



Efecto del ejercicio de baja intensidad en un modelo de obesidad osteosarcopénica y
la regulación de la expresión de miRNAs durante el envejecimiento

T E S I S

Que para obtener el grado de
Doctor en Biología Experimental

P R E S E N T A

M. en Biol. Exp. Gibrán Pedraza Vázquez

Comité tutorial:

Co-director: Dr. Armando Luna López

Co-director: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Asesora: Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Declaración de originalidad

El que suscribe **Gibran Pedraza Vazquez** alumno del posgrado en **Biología Experimental**, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: “Efecto del ejercicio de baja intensidad en un modelo de obesidad osteosarcopénica y la regulación con la expresión de miRNAs durante el envejecimiento”,

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. jurado para lo obtención del grado de Doctor en Biología Experimental es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 19 de diciembre del 2022.

Atentamente



Gibran Pedraza Vazquez

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 19 de diciembre de 2022

Comisión Académica del Posgrado en

Biología Experimental

Presente

El que suscribe **Gibran Pedraza Vazquez** alumno con número de matrícula **2143800973** del posgrado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación “Efecto del ejercicio de baja intensidad en un modelo de obesidad osteosarcopénica y la regulación con la expresión de miRNAs durante el envejecimiento” a desarrollar en el Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiese ocasionarse a esta Casa de Estudios.



Gibran Pedraza Vazquez

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular y el Laboratorio de Medicina Experimental y Carcinogénesis del departamento de Ciencias de la Salud, en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

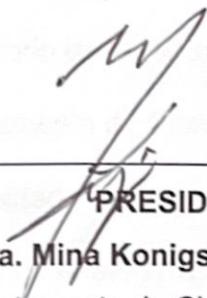
Número de becario: 570358 CVU: 634559

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "Estudio del ejercicio de baja intensidad en ratas con obesidad osteosarcopénica y su relación con la expresión de miRNAs en el envejecimiento", que presentó

M. en B.E. Gibrán Pedraza Vázquez

El día 19 de diciembre de 2022

MIEMBROS DEL JURADO



PRESIDENTE

Dra. Mina Konigsberg Fainstein
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana



SECRETARIO

Dr. Óscar Rosas Carrasco
Departamento de la Salud
Universidad Iberoamericana



VOCAL

Dra. Miriam T. López Teros
Departamento de la Salud
Universidad Iberoamericana



VOCAL

Dr. Iván Bahena Ocampo
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana

COMITÉ TUTORAL

CODIRECTOR EXTERNO

Dr. Armando Luna López

Departamento de Investigación Básica

Instituto Nacional de Geriátría

allbioexp@yahoo.com

CODIRECTOR INTERNO

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Laboratorio de Medicina Experimental y Carcinogénesis

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

legq@xanum.uam.mx

ASESOR

Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

mkf@xanum.uam.mx

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Luna López por permitirme ser parte de este proyecto, sus enseñanzas y palabras de aliento. Gracias por su apoyo durante mi formación de licenciatura, maestría y ahora en el doctorado.

Al Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz por su apoyo incondicional, los consejos dentro y fuera del laboratorio y sus valiosos comentarios que sin duda fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Mina Konigsberg Fainstein por todo el apoyo a lo largo de todos estos años, sus valiosos comentarios para enriquecer este proyecto y por abrirme las puertas de su laboratorio.

Al Dr. Juan Carlos Gómez Verjan por los valiosos aportes en el análisis bioinformático de este proyecto, gracias por su disponibilidad, análisis de datos y enseñanzas a lo largo del proyecto.

A los doctores Miriam T. López Teros, Oscar Rosas Carrasco e Iván Bahena Ocampo por sus valiosas observaciones a esta tesis y formar parte del jurado.

A mis compañeros de ambos laboratorios. Rafa, Beatriz, David, Paola, Ula, Sandra Li, Roberto, Vero, Elisa, Luis, Ale Escobedo, y Lisette. Por siempre hacerme sentir como en casa. Sepan que sin ustedes esto no sería posible y de verdad los considero parte de mi familia.

A mis amigos. Rafa, Wendy, Betty Mora, Betty Mena, Gaby, David, Paola, Ula, Sandra Li, Roberto, Luis, Ale Escobedo, Lisette, María, José, Qin, Karen, Sarah, Raúl y todos los que se me escapan en este momento. Gracias por estar siempre cerca, ayudarme y sobre todo darme ánimos cuando más lo necesité.

DEDICATORIAS

Para Aranza. No me alcanzan los girasoles en el mundo para agradecer todo el tiempo, consejos y amor que me brindas en todo momento. Gracias por caminar de la mano conmigo todo este tiempo, por tus abrazos inesperados y por abrirme la puerta la noche del diluvio universal. Te amo mucho, hasta quién sabe dónde.

Para mis padres y hermana. Papá, gracias por enseñarme a ver la vida como biólogo desde que era un niño, por impulsarme a hacer lo que me gusta y luchar por mis ideales. Siempre vas a ser mi biólogo favorito. Mamá, gracias por enseñarme a ser independiente, valorar todo lo que hago, ayudar a los que lo necesitan y apoyarme en todo lo que intento. Eve, por recibirme con un abrazo sincero en todo momento. Gracias hermanita.

Gracias por todo su apoyo, amor y comprensión. Los amo mucho.

Para Santi, por enseñarme que se puede aprender a caminar dos veces. Siempre te llevo en la mente y el corazón. Eres lo que me impulsa a seguir adelante. Te amo.

Para Pikín, Fer y Viry. Porque, aunque no estén aquí, vivirán siempre en mi mente.

Resumen

La obesidad osteosarcopénica (OSO) ha sido asociada con la falta de movilidad, caídas, fracturas y otras discapacidades que incrementan el riesgo de mortalidad. Sin embargo, la etiología de esta enfermedad sigue siendo una incógnita. Estudios recientes revelan que el sedentarismo, el aumento de grasa corporal y la regulación epigenética son críticos para que la OSO sea desarrollada, siendo el ejercicio el único tratamiento capaz de prevenir la aparición de esta enfermedad. Por ello, establecimos un modelo de OSO con un grupo de ratas en condiciones de sedentarismo, otro grupo fue sometido a una rutina de ejercicio de baja intensidad (LRER). Determinamos el grado de sarcopenia, obesidad y osteopenia a distintas edades y analizamos el perfil de expresión de miRNAs a lo largo de la vida de los animales mediante microarreglos de expresión en el músculo gastrocnemio. De forma interesante, encontramos que el ejercicio modula la expresión de miRNAs. El análisis de enriquecimiento mostró que estos miRNAs están fuertemente asociados a la regulación del sistema inmune por lo que análisis posteriores al perfil inflamatorio usando los cocientes de IL-6/IL10 y el de TNF- α /IL-10 mostraron que las ratas LRER mostraban un perfil pro-inflamatorio más bajo que el de las ratas sedentarias. Por otro lado, el ejercicio previene la pérdida de fuerza y mantiene la funcionalidad del músculo a lo largo de la vida de los animales. La expresión diferencial de los miRNAs sugiere que participan en este proceso regulando la respuesta inflamatoria asociada con el envejecimiento, previniendo así el desarrollo de la OSO.

Abstract

Osteosarcopenic obesity (OSO) has been associated with immobility, falls, fractures, and other dysfunctions, which could increase mortality risk. However, its etiology remains unknown. Recent studies revealed that sedentarism, fat gain, and epigenetic regulators are critical in its development. One effective intervention to prevent and treat OSO is exercise. Therefore, in the present study, by keeping rats in conditions of sedentarism and others under a low-intensity exercise routine, we established an experimental model of OSO. We determined the degree of sarcopenia, obesity, and osteopenia at different ages and analyzed the miRNA expression during the lifespan using miRNA microarrays from gastrocnemius muscle. Interestingly microarrays results showed that there is a set of miRNAs that changed their expression with exercise. The pathway enrichment analysis showed that these miRNAs are strongly associated with immune regulation. Further inflammatory profiles with IL-6/IL-10 and TNF- α /IL-10 ratios showed that exercised rats presented a lower pro-inflammatory profile than sedentary rats. Exercise prevented strength loss and maintained skeletal muscle functionality over time. Differential expression of miRNAs suggests that they might participate in this process by regulating the inflammatory response associated with aging, thus preventing the development of OSO.

Índice

1. Introducción	1
1.1 Envejecimiento	1
1.2 Sarcopenia, obesidad y envejecimiento	3
1.2.1 Obesidad Osteosarcopénica	5
1.3 Factores detonantes de la OSO	8
1.4 Expresión de miRNAs y su relación con el músculo esquelético en el envejecimiento	10
1.5 El ejercicio y el envejecimiento	12
2. Antecedentes	15
3. Justificación	16
4. Pregunta de investigación	17
5. Hipótesis	17
6. Objetivos	17
6.1 Objetivo General	17
6.2 Objetivos particulares	17
7. Material y métodos	18
7.1 Animales	18
7.2 Grupo sedentario (SED)	19
7.3 Grupo con rutina de ejercicio (LRER: Long-life running exercise routine)	19
7.4 Perfil bioquímico	20
7.5 Absorciometría de rayos X de energía dual (DXA)	20
7.6 Fuerza de agarre	21

7.7 Extracción de RNA total	22
7.8 Microarreglos de expresión de miRNAs.....	22
7.9 Análisis de expresión, enriquecimiento de blancos y vías de señalización	23
7.10 Perfil inflamatorio	24
7.11 Análisis estadístico	24
7.12 Disponibilidad de datos	24
8. Resultados	26
8.1 Perfil bioquímico	26
8.2 Composición corporal.....	28
8.3 Fuerza de agarre	29
8.4 Índice de Masa Muscular Esquelética (SMI) e Índice de Funcionalidad Muscular (SMFI).	29
8.5 Análisis del perfil de expresión de miRNAs.....	31
8.6 Análisis de enriquecimiento de blancos y vías de señalización.	37
8.7 miRNAs con expresión diferencial compartidos entre grupos experimentales para cada grupo de edad.	39
8.8 Perfil inflamatorio de ratas SED y LRER a lo largo del tiempo.	40
9. Discusión	44
10. Conclusiones	53
11. Perspectivas	54
12. Referencias	55
13. Anexos.....	70

Índice de figuras

Figura 1. Distribución poblacional por edades en 2022 y proyección poblacional en 2050. CONAPO, 2022.....	2
Figura 2. Infiltración de tejido graso en el músculo durante el envejecimiento. Además de las limitaciones regenerativas que se observan en el envejecimiento, el sedentarismo, la nutrición y otros factores pueden ser determinantes en el deterioro o mantenimiento del tejido muscular, fuerza y desempeño físico del adulto mayor (Modificado de DiStefano, 2018).	8
Figura 3. OSO como una enfermedad multifactorial.	9
Figura 4. Mecanismo de acción de los miRNAs. Modificado de Vector Biolabs, 2022.....	13
Figura 5. El sedentarismo como factor determinante en el desarrollo de OSO.....	15
Figura 6. Diseño experimental del proyecto.....	25
Figura 7. Gráficas de composición corporal por DXA, SMI, fuerza y funcionalidad.. ..	30
Figura 8. Análisis de componentes principales basado en los perfiles de expresión de los microarreglos.. ..	32
Figura 9. Heatmap y análisis de agrupamiento con dendogramas.....	33
Figura 10. Volcano plots de la expresión diferencial entre las ratas LRER y SED.....	35
Figura 11. Tablas mostrando el top 10 de miRNAs diferencialmente expresados para cada transición (a) y diagramas de Venn (b).....	36
Figura 12. Análisis de enriquecimiento de vías de señalización de los miRNAs con expresión diferencial en SED (A1, B1 y C1) y en LRER (A2, B2 y C2)	38
Figura 13. Perfil inflamatorio de suero de las ratas SED y LRER.....	42
Figura 14. Heatmap de los perfiles inflamatorios de las ratas SED y LRER.	43

Índice de tablas

Tabla 1. Perfil Bioquímico de ratas SED y LRER de 8 meses	26
Tabla 2. Perfil Bioquímico de ratas SED y LRER de 12 meses	26
Tabla 3. Perfil Bioquímico de ratas SED y LRER de 18 meses	27
Tabla 4. Perfil Bioquímico de ratas SED y LRER de 24 meses	27
Tabla 5. miRNAs compartidos y su asociación con la inflamación.	41

1. Introducción

1.1 Envejecimiento

Envejecer es un concepto fuertemente ligado a nosotros, la idea de un adulto mayor normalmente resulta en un cliché en nuestra mente: cabello blanco, arrugas y capacidades físicas mermadas por el tiempo. Esta percepción del envejecimiento puede ser resultado del contexto social en el que nos desarrollamos, producto de una circulación de ideas y símbolos a través de la prensa, cine, televisión y redes sociales (Vivaldo, 2022).

Sin embargo, y de acuerdo con Vivaldo, la experiencia de envejecer no es homogénea, son distintas las maneras en las que envejecen los varones y las mujeres, incluso es distinto experimentar esta etapa de la vida en la ciudad o el campo, o desde distintos estratos sociales (Vivaldo, 2020), es por ello que el deterioro de una persona a otra puede darse en mayor o menor proporción, es decir, el estilo de vida impacta profundamente en la forma en la que envejecemos.

En el contexto biológico, el envejecimiento es un fenómeno caracterizado por el deterioro gradual, progresivo e irreversible de un organismo a lo largo del tiempo (Rajawat, Hilioti and Bossis, 2009; López-Otín *et al.*, 2013). Sin embargo, como se menciona antes, este proceso puede ser fuertemente influenciado por factores ambientales, socioeconómicos que pueden impactar de forma negativa sobre cada individuo.

En nuestro país el Consejo Nacional de Población (CONAPO) estima que en el año 2050 el 22.5 % de la población en México será mayor a 60 años, contrastando con el 6.2% que se contabilizó en 2010, y el 12% del 2022 (Figura 1) por ello el estudio del envejecimiento se ha convertido en un tema de suma importancia, ya que durante el envejecimiento incrementa el riesgo de los individuos a padecer enfermedades como el cáncer, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, entre otras dificultades motoras y cognitivas que se presentan con regularidad relacionadas con el proceso de sarcopenia, obesidad y osteoporosis (López-Otín *et al.*, 2013; Kennedy *et al.*, 2014).

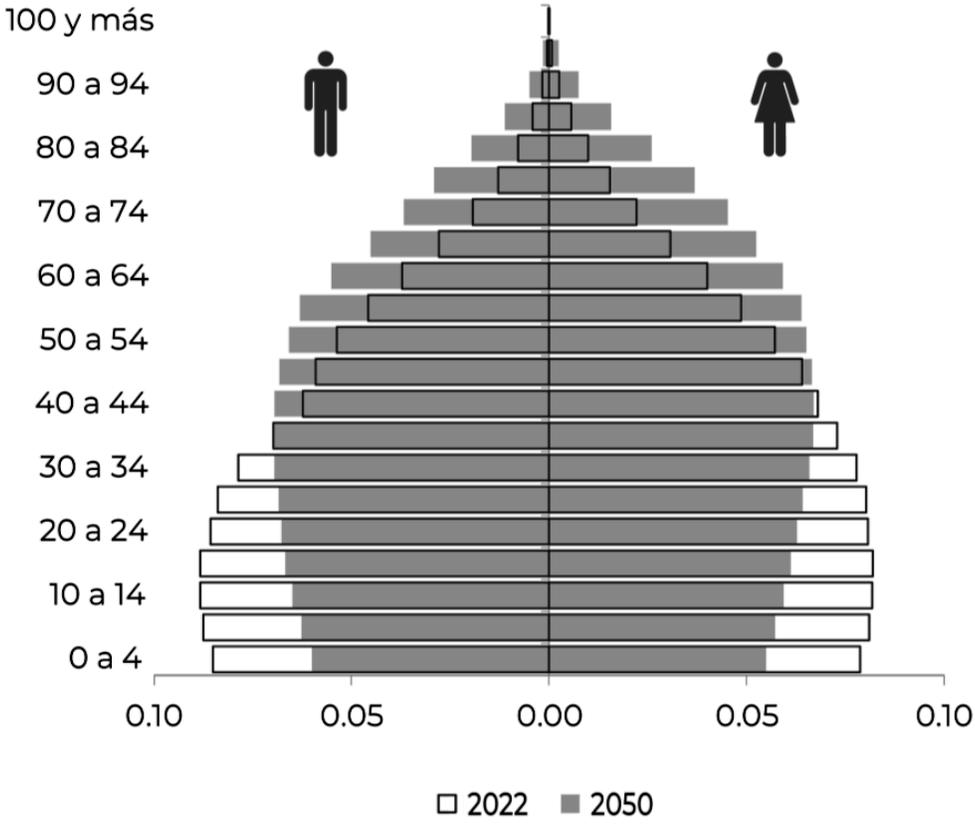


Figura 1. Distribución poblacional por edades en 2022 y proyección poblacional en 2050. CONAPO, 2022.

1.2 Sarcopenia, obesidad y envejecimiento

La sarcopenia es una de las enfermedades que predomina en el envejecimiento, esta se caracteriza por la pérdida de masa muscular esquelética, misma que se asocia con la disminución de la fuerza muscular. El término sarcopenia (del griego “*sarkos*” o carne y “*penia*” o pérdida) fue acuñado por Rosenberg en 1989 para referirse a este fenómeno. A partir de ese momento, esta definición ha sido objeto de constantes cambios, por lo que recientemente se definió como un síndrome que se caracteriza por una pérdida gradual y generalizada de la masa y fuerza muscular, con riesgo de presentar resultados adversos como la discapacidad física, calidad de vida deficiente y mortalidad (Rosenberg, 1997; Cruz-Jentoft *et al.*, 2019).

La sarcopenia puede ser un evento asociado directamente al envejecimiento, por ello la prevalencia en la población geriátrica es elevada. En Estados Unidos el 30% de los adultos mayores a 60 años (incrementándose a 50% en mayores de 80 años) desarrollan este síndrome (Doherty, 2003; Cruz-Jentoft *et al.*, 2019). En México no se tiene un estudio demográfico que muestre la prevalencia de la sarcopenia a nivel nacional, sin embargo, estudios regionales han reportado que el 33.6% de adultos mayores en la Ciudad de México lo padecen (Arango-Lopera *et al.*, 2013). Alemán y colaboradores en 2011, en un estudio con 302 adultos mayores aparentemente sanos reportaron una prevalencia de sarcopenia del 23% en el Noreste de México (Aleman *et al.*, 2011). Estudios y estimaciones más recientes colocan el porcentaje de prevalencia de esta enfermedad entre el 10 y 11% (Perez-Zepeda *et al.*, 2016; Rosas-Carrasco, Ruiz-Valenzuela and López-Teros, 2021).

El desarrollo de sarcopenia puede ser debido a que durante el envejecimiento se produce un retraso en la reparación del tejido muscular; se ha reportado una pérdida hasta del 40% del tejido muscular en ratas viejas en comparación a lo que se observa en ratas jóvenes (Marsh *et al.*, 1997). Una desregulación en la proliferación y diferenciación de las células satélite musculares, precursoras de los miocitos, puede ser la causa de la deficiencia en los mecanismos de reparación en el músculo envejecido (Carlson *et al.*, 2009; Shefer *et al.*, 2010). Otra posible causa puede ser la expresión alterada de factores reguladores mitogénicos y la miostatina, mismas que juegan un papel importante en la inhibición de la proliferación y diferenciación en la regeneración del músculo envejecido, se ha visto que la expresión de genes como MyoD, myf5, miogenina y la cadena pesada de la miosina (MHC) están disminuidas en el músculo envejecido, afectando a su vez el recambio de proteínas como la miosina (Degens, 2007). Aunado a esto, la presencia de radicales libres en el músculo viejo puede oxidar proteínas asociadas al músculo (como la miosina) debilitando la formación de fibras musculares.

Los cambios asociados a la edad en la masa, composición y función muscular están controlados por los cambios a nivel celular. Las células satélite del músculo son células progenitoras responsables de la miogénesis, en parte, por renovación, regeneración y adaptación del músculo esquelético (Hawke and Garry, 2001). Se ha reportado que la población de células satélite del músculo declina con la edad en ratones (Shefer *et al.*, 2006) y el contenido de células satélites es reducido en las fibras musculares tipo II en el envejecimiento (Verdijk *et al.*, 2007).

1.2.1 Obesidad Osteosarcopénica

El envejecimiento no sólo se acompaña de una disminución de la masa muscular, sino también de una disminución de la densidad ósea y un aumento de la masa grasa. Estos cambios pueden alterar la arquitectura del tejido muscular esquelético, dificultando la movilidad, lo cual puede provocar una baja actividad física. La distribución de la grasa cambia con la edad, no sólo aumenta la grasa visceral abdominal y disminuye la grasa abdominal subcutánea, sino también ocurre infiltración de grasa en el músculo esquelético (Figura 2), el hígado, el corazón y el páncreas; estos cambios ocurren incluso sin cambios significativos en el IMC y tienen consecuencias importantes sobre el perfil de factores de riesgo metabólico y cardiovascular (Zamboni *et al.*, 2008; Kob *et al.*, 2015).

La obesidad se considera una enfermedad crónica multisistémica que afecta las funciones fisiológicas de los individuos que la padecen. Esta enfermedad es influenciada por factores genéticos y ambientales, donde el sedentarismo y la dieta juegan papeles fundamentales en la ganancia de grasa corporal que caracteriza a esta enfermedad (Sarma, Sockalingam and Dash, 2021). Acorde a una interpretación más amplia de la teoría de la lipotoxicidad, se ha sugerido que la acumulación intracelular de grasa y/o sus derivados podría ser la causa de condiciones patológicas como la resistencia a la insulina, sino también para la disminución de la masa muscular en la obesidad. En el corazón, el hígado y el páncreas se han descrito mecanismos de apoptosis debido al exceso intracelular de ácidos grasos. La morfología, el tamaño y

la función del músculo, son alterados por una alta absorción y almacenamiento de los ácidos grasos (Ilich, Kelly, Inglis, *et al.*, 2014; Espinel-Bermudez *et al.*, 2018).

La obesidad se asocia con un pobre estado funcional, morbilidad y mortalidad en todas las edades. Es catalogada como una enfermedad que impacta fuertemente en el estado de salud y calidad de vida de los adultos mayores (Rosas-Carrasco *et al.*, 2012). Se sabe que la masa de la grasa corporal aumenta de 20% a 40% entre los 20 y 80 años, y el depósito de lípidos se modifica, incrementando la infiltración grasa en el hígado y el músculo esquelético.

La obesidad osteosarcopénica (OSO) es la combinación del exceso de peso corporal (masa grasa), la reducción de masa y/o fuerza muscular y densidad ósea (Ilich, 2017). Se tiene evidencia de que la obesidad sarcopénica conduce a un mayor deterioro funcional que sólo la sarcopenia o la obesidad por separado (Rolland *et al.*, 2009). Baumgartner y colaboradores reportaron que los hombres y mujeres mayores de 60 años con obesidad sarcopénica tienen respectivamente un 8% y 11% mayor riesgo de tener 3 o más discapacidades (Baumgartner *et al.*, 2004; Zamboni *et al.*, 2008). Kim y colaboradores en 2014, en un análisis sobre la población coreana con obesidad sarcopénica, encontraron tras un seguimiento de 27 meses que la masa de tejido blando magro apendicular disminuye significativamente, mientras que la masa grasa total y del tronco aumenta en los hombres y las mujeres, sin cambios en el peso ni en el IMC (J. K. Kim *et al.*, 2014). Es decir, en apariencia las personas con obesidad sarcopénica pueden no mostrar indicios de incremento de peso, sin embargo, la masa

muscular perdida es sustituida por grasa (T. N. Kim *et al.*, 2014; Distefano and Goodpaster, 2018).

Para el estudio de la obesidad osteosarcopénica se han desarrollado diferentes modelos en ratas, entre los más destacados se encuentra el modelo de obesidad sarcopénica en ratas con una dieta alta en grasas en la que se observó que el IMC no se incrementaba con respecto a las que tenían una dieta normal, en un análisis a lo largo de la vida de las ratas. No obstante, los animales con una dieta alta en grasas presentaban una disminución de en la masa muscular de los cuádriceps y una acumulación de grasa intramuscular (Kob *et al.*, 2015; Distefano and Goodpaster, 2018). En otro modelo similar de obesidad sarcopénica Tardif y colaboradores encontraron que la dieta alta en grasas solo presenta un incremento del IMC en organismos jóvenes, mientras que esta dieta no incrementa el IMC en organismos envejecidos. Sin embargo, al igual que Kob y colaboradores observaron una disminución de la masa muscular y un incremento en la grasa abdominal y periepididimal, así como la acumulación de grasa intramuscular (Tardif *et al.*, 2014). Resultados de nuestro laboratorio, muestran que ratas sedentarias con una dieta normal entre los 24-28 meses de edad presentan una acumulación de grasa abdominal e infiltración de grasa en los músculos sin una variación en el IMC. Los datos anteriores sugieren que la obesidad sarcopénica no es un fenómeno que pueda distinguirse con sólo evaluar el índice de masa corporal.

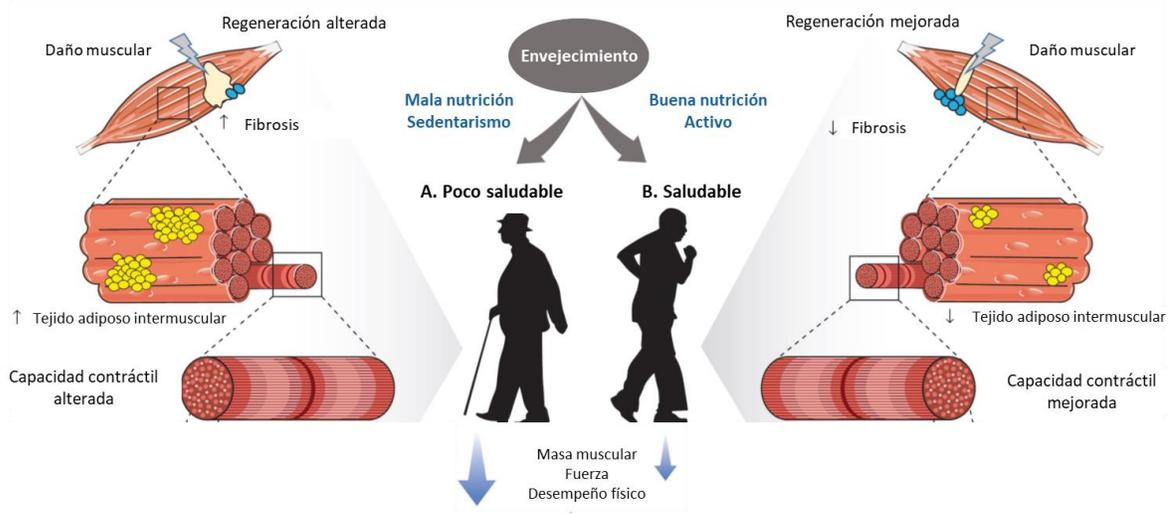


Figura 2. Infiltración de tejido graso en el músculo durante el envejecimiento. Además de las limitaciones regenerativas que se observan en el envejecimiento, el sedentarismo, la nutrición y otros factores pueden ser determinantes en el deterioro o mantenimiento del tejido muscular, fuerza y desempeño físico del adulto mayor (Modificado de DiStefano, 2018).

1.3 Factores detonantes de la OSO

Durante el envejecimiento, existen diversos cambios hormonales, metabólicos, fisiológicos, genéticos y epigenéticos en diversos tejidos, incluyendo un incremento de la grasa corporal, pérdida de masa muscular, fuerza y una disminución de la densidad ósea (Ponti *et al.*, 2020).

En años recientes se ha propuesto que los individuos que cumplen con estos cambios en estos tres tejidos (muscular, óseo y graso) de manera exacerbada, son diagnosticados con obesidad osteosarcopénica (Ilich, Kelly, Inglis, *et al.*, 2014).



Figura 3. OSO como una enfermedad multifactorial.

La etiología de esta enfermedad no ha sido completamente descrita. A pesar de su origen desconocido, diversas condiciones podrían estar influyendo en su desarrollo. Entre ellas, las mejor descritas son el sedentarismo, obesidad, así como factores genéticos, epigenéticos y la inflamación (Cruz-Jentoft *et al.*, 2019). El sedentarismo en adultos mayores es sin duda uno de los factores más fuertes, a tal grado que puede ser considerado característico de este grupo de edad, sin embargo, esta baja actividad física solo consigue que el deterioro del organismo se acelere, particularmente en el músculo esquelético, conduciendo también a la obesidad y pérdida de masa ósea (Koliaki *et al.*, 2019). Igualmente, la desregulación de adipocinas procedentes de tejido

adiposo visceral, como el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), la proteína C reactiva (CRP), leptina, y adiponectina las cuales están estrechamente asociados con la sarcopenia y promueven un estado inflamatorio de bajo grado, esto sugiere que el componente inflamatorio juega un papel fundamental en el desarrollo de la OSO (Roubenoff, 2004; Rosen and Bouxsein, 2006; Beyer, Mets and Bautmans, 2012). Factores de fondo genético y epigenético pueden contribuir de manera conjunta al desarrollo y perpetuación de esta enfermedad, volviendo sumamente complicado el abordaje eficaz de alguna intervención clínica.

1.4 Expresión de miRNAs y su relación con el músculo esquelético en el envejecimiento

Los microRNAs (miRNA) son ácidos ribonucleicos pequeños no codificantes de naturaleza endógena. Persisten en varios grupos de eucariontes y realizan funciones críticas durante el desarrollo y la homeostasis celular. Están conformados de 19 a 25 nucleótidos de longitud y regulan la traducción del RNA mensajero (mRNA). Los microRNAs pueden inhibir la traducción, estabilizando o induciendo la degradación del mRNA. Ellos regulan la expresión genética y están involucrados en el control de diversas funciones celulares como la diferenciación, la proliferación, la apoptosis y el metabolismo (Sayed and Abdellatif, 2011).

Los miRNAs son sintetizados en el núcleo por la RNA polimerasa tipo II o III, pueden tener como origen un gen o intrón, y este primer transcrito es conocido como pri-miRNA. Posteriormente, es escindido por Drosha dando origen al pre-miRNA, transportado al citosol por la Exportina-5. Una vez en el citoplasma, el pre-miRNA es

nuevamente escindido por la enzima Dicer, originando al miRNA de cadena doble, mismo que será acoplado a Ago2 en complejo con Dicer y TRBP para constituir el complejo de silenciamiento de RNAs interferentes o RISC (Figura 4). El complejo RISC se une al mRNA blanco mediante la secuencia semilla del miRNA maduro (cadena sencilla) y dependiendo de la afinidad de la secuencia del miRNA por el mensajero puede conducir a la escisión del blanco, desadenilación o represión traduccional (Sannicandro, Soriano-Arroquia and Goljanek-Whysall, 2019).

Debido a la gran variedad de blancos que cada miRNA posee, están implicados en la regulación de casi todos los procesos celulares, como la respuesta al estrés oxidante, la angiogénesis, la oncogénesis, la adipogénesis y en la miogénesis. Esa es la razón por la cual sus expresiones anormales se asocian a muchas condiciones fisiológicas y patológicas (Paul *et al.*, 2018; Saliminejad *et al.*, 2019). La expresión de miRNAs se altera en muchos procesos biológicos tales como el desarrollo, la división celular, la diferenciación, y la senescencia, así como en condiciones patológicas, como el cáncer, patología cardiovascular, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), y la distrofia muscular. Recientemente también se ha identificado la alteración de diversos miRNAs en la función de la masa muscular esquelética o con sarcopenia en adultos mayores (Sannicandro, Soriano-Arroquia and Goljanek-Whysall, 2019; Dowling *et al.*, 2022).

Los microRNAs son un atractivo terapéutico porque se ha observado que sólo uno de ellos puede regular varios genes y que podría influir en toda la ruta de señalización (Sannicandro, Soriano-Arroquia and Goljanek-Whysall, 2019). Además, así mismo podrían inhibir *in vivo* sin efectos adversos relacionados con los agentes terapéuticos

habituales. Puesto que pueden ser detectados en muestras de suero, plasma, orina y saliva en una forma estable, reproducible y consistente entre individuos de la misma especie, se espera que sean útiles como biomarcadores para el diagnóstico clínico y el control de enfermedades.

La identificación de miRNAs específicos de músculos llamados myomiR (miR-1, miR-133 a/b, miR-206, miR-208b, miR-499 y miR-486) ha ampliado nuestro conocimiento de la red molecular en el músculo esquelético (Sempere *et al.*, 2004; McCarthy, 2008).

El músculo esquelético está caracterizado por la expresión alta de miR-1, miR-206 y miR-133, los cuales han sido definidos como myomiRs y han sido detectados tanto en el músculo esquelético de ratones como en humanos (Sempere *et al.*, 2004). Por lo tanto, la regulación de estos miRNAs específicos de músculo, así como su relación con las funciones musculares como la miogénesis, la hipertrofia, y el metabolismo de la energía, ha sido de particular interés en los últimos años (Soriano-Arroquia *et al.*, 2016).

1.5 El ejercicio y el envejecimiento

El riesgo de desarrollar enfermedades en la última etapa de la vida (envejecimiento) como las cardiovasculares, la diabetes tipo 2, osteoporosis, fragilidad, la obesidad, la sarcopenia o ambas puede disminuirse mediante el ejercicio físico habitual (Pillard *et al.*, 2011; D'Alessandro *et al.*, 2018).

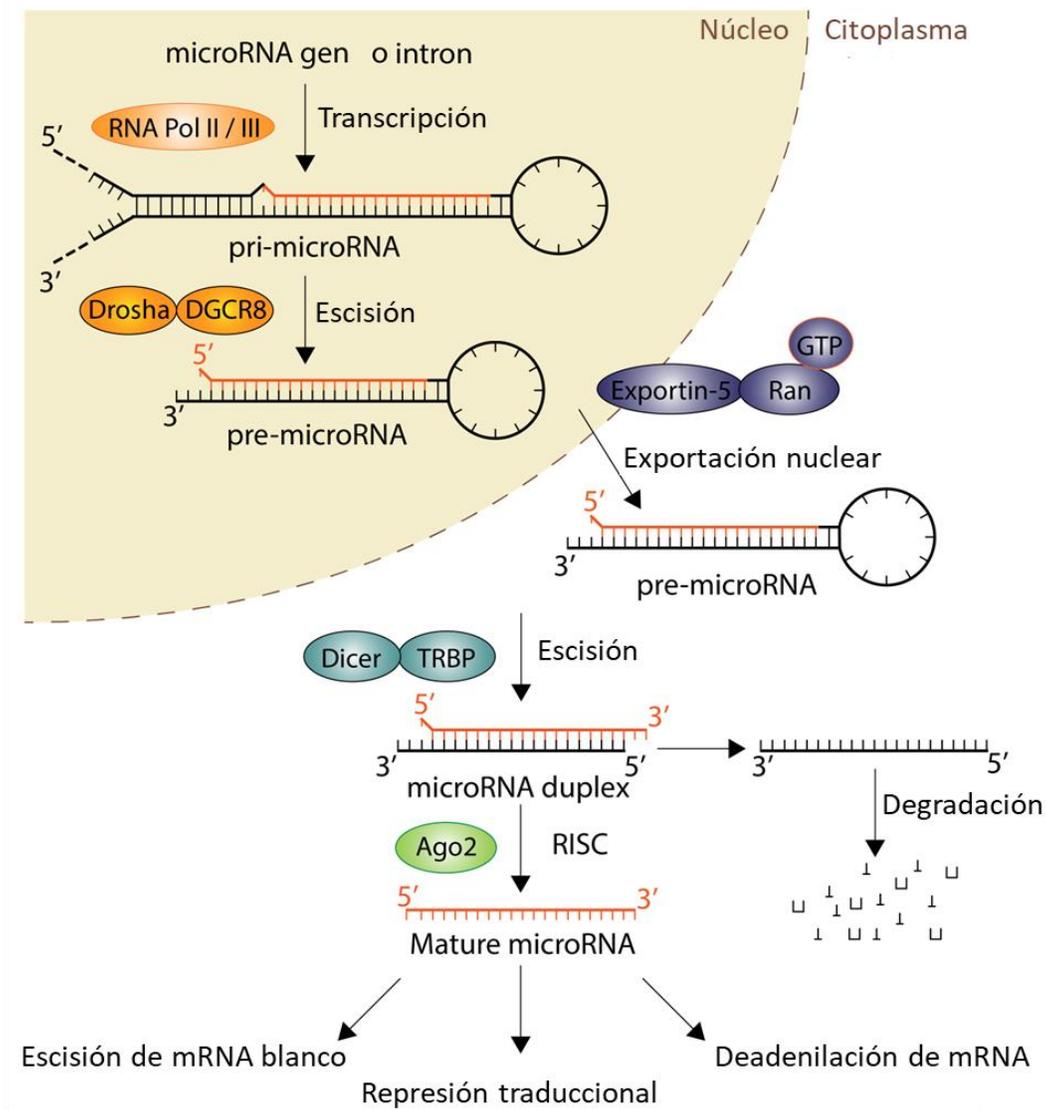


Figura 4. Mecanismo de acción de los miRNAs. Modificado de Vector Biolabs, 2022.

El sedentarismo es sin duda el factor más influyente dentro del desarrollo de enfermedades como la OSO. Por definición, el sedentarismo es la falta de ejercicio propiamente ejecutado (Fox, 2012), en términos fisiológicos, se refiere a una persona que gasta menos de 150 kcal por día en una actividad de intensidad moderada o alta

como el ejercicio o cualquier otra actividad cotidiana (González-Gross and Meléndez, 2013). En ese sentido, el tipo de ejercicio más estudiado consiste en entrenamiento de resistencia y/o aeróbico como el ejercicio de resistencia o una combinación de diferentes tipos de ejercicio con diferentes influencias sobre el envejecimiento y la obesidad sarcopénica. El entrenamiento de resistencia reduce el peso corporal y aumenta la fuerza muscular y la masa de manera efectiva en las personas de edad avanzada. Una sesión de ejercicio aeróbico restaura la respuesta anabólica de proteínas del músculo a la insulina mediante la mejora de la función endotelial y la señalización Akt / mTOR en sujetos de edad avanzada (Fujita *et al.*, 2007). Además, se ha denotado que el ejercicio de resistencia, atenúa los cambios en el número de células satélite y su capacidad miogénica durante el envejecimiento (Shefer *et al.*, 2010). Igualmente, el ejercicio aeróbico tiene un potencial anti-inflamatorio mediante la reducción de citocinas asociadas a la obesidad en adultos mayores como la IL-6, IL-18, TNF- α y CRP (Kohut *et al.*, 2006).

En el contexto del envejecimiento, los mecanismos moleculares durante el entrenamiento de resistencia se centran en el aumento de la capacidad antioxidante debido a la sobreexpresión de las enzimas catalasa y SOD2 (Johnson *et al.*, 2015; López-Cervantes *et al.*, 2022).

La inactividad física que frecuentemente se asocia al envejecimiento es uno de los factores fundamentales que contribuye a la aparición de sarcopenia, un aspecto central de la fragilidad.

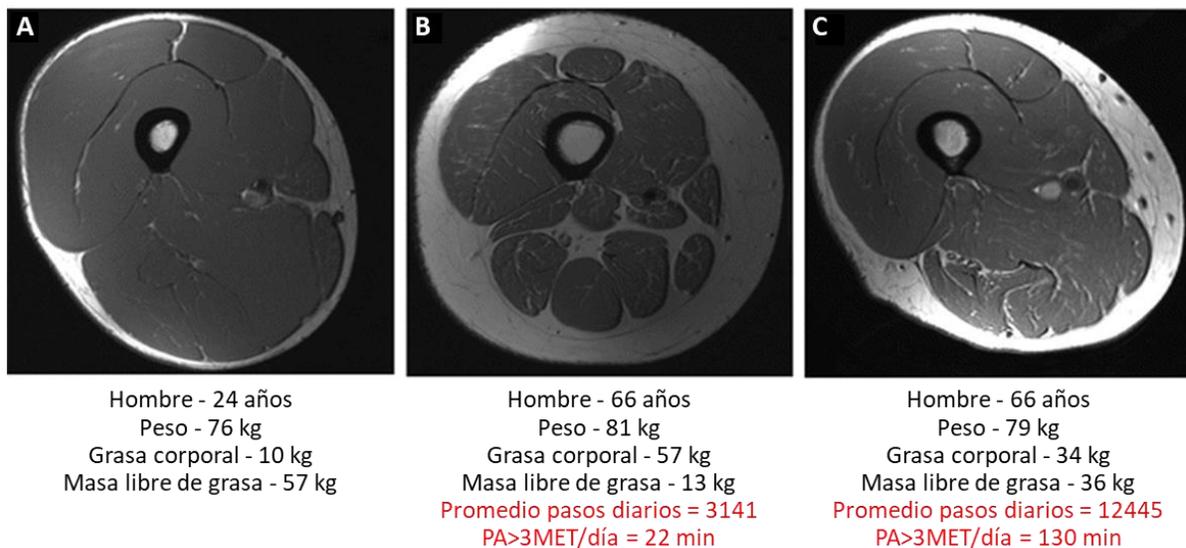


Figura 5. El sedentarismo como factor determinante en el desarrollo de OSO.

Se ha comprobado en un modelo de obesidad sarcopénica que el ejercicio de resistencia, regula la producción de proteínas musculares a través de la disminución en la expresión de DEPTOR, una molécula inhibidora de la vía mTOR (Nilsson *et al.*, 2013). El entrenamiento de resistencia atenúa la pérdida de masa muscular en los adultos mayores frágiles obesos en el tratamiento para bajar de peso (Frimel, Sinacore and Villareal, 2008). Particularmente, el ejercicio de resistencia también disminuye la progresión patológica en los ancianos obesos frágiles mediante la reducción de las moléculas inflamatorias IL-6, TNF- α , TLR4 (Toll-like receptor 4) y PCR (proteína C reactiva) (Lambert *et al.*, 2008; Donges, Duffield and Drinkwater, 2010).

2. Antecedentes

El ejercicio es reconocido como la única terapia preventiva en el desarrollo de sarcopenia y obesidad osteosarcopénica. Sin embargo, la movilidad de los pacientes

que padecen estas enfermedades puede encontrarse comprometida y limitar su capacidad para realizar ejercicios aeróbicos o de resistencia. En el laboratorio se ha demostrado que una rutina de ejercicio de baja intensidad puede ayudar a prevenir la aparición de la sarcopenia (Mena-Montes *et al.*, 2021), y que en combinación con metformina puede evitar la pérdida de masa muscular esquelética y fuerza en ratas viejas (Hernandez-Alvarez *et al.*, 2019). Por lo que la rutina de ejercicio de baja intensidad puede ser una alternativa cuando la movilidad es limitada.

Por otro lado, diversos estudios muestran que los miRNAs pueden regular la cantidad de músculo esquelético en el organismo (Soriano-Arroquia *et al.*, 2016; Sannicandro, Soriano-Arroquia and Goljanek-Whysall, 2019), proponiendo que los miRNAs pueden servir como un blanco terapéutico en este tipo de enfermedades.

3. Justificación

La OSO es una enfermedad que afecta gravemente la calidad de vida de los adultos mayores que la padecen y aunque la prevalencia aun no alcanza límites alarmantes, la población de adultos mayores con respecto a las proyecciones en pirámides poblacionales va en aumento, por lo que esta enfermedad, al igual que otros padecimientos asociados a la edad, está cobrando mucha relevancia.

A la fecha existen pocos estudios que incluyan el papel del ejercicio sobre la expresión de los miRNAs en el desarrollo y progresión de la OSO, por lo cual, el establecimiento de este modelo de OSO y el seguimiento de los miRNAs a lo largo de la vida de ratas

sedentarias y ratas sometidas a un régimen de ejercicio puede ser clave en el entendimiento de la enfermedad.

4. Pregunta de investigación

¿Cómo se verá afectada la expresión de miRNAs a lo largo de la vida con la rutina de ejercicio de baja intensidad? ¿Cuál será el impacto de esta sobre el desarrollo y establecimiento de la OSO?

5. Hipótesis

La intervención de la rutina de ejercicio baja intensidad podría retardar la aparición de la OSO, mediante mecanismos asociados a la expresión de miRNAs en distintas etapas de la vida de las ratas.

6. Objetivos

6.1 Objetivo General

Determinar los mecanismos de regulación asociados a la expresión de miRNAs en el modelo de obesidad sarcopénica bajo un régimen de ejercicio de baja intensidad.

6.2 Objetivos particulares

Determinar los cambios en la composición corporal generados por la rutina de ejercicio de baja intensidad a lo largo de la vida de las ratas.

Obtener y comparar los perfiles de expresión de miRNAs a lo largo de la vida.

Analizar los cambios fisiológicos y su relación con los perfiles de expresión de miRNAs.

7. Material y métodos

7.1 Animales

Para este estudio fueron utilizadas 115 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) de 4 meses, obtenidas del bioterio de la UAM Iztapalapa. Todos los animales se mantuvieron en un cuarto con ciclo de luz invertido (12 horas de oscuridad/ 12 horas de luz), en cajas de acrílico transparente de 6 mm de espesor y con las siguientes dimensiones: 53 cm de largo, 43 cm de largo y 20 cm de alto, con acceso libre a agua y comida (Abene BDL-7100). Las ratas fueron divididas en dos grupos experimentales; el primero corresponde al de ratas sedentarias y el segundo a las ratas que fueron sometidas al régimen de ejercicio.

Cada grupo experimental fue subdividido en grupos de edad a los cuales serían sacrificados los animales (8, 12, 18 y 24 meses), con por lo menos 5 individuos por grupo. El promedio de vida de las ratas Wistar es de aproximadamente 28 meses y datos de nuestro laboratorio nos indican que a esta edad llegan el 40% de los animales. Como medida preventiva y para garantizar que tuviéramos los 5 animales envejecidos, se utilizaron 15 animales para los grupos de edad más avanzados.

Todas las ratas fueron sacrificadas con un periodo de ayuno de ocho horas y dos días después de la última rutina de ejercicio (a las distintas edades mencionadas arriba). Se diseccionó el músculo gastrocnemio de ambas extremidades anteriores, los músculos fueron etiquetados y almacenados a -80° C para su posterior procesamiento. Todos los protocolos experimentales con los animales siguieron lo establecido en la

“Guía para el cuidado de los animales de laboratorio” (NOM-062-ZOO-1999) y para el manejo de residuos biológicos (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002).

7.2 Grupo sedentario (SED)

Para el grupo sedentario se utilizaron 60 ratas, las cuales fueron divididas (5 animales por caja). Las condiciones estándar de mantenimiento de estos animales se mantuvieron a lo largo de su vida, con comida y agua ad libitum, sin actividad física que favoreciera su movilidad, más allá del comportamiento normal de estos animales en las cajas, fueron los factores que nos llevaron a determinar que eran condiciones de sedentarismo, confirmadas en varios reportes al momento (Hernandez-Alvarez *et al.*, 2019; Mena-Montes *et al.*, 2021).

7.3 Grupo con rutina de ejercicio (LRER: Long-life running exercise routine)

A partir de los 4 meses de edad, las ratas pertenecientes al grupo de ejercicio fueron sometidas a un periodo de reconocimiento y adaptación a la caminadora (Treadmill Control LE8710 Panlab Harvard Apparatus) de 5 carriles. El proceso de adaptación se llevó a cabo durante 3 semanas, 5 días a la semana. La primera semana las ratas corrieron a una velocidad de 10 cm/s durante 10 min, la segunda semana a 15 cm/s por 15 min y la tercera 20 cm/s durante 20 min.

Posterior al periodo de entrenamiento las ratas fueron ejercitadas en las primeras horas de su ciclo de oscuridad durante 30 min/día en la caminadora, caminando a 25 cm/s, 5 veces/semana, desde los 4 meses de edad hasta los 8, 12, 18 y 24 meses.

Cabe destacar que esta rutina de ejercicio no generó ningún dolor o molestia en los animales que requiriese una intervención farmacológica.

7.4 Perfil bioquímico

El perfil bioquímico de los animales se obtuvo del suero de las ratas de ambos grupos experimentales. Dicho suero fue obtenido mediante la centrifugación de la sangre a 3500 rpm por 10 min. Una vez obtenido se realizaron las determinaciones de glucosa, creatinina, colesterol, HDL y triacilglicéridos usando el analizador bioquímico SPOTCHEM® EZ SP-4430 (Jant, CA, USA).

7.5 Absorciometría de rayos X de energía dual (DXA)

La composición corporal fue determinada usando el scanner DXA (Serie Discovery QDR, Hologic® Discovery) del Instituto Nacional de Geriátría. Las determinaciones se realizaron en distintas edades (8, 12, 18 y 24 meses) para ambos grupos experimentales. Dado que el equipo está optimizado para uso humano, fue calibrado con el Hologic Rat Step Phantom P/N 010-0758 previo a las determinaciones en las ratas. Los días de las determinaciones, las ratas fueron sedadas con coctel compuesto de 2.5 ml de ketamina (100 mg/ml), 0.8 ml de xilacina (20 mg/ml) y 2.5 ml de solución salina. De dicha mezcla, se administraron 100 µl por cada 100 g de peso del animal. El equipo hace dos emisiones de rayos X de baja intensidad, una de ellas permite detectar la grasa corporal, la segunda la masa ósea, el software del equipo (QDR®) toma esas dos características en conjunto y hace un diferencial con respecto al

espectro total para conseguir una determinación de la masa libre de grasa y hueso, lo que puede referenciarse como músculo en muchas regiones del cuerpo.

Para calcular el índice de músculo esquelético (SMI por sus siglas en inglés *Skeletal Muscle Index*) se tomó la masa libre de grasa y hueso de las cuatro extremidades y se dividió por la longitud naso-rectal del animal al cuadrado. Para realizar el cálculo anterior se seleccionaron las extremidades en dos regiones, superior e inferior, dibujando un rectángulo con el software del equipo en la región del Acromion derecho-Acromion izquierdo: fascia axilar derecha-fascia axilar izquierda para la región superior y la región de la vértebra sacra 1 (S1)-raíz de la cola para la región inferior.

Los resultados de la composición corporal (grasa, hueso y masa libre de grasa y hueso) están reportados como porcentaje. En el caso del porcentaje de grasa, si este excedía el 30% en su composición corporal se consideraba que el animal padecía obesidad. El punto de corte para determinar la osteopenia fue determinado usando 2.5 veces el valor de la desviación estándar de los valores de BMD mostrados por las ratas jóvenes, si el valor era menor a ese punto de corte entonces se consideró como osteopenia. En el caso de sarcopenia y dinapenia, se utilizó como referencia 2 veces el valor de la desviación estándar de los valores de ratas jóvenes como límite inferior para su determinación.

7.6 Fuerza de agarre

La fuerza de agarre fue determinada usando un dinamómetro digital Rhino BAC-20 (PKCh) con un rango de medición entre 0.1 N (Newton) y 200 N. El dinamómetro fue

colocado de forma vertical junto con una rejilla de acero inoxidable, lo que facilitó el agarre de las ratas durante la determinación. De tal forma, se consideró el valor máximo de fuerza registrado en el dinamómetro al momento de soltar la rejilla. Los resultados fueron reportados en N/kg (Hernandez-Alvarez *et al.*, 2019).

7.7 Extracción de RNA total

La extracción del ácido ribonucleico total (RNA total) se realizó a partir de los gastrocnemios diseccionados mediante la técnica del reactivo de Trizol[®] (Invitrogen). Para la homogenización del tejido se utilizó nitrógeno líquido, el cual fue vertido cuidadosamente sobre la muestra en un mortero (previamente enfriado en hielo seco o dejado en el ultracongelador por 15 min aproximadamente) y pulverizado con ayuda del pistilo, presionando ligeramente al principio hasta que se fragmentara el trozo de músculo para evitar que la muestra saltara fuera del mortero.

Una vez pulverizado el tejido, fue transferido con ayuda de una espátula a un tubo de 1.5 ml para posteriormente agregar el Trizol[®] y comenzar el protocolo de extracción de RNA total según el protocolo descrito por el fabricante (Invitrogen, Life Technologies). Al finalizar la extracción el RNA total fue resuspendido en 20 µl de agua libre de nucleasas (sin DEPC ni inhibidores enzimáticos).

7.8 Microarreglos de expresión de miRNAs

Para este estudio se utilizaron microarreglos GeneChip[®] miRNA 4.0 (Affymetrix, Thermo). Posterior a la extracción de RNA total, se prepararon las muestras para el

uso de los microarreglos. El RNA fue cuantificado en el espectrofotómetro NanoDrop® (NanoDrop2000, Thermo Scientific, USA) y se reservaron 100 ng/μl de RNA en un volumen de 30 ul de agua libre de nucleasas para ser enviados a la Unidad de Microarreglos del Instituto Nacional de Medicina Genómica en la Ciudad de México donde se realizó el marcaje, hibridación y lectura del chip según el protocolo descrito por el fabricante.

7.9 Análisis de expresión, enriquecimiento de blancos y vías de señalización

El análisis de los datos crudos de los microarreglos fue realizado con el software Transcriptome Analysis Console (v 4.1) desarrollado por el fabricante de los microarreglos (Affymetrix, Thermo, USA). Con ayuda del software se realizó el control de calidad, normalización de los datos y el análisis de expresión diferencial. Para dicho análisis se utilizaron los siguientes parámetros RMA rat only, log₂-fold change (FC) de < -2.0 o >2.0 y una tasa de descubrimiento de falsos positivos (FDR) de 0.05.

Una vez obtenidas las listas de miRNAs con expresión diferencial se realizó el análisis de enriquecimiento que consistió en dos etapas. La primera fue el enriquecimiento de los blancos de los miRNAs con expresión diferencial de cada grupo experimental. Para obtener los blancos usamos todos los miRNAs con expresión diferencial (sobrexpresados y reprimidos) y usamos las bases de datos miRNet (Chang *et al.*, 2020) y miRWalk (Sticht *et al.*, 2018). Una vez obtenidos los blancos, la segunda etapa del enriquecimiento se realizó usando las listas de genes, las cuales fueron sometidas a la base de datos Comparative Toxicogenomics Database (CTD) (Davis *et al.*, 2019) para obtener la lista de vías de señalización afectadas. Para ambos pasos, se

consideró un valor de la p ajustada <0.01 asignado por la metodología de cada plataforma. El valor de enriquecimiento o *enrichment score* se calculó como $-\log_{10}(\text{valor de } p \text{ ajustado})$.

7.10 Perfil inflamatorio

El perfil inflamatorio fue determinado usando el suero de los animales mediante el uso del kit Bio-Plex Multiplex immunoassay system® (BioRad, USA). El ensayo fue preparado utilizando el protocolo del fabricante, para la colección de los datos se usó el lector Luminex Instrument y la concentración de los analitos fue determinada con las recomendaciones del fabricante. Las concentraciones de las citocinas fueron representadas en pg/ml. Posteriormente se realizó la relación de IL-6/IL-10 y TNF- α /IL-10.

7.11 Análisis estadístico

Todos los datos son representados como medias \pm SD de por lo menos 5 individuos o 3 experimentos independientes. Los niveles de significancia ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$) fueron evaluados mediante t-Student y análisis de varianza (ANOVA), seguidos de una prueba de comparaciones múltiples (Tukey) en GraphPad Prism y/o NCSS.

7.12 Disponibilidad de datos

Los datos de microarreglos discutidos en el presente trabajo fueron depositados en la base de datos Gene Expression Omnibus del NCBI, y pueden ser consultados a través del número de acceso a la serie del GEO (GEO Series accession number) GSE175390 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE175390>).

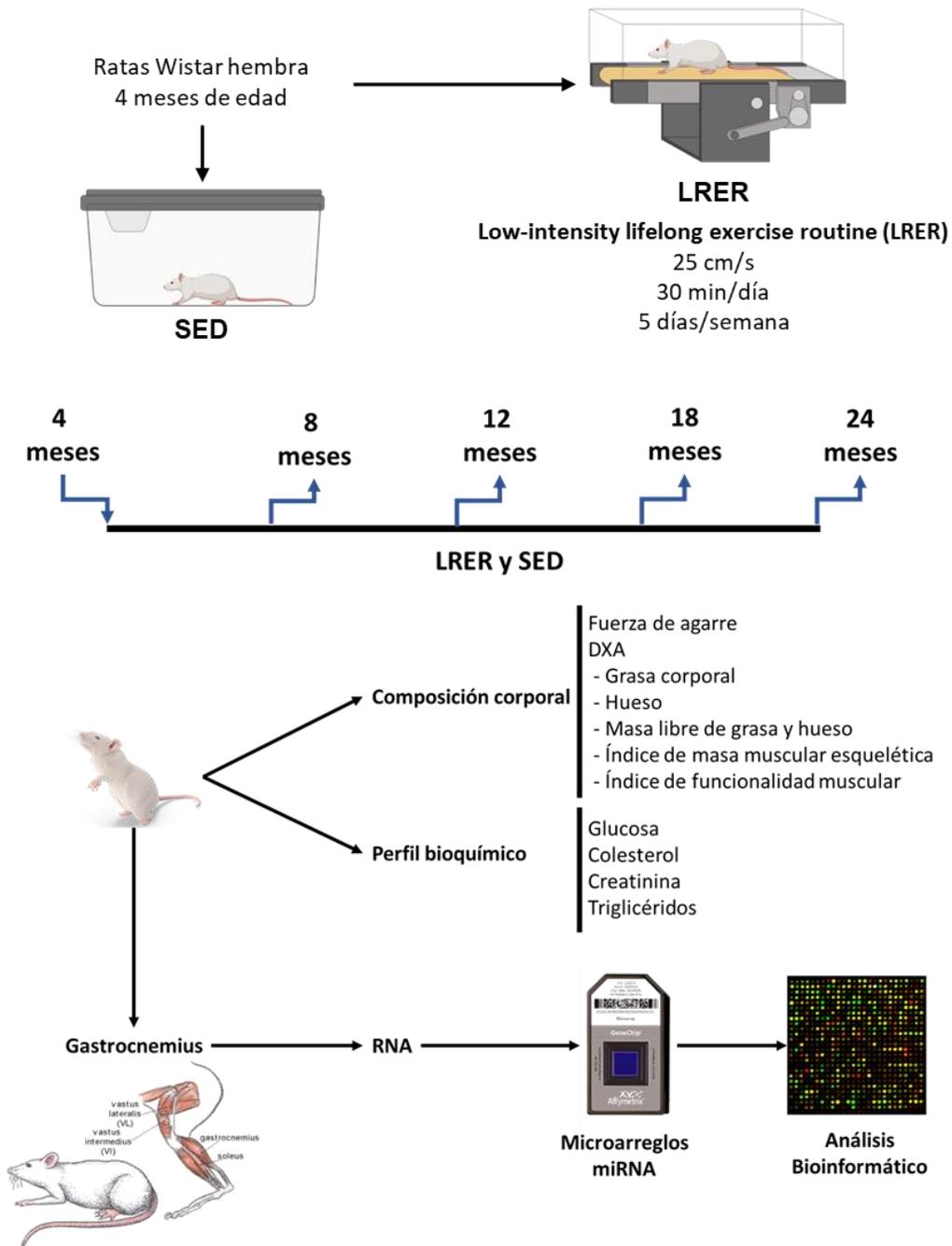


Figura 6. Diseño experimental del proyecto.

8. Resultados

8.1 Perfil bioquímico

Dentro de los parámetros bioquímicos que fueron determinados (Tabla 1-4) encontramos diferencias significativas en algunos de ellos entre los grupos experimentales, sin embargo, ninguno de esos parámetros se encontraba fuera de los rangos normales reportados (Giknis and Clifford, 2008). Esto sugiere que ambos grupos experimentales se encontraron en condiciones saludables a lo largo de todo el experimento. Esto sugiere que la rutina de ejercicio es apropiada incluso en los individuos envejecidos, debido a que no causa alteraciones en estos parámetros bioquímicos.

Tabla 1. Perfil Bioquímico de ratas SED y LRER de 8 meses

Variable	SED	LRER	p-value
Glucosa (mg/dL)	114.2±2.68	131±14.089	0.054
Colesterol (mg/dL)	74.4±14.43	75.2±7.94	0.916
Triglicéridos (mg/dL)	179.6±46.71	99.6±26.05	0.014 *
HDL-c (mg/dL)	21.2±3.96	26.4±2.50	0.043 *
Creatinina (mg/dL)	0.66±0.054	0.66±0.054	1.000

Tabla 2. Perfil Bioquímico de ratas SED y LRER de 12 meses

Variable	SED	LRER	p-value
Glucosa (mg/dL)	139±9.16	109.5±9.53	0.010 *
Colesterol (mg/dL)	90.66±34.53	100.25±8.42	0.681

Triglicéridos (mg/dL)	88.66±15.30	126.75±57.34	0.281	*
HDL-c (mg/dL)	27±14	29±5.47	0.832	
Creatinina (mg/dL)	0.66±0.054	0.75±0.055	0.024	*

Tabla 3. Perfil Bioquímico de ratas SED y LRER de 18 meses

Variable	SED	LRER	p-value	
Glucosa (mg/dL)	113.5±9.71	107±13.39	0.464	
Colesterol (mg/dL)	86.25±19.24	84.5±51.08	0.952	
Triglicéridos (mg/dL)	84.25±26.31	90±21.19	0.393	
HDL-c (mg/dL)	27.25±6.23	23.5±12.47	0.616	
Creatinina (mg/dL)	0.74±0.089	0.80±0.081	0.329	

Tabla 4. Perfil Bioquímico de ratas SED y LRER de 24 meses

Variable	SED	LRER	p-value	
Glucosa (mg/dL)	100.33±32.56	91.5±27.77	0.724	
Colesterol (mg/dL)	73±20.66	116.75±19.72	0.043	*
Triglicéridos (mg/dL)	88.66±30.89	120.5±22.66	0.215	
HDL-c (mg/dL)	22.33±5.85	35±6.97	0.049	*
Creatinina (mg/dL)	0.20±0.015	0.65±0.055	0.0005	**

8.2 Composición corporal.

Para evaluar si la LRER fue capaz de modificar la composición corporal de las ratas, se utilizó el escáner DXA del Instituto Nacional de Geriátrica para determinar la proporción de grasa, de hueso y la proporción de la masa libre de grasa y hueso (músculo) de ambos grupos experimentales. Los resultados muestran que las ratas SED tienen una mayor proporción de grasa corporal a diferencia de las ratas LRER. El grupo SED superó el umbral de obesidad desde los 12 meses (31.31% de grasa corporal), y se mantuvo por encima a los 18 (32.86%) y 24 meses (33.26%), mientras que el grupo LRER únicamente muestra un porcentaje superior al 30% a los 18 meses (37.4% de grasa corporal), sin embargo, se mantuvo por debajo en los otros grupos de edad (Figura 7a).

La masa libre de grasa y hueso (FFBFM), considerada masa magra o músculo, mostró una disminución gradual a lo largo del tiempo en el grupo SED, mientras que en el grupo LRER dicha proporción se mantuvo sin cambios significativos. Los resultados muestran que el grupo LRER tiene una mayor proporción de FFBFM que el grupo SED; las diferencias estadísticas son observadas a los 8 meses (75.41% vs 71.53%, $p < 0.05$), 12 meses (72.86% vs 64.78%) y a los 24 meses (69.03% vs 64.78%). Determinamos la presencia de sarcopenia cuando el valor de FFBFM disminuía 2 veces la desviación estándar de las ratas SED de 8 meses, estableciendo el punto de corte para valores por debajo de 67.97% de FFBFM. Basados en lo anterior, las ratas pertenecientes al grupo SED desarrollan sarcopenia a partir de los 12 meses, demostrando que la rutina LRER retarda la pérdida de masa muscular (Figura 7c).

Las ratas del grupo SED de 18 y 24 meses cumplen el criterio para la determinación de osteopenia (el valor de BMC disminuye 2.5 veces la desviación estándar con respecto a la media de las ratas SED de 8 meses). En contraste, las ratas LRER sólo presentan osteoporosis a los 18 meses (Figura 7b)

8.3 Fuerza de agarre

Bajo el mismo criterio que la osteopenia se determinó la presencia de dinapenia con la fuerza de agarre. Las ratas del grupo SED muestran dinapenia a los 18 y 24 meses de edad (Figura 7e). Por otro lado, las ratas del grupo SED muestran estadísticamente una menor fuerza de agarre con respecto a las ratas LRER desde los 12 hasta los 18 meses.

8.4 Índice de Masa Muscular Esquelética (SMI) e Índice de Funcionalidad Muscular (SMFI).

La obesidad y la inflamación impactan directamente sobre la funcionalidad del músculo esquelético. Durante la reparación del músculo, las células satelitales bajo condiciones pro-inflamatorias y abundancia de ácidos grasos pueden diferenciarse en adipocitos (van Herpen and Schrauwen-Hinderling, 2008).

En el músculo, este destino celular incrementa la inflamación y altera la funcionalidad del tejido ya que interfiere con su arquitectura habitual (van Herpen and Schrauwen-Hinderling, 2008; Koliaki *et al.*, 2019). Es por ello que calculamos el índice de masa muscular esquelética (SMI).

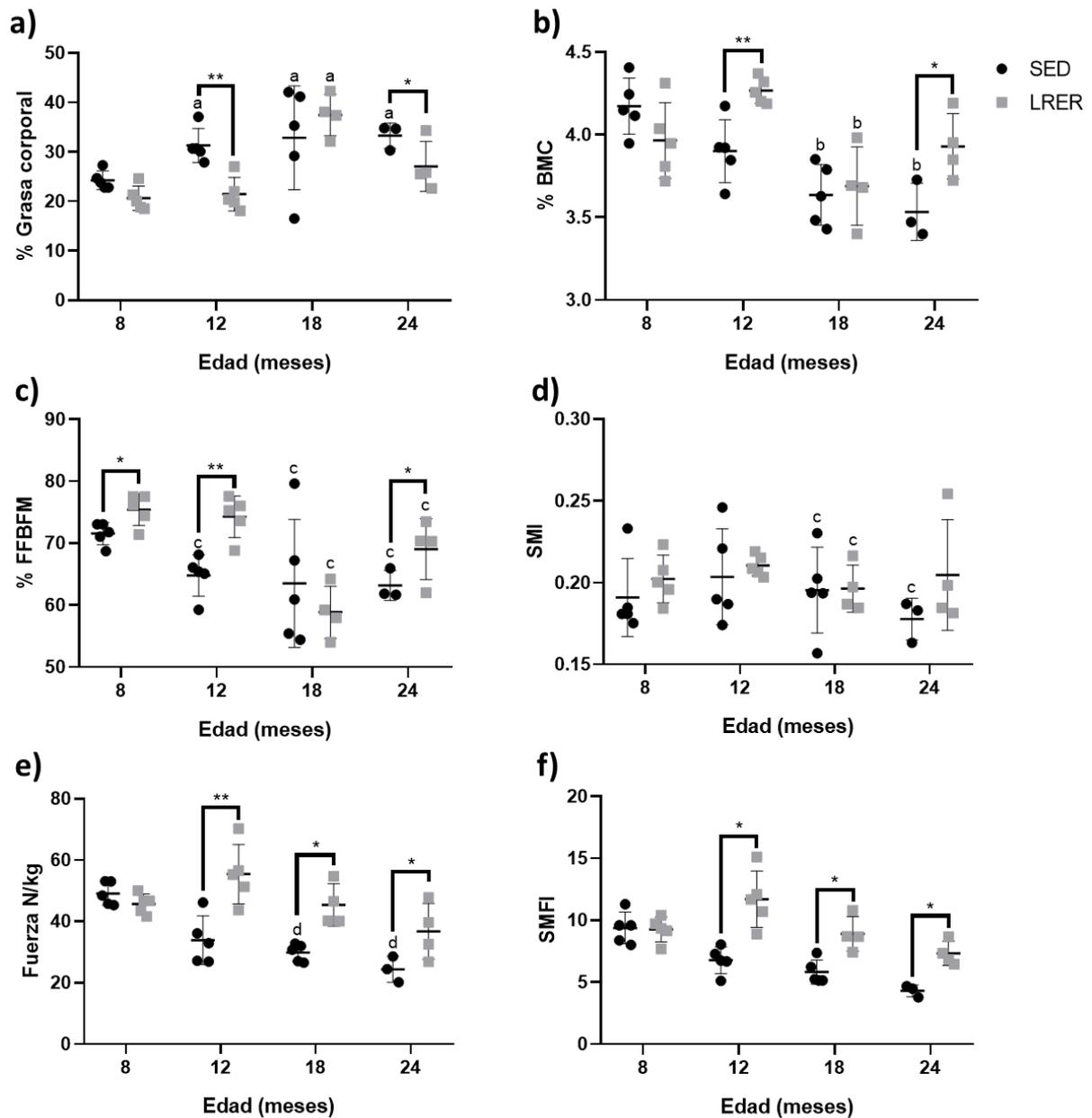


Figura 7. Gráficas de composición corporal por DXA, SMI, fuerza y funcionalidad. Las gráficas muestran el porcentaje de grasa corporal (a), BMC (b) y masa magra (c) a los 8, 12, 18 y 24 meses de edad de las ratas SED y LRER. También se muestran las gráficas correspondientes al SMI (d), fuerza de agarre (e) y SMFI (f). Significancia: t-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ LRER vs. SED. a-Obesidad, b-Osteoporosis, c-Sarcopenia y d-Dinapenia.

Calculamos el índice de funcionalidad del músculo esquelético (Skeletal Muscle Functionality Index o SMFI), índice que nos permite establecer una relación entre el SMI y la fuerza de agarre de los animales. Calculamos el SMFI para todos los grupos experimentales y de edad y reveló que la LRER es fundamental para el mantenimiento de la funcionalidad del tejido a lo largo del tiempo (Figura 7f). De forma más específica, la funcionalidad muscular entre las ratas del grupo SED y LRER muestra diferencias significativas a los 12, 18 y 24 meses. A los 12 meses el SMFI de las ratas LRER es 70.26% mayor con respecto a las SED, 52.74% mayor a los 18 meses y 70% a los 24 meses. Análisis posteriores mostraron también que la funcionalidad de las ratas LRER de 24 meses era estadísticamente igual a la de las ratas SED de 12 meses.

8.5 Análisis del perfil de expresión de miRNAs.

Se ha reportado previamente en el músculo esquelético de ratones que la expresión de miRNAs entre ratones viejos y jóvenes es distinta (Soriano-Arroquia *et al.*, 2016), es por ello que nos dimos a la tarea de evaluar si la rutina de ejercicio de baja intensidad podría ser capaz de modificar los perfiles de expresión de miRNAs.

El análisis de expresión de miRNAs mostrado en la Figura 8 y 9 en forma de análisis de componentes principales (PCA) y un mapa de calor muestran que, en el caso del PCA, las muestras pertenecientes al mismo grupo se posicionan muy cerca entre ellas, lo cual es un indicador del parecido de su perfil de expresión. En el caso del mapa de calor, también nos muestra que los perfiles de expresión son similares en algunos casos, sin embargo, algunas muestras tienen un perfil de expresión más parecido al de otros grupos o muestras. La variabilidad en la expresión nos muestra que el ejercicio

tiene un efecto sobre la regulación de la expresión global de miRNAs y que cada ente biológico es distinto independientemente del tratamiento o edad.

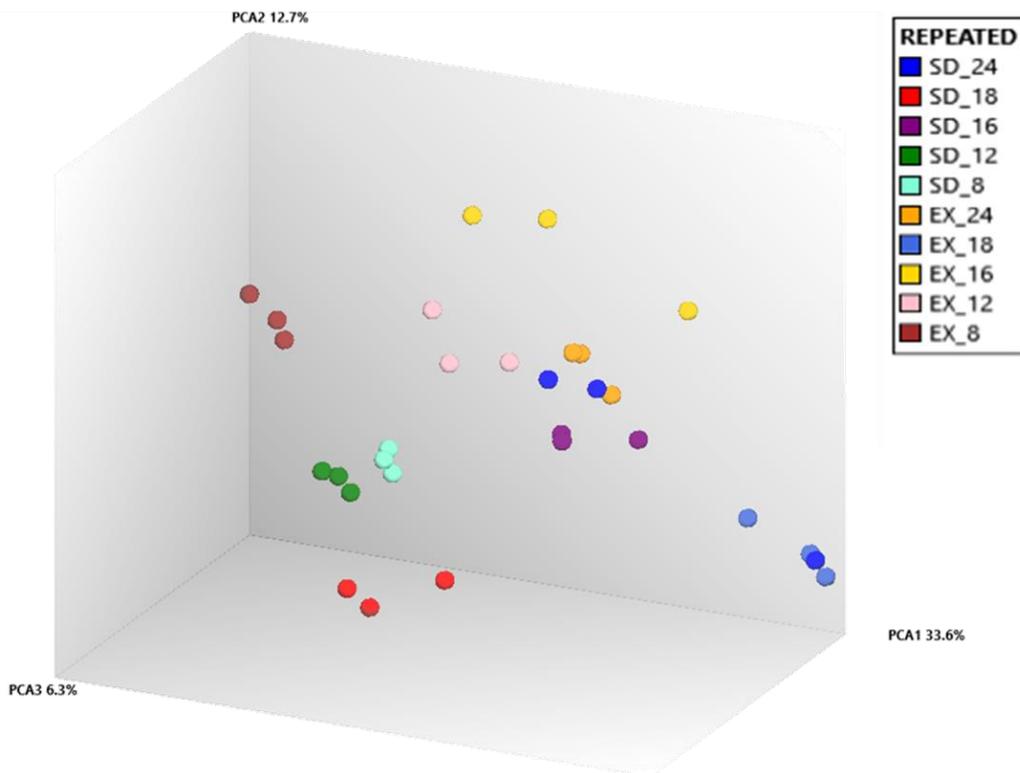


Figura 8. Análisis de componentes principales basado en los perfiles de expresión de los microarreglos. Este análisis indica el parecido de las muestras entre ellas, basado en los niveles de expresión de miRNAs.

Para determinar las transiciones de los perfiles de expresión de miRNAs establecimos las siguientes ventanas de tiempo para las ratas SED (1) y LRER (2). En el caso de las ratas SED el esquema fue el siguiente A1 para la transición de 8-12 meses; B1 de 12-18; C1 de 18-24 meses. Para el caso del grupo LRER el esquema es el mismo A1 para la transición de 8-12 meses; B2 de 12-18; C2 de 18-24 meses. Posterior al

establecimiento de las ventanas de tiempo se realizó el análisis de expresión diferencial de cada grupo experimental.

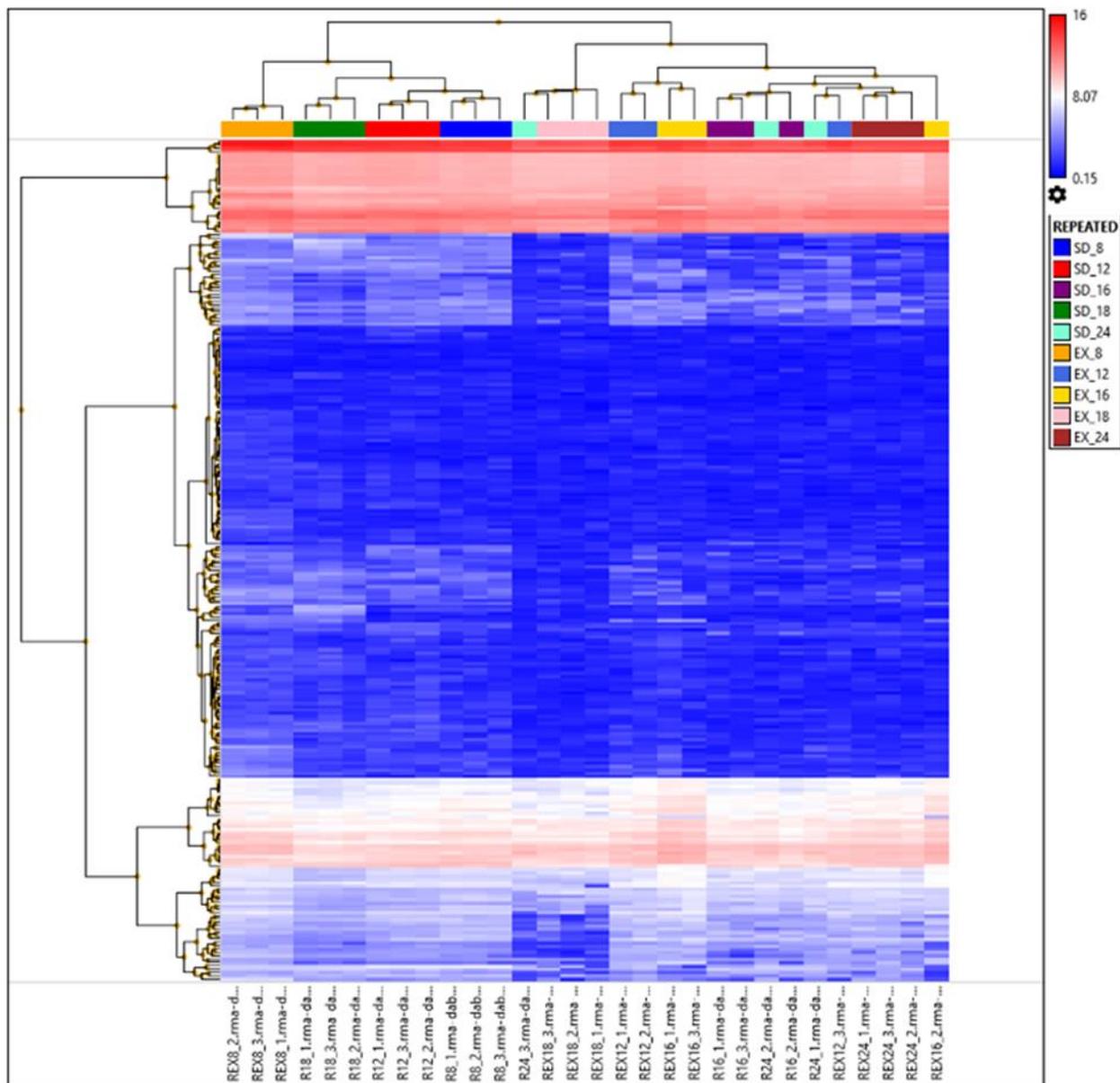


Figura 9. Mapa de calor y análisis de agrupamiento con dendogramas. Los dendogramas de las filas y columnas muestran la distancia o similitud entre cada una de ellas.

Los resultados muestran que la expresión de miRNAs cambia a lo largo del tiempo y que dicha progresión es distinta para cada grupo experimental. Los volcano plots de las ratas SED muestran 15 miRNAs con expresión diferencial en A1, 28 en B1 y 55 en C1. Para las ratas LRER 80 miRNAs con expresión diferencial en A2, 56 en B2 y 27 en C2. Comparando los volcano plots entre SED y LRER de la primera ventana de tiempo (A1 vs A2) podemos ver que la mayoría de miRNAs en A1 se encuentran sobreexpresados mientras que en A2 la mayoría de los miRNAs están reprimidos. Comparando B1 vs B2, todos los miRNAs de B2 están reprimidos y para la comparación de C1 vs C2, la mayoría de los miRNAs en C1 están reprimidos mientras que en C2 están sobreexpresados (Figura 10).

Los 10 de miRNAs con expresión diferencial más alta son mostrados en la figura 11a por grupo de edad y grupo experimental. Hicimos diagramas de Venn para determinar si eran los mismos miRNAs entre SED y LRER. Para la comparación A1 vs A2, encontramos 9 miRNAs específicos para A1, 74 para A2 y 6 que se comparten entre ambos grupos. Para B1 vs B2 encontramos 18 específicos para B1, 46 para B2 y 10 compartidos. En el caso de C1 vs C2 encontramos 55 miRNAs específicos para C1, 22 para C2 y 5 miRNAs compartidos (Figura 11b).

Adicionalmente, se realizó un análisis comparativo de todos los miRNAs con expresión diferencial de los distintos grupos de edad por cada grupo experimental. Se encontró que las ratas SED únicamente mantienen un miRNA con expresión diferencial en las distintas edades, mientras que las ratas LRER no comparten ningún miRNA con expresión diferencial entre las distintas edades.

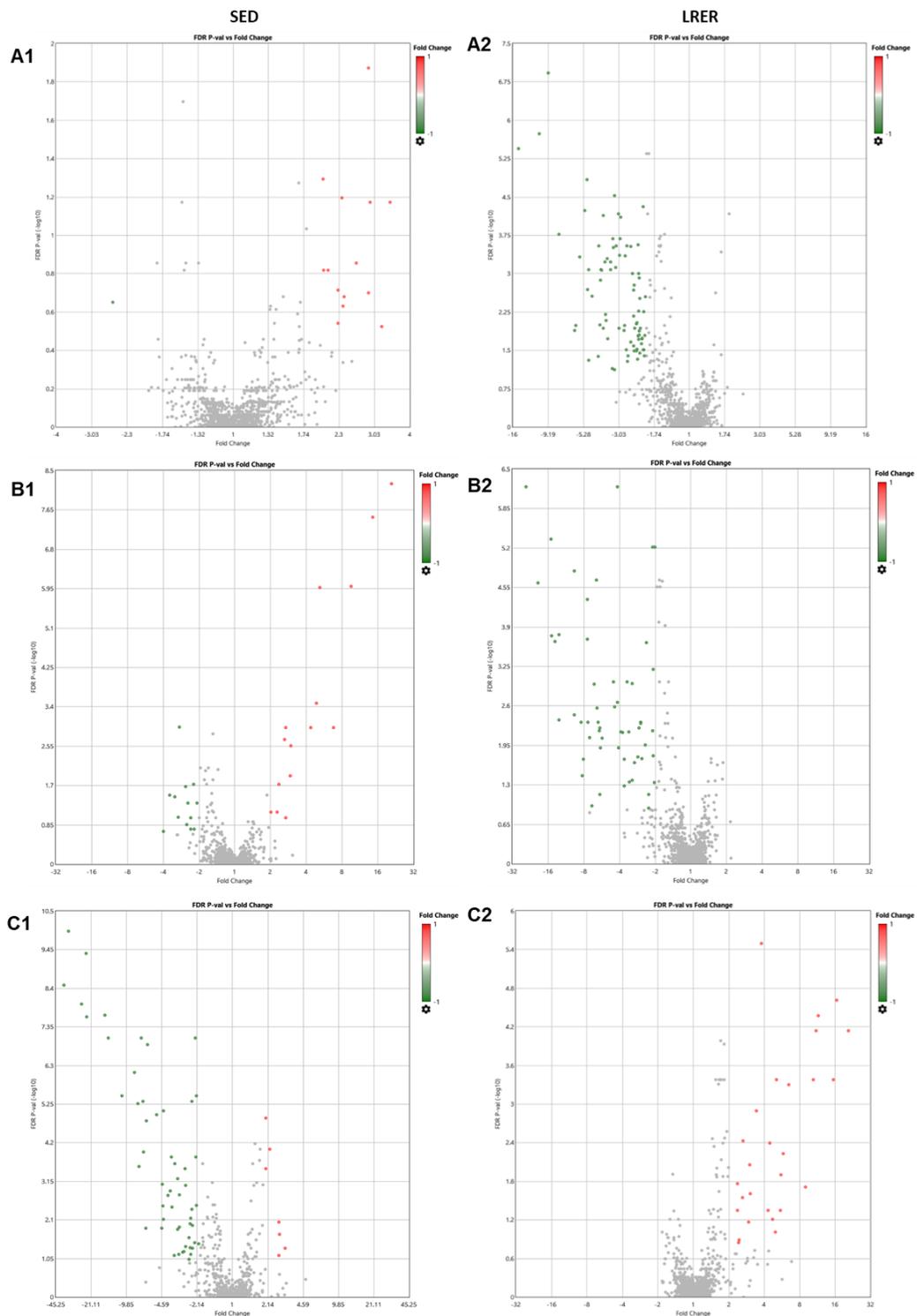


Figura 10. Gráficas de volcán de la expresión diferencial entre las ratas LRER y SED. En A1 y A2, se muestra la transición de 8-12 meses, B1 y B2 corresponden a la transición de 12-18 meses, finalmente C1 y C2 corresponden a la transición de 18-24 meses. $FC = -2 < 0 > 2$, $p < 0.01$, $FDR < 0.05$.

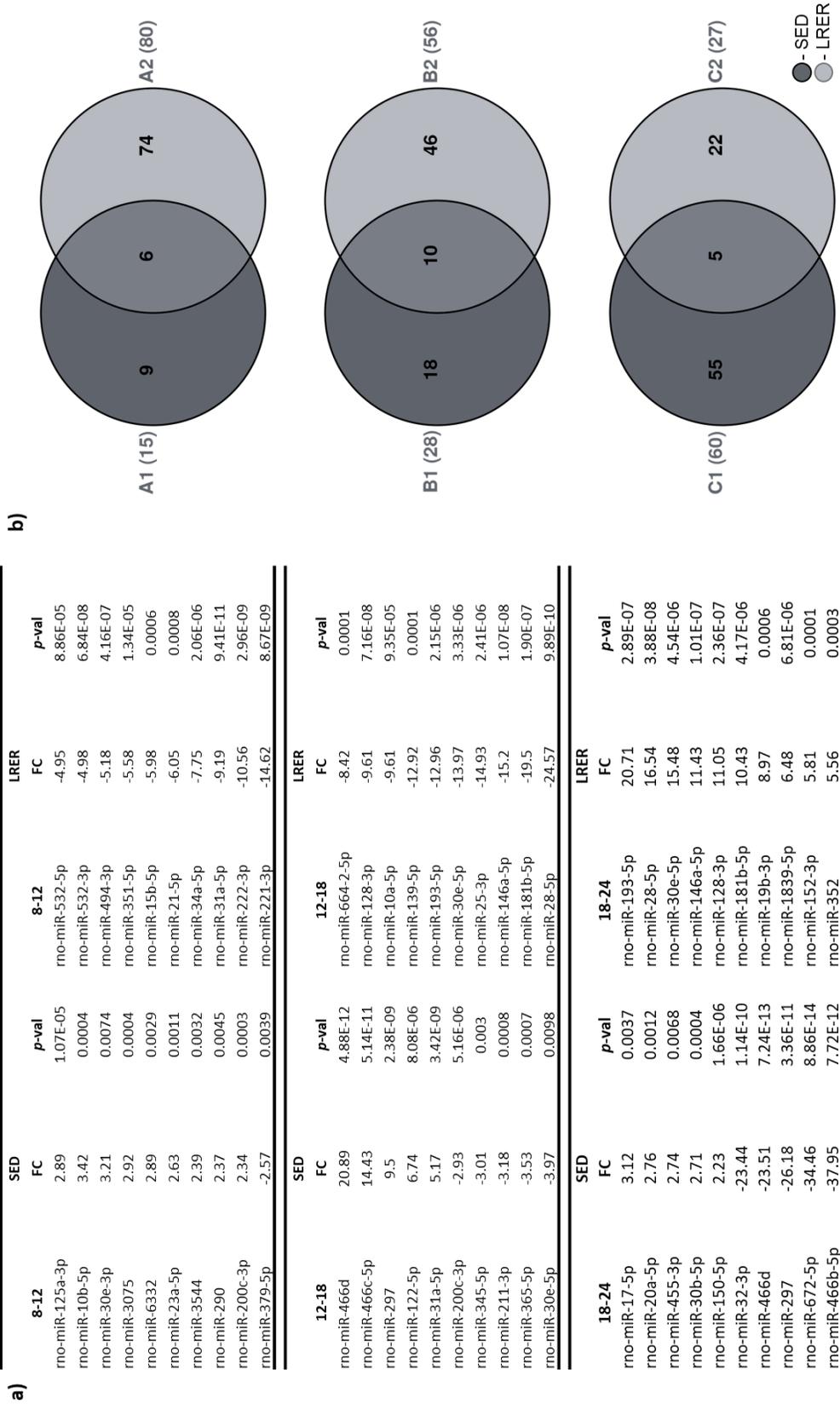


Figura 11. Tablas mostrando los 10 de miRNAs con expresión diferencial más alta para cada transición (a) y diagramas de Venn mostrando el número de miRNAs específicos para cada grupo experimental en cada transición, así como los que se comparten entre sí (b).

8.6 Análisis de enriquecimiento de blancos y vías de señalización.

Una vez obtenidos los miRNAs con expresión diferencial realizamos el análisis de expresión diferencial. Para ello se requirió de dos análisis de enriquecimiento; el enriquecimiento de blancos de los miRNAs y el enriquecimiento de vías de señalización usando esos blancos. Para el enriquecimiento de blancos se utilizaron las bases de datos miRNET (Chang *et al.*, 2020) y miRWalk (Sticht *et al.*, 2018) especializadas en la predicción de blancos de miRNAs y generación de redes de interacción. Posteriormente, los blancos se sometieron a la base CTD (Davis *et al.*, 2019) para el análisis de enriquecimiento de vías de señalización.

El enriquecimiento de vías de señalización de los miRNAs con expresión diferencial en SED muestra alteraciones en vías metabólicas, de proliferación y vías de señalización asociadas a la regulación inmune de los animales (Figura 12), esta tendencia en alteraciones se mantiene en las distintas edades de A1, B1 y C1. En las ratas LRER de la edad A2, los miRNAs con expresión diferencial fueron asociados con vías relacionadas con metabolismo, hormonas e inflamación y regulación del sistema inmune. En las edades B2 y C2, las vías más alteradas fueron relacionadas con inflamación y regulación del sistema inmune, además de vías de metabolismo y mecanismos de sobrevivencia.

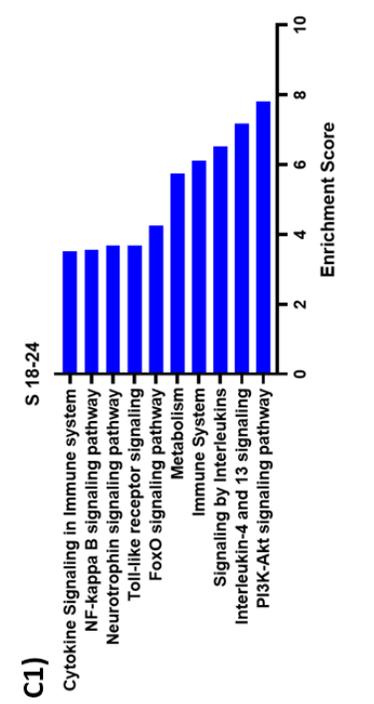
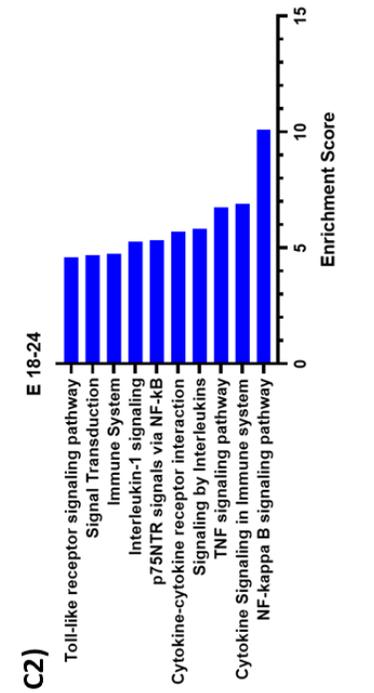
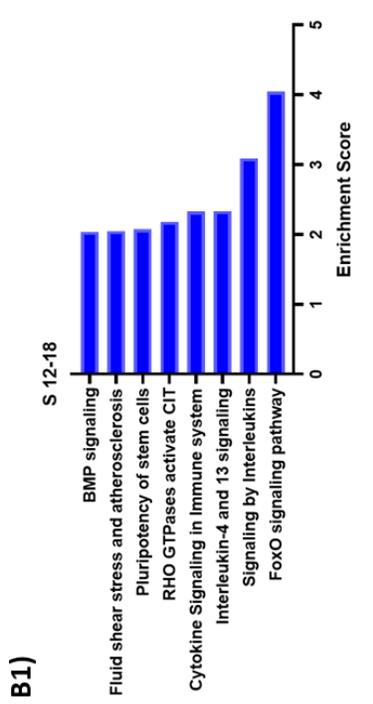
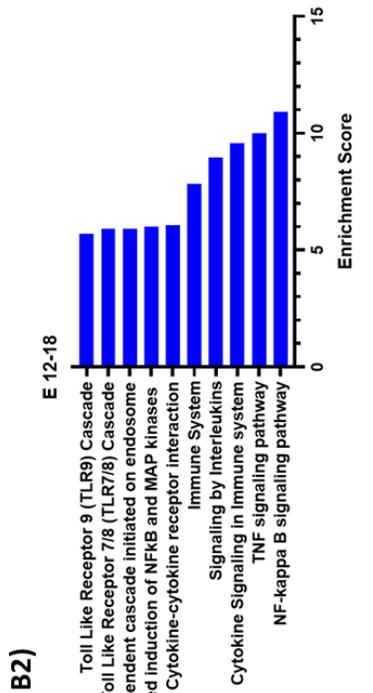
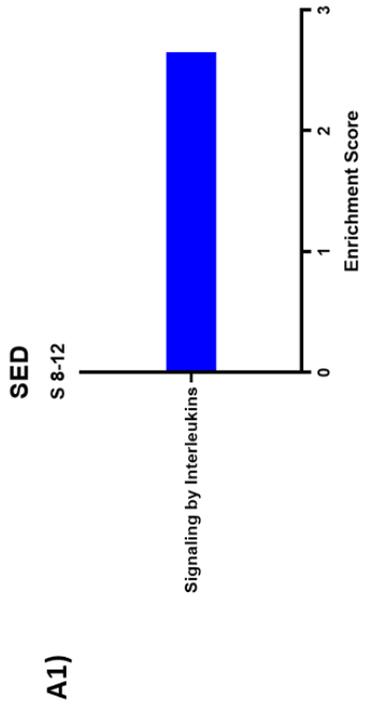
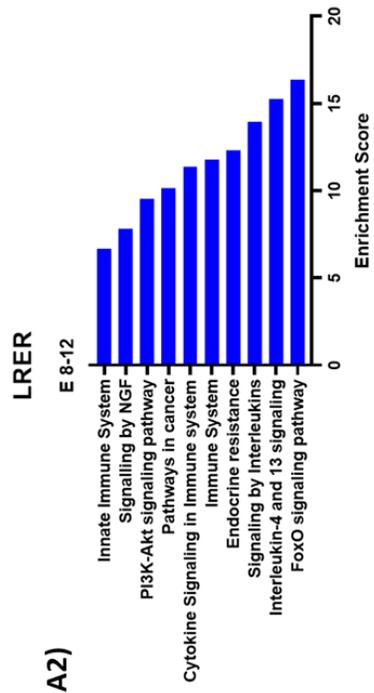


Figura 12. Análisis de enriquecimiento de vías de señalización de los miRNAs con expresión diferencial en SED (A1, B1 y C1) y en LRER (A2, B2 y C2) en la transición de 8-12 (A1 y A2), 12-18 (B1 y B2) y 18-24 meses (C1 y C2). El *enrichment score* fue calculado como $-\log_{10}$ (valor de *p* ajustado).

De forma interesante vemos que las vías de señalización en ambos grupos experimentales y en todos los grupos de edad apuntan a procesos inflamatorios o asociados a la regulación del sistema inmune.

8.7 miRNAs con expresión diferencial compartidos entre grupos experimentales para cada grupo de edad.

Es importante destacar que a pesar de que los análisis de enriquecimiento mostraron cambios en mecanismos y funciones similares, los miRNAs para cada comparación eran distintos. Debido a esto, se hizo un análisis de estos para poder determinar cómo podrían estar actuando, ya que la evidencia del estado fisiológico del tejido era claramente superior en las ratas LRER.

Para ello realizamos un nuevo análisis comparativo, ya que, si bien no se compartían miRNAs entre grupos de edad dentro del mismo grupo experimental, existían miRNAs que se compartían por grupo de edad entre grupos experimentales, es decir las comparaciones A1 vs A2, B1 vs B2 y C1 vs C2. En la primera comparación A1 vs A2 (correspondiente a la transición 8-12 meses) donde se comparten 6 miRNAs (rno-mir-134-5p, rno-mir-678, rno-mir-23a-5p, rno-mir-125a-5p, rno-mir-6332 and rno-mir-134-5p), sin embargo, analizando los valores de expresión encontramos que todos estaban sobreexpresados en las ratas SED y reprimidos en las LRER. Para la comparación B1 vs B2 (correspondiente a la transición 12-18 meses) 5 de los 10 miRNAs que se

comparten (rno-mir-30e-5p, rno-mir-1839-5p, rno-mir-194-5p, rno-mir-10b-5p and rno-mir-497-5p) estaban sobreexpresados en SED y reprimidos en LRER. Los 5 miRNAs restantes (rno-mir-494-3p, rno-mir-127-3p, rno-mir-672-5p, rno-mir-32-3p, and rno-mir-122-5p) estaban reprimidos en ambos grupos, sin embargo, los correspondientes al grupo LRER mostraban un valor de FC al menos 4 veces más bajo que las SED. En la comparación C1 vs C2 (correspondiente a la transición 18-24 meses) cinco miRNAs (rno-mir-152-3p, rno-mir-146a-5p, rno-mir-1839-5p, rno-mir-296-3p and rno-mir-20a-5p) estaban reprimidos en las ratas SED y sobreexpresados en las LRER (Tabla 5).

Basándonos en el análisis de enriquecimiento de las vías de señalización, donde las vías enriquecidas apuntaban a una relación con la inflamación y la regulación del sistema inmune, buscamos en la literatura si existía evidencia directa que asociara a cada uno de estos miRNAs con alguno de estos procesos. El resultado de la investigación documental muestra que en la primera comparación (A1 vs A2) 2 de los 6 miRNAs compartidos (33%) están asociados con procesos inflamatorios. En la siguiente comparación (B1 vs B2) 7 de los 10 miRNAs compartidos (70%) se asociaron también con inflamación, ocurriendo también en la última comparación (C1 vs C2) donde 4 de los 5 miRNAs compartidos (80%) mostraban dicha asociación.

8.8 Perfil inflamatorio de ratas SED y LRER a lo largo del tiempo.

Dado que los datos sugieren la implicación de procesos inflamatorios, nos dimos a la tarea de verificar a nivel fisiológico si los miRNAs y la modificación de su expresión por la rutina de ejercicio estaban teniendo un efecto sobre los niveles de citocinas en circulación. Para ello se utilizó el kit BioPlex Multiplex en los sueros de los animales.

Tabla 5. miRNAs compartidos y su asociación con la inflamación.

	SED		LRER		Ortólogos (Hsa)	Asociado con inflamación	Referencia (PMID)
	FC	p-value	FC	p-value			
8-12							
rno-mir-134-5p	2.27	2.60E-03	-3.16	6.04E-06	MIR134	✓	18942116
rno-mir-678	2.28	6.50E-03	-2.8	0.0008	-	x	-
rno-mir-23a-5p	2.63	1.10E-03	-3.45	2.93E-05	MIR23A	✓	27320175
rno-mir-125a-3p	2.89	1.07E-05	-2.96	3.22E-06	MIR125A	x	-
rno-mir-6332	2.89	2.90E-03	-2.3	0.0028	-	x	-
rno-mir-3075	2.92	4.00E-04	-2.4	9.16E-05	-	x	-
	SED		LRER		Ortólogos (Hsa)	Asociado con inflamación	Referencia (PMID)
	FC	p-value	FC	p-value			
12-18							
rno-mir-30e-5p	-3.97	9.80E-03	-13.97	3.33E-06	MIR30E	✓	33180227
rno-mir-1839-5p	-2.54	5.70E-03	-7.44	2.89E-06	SCARNA15	x	-
rno-mir-194-5p	-2.49	1.10E-03	-6.53	2.35E-05	-	x	-
rno-mir-10b-5p	-2.36	7.90E-03	-3.47	1.85E-05	MIR10B	✓	29850779
rno-mir-497-5p	-2.34	3.40E-03	-4.18	5.06E-05	MIR497	✓	29883261
rno-mir-494-3p	2.68	3.50E-03	-2.03	3.00E-03	MIR494	✓	18258830
rno-mir-127-3p	2.69	7.28E-06	-2.09	8.00E-04	MIR127	✓	18942116
rno-mir-672-5p	2.94	2.00E-04	-2.64	2.00E-04	-	✓	27378744
rno-mir-32-3p	4.33	6.20E-06	-2.73	2.00E-04	MIR32	x	-
rno-mir-122-5p	6.74	8.08E-06	-3.12	2.50E-03	MIR122	✓	31759057
	SED		LRER		Ortólogos (Hsa)	Asociado con inflamación	Referencia (PMID)
	FC	p-value	FC	p-value			
18-24							
rno-mir-152-3p	-4.47	1.00E-04	5.81	1.00E-04	MIR152	✓	32583487
rno-mir-146a-5p	-3.29	8.00E-04	11.43	1.01E-07	MIR146A	✓	33161770
rno-mir-1839-5p	-2.86	4.80E-03	6.48	6.81E-06	SCARNA15	x	-
rno-mir-296-3p	-2.49	5.00E-04	2.6	9.00E-04	MIR296	✓	24263102
rno-mir-20a-5p	2.76	1.20E-03	3.42	1.83E-05	MIR20A	✓	32117757

Nuestros resultados muestran que los perfiles inflamatorios de las ratas SED y las del grupo LRER son distintos (Figura 13). Las diferencias en la mayoría de las citocinas comienzan a aparecer a los 18 meses de edad, tanto para el grupo SED como para el LRER, sin embargo, no son las mismas citocinas las que muestran dichas diferencias, lo cual coincide con lo encontrado en los perfiles de expresión de miRNAs y el análisis de enriquecimiento. No es el caso de citocinas canónicamente pro-inflamatorias, como

IL-6 y TNF- α incrementan de forma significativa a lo largo del tiempo en ambos grupos experimentales. En el caso de citocinas anti-inflamatorias, como la IL-10, disminuye su concentración en suero de forma significativa a lo largo del tiempo en el grupo SED, caso contrario al grupo LRER donde se mantiene la concentración sin cambios significativos a lo largo del tiempo, pero significativamente mayor a los 24 meses con respecto a las ratas de la misma edad del grupo SED.

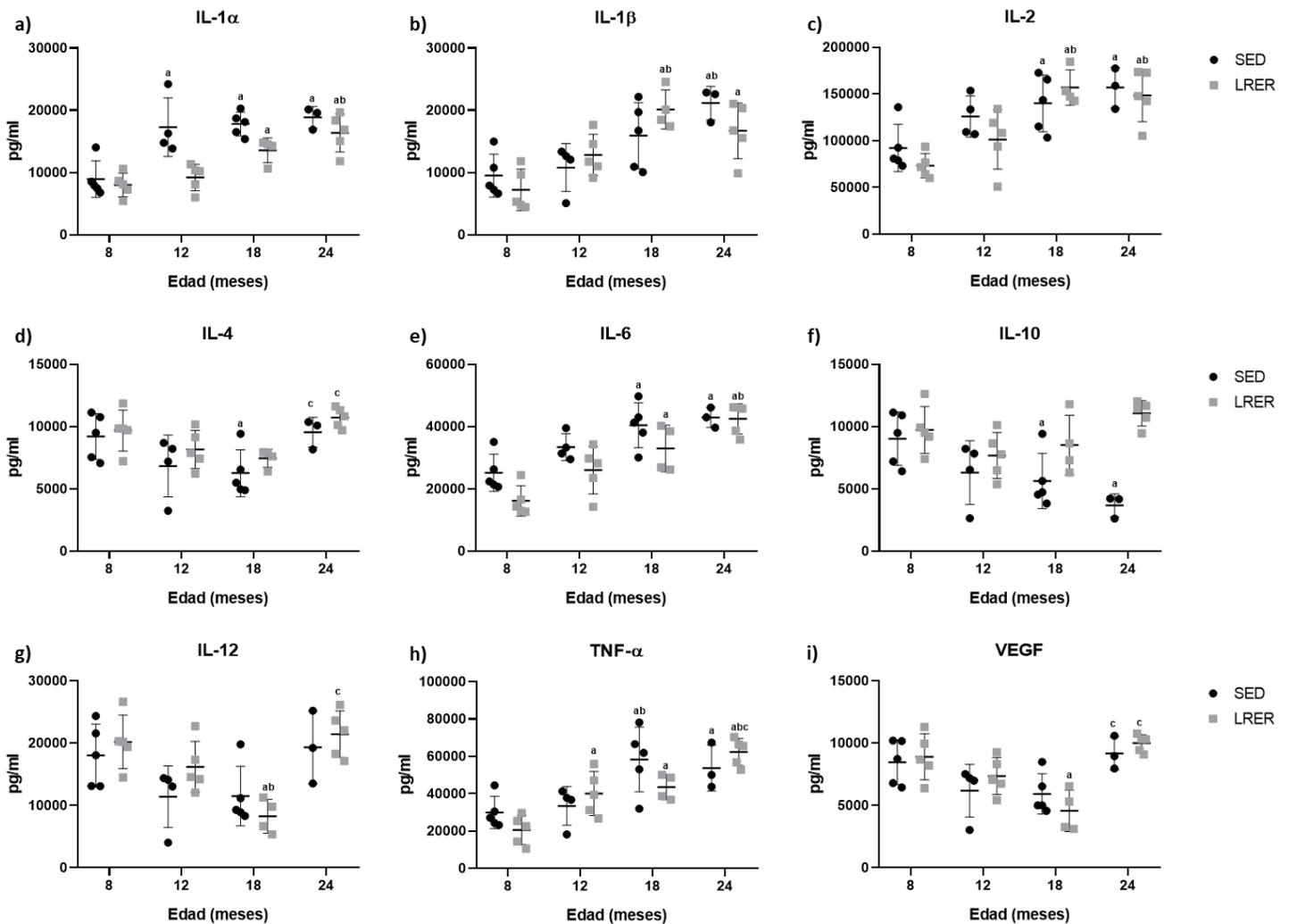


Figura 13. Perfil inflamatorio de suero de las ratas SED y LRER. Las gráficas muestran los niveles de las citocinas IL-1 α (a), IL-1 β (b), IL-2 (c), IL-4 (d), IL-6 (e), IL-10 (f), IL-12 (g), TNF- α (h), and VEGF (i) de las ratas SED y LRER a las distintas edades. Los resultados están expresados en pg/ml. Significancia: ANOVA seguida de Tukey. $p < 0.05$. a: diferente de 8 meses; b: diferente de 12 meses; c: diferente de 18 meses.

Para comparar el estado inflamatorio de los animales, recurrimos al cociente de IL-6/IL-10 y el de TNF- α /IL-10 para tener una idea entre la proporción entre citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. Como resultado del cálculo de estos índices se encontró que las ratas SED tienen un incremento en el perfil pro-inflamatorio a lo largo del tiempo en ambos cocientes, con diferencias significativas a los 18 y 24 meses comparados con los bajos cocientes pro-inflamatorios de las ratas LRER (Figura 14). Por lo que nuestros resultados sugieren que la LRER mantiene un perfil pro-inflamatorio bajo a lo largo del tiempo, mismo que podría estar siendo regulado por la expresión de miRNAs bajo la rutina de ejercicio.

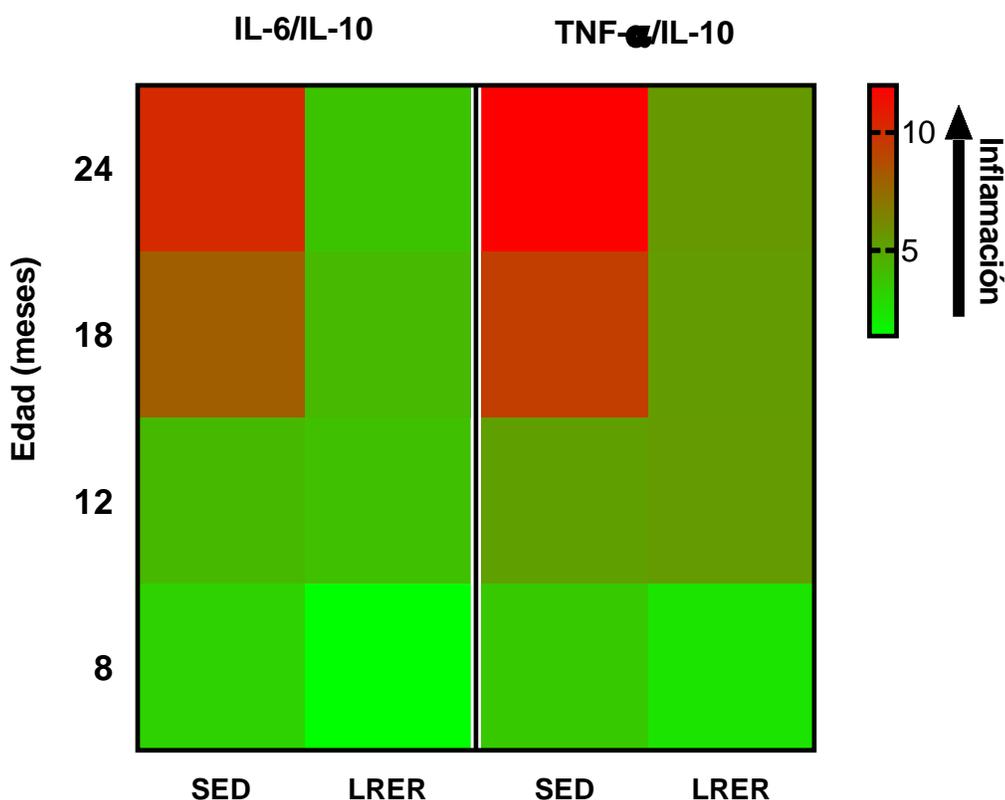


Figura 14. Heatmap de los perfiles inflamatorios de las ratas SED y LRER. Los valores fueron tomados de los cocientes de IL-6/IL-10 y TNF- α /IL-10 de las ratas de ambos grupos. A mayor valor corresponde un mayor nivel de inflamación.

9. Discusión

Una vida sedentaria es sin duda de los factores de riesgo más grandes que contribuyen al desarrollo de OSO (McLeod *et al.*, 2016; Cruz-Jentoft *et al.*, 2019). Sin embargo, el ejercicio o una actividad física constante, mejora diversos aspectos deletéreos del envejecimiento, incluyendo la pérdida de la fuerza y masa muscular esquelética asociada a la sarcopenia (Vlietstra, Hendrickx and Waters, 2018; Beckwée *et al.*, 2019; De Mello *et al.*, 2019). En el presente estudio demostramos que una rutina de ejercicio de baja intensidad es suficiente para retardar la aparición de la OSO, proceso que estaría asociado a la reducción de la grasa corporal y la inflamación. Algunos reportes dicen que, durante el desarrollo de la OSO, es muy importante la comunicación que existe entre los tejidos que forman parte de esta enfermedad, ya que los tres tejidos (óseo, graso y muscular) son considerados tejidos endocrinos (Ilich, Kelly, Inglis, *et al.*, 2014). Algunas de las moléculas que son secretadas por estos tejidos puede influir en distintas etapas de diferenciación de las distintas células madre mesenquimales (mesenchymal stem cells o MSC por sus siglas en inglés) propias de cada tejido, es decir, el microambiente generado alrededor de estos tejidos puede alterar el destino celular de las MSC. Los factores principales que pueden alterar el desarrollo y funciones de estos tejidos es la inflamación, estrés, obesidad, el envejecimiento mismo y factores nutricionales (Ilich, Kelly, Kim, *et al.*, 2014; Kelly *et al.*, 2019). Se ha reportado también que el incremento de grasa corporal y visceral correlaciona de forma positiva con los altos niveles de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6 y la proteína C reactiva (CRP), mismas que a su vez pueden contribuir a perpetuar la

obesidad, osteoporosis y sarcopenia (Schaap *et al.*, 2009; Ilich, Kelly, Kim, *et al.*, 2014; Mavros *et al.*, 2014).

En este estudio, vías de señalización asociadas a procesos inflamatorios están alterados de todas las ventanas de tiempo que fueron evaluadas, y que posteriormente en el análisis de los perfiles inflamatorios (cocientes de IL-6/IL-10 y TNF- α /IL-10 mostrados en la Figura 14) reveló diferencias entre edades y grupos experimentales. Estos resultados concuerdan con otros reportes donde el ejercicio disminuye la inflamación sistémica. El ejercicio de resistencia ha probado ser un atenuante en la pérdida de masa muscular en adultos mayores con obesidad y fragilidad durante un tratamiento para pérdida de peso (Frimel, Sinacore and Villareal, 2008). También se ha demostrado que el entrenamiento de resistencia disminuye la progresión patológica de pacientes de edad avanzada mediante la reducción de proteínas inflamatorias como IL-6, TNF- α y CRP (Lambert *et al.*, 2008; Donges, Duffield and Drinkwater, 2010). De la misma forma, un metaanálisis reciente muestra que una mayor concentración de citocinas inflamatorias en circulación están asociadas con una menor masa y fuerza muscular esquelética (Tuttle, Thang and Maier, 2020). También es discutido que, si bien la IL-6 está fuertemente asociada con el deterioro muscular (Belizário *et al.*, 2016) también se han observado sus efectos benéficos cuando es secretada por el músculo durante el ejercicio, mejorando la tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina al final de la actividad física (Pedersen and Febbraio, 2006). A pesar de que la IL-6 se ha asociado siempre con el envejecimiento y la inflamación (Franceschi *et al.*, 2000; Tuttle, Thang and Maier, 2020), por sí sola no es capaz de desencadenar la pérdida

de masa muscular (Tuttle, Thang and Maier, 2020). Sin embargo, un metaanálisis reveló que la IL-6 en conjunto con TNF- α si podrían estar generando el ambiente fisiológico requerido para desencadenar la pérdida de la masa muscular (Belizário *et al.*, 2016; Tuttle, Thang and Maier, 2020), lo que podría explicar la pérdida de músculo en las ratas SED de nuestro modelo, ya que al carecer del componente anti-inflamatorio provisto por la IL-10, las ratas SED sucumben ante el efecto combinado de IL-6 y TNF- α .

Una de las alteraciones que observamos fue un incremento de casi todas las citocinas a lo largo del tiempo, lo que concuerda con datos previamente reportados. Esto podría estar asociado directamente con el fenómeno llamado *inflammaging* (Franceschi *et al.*, 2000; Barajas-Gómez *et al.*, 2017) que parece estar bloqueado por efecto del ejercicio de baja intensidad en nuestro modelo.

Otro factor que parece estar influenciando el estado inflamatorio de las ratas SED es la obesidad. Se ha demostrado que la obesidad favorece la pérdida de la arquitectura del tejido muscular y contribuye a la inflamación de bajo grado característica de enfermedades crónicas y el envejecimiento (van Herpen and Schrauwen-Hinderling, 2008; Tardif *et al.*, 2014; Koliaki *et al.*, 2019). En nuestros resultados, la cantidad de grasa corporal de las ratas SED se encontraba por encima del 30% desde los 12 meses de edad, lo cual es considerado obesidad, contrario a lo mostrado en las ratas LRER, las cuales excedieron este umbral hasta los 18 meses de edad, pero disminuyó nuevamente a los 24 meses.

La rutina de ejercicio LRER disminuyó la concentración de distintas citocinas pro-inflamatorias como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, y TNF- α e incrementó la concentración de citocinas anti-inflamatorias como IL-4 e IL-10 comparado con los grupos SED. Esto sugiere que para preservar la composición y funcionalidad del tejido óseo y muscular es necesario reducir la grasa corporal y la inflamación en este modelo de ratas Wistar con OSO.

Como se mencionó antes, la regulación que ejercen los miRNAs sobre el músculo esquelético está cobrando cada vez más importancia. Estas moléculas son capaces de regular cambios en la masa y función muscular asociados con la edad. Se ha demostrado que, en ratones, el envejecimiento altera la expresión de miRNAs (Soriano-Arroquia *et al.*, 2016) y su asociación con el músculo en condiciones sedentarias. Además, cambios en la expresión de miRNAs asociados con rutinas de ejercicio también han sido observados en humanos (Makarova *et al.*, 2014; Hou *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2020).

Es importante notar que mientras que la mayoría de los estudios se concentran en comparar individuos jóvenes vs viejos, y la mayoría de las rutinas de ejercicio se llevan a cabo en periodos de tiempo cortos, nuestro estudio hace énfasis en aplicar una rutina de ejercicio de baja intensidad a lo largo de la vida de las ratas. De esta manera somos capaces de observar los cambios en la expresión de los miRNAs además de su progresión en distintas ventanas de tiempo para asociarlos posteriormente con parámetros fisiológicos comparados con ratas SED.

Nuestro estudio revela que los miRNAs que aparecen durante el proceso de envejecimiento bajo condiciones sedentarias difieren significativamente de los perfiles de expresión de las ratas LRER (Figura 10). Por motivos estadísticos no podemos referirnos al set de miRNAs como una firma molecular de la OSO, consideramos esencial resaltar su importancia en esta enfermedad para estudios posteriores. Existen diferencias considerables entre ambos grupos experimentales a lo largo del tiempo. Observamos por ejemplo que el número de miRNAs con expresión diferencial que solamente están en el grupo SED incrementa a lo largo del tiempo, mientras que en los que corresponden a las ratas LRER este número disminuye (Figura 11). Además, los miRNAs con expresión diferencial no fueron los mismos, es decir, en cada ventana de tiempo los miRNAs con expresión diferencial eran completamente distintos a los de la ventana de tiempo anterior dentro del mismo grupo experimental. Esto sugiere que la expresión de miRNAs está fuertemente asociada con cada etapa de la vida de los organismos y que es por ende susceptible a ser modificada por el envejecimiento. De forma interesante, a pesar de que dentro de cada grupo experimental no se compartían miRNAs en las distintas ventanas temporales y de que basados en los volcano plots, los perfiles de expresión parecían opuestos (es decir, mientras que en las SED mostraron la mayor parte de sus miRNAs sobreexpresados los LRER mostraban un perfil de expresión con miRNAs en su mayoría reprimidos) se encontraron miRNAs compartidos entre grupos experimentales en los mismos grupos de edad pero con niveles de expresión opuestos (Tabla 5). Esto puede indicar que los miRNAs son importantes en el proceso de envejecimiento y el desarrollo de la OSO influenciando fuertemente procesos inflamatorios sistémicos.

Con respecto a los dos de los miRNAs con expresión diferencial asociados con inflamación compartidos entre SED y LRER en la primera ventana de tiempo (miR-134-5p y miR-23a-5p) corresponden al 33% de los miRNAs compartidos. Algunos reportes muestran que el miR-134 promueve la inflamación y apoptosis en células epiteliales y trofoblastos en patologías asociadas al metabolismo como la diabetes (Wang *et al.*, 2016; Ke *et al.*, 2022), mientras que el miR-23a-5p parece regular la inflamación el estrés oxidante (Yang *et al.*, 2018). El grupo de Chen y colaboradores demostró que ratones C57BL/6 tratados con LPS incrementa los niveles de expresión de miR-23a-5p, así también las concentraciones de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- α y reduce los de IL-10 (Chen *et al.*, 2021). Esto coincide con nuestros datos que muestran una reducción en la expresión de ambos miRNAs acompañados de un perfil inflamatorio más bajo en las ratas LRER comparadas con las del grupo SED.

La regulación de la expresión de miRNAs en la transición de 12-18 meses parece un poco más compleja debido a que, durante esta etapa, las hembras atraviesan una etapa de cambios hormonales y metabólicos importantes. En esta etapa, las ratas hembra entran a un periodo similar a la menopausia en humanos conocido como senescencia reproductiva, en la que incrementa la grasa corporal y disminuye la cantidad de músculo, además de también estar asociada con procesos inflamatorios (Koebele and Bimonte-Nelson, 2016) En esta etapa, encontramos 10 miRNAs compartidos entre las ratas de los grupos LRER y SED, de los cuales 7 (70%) de ellos están asociados con inflamación. En el grupo SED, se observa que 4 miRNAs (miR-

10b-5p, miR-494-3p, miR-127-3p, y miR-122-5p) están sobreexpresados comparados con el grupo LRER. Estos 4 miRNAs están asociados con mecanismos pro-inflamatorios, por ejemplo, el miR-10b-5p se ha reportado en niños con sobrepeso u obesidad, quienes también presentan una inflamación de bajo grado (Lauria *et al.*, 2022). El miR-494-3p induce la polarización pro-inflamatoria M1 en macrófagos, incrementando los niveles de la citocina CCR2. También, este miRNA induce la respuesta pro-inflamatoria desencadenada por mecanismos de hipoxia-reperfusión en células HK2 y suero de pacientes con daño renal agudo después de una cirugía cardiaca (Gong *et al.*, 2021; van Ingen *et al.*, 2021). En el caso del miR-127-3p, se encuentra sobreexpresado en tejido adiposo visceral de mujeres pre-diabéticas y diabéticas, donde existe una asociación con este miRNA y la secreción de citocinas pro-inflamatorias (Strycharz *et al.*, 2021). Wang *et al.* Demostraron que el miR-122-5p incrementa la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, MCP-1, y TNF- α en células THP-1, HUVEC, LO2 en respuesta a un estímulo con LPS (Wang *et al.*, 2022). En general, los resultados sugieren que estos miRNAs están involucrados con la respuesta pro-inflamatoria de enfermedades metabólicas asociadas con la acumulación de tejido adiposo en respuesta a un estado inflamatorio o daño al tejido.

Es importante señalar que en las ratas SED de 12-18 meses existe una respuesta anti-inflamatoria compensatoria regulada por al menos 3 de los miRNAs compartidos con el grupo LRER. Un reporte menciona que el miR-30a-5p inhibe la traducción de NLP3, que impide la formación del inflammasoma, reduciendo la secreción de citocinas pro-inflamatorias (La Rosa *et al.*, 2021). El carácter anti-inflamatorio del miR-30a-5p fue

corroborado en un estudio donde su sobreexpresión disminuye los niveles de citocinas pro-inflamatorias en un modelo de ratones expuestos a partículas de materia finas (PM₂₅) y en un modelo de daño hepático causado por CdCl₂ (Li *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2022). El miR-497-5p regula la inflamación inducida por LPS en cardiomiocitos H9c2 y en la línea celular AC16, donde disminuye las citocinas IL-1 β , IL-6, y TNF- α (Li *et al.*, 2022). Un estudio reciente muestra que la sobreexpresión del miR-672-5p en microglía con polaridad M2 promueve la recuperación funcional de la médula espinal después de una lesión, favoreciendo la respuesta anti-inflamatoria (Zhou *et al.*, 2022). También, uno de los mecanismos más interesantes mostrados por el miR-497-5p es que disminuye la secreción de IL-6, citocina pro-inflamatoria, inducida por atrofia de células musculares (Freire *et al.*, 2021).

El análisis de la regulación de los miRNAs en la última ventana de tiempo (18-24 meses), que corresponde a la transición de adultos a viejos, muestra que 4 (80%) de los miRNAs que se comparten entre las ratas de ambos grupos experimentales, están sobreexpresados en LRER y están asociados con la respuesta inflamatoria. De forma interesante, estos 4 miRNAs están reportados por su asociación con la respuesta anti-inflamatoria. Por ejemplo, se ha reportado que el mir-146a-5p tiene un efecto anti-inflamatorio porque su sobreexpresión disminuye los niveles de IRAK1, que a su vez inhibe la translocación al núcleo de NF- κ B, y debido a ello, los niveles de IL-6 y TNF- α disminuyen también en MSC que fueron tratadas con Tongxinluo, un compuesto usado en la medicina tradicional China para tratar infarto al miocardio (Xiong *et al.*, 2022). Uno de los miRNAs más interesantes fue el miR-152-3p porque se ha asociado

con el inflammaging. Personas con síndrome de Down (DS) suelen envejecer de forma prematura, por lo que suelen padecer enfermedades asociadas al envejecimiento y un perfil inflamatorio más alto que personas de la misma edad que no presentan este síndrome. Este estudio fue llevado a cabo por Morsianin *et al.* demostrando que el miR-152-3p disminuye con la edad en personas con DS y que ese mismo miRNA presenta niveles más altos en personas sin DS (Rostami *et al.*, 2012; Iulita *et al.*, 2016; Morsiani *et al.*, 2022). Esto último sugiere que el miR-152-3p estaría incrementando en las ratas LRER de nuestro estudio como un mecanismo de respuesta anti-inflamatoria. También, el miR-296-3p se ha reportado por tener blancos asociados con la respuesta anti-inflamatoria en humanos y ratones (Li *et al.*, 2018). Se demostró también que la expresión del miR-296-3p en macrófagos alveolares porcinos disminuyen su expresión de TNF- α en un mecanismo que involucra IRF-1 (Zhang *et al.*, 2021). Finalmente, se ha reportado que el miR-20a-5p reduce de forma significativa los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en ratas Sprague-Dawley con dietas altas en grasas, en un mecanismo que involucra la inhibición de la vía JNK/NF- κ B (Liu *et al.*, 2021). La participación del miR-20a-5p en la regulación del estado inflamatorio ha sido confirmado en la línea celular HT22, la cual, fue sometida a un tratamiento con MPP+ y se observó que la sobreexpresión de este miRNA ayuda a disminuir los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α , así como la expresión de p65 (Wang *et al.*, 2021). Esto concuerda con nuestros descubrimientos porque en las ratas LRER de 24 meses presentan un porcentaje más alto de grasa y un perfil inflamatorio más bajo, comparado con las ratas SED.

Algunos estudios han examinado la expresión de los niveles de miRNAs en el contexto del ejercicio y en el envejecimiento, mostrando discrepancias entre ellos y sin llegar a un consenso de un solo miRNA o grupo de miRNAs que defina una firma genética de esta enfermedad. Estas discrepancias pueden ser producto de las distintas metodologías en términos de duración, tipo de ejercicio, edades y otros factores que pueden influir al momento de realizar estos estudios.

Esto último puede ser usado como un indicador de que existe una asociación entre la edad cronológica y la expresión de miRNAs, en donde el ejercicio funciona como un modulador de la edad biológica de los animales de este estudio. Esto puede ser confirmado en nuestros resultados, donde observamos que las ratas LRER de 24 meses de edad muestran la misma funcionalidad que las ratas SED de 12 meses (Figura 7f). Este resultado es una muestra del poder que una intervención tan sencilla como caminar 30 min al día puede tener sobre el tejido muscular esquelético. Sin duda sería interesante explorar en futuras investigaciones la relación entre la edad cronológica y la edad biológica basada en la expresión de miRNAs en nuestro modelo murino, similar al realizado en humanos (Huan *et al.*, 2018).

10. Conclusiones

En el presente trabajo, nuestros resultados muestran que los miRNAs, pueden ser modulados por el ejercicio durante el envejecimiento, atenuando el desgaste muscular e impactando profundamente en la regulación del componente inflamatorio asociado a la edad y la OSO. Este mecanismo regulatorio puede ser determinante en la infiltración de adipocitos en el tejido muscular, ya que disminuye el perfil pro-

inflamatorio. Por si mismos, los miRNAs juegan un papel fundamental en el envejecimiento y el desarrollo de OSO, la gran mayoría de estudios muestran que, en efecto, existe un cambio en la expresión de miRNAs, sin embargo, estos cambios solo son observados entre individuos jóvenes y viejos. En ese sentido, nosotros consideramos que son los eventos intermedios los que pueden ser determinantes en el desarrollo de esta enfermedad. Debido a ello pudimos observar que los miRNAs que participan en cada etapa de la vida son completamente distintos en cada una de ellas y que, a pesar de ello, parecen estar gobernando los mismos procesos (en este caso procesos inflamatorios). Esto habla del alto nivel de regulación que estas moléculas tan pequeñas pueden ejercer sobre un organismo durante el envejecimiento, bajo una rutina de ejercicio, o en el desarrollo de OSO y lo mucho que aún nos queda por aprender de los miRNAs.

11. Perspectivas

Sería interesante evaluar la participación de reguladores de procesos inflamatorios como NF- κ B, su asociación con la expresión de los distintos sets de miRNAs reportados en este trabajo.

Posteriormente, evaluar estos sets de miRNAs en pacientes sedentarios o pacientes que se ejercitan de forma regular, junto con otros parámetros para determinar el diagnóstico de OSO y el componente inflamatorio.

12. Referencias

Aleman, H. *et al.* (2011) 'Longitudinal evidence on the association between interleukin-6 and C-reactive protein with the loss of total appendicular skeletal muscle in free-living older men and women', *Age Ageing*, 40(4), pp. 469–475. doi: 10.1093/ageing/afr040.

Arango-Lopera, V. E. *et al.* (2013) 'Mortality as an adverse outcome of sarcopenia', *J Nutr Health Aging*, 17(3), pp. 259–262. doi: 10.1007/s12603-012-0434-0.

Barajas-Gómez, B. A. *et al.* (2017) 'Relationship of inflammatory profile of elderly patients serum and senescence-associated secretory phenotype with human breast cancer cells proliferation: Role of IL6/IL8 ratio', *Cytokine*, 91, pp. 13–29. doi: 10.1016/j.cyto.2016.12.001.

Baumgartner, R. N. *et al.* (2004) 'Sarcopenic obesity predicts instrumental activities of daily living disability in the elderly', *Obes Res*, 12(12), pp. 1995–2004. doi: 10.1038/oby.2004.250.

Beckwée, D. *et al.* (2019) 'Exercise Interventions for the Prevention and Treatment of Sarcopenia. A Systematic Umbrella Review', *Journal of Nutrition, Health and Aging*. Springer-Verlag France, pp. 494–502. doi: 10.1007/s12603-019-1196-8.

Belizário, J. E. *et al.* (2016) 'Skeletal muscle wasting and renewal: a pivotal role of myokine IL-6', *SpringerPlus*. SpringerOpen. doi: 10.1186/s40064-016-2197-2.

Beyer, I., Mets, T. and Bautmans, I. (2012) 'Chronic low-grade inflammation and age-related sarcopenia', *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 15(1), pp. 12–22. doi: 10.1097/MCO.0B013E32834DD297.

Carlson, M. E. *et al.* (2009) 'Molecular aging and rejuvenation of human muscle stem cells', *EMBO Mol Med*, 1(8–9), pp. 381–391. doi: 10.1002/emmm.200900045.

Chang, L. *et al.* (2020) 'miRNet 2.0: network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology', *Nucleic acids research*, 48(W1), pp. W244–W251. doi: 10.1093/nar/gkaa467.

Chen, Y. F. *et al.* (2021) 'MicroRNA-23a-5p Is Involved in the Regulation of Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury by Targeting HSP20/ASK1', *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021. doi: 10.1155/2021/9942557.

Cruz-Jentoft, A. J. *et al.* (2019) 'Sarcopenia: Revised European consensus on definition and diagnosis', *Age and Ageing*. Oxford University Press, pp. 16–31. doi: 10.1093/ageing/afy169.

D'Alessandro, C. *et al.* (2018) 'Prevalence and Correlates of Sarcopenia among Elderly CKD Outpatients on Tertiary Care', *Nutrients*, 10(12). doi: 10.3390/nu10121951.

Davis, A. P. *et al.* (2019) 'The Comparative Toxicogenomics Database: update 2019', *Nucleic Acids Res*, 47(D1), pp. D948–D954. doi: 10.1093/nar/gky868.

Degens, H. (2007) 'Age-related skeletal muscle dysfunction: causes and mechanisms', *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 7(3), pp. 246–252. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17947808>.

Distefano, G. and Goodpaster, B. H. (2018) 'Effects of Exercise and Aging on Skeletal Muscle', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(3). doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A029785.

Doherty, T. J. (2003) 'Invited review: Aging and sarcopenia', *J Appl Physiol* (1985), 95(4), pp. 1717–1727. doi: 10.1152/jappphysiol.00347.2003.

Donges, C. E., Duffield, R. and Drinkwater, E. J. (2010) 'Effects of resistance or aerobic exercise training on interleukin-6, C-reactive protein, and body composition', *Med Sci Sports Exerc*, 42(2), pp. 304–313. doi: 10.1249/MSS.0b013e3181b117ca.

Dowling, L. *et al.* (2022) 'MicroRNAs in obesity, sarcopenia, and commonalities for sarcopenic obesity: a systematic review', *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 13(1), pp. 68–85. doi: 10.1002/JCSM.12878.

Espinel-Bermudez, M. C. *et al.* (2018) 'Associated factors with sarcopenia among Mexican elderly: 2012 National Health and Nutrition Survey', *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 56(Suppl 1), pp. S46–S53. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29624960>.

Fox, M. (2012) 'What Is Sedentarism?', *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 112(8), pp. 1124–1128. doi: 10.1016/J.JAND.2012.06.018.

Franceschi, C. *et al.* (2000) 'Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence', in *Annals of the New York Academy of Sciences*. New York Academy of Sciences, pp. 244–254. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x.

Freire, P. P. *et al.* (2021) 'Decreased miR-497-5p Suppresses IL-6 Induced Atrophy in Muscle Cells', *Cells*, 10(12). doi: 10.3390/CELLS10123527.

Frimel, T. N., Sinacore, D. R. and Villareal, D. T. (2008) 'Exercise attenuates the weight-loss-induced reduction in muscle mass in frail obese older adults', *Med Sci Sports*

Exerc, 40(7), pp. 1213–1219. doi: 10.1249/MSS.0b013e31816a85ce.

Fujita, S. *et al.* (2007) 'Aerobic exercise overcomes the age-related insulin resistance of muscle protein metabolism by improving endothelial function and Akt/mammalian target of rapamycin signaling', *Diabetes*, 56(6), pp. 1615–1622. doi: 10.2337/db06-1566.

Giknis, M. and Clifford, C. (2008) *Clinical laboratory parameters for Crl: Wi(Han) rats*. Edited by Charles River Laboratories International. Wilmington, MA : Charles River Laboratories International .

Gong, Q. *et al.* (2021) 'Hsa-miR-494-3p attenuates gene HtrA3 transcription to increase inflammatory response in hypoxia/reoxygenation HK2 Cells', *Scientific reports*, 11(1). doi: 10.1038/S41598-021-81113-X.

González-Gross, M. and Meléndez, A. (2013) 'Sedentarism, active lifestyle and sport: Impact on health and obesity prevention', *Nutricion hospitalaria*, 28 Suppl 5(SUPPL.5), pp. 89–98. doi: 10.3305/NH.2013.28.SUP5.6923.

Hawke, T. J. and Garry, D. J. (2001) 'Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology', *J Appl Physiol* (1985), 91(2), pp. 534–551. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11457764>.

Hernandez-Alvarez, D. *et al.* (2019) 'Long-Term Moderate Exercise Combined with Metformin Treatment Induces an Hormetic Response That Prevents Strength and Muscle Mass Loss in Old Female Wistar Rats', *Oxid Med Cell Longev*, 2019, p. 3428543. doi: 10.1155/2019/3428543.

van Herpen, N. A. and Schrauwen-Hinderling, V. B. (2008) 'Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity', *Physiol Behav*, 94(2), pp. 231–241. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.11.049.

Hou, Z. *et al.* (2019) 'Longterm Exercise-Derived Exosomal miR-342-5p: A Novel Exerkine for Cardioprotection', *Circulation Research*, 124(9), pp. 1386–1400. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.314635.

Huan, T. *et al.* (2018) 'Age-associated microRNA expression in human peripheral blood is associated with all-cause mortality and age-related traits', *Aging Cell*, 17(1). doi: 10.1111/accel.12687.

Ilich, J. Z., Kelly, O. J., Inglis, J. E., *et al.* (2014) 'Interrelationship among muscle, fat, and bone: connecting the dots on cellular, hormonal, and whole body levels', *Ageing research reviews*, 15(1), pp. 51–60. doi: 10.1016/J.ARR.2014.02.007.

Ilich, J. Z., Kelly, O. J., Kim, Y., *et al.* (2014) 'Low-grade chronic inflammation perpetuated by modern diet as a promoter of obesity and osteoporosis', *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 65(2), pp. 139–148. doi: 10.2478/10004-1254-65-2014-2541.

Ilich, J. Z. (2017) 'Another Impairment in Older Age: What Does Osteosarcopenic Obesity Syndrome Mean for Middle-Aged and Older Women?', *Journal of the American Medical Directors Association*, 18(8), pp. 648–650. doi: 10.1016/J.JAMDA.2017.05.001.

van Ingen, E. *et al.* (2021) 'Inhibition of microRNA-494-3p activates Wnt signaling and

reduces proinflammatory macrophage polarization in atherosclerosis', *Molecular therapy. Nucleic acids*, 26, pp. 1228–1239. doi: 10.1016/J.OMTN.2021.10.027.

Iulita, M. F. *et al.* (2016) 'An inflammatory and trophic disconnect biomarker profile revealed in Down syndrome plasma: Relation to cognitive decline and longitudinal evaluation', *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 12(11), pp. 1132–1148. doi: 10.1016/J.JALZ.2016.05.001.

Jiang, X. *et al.* (2022) 'Identification of miRNAs involved in liver injury induced by chronic exposure to cadmium', *Toxicology*, 469. doi: 10.1016/J.TOX.2022.153133.

Johnson, M. L. *et al.* (2015) 'Differential Effect of Endurance Training on Mitochondrial Protein Damage, Degradation, and Acetylation in the Context of Aging', *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 70(11), pp. 1386–1393. doi: 10.1093/GERONA/GLU221.

Ke, W. *et al.* (2022) 'miR-134-5p promotes inflammation and apoptosis of trophoblast cells via regulating FOXP2 transcription in gestational diabetes mellitus', *Bioengineered*, 13(1), pp. 319–330. doi: 10.1080/21655979.2021.2001219.

Kelly, O. J. *et al.* (2019) 'Osteosarcopenic Obesity: Current Knowledge, Revised Identification Criteria and Treatment Principles', *Nutrients*, 11(4). doi: 10.3390/nu11040747.

Kennedy, B. K. *et al.* (2014) 'Geroscience: linking aging to chronic disease', *Cell*, 159(4), pp. 709–713. doi: 10.1016/j.cell.2014.10.039.

Kim, J. K. *et al.* (2014) 'Prevalence of and factors associated with sarcopenia in elderly

patients with end-stage renal disease', *Clin Nutr*, 33(1), pp. 64–68. doi: 10.1016/j.clnu.2013.04.002.

Kim, T. N. *et al.* (2014) 'Impact of visceral fat on skeletal muscle mass and vice versa in a prospective cohort study: the Korean Sarcopenic Obesity Study (KSOS)', *PLoS One*, 9(12), p. e115407. doi: 10.1371/journal.pone.0115407.

Kob, R. *et al.* (2015) 'Sarcopenic obesity: molecular clues to a better understanding of its pathogenesis?', *Biogerontology*, 16(1), pp. 15–29. doi: 10.1007/s10522-014-9539-7.

Koebele, S. V. and Bimonte-Nelson, H. A. (2016) 'Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research', *Maturitas*, 87, p. 5. doi: 10.1016/J.MATURITAS.2016.01.015.

Kohut, M. L. *et al.* (2006) 'Aerobic exercise, but not flexibility/resistance exercise, reduces serum IL-18, CRP, and IL-6 independent of beta-blockers, BMI, and psychosocial factors in older adults', *Brain Behav Immun*, 20(3), pp. 201–209. doi: 10.1016/j.bbi.2005.12.002.

Koliaki, C. *et al.* (2019) 'Sarcopenic Obesity: Epidemiologic Evidence, Pathophysiology, and Therapeutic Perspectives', *Current obesity reports*. NLM (Medline), pp. 458–471. doi: 10.1007/s13679-019-00359-9.

Lambert, C. P. *et al.* (2008) 'Exercise but not diet-induced weight loss decreases skeletal muscle inflammatory gene expression in frail obese elderly persons', *J Appl Physiol (1985)*, 105(2), pp. 473–478. doi: 10.1152/jappphysiol.00006.2008.

Lauria, F. *et al.* (2022) 'Circulating miRNAs Are Associated with Inflammation Biomarkers in Children with Overweight and Obesity: Results of the I.Family Study', *Genes*, 13(4). doi: 10.3390/GENES13040632.

Li, H. *et al.* (2018) 'MicroRNA-296: a promising target in the pathogenesis of atherosclerosis?', *Molecular Medicine*, 24(1). doi: 10.1186/S10020-018-0012-Y.

Li, J. *et al.* (2022) 'Mesenchymal stem cells-derived exosomes prevent sepsis-induced myocardial injury by a CircRTN4/miR-497-5p/MG53 pathway', *Biochemical and biophysical research communications*, 618, pp. 133–140. doi: 10.1016/J.BBRC.2022.05.094.

Li, M. *et al.* (2020) 'Circular RNA circBbs9 promotes PM 2.5-induced lung inflammation in mice via NLRP3 inflammasome activation', *Environment international*, 143. doi: 10.1016/J.ENVINT.2020.105976.

Liu, X. *et al.* (2021) 'MiR-20a-5p overexpression prevented diabetic cardiomyopathy via inhibition of cardiomyocyte apoptosis, hypertrophy, fibrosis and JNK/NF- κ B signalling pathway', *Journal of biochemistry*, 170(3), pp. 349–362. doi: 10.1093/JB/MVAB047.

López-Cervantes, S. P. *et al.* (2022) 'Moderate exercise combined with metformin-treatment improves mitochondrial bioenergetics of the quadriceps muscle of old female Wistar rats', *Archives of gerontology and geriatrics*, 102. doi: 10.1016/J.ARCHGER.2022.104717.

López-Otín, C. *et al.* (2013) 'The hallmarks of aging', *Cell*, 153(6), p. 1194. doi:

10.1016/J.CELL.2013.05.039.

Makarova, J. A. *et al.* (2014) 'Exercise immunology meets MiRNAs.', *Exercise immunology review*, 20, pp. 135–64. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24974725/> (Accessed: 22 March 2021).

Marsh, D. R. *et al.* (1997) 'Myogenic regulatory factors during regeneration of skeletal muscle in young, adult, and old rats', *J Appl Physiol* (1985), 83(4), pp. 1270–1275. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9338436>.

Mavros, Y. *et al.* (2014) 'Reductions in C-reactive protein in older adults with type 2 diabetes are related to improvements in body composition following a randomized controlled trial of resistance training', *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 5(2), pp. 111–120. doi: 10.1007/S13539-014-0134-1.

McCarthy, J. J. (2008) 'MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR', *Biochim Biophys Acta*, 1779(11), pp. 682–691. doi: 10.1016/j.bbagr.2008.03.001.

McLeod, M. *et al.* (2016) 'Live strong and prosper: the importance of skeletal muscle strength for healthy ageing', *Biogerontology*. Springer Netherlands, pp. 497–510. doi: 10.1007/s10522-015-9631-7.

De Mello, R. G. B. *et al.* (2019) 'Effects of Physical Exercise Programs on Sarcopenia Management, Dynapenia, and Physical Performance in the Elderly: A Systematic Review of Randomized Clinical Trials', *Journal of Aging Research*. Hindawi Limited. doi: 10.1155/2019/1959486.

Mena-Montes, B. *et al.* (2021) 'Low-Intensity Exercise Routine for a Long Period of

Time Prevents Osteosarcopenic Obesity in Sedentary Old Female Rats, by Decreasing Inflammation and Oxidative Stress and Increasing GDF-11', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Edited by L. Mosca, 2021, pp. 1–17. doi: 10.1155/2021/5526665.

Morsiani, C. *et al.* (2022) 'Blood circulating miR-28-5p and let-7d-5p associate with premature ageing in Down syndrome', *Mechanisms of ageing and development*, 206, p. 111691. doi: 10.1016/J.MAD.2022.111691.

Nilsson, M. I. *et al.* (2013) 'Abnormal protein turnover and anabolic resistance to exercise in sarcopenic obesity', *FASEB Journal*, 27(10), pp. 3905–3916. doi: 10.1096/fj.12-224006.

Paul, P. *et al.* (2018) 'Interplay between miRNAs and human diseases', *Journal of cellular physiology*, 233(3), pp. 2007–2018. doi: 10.1002/JCP.25854.

Pedersen, B. K. and Febbraio, M. (2006) 'Exercise and interleukin-6 action', *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 1(3), pp. 319–321. doi: 10.1586/17446651.1.3.319.

Perez-Zepeda, M. U. *et al.* (2016) 'Sarcopenia prevalence using simple measurements and population-based cutoff values', *J Lat Am Geriatr Med*, 2(1), pp. 8–13. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29057380>.

Pillard, F. *et al.* (2011) 'Physical activity and sarcopenia', *Clin Geriatr Med*, 27(3), pp. 449–470. doi: 10.1016/j.cger.2011.03.009.

Ponti, F. *et al.* (2020) 'Aging and Imaging Assessment of Body Composition: From Fat to Facts', *Frontiers in endocrinology*, 10. doi: 10.3389/FENDO.2019.00861.

Rajawat, Y. S., Hilioti, Z. and Bossis, I. (2009) 'Aging: Central role for autophagy and the lysosomal degradative system', *Ageing Research Reviews*, 8(3), pp. 199–213. doi: 10.1016/J.ARR.2009.05.001.

Rolland, Y. *et al.* (2009) 'Difficulties with physical function associated with obesity, sarcopenia, and sarcopenic-obesity in community-dwelling elderly women: the EPIDOS (EPIDemiologie de l'OSteoporose) Study', *Am J Clin Nutr*, 89(6), pp. 1895–1900. doi: 10.3945/ajcn.2008.26950.

La Rosa, F. *et al.* (2021) 'Pharmacological and Epigenetic Regulators of NLRP3 Inflammasome Activation in Alzheimer's Disease', *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 14(11). doi: 10.3390/PH14111187.

Rosas-Carrasco, O. *et al.* (2012) 'Overweight and obesity as markers for the evaluation of disease risk in older adults', *J Nutr Health Aging*, 16(1), pp. 14–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22237996>.

Rosas-Carrasco, O., Ruiz-Valenzuela, R. E. and López-Teros, M. T. (2021) 'Phase Angle Cut-Off Points and Their Association With Sarcopenia and Frailty in Adults of 50-64 Years Old and Older Adults in Mexico City', *Frontiers in medicine*, 8. doi: 10.3389/FMED.2021.617126.

Rosen, C. J. and Bouxsein, M. L. (2006) 'Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone?', *Nature clinical practice. Rheumatology*, 2(1), pp. 35–43. doi: 10.1038/NCPRHEUM0070.

Rosenberg, I. H. (1997) 'Sarcopenia: Origins and clinical relevance', in *Journal of*

Nutrition. American Society for Nutrition. doi: 10.1093/jn/127.5.990s.

Rostami, M. N. *et al.* (2012) 'Altered serum pro-inflammatory cytokines in children with Down's syndrome', *European cytokine network*, 23(2), pp. 64–67. doi: 10.1684/ECN.2012.0307.

Roubenoff, R. (2004) 'Sarcopenic obesity: the confluence of two epidemics', *Obesity research*, 12(6), pp. 887–888. doi: 10.1038/OBY.2004.107.

Saliminejad, K. *et al.* (2019) 'An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods', *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), pp. 5451–5465. doi: 10.1002/JCP.27486.

Sannicandro, A. J., Soriano-Arroquia, A. and Goljanek-Whysall, K. (2019) 'Micro(RNA)-managing muscle wasting', *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 127(2), pp. 619–632. doi: 10.1152/JAPPLPHYSIOL.00961.2018.

Sarma, S., Sockalingam, S. and Dash, S. (2021) 'Obesity as a multisystem disease: Trends in obesity rates and obesity-related complications', *Diabetes, obesity & metabolism*, 23 Suppl 1(S1), pp. 3–16. doi: 10.1111/DOM.14290.

Sayed, D. and Abdellatif, M. (2011) 'MicroRNAs in development and disease', *Physiol Rev*, 91(3), pp. 827–887. doi: 10.1152/physrev.00006.2010.

Schaap, L. A. *et al.* (2009) 'Higher inflammatory marker levels in older persons: associations with 5-year change in muscle mass and muscle strength', *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 64(11), pp. 1183–1189. doi: 10.1093/GERONA/GLP097.

Sempere, L. F. *et al.* (2004) 'Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation', *Genome Biol*, 5(3), p. R13. doi: 10.1186/gb-2004-5-3-r13.

Shefer, G. *et al.* (2006) 'Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle', *Dev Biol*, 294(1), pp. 50–66. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.02.022.

Shefer, G. *et al.* (2010) 'Reduced satellite cell numbers and myogenic capacity in aging can be alleviated by endurance exercise', *PLoS One*, 5(10), p. e13307. doi: 10.1371/journal.pone.0013307.

Silva, F. C. da *et al.* (2020) 'Effects of Physical Exercise on the Expression of MicroRNAs: A Systematic Review', *Journal of strength and conditioning research*, 34(1), pp. 270–280. doi: 10.1519/JSC.0000000000003103.

Soriano-Arroquia, A. *et al.* (2016) 'The functional consequences of age-related changes in microRNA expression in skeletal muscle', *Biogerontology*, 17(3), pp. 641–654. doi: 10.1007/s10522-016-9638-8.

Sticht, C. *et al.* (2018) 'miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites', *PloS one*, 13(10). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0206239.

Strycharz, J. *et al.* (2021) 'Visceral Adipose Tissue of Prediabetic and Diabetic Females Shares a Set of Similarly Upregulated microRNAs Functionally Annotated to Inflammation, Oxidative Stress and Insulin Signaling', *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(1), pp. 1–25. doi: 10.3390/ANTIOX10010101.

Tardif, N. *et al.* (2014) 'Muscle ectopic fat deposition contributes to anabolic resistance in obese sarcopenic old rats through eIF2alpha activation', *Aging Cell*, 13(6), pp. 1001–1011. doi: 10.1111/accel.12263.

Tuttle, C. S. L., Thang, L. A. N. and Maier, A. B. (2020) 'Markers of inflammation and their association with muscle strength and mass: A systematic review and meta-analysis', *Ageing Res Rev*, 64, p. 101185. doi: 10.1016/j.arr.2020.101185.

Verdijk, L. B. *et al.* (2007) 'Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292(1), pp. E151-7. doi: 10.1152/ajpendo.00278.2006.

Vivaldo, J. P. (2020) 'La vejez en el porfiriato (1876-1910). Representaciones en prensa y literatura mexicana (.epub)', *UNAM*. Available at: https://www.academia.edu/50365887/La_vejez_en_el_porfiriato_1876_1910_Representaciones_en_prensa_y_literatura_mexicana_epub_ (Accessed: 26 October 2022).

Vivaldo, J. P. (2022) 'Las representaciones de la vejez en el cine mexicano a partir de 1940', *Asociación Interdisciplinaria para el Estudio de la Historia de México, A.C.* Available at: https://www.academia.edu/71843370/Las_representaciones_de_la_vejez_en_el_cine_mexicano_a_partir_de_1940 (Accessed: 26 October 2022).

Vlietstra, L., Hendrickx, W. and Waters, D. L. (2018) 'Exercise interventions in healthy older adults with sarcopenia: A systematic review and meta-analysis', *Australasian Journal on Ageing*. Blackwell Publishing, pp. 169–183. doi: 10.1111/ajag.12521.

Wang, H. *et al.* (2022) 'MicroRNA-122-5p regulates coagulation and inflammation through MASP1 and HO-1 genes', *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 100. doi: 10.1016/J.MEEGID.2022.105268.

Wang, H. W. *et al.* (2016) 'MicroRNA-134 Contributes to Glucose-Induced Endothelial Cell Dysfunction and This Effect Can Be Reversed by Far-Infrared Irradiation', *PLoS one*, 11(1). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0147067.

Wang, Q. *et al.* (2021) 'MiR-20a-5p Regulates MPP +-Induced Oxidative Stress and Neuroinflammation in HT22 Cells by Targeting IRF9/NF- κ B Axis', *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2021. doi: 10.1155/2021/6621206.

Xiong, Y. *et al.* (2022) 'Tongxinluo-pretreated mesenchymal stem cells facilitate cardiac repair via exosomal transfer of miR-146a-5p targeting IRAK1/NF- κ B p65 pathway', *Stem cell research & therapy*, 13(1), p. 289. doi: 10.1186/S13287-022-02969-Y.

Yang, S. *et al.* (2018) 'MicroRNA-23a-5p promotes atherosclerotic plaque progression and vulnerability by repressing ATP-binding cassette transporter A1/G1 in macrophages', *Journal of molecular and cellular cardiology*, 123, pp. 139–149. doi: 10.1016/J.YJMCC.2018.09.004.

Zamboni, M. *et al.* (2008) 'Sarcopenic obesity: a new category of obesity in the elderly', *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 18(5), pp. 388–395. doi: 10.1016/j.numecd.2007.10.002.

Zhang, Y. *et al.* (2021) 'Downregulation of miR-296-3p by highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus activates the IRF1/TNF- α signaling axis in

porcine alveolar macrophages', *Archives of virology*, 166(2), pp. 511–519. doi: 10.1007/S00705-020-04921-Y.

Zhou, Z. *et al.* (2022) 'Exosome-shuttled miR-672-5p from anti-inflammatory microglia repair traumatic spinal cord injury by inhibiting AIM2/ASC/Caspase-1 signaling pathway mediated neuronal pyroptosis', *Journal of neurotrauma*. doi: 10.1089/NEU.2021.0464.

13. Anexos

Artículo publicado derivado de esta tesis:

- **Pedraza-Vázquez G**, Mena-Montes B, Hernández-Álvarez D, Gómez-Verjan JC, Toledo-Pérez R, López-Teros MT, Königsberg M, Gómez-Quiroz LE, Luna-López A. A low-intensity lifelong exercise routine changes miRNA expression in aging and prevents osteosarcopenic obesity by modulating inflammation. *Arch Gerontol Geriatr.* 2023 Feb;105:104856. doi: 10.1016/j.archger.2022.104856. Epub 2022 Nov 13. PMID: 36399890.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00144

Matrícula: 2143800973

Efecto del ejercicio de baja intensidad en un modelo de obesidad osteosarcopénica y la regulación de la expresión de miRNAs durante el envejecimiento.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 19 del mes de diciembre del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN
- DRA. MIRIAM TERESA LOPEZ TEROS
- DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO
- DR. OSCAR ROSAS CARRASCO



GIBRAN PEDRAZA VAZQUEZ
ALUMNO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: GIBRAN PEDRAZA VAZQUEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

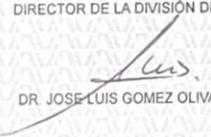
REVISÓ



MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS



DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA



DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

VOCAL



DRA. MIRIAM TERESA LOPEZ TEROS

VOCAL



DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO

SECRETARIO



DR. OSCAR ROSAS CARRASCO

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE DISERTACIÓN PÚBLICA de DOCTOR EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL del alumno GIBRAN PEDRAZA VAZQUEZ, matrícula 2143800973, quien cumplió con los 315 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio, 45 créditos de PUBLICACION y 45 créditos de EXAMEN PREDOCTORAL. Con fecha diecinueve de diciembre del 2022 presentó la DEFENSA de su DISERTACIÓN PÚBLICA cuya denominación es:

Efecto del ejercicio de baja intensidad en un modelo de obesidad osteosarcopénica y la regulación de la expresión de miRNAs durante el envejecimiento.

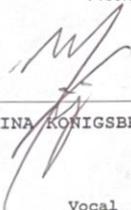
Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 45 créditos y el programa consta de 450 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobado

JURADO

Presidenta



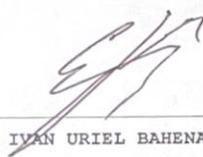
DR. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

Secretario



DR. OSCAR ROSAS CARRASCO

Vocal



DR. IVÁN URIEL BAHENA OCAMPO

Vocal



DR. MIRIAM TERESA LOPEZ TEROS