas de investigación y conocer la metodología de trabajo seguida en el grupo de investigación Freshage del departamento de Fisiología.

El estudio realizado durante el periodo abarcado por la ayuda constituirá un precedente de lo que será mi tesis doctoral, cuyo proyecto planificado para los próximos 4 años se desarrollará siguiendo el esquema temporal adjuntado. Con la finalidad de vincular la ayuda de Iniciación a la Investigación al proyecto de tesis, aprovecharé las 225 horas para trabajar dentro del primer objetivo.



La metodología que presento a continuación recoge las tareas concretas que desempeñaré durante el periodo que abarca la ayuda.

## **METODOLOGÍA**

Los animales se estabularán en el animalario de la Unidad Central de Investigación Médica de la Facultad de Medicina, bajo condiciones de temperatura ( $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), humedad relativa (60%) y ciclos de luz/oscuridad constante (12h/12h).

### • **Ratones TgG6PD**

Disponemos de una colonia de animales Tg para G6PD que poseen una copia completa del gen G6PD humano. Los machos Tg presentan una actividad G6PD  $\sim 2$  veces mayor respecto el control (Wt), mientras que las hembras presentan una actividad G6PD  $\sim 4$  veces mayor respecto el Wt.

### • **Test de fragilidad**

Utilizaremos 80 animales viejos de 18 meses de edad ( $40 \text{♀}$  y  $40 \text{♂}$ ). La mitad de los animales, tanto machos como hembras, serán Tg-G6PD y la otra mitad Wt. El test de fragilidad es un test no invasivo que realizaremos a los 18, 20, 23 y 25 meses de edad. Nuestras instalaciones disponen del material necesario (Ver Figura 3).

### • **Suplementación con RN**

20 animales de 23 meses de edad ( $10 \text{♀}$  y  $10 \text{♂}$ ) serán suplementados con  $400\text{mg}\times\text{Kg}^{-1}$  de peso de RN en el agua de bebida durante 6 semanas. El consumo de bebida será controlado cada 48 horas y la dosis de RN reajustada en base a dicho consumo.

### • **Muestra biológica:**

Se extraerán todos los músculos de los miembros inferiores de los animales para ser pesados previo procesado. Una pata será reservada para los estudios histológicos y la otra para los estudios moleculares. Se obtendrá muestra de sangre total, plasma y suero, hígado y riñón para descartar toxicidad por el tratamiento con el RN. Todas las muestras serán mantenidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior procesado y análisis.

Figura 3. Valencia Score de Fragilidad en ratones



## ✓ **Determinaciones**

### • **Estrés oxidativo en sangre y músculos**

- Malondialdehído (MDA), como índice de lipoperoxidación por HPLC<sup>25</sup>.
- Proteínas carboniladas, como índice de oxidación proteica por Western Blotting<sup>26</sup>.
- GSH y GSSG por espectrofotometría.

### • **Actividad G6PD en sangre y músculos**

Utilizando un protocolo espectrofotométrico establecido en nuestro laboratorio<sup>22</sup>.

### • **Biomarcadores de fragilidad**

Para la determinación de los niveles de BDNF en suero<sup>14</sup> y de los niveles de agrina en plasma, se utilizará la técnica de ELISA.

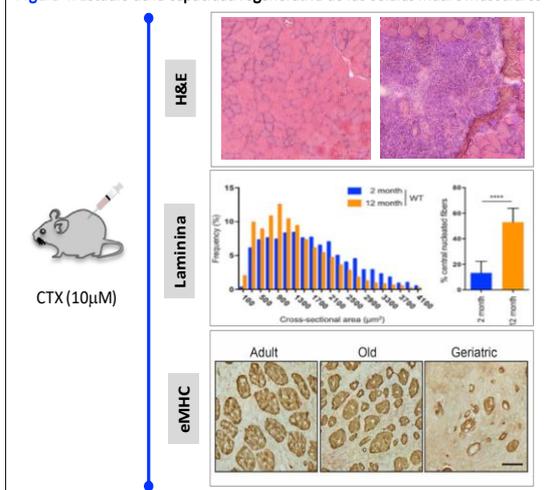
• **Capacidad regenerativa de las células satélite (Ver Figura 4)**

Inyectaremos dos grupos musculares en los animales (tibial anterior y gastrocnemio) con 10 $\mu$ M del agente mionecrótico cardiotoxina (CTX). Tras la inyección recogeremos muestras a los 4, 7 y 10 días de la regeneración.

• **Expresión génica diferencial mediante biochips de oligonucleótidos a nivel muscular**

Biochips tipo GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST Array (Thermo Fisher Scientific) detectan todo el transcriptoma de ratón (más de 26.500 genes).

Figura 4. Estudio de la capacidad regenerativa de las células madre musculares



Impacto formativo complementario

El proyecto desarrollado gracias a la ayuda de Iniciación a la Investigación tendrá un impacto formativo complementario en diferentes competencias asociadas a las materias obligatorias del Máster Universitario que estoy cursando.

(a) Competencias del módulo *La investigación y la certificación del conocimiento científico:*

- Saber aplicar los conocimientos adquiridos y su capacidad de resolución de problemas en entornos nuevos o poco conocidos dentro de contextos más amplios (o multidisciplinares) relacionados con su área de estudio.
- Identificar nuevos problemas relativos a la actividad física y el deporte susceptibles de ser estudiados mediante la investigación aplicada.
- Conocer los tipos de evaluación en la ciencia.

(b) Competencias del módulo *Investigación Cualitativa:*

- Adaptar el diseño y la metodología al objeto de estudio y las características de la investigación, así como interpretar los resultados, discutirlos y elaborar conclusiones claras y coherentes.

(c) Competencias del módulo *Investigación Cuantitativa:*

- Poseer las habilidades de aprendizaje que les permitan continuar estudiando de un modo que habrá de ser en gran medida autodirigido o autónomo.
- Comprender el complejo entorno de investigación, sus limitaciones y desafíos.
- Conocer los instrumentos de medida del ámbito de la investigación cuantitativa.
- Preparar un informe científico derivado de una investigación cuantitativa.
- Comunicar resultados de investigación experimental de acuerdo a la cultura científica de la investigación cuantitativa.

(d) Competencias del módulo *Investigación Aplicada I:*

- Concebir, diseñar y desarrollar una investigación aplicada de alguno de los contextos sociales de la actividad física y el deporte.
- Identificar y analizar las principales líneas de investigación que en la actualidad están empleando el ejercicio como herramienta de mejora de la salud y el rendimiento.
- Saber el funcionamiento y utilizar los principales medios tecnológicos necesarios para cuantificar variables relacionadas con el rendimiento y la salud.

- Conocer y aplicar diseños de investigación en un entorno de rendimiento y de mejora de la salud.

(e) Competencias del módulo *Investigación Aplicada II*:

- Comprender y analizar la investigación que se realiza en los contextos del ejercicio y la salud.
- Adaptar el diseño y la metodología al objeto de estudio y las características de la investigación, así como interpretar los resultados, discutirlos y elaborar conclusiones claras y coherentes.

Referencias

1. Vina J, et al. *Mol Aspects Med.* 2016;50:88-108.
2. Clegg A, et al. *Lancet.* 2013;381(9868):752-762.
3. Sinha SK. *HealthcarePapers* 2011;11(1):46-51.
4. Lejoyeux M, et al. *Compr Psychiatry.* 2008;49(4):353-358.
5. Goetzl EJ. Is aging a drug target? *FASEB J.* 2011;25(8):2509-2511.
6. Garcia-Valles R, et al. *Longevity & Healthspan.* 2013:2-14.
7. Song X, et al. *J Am Geriatr Soc.* 2010;58(4):681-687.
8. Fried LP, et al. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2001;56(3):M146-156.
9. Rodriguez-Manas L, et al. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2013;68(1):62-67.
10. Gill TM, et al. *N Engl J Med.* 2010;362(13):1173-1180.
11. Garcia-Garcia FJ, et al. *J Nutr Health Aging.* 2011;15(10):852-856.
12. Sternberg SA, et al. *J Am Geriatr Soc.* 2011;59(11):2129-2138.
13. Abizanda P, et al. *J Am Geriatr Soc.* 2011;59(7):1356-1359.
14. Tarazona-Santabalbina FJ, et al. A Multicomponent *J Am Med Dir Assoc.* 2016;17(5):426-433.
15. Tatar M. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2009;64(2):161-163.
16. Vina J, et al. *Free Radic Biol Med.* 2016;98:159-164.
17. Vina J, et al. *J Physiol.* 2016;594(8):1989-1999.
18. Vina J, et al. *Br J Nutr.* 2007;98 Suppl 1:S36-40.
19. Vina J, et al. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19(8):779-787.
20. Hamilton RT, et al. *J Clin Exp Pathol.* 2012;Suppl 4.
21. Deepa SS, et al. *Geroscience.* 2017;39(2):187-198.
22. Nobrega-Pereira S, et al. *Nat Commun.* 2016;7:10894.
23. Zhang H, et al. *Science.* 2016;352(6292):1436-1443.
24. Gomez-Cabrera MC, et al. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2017;72(7):885-891.
25. Gomez-Cabrera MC, et al. *Jama.* 2003;289(19):2503-2504.
26. Gomez-Cabrera MC, et al. *J Physiol.* 2005.

Firma del director:



José Viña Ribes

Firma de la solicitante:



Esther García Domínguez