



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON METFORMINA Y EJERCICIO MODERADO,
SOBRE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestra en Biología Experimental
Presenta

Biol. Exp. Stefanie Paola López Cervantes.

Comité tutorial:

Directora: Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Asesor: Dr. Oscar Flores Herrera

Asesora: Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizabal

NOVIEMBRE 2019

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular del Departamento de Ciencias de la Salud en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa; en el Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, en la Universidad Nacional Autónoma de México y en el Departamento de Bioquímica en la Facultad de Medicina, en la Universidad Nacional Autónoma de México.

El programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) de CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

Número de registro de la beca otorgada CONACYT 637705

MIEMBROS DEL JURADO

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: “Efecto del tratamiento con Metformina y Ejercicio Moderado, sobre la función mitocondrial del músculo esquelético”, que presentó Stefanie Paola López Cervantes el día 29 de noviembre del año 2019.

Presidente: Dra. Norma Edith López Diazguerrero
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Secretario: Dr. Óscar Flores Herrera
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México.

Vocal: Dr. Armando Luna López
Departamento de Investigación Básica
Instituto Nacional de Geriátría

Vocal: Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizabal
Departamento de Biomedicina Cardiovascular
Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez.

Comité Tutorial:

Directora de Tesis: Dra. Mina Königsberg Fainstein
Departamento. Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad
Iztapalapa
mkf@xanum.uam.mx

Asesor: Dr. Oscar Flores Herrera
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma
de México.
oflores@bq.uam.mx

Asesora: Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizabal
Departamento de Biomedicina Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología,
Ignacio Chávez.
czazuetam@hotmail.com

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia, que siempre me ha acompañado, guiado y apoyado en cada una de mis decisiones. Especialmente a mi mamá y a Luis, que sin ellos no sería posible estar aquí, gracias por escucharme, por darme ánimos, por su apoyo incondicional, gracias Ma por tus valiosos consejos, por tu paciencia y todo el amor que me das. Toñote gracias por soportar mis desvelos y a veces mi mal genio ¡te amo peque! eres la personita que me motiva cada día a seguir adelante.

A la memoria de José Luis, mi padre que me enseñó lo que es correcto y no, que me exigía a ser mejor cada día, gracias, ojalá estuvieras aquí.

A la Dra. Mina Konigsberg Fainstein por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por la confianza, por los consejos que me ha brindado y el apoyo en los momentos difíciles.

Al Dr. Oscar Flores Herrera gracias por recibirme en su laboratorio y brindarme la oportunidad de trabajar en el, por sus valiosas aportaciones en el desarrollo de este proyecto, por la confianza que me ha brindado, por su amabilidad y apoyo incondicional.

A la Mta. Mercedes Esparza por su paciencia y disponibilidad en este proyecto, por sus consejos, por darme ánimos en los momentos de mayor frustración, pero, sobre todo, gracias por la amistad que me ha sabido ofrecer, gracias por todo Meche.

Al Dr. Antonio Peña del Instituto de Fisiología Celular en la UNAM por permitirme trabajar en su laboratorio.

A la Mta. Norma Sánchez por su apoyo en la realización de este proyecto, por su paciencia al enseñarme a usar el oxímetro, por ayudarme aislar mitocondrias de músculo en un laboratorio de levaduras, muchísimas gracias.

A Martha Calahorra por apoyarme en realizar este proyecto y por sus sabios consejos.

A mis compañeros de laboratorio, que más que mis compañeros son mis amigos, gracias por sus consejos, por apoyarme en cada momento, por tener siempre esa buena actitud para ayudar en los mejores momentos, pero sobre todo en los malos, en especial a Ula, Gib y Rafita, por su apoyo incondicional, los quiero.

A mis amigos de la maestría Fer, Fabi, Samito y Armando, gracias por sus consejos, por apoyarme en mis momentos de frustración, por escucharme, por las risas, por estar siempre conmigo.

Al 5bis, sin ustedes no sería posible, gracias por sus consejos, por apoyarme en cada momento a veces bueno a veces frustrante, por esperarme tan noche, por ofrecerme un poco de café con donitas o comerse mis dulces, los quiero muchísimo, en ustedes encontré una nueva familia.

Isme gracias por escucharme cuando lo necesite, por tus consejos, por siempre tener una buena actitud, por los ánimos y abrazos que siempre me diste, te quiero mucho peque.

Iris ¡amiba! La distancia nunca ha sido una limitante en nuestra relación, te quiero muchísimo, gracias por todo el apoyo y sobre todo por los regaños que me he ganado, te extraño.

Vianey gracias por caminar conmigo, por el cariño y consejos, por escucharme a las 3 de la mañana, te quiero mucho flaca.

Omar gracias por ese atolito por las mañanas y los dulces, por aguantar mi dolor de cabeza y hasta mi mal genio, por aconsejarme y calmarme cuando pierdo la cabeza.

Antonio gracias por escucharme cuando más lo necesite, por tus sabios consejos, por tus abrazos, tu apoyo, por llevarme papitas y donas en los días más felices, cansados y hasta frustrantes. También fuiste parte de esto, gracias.

RESUMEN

El envejecimiento es un proceso natural e inevitable que se caracteriza por el deterioro progresivo físico y mental, presentando una acumulación de componentes disfuncionales, que finaliza con la muerte.

Uno de los trastornos más importante durante el envejecimiento, es el deterioro en la movilidad y la capacidad física. Lo anterior debido a una pérdida progresiva de la masa y la fuerza del músculo esquelético, en un proceso conocido como sarcopenia. La etiología de la sarcopenia se ha relacionado con diversos factores como el estrés oxidante, la pérdida de la homeostasis de proteínas y la disfunción mitocondrial.

Las mitocondrias desempeñan un papel fundamental debido a su importancia en la producción de energía, de especies reactivas de oxígeno y en la señalización para inducir la apoptosis. Se sabe que las funciones mitocondriales se deterioran con el envejecimiento, incluida la síntesis de proteínas mitocondriales, la respiración y la producción de ATP. Se ha sugerido que el ejercicio podría generar efectos benéficos en el ciclo de vida mitocondrial, ya que produce en las principales vías de señalización relacionadas con el control de calidad y cantidad de mitocondrias durante el envejecimiento. Por otro lado, se ha descrito que la metformina (MTF), una biguadina empleada en el tratamiento de diabetes tipo 2, mejora el rendimiento físico, la sensibilidad a la insulina, además de que disminuye el colesterol y las lipoproteínas de baja densidad. A nivel molecular, la MTF aumenta la actividad de la AMPK y la respuesta antioxidante. La interrogante de este trabajo se basa en esclarecer si el tratamiento conjunto de MTF + ejercicio moderado a lo largo de la vida, podrá ejercer un efecto protector contra la disfunción mitocondrial en músculo esquelético de ratas viejas. Para ello, se cuantifico el consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de músculo esquelético tipo cuádriceps. Además, se determinó la presencia de supercomplejos respiratorios y la actividad enzimática de los OXPHOS, así como la síntesis e hidrólisis de ATP.

En nuestras condiciones experimentales observamos que los animales viejos con un tratamiento con MTF + ejercicio tuvieron una mejor respuesta durante el consumo de

oxígeno, un mejor cociente P/O y actividad enzimática comparado con los animales que solo fueron tratados con metformina o sedentarios.

ABSTRACT

Aging is a natural and inevitable process characterized by progressive physical and mental decline, presenting an accumulation of dysfunctional components, and ending with death. In particular, one of the health complications during aging is the failure in mobility and physical capacity, due to a progressive loss of skeletal muscle mass and strength, in a process known as sarcopenia. The etiology of sarcopenia has been related to various factors such as oxidative stress, loss of protein homeostasis and mitochondrial dysfunction. Mitochondria have a significant role due to their importance in energy production, in the reactive oxygen species generation and in apoptosis pathway signaling. It is known that mitochondrial functions deteriorate with aging, including mitochondrial protein synthesis, respiration and ATP production.

It has been suggested that exercise could generate beneficial effects in the mitochondrial life cycle, since it has effects on the main signaling pathways related to quality control and quantity of mitochondria during aging. On the other hand, metformin (MTF), a biguanide which is used as a treatment for type 2 diabetes is known to improve physical performance, insulin sensitivity, and decrease cholesterol and low-density lipoproteins levels. At the molecular level, metformin increases AMPK activity and antioxidant response. So, this study aims is to clarify whether the combined treatment with MTF + moderate exercise during the rats lifespan could prevent mitochondrial dysfunction in old rats. The oxygen consumption of mitochondria isolated from quadriceps skeletal muscle was measured, as well as the occurrence of respiratory supercomplexes and the OXPHOS enzymatic activity, ATP synthesis and hydrolysis. Under our experimental conditions the mitochondria from old animals treated with MTF + exercise had a better response during oxygen consumption, P/O ratio and enzymatic activity compared to animals that were treated only with metformin.

INDICE

RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	10
INDICE.....	11
ABREVIATURAS.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	16
1.1 MITOCONDRIA.....	17
1.2 SUPERCOMPLEJOS.....	18
1.3 BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL.....	21
1.4 FUSIÓN Y FISIÓN.....	23
1.4.1 FUSIÓN MITOCONDRIAL.....	23
1.4.2 FISIÓN MITOCONDRIAL.....	24
1.5 MITOFAGIA.....	24
1.6 ENVEJECIMIENTO Y DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL.....	25
1.7 EJERCICIO.....	27
1.8 METFORMINA.....	27
2. ANTECEDENTES.....	28
3. JUSTIFICACIÓN.....	31
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	33
5. HIPÓTESIS.....	33
6. OBJETIVO GENERAL.....	33
7. OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
8. MATERIAL Y MÉTODO.....	34
8.1 ANIMALES.....	34
8.2 GRUPOS EXPERIMENTALES.....	34
8.3 RUTINA DE EJERCICIO.....	36
8.4 TRATAMIENTO CON METFORMINA.....	37
8.5 AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS.....	37
8.6 RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL.....	38
8.7 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA MITOCONDRIAL.....	39

8.8	SUPERCOMPLEJOS	40
8.9	ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NATIVAS.....	41
8.10	ACTIVIDAD EN GEL DE LOS COMPLEJOS Y SUPERCOMPLEJOS RESPIRATORIOS.....	41
8.11	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	42
8.12	DISEÑO EXPERIMENTAL	43
9.	RESULTADOS.....	44
9.1	CONSUMO DE OXÍGENO.....	44
9.2	CONTROL RESPIRATORIO Y COCIENTE P/ O	54
9.3	ACTIVIDAD NADH-UBIQUINONA OXIDORREDUCTASA.....	54
9.4	ACTIVIDAD DE SUCCINATO- UBIQUINONA OXIDORREDUCTASA.....	56
9.5	ACTIVIDAD DE CITOCROMO C OXIDASA.....	57
9.6	SÍNTESIS E HIDRÓLISIS DE ATP	59
10.	DISCUSIÓN.....	61
11.	CONCLUSIÓN	65
12.	PERSPECTIVAS	66
14.	REFERENCIAS	67

ABREVIATURAS

μM	micromolar
ADP	Adenosín 5´ - difosfato
AM	Adultos mayores
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
ATP	Adenosín 5´ trifostato
BN- PAGE	Electroforesis nativa en geles azules
BSA	Albúmina de suero bovino
CCCP	Carbonil cianuro <i>m</i> - clorofenil hidrazona
CN	Cianuro
CONAPO	Consejo Nacional de Población
CTE	Cadena trasportadora de electrones
DAB	3, 3'-diaminobenzidina
DBQ	2,6-Dimetoxi- 1,4- benzoquinona
DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOC	Acido 3 α , 12 α -Dihidroxi- 5 β -colan- 24 oico.
Drp1	Proteína relacionada con la Dinamina 1
DTT	Diclorodifeniltricloroetano
EDTA	Ácido 2-([{2-bis(carboximetil)amino]etil}(carboximetil) amino) acético.

ENT	Enfermedades no transmisibles
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FAD	Flavín adenín dinucleótido oxidado
FADH2	Flavín adenín dinucleótido reducido
Fis 1	Proteína 1 de fisión mitocondrial.
FMN	Flavín mononucleótido
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	Ácido 4-(2- hidroxietil)- 1- piperazina- etanosulfónico.
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
KCl	Cloruro de Potasio
kDa	Kilodaltones.
LDH	Lactato deshidrogenasa
Mfn 1	Proteína mitofusina 1
Mfn 2	Proteína mitofusina 2
mg	Miligramos
MgSO₄	Sulfato de Magnesio
mM	milimolar
mtDNA	DNA mitocondrial
MTF	Metformina
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio de bromuro
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
OPA 1	Proteína de atrofia óptica 1

OXPHOS	Complejos de la Fosforilación oxidativa
Pb (NO3)	Nitrato de plomo
PDVF	Fluoruro de polivinilideno
PGC1α	Coactivador gamma del receptor activado por proliferador de peroxisomas 1- α
PK	Piruvato cinasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetisulfonilo
TMPD	N,N,N',N'-Tetrametil-p-fenilenediamina
V₁	Monómero de la F1F0 -ATP sintasa
V₂	Dímero de la F1F0 -ATP sintasa

1. INTRODUCCIÓN

La reducción de la natalidad y el aumento de la esperanza de vida en nuestro país han modificado la pirámide poblacional incrementando el número de adultos mayores (AM) y disminuyendo el de jóvenes y niños. Según la proyección del Consejo Nacional de Población (CONAPO), y del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), para el año 2050 existirán 32.4 millones de (AM) en México (21.5% de la población total) (INEGI, 2017). Esto generará una problemática en el país, ya que el aumento en este segmento de la población traerá consigo el aumento en enfermedades relacionadas con el envejecimiento.

El envejecimiento es un proceso natural e inevitable que se caracteriza por el deterioro físico y mental progresivo, es decir, es una acumulación gradual de componentes disfuncionales que finaliza con la muerte (López-Otín et al., 2013). En particular, uno de los trastornos más importantes durante el envejecimiento es el deterioro en la movilidad y la capacidad física, debido a una pérdida progresiva de la masa y la fuerza del músculo esquelético, en un proceso conocido como sarcopenia (Jaimovich et al., 2018).

El músculo esquelético está formado por fibras mixtas: tipo I oxidativo lento, tipo IIA oxidativo-glucolítico rápido, tipo IIB de tipo glucolítico rápido y fibras híbridas. Durante el envejecimiento hay una disminución del 30-40% de las fibras musculares, siendo las fibras de tipo IIA y B, las más afectadas (Verdijk et al., 2007). Desafortunadamente, las alteraciones del músculo esquelético favorecen la aparición de otras enfermedades o síndromes como la disminución de la tasa metabólica, el aumento de la resistencia a la insulina y la disminución en el

contenido mineral óseo (O'Neill et al., 2015) provocando discapacidad física, fragilidad, pérdida de la independencia funcional y mortalidad. La disminución de la actividad física y las limitaciones funcionales durante el envejecimiento favorece un estilo de vida sedentario reduciendo de esta manera el rendimiento y la fuerza muscular además de que la inactividad física está relacionada con la pérdida de masa muscular.

La etiología de la sarcopenia se ha relacionado con diversos factores tales como el estrés oxidante, la pérdida de la homeostasis de proteínas, la apoptosis, la inflamación, y la disfunción mitocondrial (Campo et al., 2017). Las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en el deterioro muscular relacionado con el envejecimiento debido a su importancia en la producción de energía, en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), la regulación de varias vías catabólicas y en la señalización para inducir apoptosis confiere a este organelo una posición central en el mantenimiento de la viabilidad de las células musculares. (Kim et al., 2017; O'Neill et al., 2015).

1.1 MITOCONDRIA

Las mitocondrias son el principal sitio de producción de ATP en las células eucariotas. La mitocondria consiste en una matriz soluble limitada por una doble membrana, una membrana interna impermeable a los iones y una membrana externa permeable a las moléculas de hasta 5 kDa. Los donadores de electrones, NADH y FADH₂, productos de la oxidación de acetil- CoA son utilizados por la CTE

de la membrana interna mitocondrial para establecer un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana. La fuerza protón motriz resultante, que comprende tanto un potencial de voltaje como un gradiente de pH, es utilizada por la ATP sintasa para la producción de ATP (Kim et al., 2017; Carter et al., 2015).

De acuerdo con la hipótesis endosimbiótica, las mitocondrias se originaron por la incorporación de las eubacterias aerobias por una eucariota anaerobia. Como resultado, la mitocondria tiene su propio sistema genético con varias características similares a las bacterias, incluido un genoma de DNA circular compacto llamado mtDNA, una maquinaria de transcripción simple que produce transcripciones de RNA multigénicos y una maquinaria de traducción con sensibilidad antibiótica similares a las células procariontas. Sólo 13 genes mitocondriales codifican proteínas, todas las cuales son subunidades esenciales de la cadena respiratoria; los genes restantes son 22 tRNAs y 2 rRNAs necesarios para la traducción de proteínas dentro de la matriz mitocondrial. Por lo tanto, los genes nucleares controlan la transcripción mitocondrial, la traducción y la replicación del mtDNA (Ramos et al., 2016).

1.2 SUPERCOMPLEJOS

Las mitocondrias presentan los cinco complejos de la fosforilación oxidativa (OXPHOX, Complejo I-V) en su membrana interna. Los complejos I al IV son oxidorreductasas que, con excepción del complejo II, acoplan el transporte de electrones con la traslocación de protones a través de la membrana interna

mitocondrial. La fuerza protón motriz generada es utilizada por la ATP sintasa (complejo V) para la producción de ATP a partir de ADP y fosfato. El complejo I o NADH ubiquinona-oxidorreductasa es el primer y principal punto de entrada de electrones a la cadena respiratoria, transfiere los electrones provenientes del NADH a la ubiquinona. El complejo II o succinato ubiquinona-oxidorreductasa, transfiere los electrones del FADH₂ a la ubiquinona y conecta directamente el ciclo de Krebs con la cadena respiratoria. Cuando la ubiquinona se encuentra reducida a ubiquinol, los electrones pueden transferirse al complejo III o ubiquinol- citocromo c oxidoreductasa, que se encuentra en la membrana como un dímero funcional. El citocromo c media la transferencia de electrones del complejo III a la citocromo c-oxidasa (complejo IV). Finalmente, los electrones se transfieren al oxígeno molecular que se reduce en agua (Boekema et al., 2006; Acín et al., 2008).

La mitocondria es la principal fuente de energía en la mayoría de los tipos celulares, controla diferentes rutas metabólicas e interviene en diversas vías de señalización, que van desde la síntesis de pirimidinas hasta la regulación de la apoptosis. El modelo actual para la organización de la cadena de transporte de electrones (CTE) es el modelo de difusión aleatoria, el cual propone que los grandes complejos se mueven aleatoriamente dentro de la membrana interna mitocondrial y que los electrones fluyen entre ellos conectados por los portadores móviles (Ubiquinona o Coenzima Q y citocromo c). Este modelo, también conocido como modelo fluido, se enfrentó al modelo sólido en el cual los complejos respiratorios se organizan en macroestructuras dentro de la membrana interna mitocondrial para realizar un transporte más rápido y eficiente de electrones (Greggio et al., 2017).

Sin embargo, el modelo fluido había ganado aceptación principalmente basado en estudios cinéticos, ya que los complejos respiratorios pueden purificarse individualmente y conserva su actividad enzimática. No obstante, la evidencia favorece nuevamente al modelo sólido, que propone que los diferentes complejos respiratorios se ensamblan en estructuras supramoleculares (supercomplejos) presentando una estequiometría definida. La mayor parte de los complejo I se encuentran unidos a dímeros del complejo III y monómeros del complejo IV (CICIII₂CIV), una estructura que contiene todos los complejos necesarios para transferir electrones del NADH al O₂, y por lo que, se le denomina respirosoma. También existen otros supercomplejos como el CICIII₂ o el CIII₂CIV. La formación de supercomplejos es importante para la estabilidad de los complejos de la CTE y para reducir la producción de ERO. La formación de supercomplejos se descubrió al emplear geles nativos (BN- PAGE, electroforesis en gel azul nativo) que evidenciaron las combinaciones electroforéticas de diferentes complejos respiratorios (Cogliati et al., 2016; Gu et al., 2016).

Otro ejemplo de organización de niveles superiores de supercomplejos, es la F₁F₀ ATP sintasa también conocida como CV. Esta enzima es un complejo de 750 kDa formado por 15-18 subunidades. La F₁ se encuentra expuesta en la matriz mitocondrial, constituida por tres subunidades α y tres β , que están conectadas al sector F₀ que se encuentra embebido en la membrana interna a través de un tallo central y otro periférico. La F₀ está compuesta por la subunidades a, A6L, e, f, g. El tallo central contiene a las subunidades γ , δ , ϵ , mientras que el tallo periférico está constituido por las de subunidades OSCP (Su 5), b, d, F6 (h).

La ATPsintasa es un dímero de 1400 kDa que incluye subunidades específicas para la estabilización de dicho dímero como la e, g y k, que no se detectan en los monómeros. Se ha reportado que en todos los organismos los dos monómeros se asocian a través de la membrana gracias a la subunidad F₀ y forman un ángulo que puede variar entre los 35 y 90°. A pesar de que los dímeros de la ATPsintasa se describieron en 1990, se propone que existe un tipo de organización más alto como los oligómeros; lo anterior se demostró en mitocondrias de *Paramecium* mediante microscopía electrónica (Letts et al., 2016; Dudkina et al., 2015).

Se piensa que los supercomplejos de OXPHOS permiten mejorar el flujo de electrones entre los complejos al reducir la distancia de difusión de los portadores de electrones móviles como la ubiquinona y el citocromo c. Finalmente, se ha sugerido que la formación de supercomplejos es importante para prevenir una excesiva formación de radicales libres. En el caso particular de los dímeros y oligómeros de ATPsintasa, se ha reportado que producen una curvatura local de la membrana, lo cual fomenta la formación de las crestas. Esto sugiere fuertemente que la dimerización de las ATP sintasas es esencial para la morfología mitocondrial (Dudkina et al., 2010).

1.3 BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL

La biogénesis mitocondrial permite la expansión de la red mitocondrial existente. Este proceso se desarrolla constantemente dentro del músculo esquelético para

mantener el contenido y la función mitocondrial en respuesta a diversos estímulos (Trewin et al., 2018).

El coactivador-1 α del receptor- γ activado por el proliferador de peroxisoma (PGC-1 α) está implicado en la regulación transcripcional de numerosos productos nucleares y mitocondriales que participan en los eventos celulares que controlan la masa y la función muscular. Por ello, PGC-1 α es un regulador esencial en la biogénesis mitocondrial. Así, los procesos que coordina incluyen la transcripción de genes nucleares, la importación de las proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo (NEMP, por sus siglas en inglés), la transcripción y la replicación del mtDNA. También interactúa con varios factores de transcripción, incluyendo PPAR, Nrf1/2 y ERR, MEF2, FoxO, así como la expresión de Tfam (que estimula directamente la replicación del mtDNA y la transcripción). Se ha visto que la isoforma PGC-1 α estimula la hipertrofia muscular debido a su capacidad para activar la vía IGF-1/mTOR. Por lo que se ha sugerido que durante el envejecimiento se podría ver afectada la función y expresión de PGC-1 α (Ji et al., 2015; Kim et al., 2015).

Otro factor importante que regula la biogénesis mitocondrial es la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) (Senesi et al., 2015), ya que promueve dicho proceso a través de PGC-1 α y Nrf1/2. Así mismo, el ejercicio también puede estimular AMPK, lo que lleva a la activación de PGC-1 α por fosforilación directa en residuos de treonina y serina (Wenz et al., 2009). Este evento de fosforilación puede ayudar a promover la biogénesis mitocondrial (Kim et al., 2008).

1.4 FUSIÓN Y FISIÓN

Además de la biogénesis mitocondrial, la remodelación dinámica de la mitocondria ayuda a promover la calidad mitocondrial. La red mitocondrial experimenta una fusión constante (la unión de mitocondrias separadas que conducen a la formación de redes continuas) y fisión (la división de las mitocondrias en unidades individuales) para mantener el contenido mitocondrial y la homeostasis estructural y funcional (Drake et al., 2015).

1.4.1 FUSIÓN MITOCONDRIAL

La fusión mitocondrial es un proceso que involucra la unión de la membrana mitocondrial interna (MMI) y la membrana mitocondrial externa (MME) de dos mitocondrias distintas o regiones diferentes del retículo mitocondrial, lo que resulta en la mezcla de membranas y contenido dentro del espacio intermembrana y matriz mitocondrial. La fusión mitocondrial depende de proteínas transmembranales con actividad de GTPasas llamadas mitofusinas (MFN) 1 y 2 y de la proteína de atrofia óptica 1 (OPA 1). Las MFN se encargan de la fusión de la MME mientras que OPA1 está asociada y es esencial para la fusión de la MMI. La eliminación del gen *Opa1* previene la fusión MMI, mientras que la eliminación de los genes *mfn* 1/2 da como resultado la pérdida de la fusión MME e MMI, afectando la función mitocondrial. En general, se acepta que la fusión mezcla componentes mitocondriales, que pueden ser críticos para el control de calidad mitocondrial (Roy et al., 2015).

1.4.2 FISIÓN MITOCONDRIAL

La fisión mitocondrial promueve la fragmentación de las mitocondrias y se desencadena en gran medida por una pérdida del potencial de membrana, ya que en este proceso se separan las mitocondrias dañadas de las sanas. Por lo tanto, la fisión también es crítica para mantener la calidad mitocondrial general. Está bien aceptado que la proteína relacionada con la dinamina GTPasa (DRP) 1 es crucial para la fisión de la MME. La despolarización de las mitocondrias recluta la GTPasa DRP1 del citosol para ensamblarse en las mitocondrias dañadas. Se ha sugerido que la fisión mitocondrial mediada por DRP1 depende de la proteína de fisión mitocondrial 1 (FIS 1) y la proteína de la división mitocondrial 1 (MDV 1). FIS1 está anclada a la MME, donde forma un haz de 6 hélices con motivos de repetición de tetratricopéptido en tándem que sirven como interfaz entre MDV1 y DRP1. Varias proteínas DRP1 se van ensamblando sobre FIS1 y forman una espiral alrededor de la MME que, después de la hidrólisis de GTP, provocan la escisión de la porción dañada de las mitocondrias. Una vez fisionadas, las mitocondrias disfuncionales se degradan por mitofagia y sus componentes se reciclan (Kim et al., 2017).

1.5 MITOFAGIA

Dado que las mitocondrias desempeñan un papel importante, tanto en el metabolismo normal, como en la supervivencia en respuesta al estrés celular, es necesario mantener un cierto control de calidad, tanto para la correcta producción de ATP, como para evitar un incremento en la generación de ERO. La mitofagia

(autofagia de la mitocondria) es el proceso de eliminación de mitocondrias disfuncionales, y se produce principalmente por el daño al mtDNA o a la CTE que se ven reflejados en una disminución del potencial transmembranal. Sin embargo, la mitofagia no solo elimina a las mitocondrias disfuncionales, sino que también participa en la respuesta adaptativa a la privación de nutrientes, hipoxia o proliferación (Wallace et al., 2005; Schlagowski et al., 2016).

La mitofagia está regulada por dos proteínas principales: la cinasa PINK1 (PTEN inductor de la cinasa putativa 1), que puede detectar el estado de polarización mitocondrial y Parkin (Parkin RBR E3 ubiquitina proteína ligasa) que es una E3-ubiquitin ligasa. En condiciones normales, es decir, cuando la mitocondria está polarizada, PINK1 se importa a la membrana interna mitocondrial donde es escindida por una proteasa (PARL). Sin embargo, cuando la membrana mitocondrial no está polarizada, PINK1 no se transloca, acumulándose en la membrana externa, reclutando y fosforilando a Parkin, que al activarse ubiquitina masivamente las proteínas de la MME, permitiendo que p62 reclute a LC3 (la cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada al microtúbulo) para la formación del autofagosoma y posteriormente la unión con el lisosoma para su degradación (Moreira et al., 2017; Joseph et al., 2016).

1.6 ENVEJECIMIENTO Y DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL

Se sabe que las funciones mitocondriales se deterioran durante el envejecimiento, incluida la síntesis de proteínas mitocondriales, la respiración y la producción de

ATP. En cuanto a la dinámica mitocondrial, se ha reportado que muchas de las proteínas relacionadas con la fusión (Mfn1, Mfn2 y Opa1), se encuentran disminuidas (Carter et al., 2015).

Así mismo, durante el envejecimiento se alteran varias enzimas que regulan río arriba la expresión de PGC-1 α , unas de ellas son CREB fosforilado, la proteína cinasa p38, AMPK, CaMK y calcineurina A (Li et al., 2015). También se ha encontrado una disminución en el nivel de la proteína AMPK muscular, así como disminución de la fosforilación. Ya que AMPK es un regulador principal de PGC-1 α (Kjobsted et al., 2017), por lo que disminuye la biogénesis mitocondrial.

Otro mecanismo importante es la regulación redox. Durante el envejecimiento aumenta la generación de ERO en el músculo esquelético, lo que podría activar a NF-kB. Este sería un regulador negativo para PGC-1 α , aunque las ERO también podrían activar AMPK y p38, que a su vez activaría a PGC-1 α y así compensar la regulación negativa con la edad (Wenz et al., 2009).

A la fecha existen varias intervenciones para evitar la disfunción mitocondrial durante el envejecimiento, y en particular para evitar que ese daño mitocondrial se vea reflejado en la pérdida de la masa o la fuerza muscular. Entre los más importantes, y que se relacionan con nuestro proyecto, se encuentran el ejercicio y la metformina.

1.7 EJERCICIO

Se ha sugerido que el ejercicio podría generar efectos benéficos en el ciclo de vida mitocondrial (Venditti et al., 2007), ya que tiene efectos en las principales vías de señalización relacionadas con el control de calidad y cantidad de mitocondrias durante el envejecimiento. La contracción del músculo esquelético durante el ejercicio físico puede activar una respuesta mitocondrial aumentando la biogénesis, la expresión de proteínas relacionadas con la dinámica mitocondrial y activar el recambio mitocondrial vía mitofagia (Lawler et al., 2016). Se ha propuesto al ejercicio como una de las intervenciones más efectivas para prevenir el deterioro muscular durante el envejecimiento, por lo que se hablará de ello más adelante, en la parte de antecedentes.

1.8 METFORMINA

La metformina (MTF) es una biguadina que se utiliza como fármaco en el tratamiento de diabetes tipo 2 desde hace más de 60 años. Se ha descrito que la MTF puede imitar algunos de los beneficios de la restricción calórica, como mejorar el rendimiento físico, tener una mejor sensibilidad a la insulina, una disminución en el colesterol y de las lipoproteínas de baja densidad. A nivel molecular, la MTF aumenta la actividad de la AMPK y la respuesta antioxidante (López-Otín et al., 2016; Mennes et al., 2013). Aunque no se conoce con exactitud cuál es su mecanismo de acción, se sabe que la MTF inhibe la actividad del complejo I de la CTE; esta inhibición podría ser un mecanismo para la activación de AMPK (Hur et

al., 2015; Martin-Montalvo et al., 2013). A continuación, se describen algunos antecedentes de sus efectos en cuanto a la función mitocondrial.

2. ANTECEDENTES

Varios estudios han demostrado que el mecanismo de acción de la MTF implica la activación de AMPK, esto ocurre por el aumento de la relación AMP/ATP (Senesi et al., 2015; Suwa et al., 2006; Kjobsted et al., 2017). Otros estudios proporcionan evidencia de que la metformina inhibe parcialmente el complejo I de la CTE (Andrzejewski et al., 2014; Wessels et al., 2014; Sharoff et al., 2010), alterando el rendimiento mitocondrial. Si bien existe controversia con respecto a los mecanismos moleculares subyacentes a la acción de la MTF, existe un acuerdo general en que el medicamento causa estrés energético, lo que podría generar una respuesta hormética de protección. Recientemente se reportó que la MTF provocó una disminución de la respiración mitocondrial, dependiente de la dosis usada, en células cancerosas, lo cual disminuyó la síntesis de ATP. Corroborando lo anterior, Andrezejewki y colaboradores demostraron en células MCF7, que la MTF disminuyó la respiración mitocondrial, lo cual tuvo un impacto en la capacidad de las mitocondrias para generar ATP.

Como se sabe, la capacidad oxidativa del músculo esquelético *in vivo* está determinada por la función mitocondrial intrínseca, así como por el contenido mitocondrial total. Suwa y colaboradores en 2006, reportaron que existe un aumento en la expresión de la proteína PGC-1 α y una actividad incrementada de la

citrato sintasa en ratas Wistar, después de 2 semanas de tratamiento con MTF, lo que sugiere una estimulación de la biogénesis mitocondrial.

Por otro lado, la acción inhibitoria de la MTF sobre la respiración dependiente del complejo I se ha demostrado anteriormente, pero en estudios in vitro, en los cuales se aislaron mitocondrias del hígado de rata y del músculo esquelético, así como células permeabilizadas. Las mitocondrias se incubaron con MTF y se vio el efecto inhibitorio. Lo mismo se ha reportado en células cultivadas tratadas con MTF, donde se observa el efecto inhibitorio del fármaco sobre la actividad del complejo I (Wesswls et al., 2014). Por el contrario, estudios en modelos ex vivo no concuerdan con los efectos de la MTF antes reportados. Se ha visto que después de 4 semanas de tratamiento con MTF (320 mg/kg/día) disminuye la capacidad respiratoria de fibras musculares permeabilizadas obtenidas del gastrocnemio de ratas Zucker obesas. Sorprendentemente, en los cultivos de células musculares L6 (mioblastos de rata) tratados con MTF, aumentaron la formación de la energía mitocondrial después de ser tratadas con MTF.

Las discrepancias en la literatura podrían ser causadas por las diferencias en las especies, los regímenes de dosificación, los tipos de fibras musculares y los métodos utilizados para determinar el efecto de la MTF en las mitocondrias (Vytla et al., 2013).

Como se ha mencionado, la MTF puede comprometer la producción de ATP (Martin-Montalvo et al., 2013; Jackson et al., 2016), activando a la AMPK, la cual incrementa la autofagia y la biogénesis mitocondrial. Por lo que, una reprogramación metabólica puede favorecer el metabolismo oxidativo, teniendo un efecto positivo

sobre el músculo esquelético ya que el tratamiento con MTF mejora la expresión de PGC-1 α y la biogénesis mitocondrial, posiblemente a través de la activación de AMPK (Langone et al., 2014; Bo et al., 2010).

La AMPK y las sirtuinas dependientes de NAD⁺, señalizan una función metabólica importante: la expresión de PGC-1 α se ejerce a través de la fosforilación mediada por AMPK y la desacetilación de FOXO3 mediada por SIRT1 requerida para el control de la transcripción completa de PGC-1 α (Kjobsted et al., 2017; Pestronk et al., 2017), por lo tanto, el uso de MTF podría activar esta vía, podría mejorar la función mitocondrial.

Por otro lado, se ha reportado la capacidad que tiene la MTF para mejorar el rendimiento físico muscular de ratones (Yang et al., 2015). La señalización de Akt es central en la regulación de la función muscular. Así, la MTF aumenta la activación de Akt en músculo gastrocnemio y cuádriceps femoral (Hur et al., 2015), lo que sugiere que no solo se podría utilizar este fármaco en afecciones relacionadas con el envejecimiento, sino también en condiciones de atrofia muscular relacionadas con el sedentarismo (Kandarian et al., 2006).

Así mismo, se encontró que la proteína SOD2 (superóxido dismutasa mitocondrial, enzima antioxidante que dismuta el radical-anión superóxido en peróxido de oxígeno) aumenta su expresión después del tratamiento con MTF. La SOD2 actúa como una línea de defensa primaria para hacer frente a las ERO. La disminución de la SOD2 se asocia con el sedentarismo, caracterizado por la resistencia a insulina. Entonces, la MTF podría actuar como un agente que contrarresta el estrés oxidante (Senesi et al., 2016).

De igual forma, la realización de ejercicio físico desempeña un papel importante para evitar el deterioro del músculo, ya que produce un aumento en el metabolismo energético y producción de ATP en los músculos. Uno de los efectos más relevantes del ejercicio, es el disminuir la resistencia a la insulina y esto se debe a la reducción del tejido adiposo, aumento de la masa muscular y aumento en los transportadores a glucosa. Los efectos del ejercicio físico pueden tener un gran impacto en la prevención y tratamiento de enfermedades metabólicas (Yang et al., 2015) (Hur et al., 2015; Martins et al., 2018) y también en la prevención de la sarcopenia.

3. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, el 63% de las muertes anuales son causadas por las enfermedades no transmisibles (ENT) que generalmente son crónicas. Los cuatro tipos principales de ENT son: las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades respiratorias crónicas, la diabetes y el cáncer. El 75% de esos decesos se concentran en países de bajos y medianos ingresos.

Estas enfermedades, además, tienen consecuencias socioeconómicas graves, principalmente en comunidades socialmente desfavorecidas, en donde el acceso a servicios de salud es limitado, generando con ello un incremento en gastos adicionales para hacer frente a los costos de la enfermedad y su duración. Por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que, con el fin de mejorar las funciones cardio-respiratorias y musculares, la salud ósea, y para reducir el riesgo de ENT y depresión, se recomienda acumular un mínimo de 150 minutos

semanales de actividad física aeróbica moderada para la población mayor de 18 años (Soto et al., 2016). Sin embargo, con la información recabada a finales del 2016, el 52.2% de la población mexicana mayor de 18 años es sedentaria. Esto genera una problemática, ya que la reducción de natalidad y el aumento de la esperanza de vida han dado como resultado un aumento cada vez más de adultos y adultos mayores, por consecuencia si no hay un cambio en los hábitos de práctica físico-deportiva, para el año 2050 habrá más adultos mayores con enfermedades relacionadas con el envejecimiento o ENT, las cuales pueden reducir la esperanza de vida.

El hecho de que el tratamiento con MTF se asocie con un menor riesgo de padecer cáncer y enfermedades cardiovasculares, plantea la posibilidad de que desempeñe un papel benéfico para otras enfermedades tales como la sarcopenia, sin embargo, no queda claro cómo sería su efecto en su uso combinado con ejercicio.

Se sabe que tanto la MTF como el ejercicio pueden activar la vía AMPK y así promover la biogénesis mitocondrial e inhibir la apoptosis, cada estímulo con su efecto por separado, pero no se sabe cómo actuarán en conjunto.

Con estos antecedentes, surge el interés de conocer si el tratamiento ejercicio/MTF es capaz de mejorar la disfunción mitocondrial en músculo esquelético causada por el envejecimiento y así presentar un estímulo aditivo.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué efecto ejerce el ejercicio moderado en conjunto con el tratamiento con MTF a lo largo de la vida, sobre la función mitocondrial del músculo esquelético de ratas viejas?

5. HIPÓTESIS

El ejercicio moderado y el tratamiento con MTF a lo largo de la vida, mejorará la función mitocondrial en el músculo esquelético de ratas viejas.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del tratamiento con metformina y ejercicio moderado a lo largo de la vida sobre la disfunción mitocondrial del músculo esquelético de ratas viejas de la cepa Wistar.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto del tratamiento con MTF + ejercicio moderado a lo largo de la vida, en el consumo de oxígeno por las mitocondrias aisladas de músculo esquelético cuádriceps de ratas viejas.

- Evaluar el efecto del tratamiento con MTF + ejercicio moderado a lo largo de la vida, en la presencia o ausencia de supercomplejos en músculo esquelético cuádriceps de ratas viejas.
- Evaluar el efecto del tratamiento con MTF + ejercicio moderado a lo largo de la vida, en la función de la ATPsintasa (síntesis e hidrólisis del ATP) en mitocondrias de músculo esquelético cuádriceps de ratas viejas.

8. MATERIAL Y MÉTODO

8.1 ANIMALES

Para este trabajo se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar, que se sacrificaron a los 24 meses de edad (600 g), al terminar los tratamientos que se describirán más abajo. Las ratas se obtuvieron del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de temperatura ambiente $28^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$, con un ciclo de luz invertido, 12 horas de luz y 12 de oscuridad; con libre acceso a comida y agua, se manejaron de acuerdo con los criterios establecidos por la “Guía para el Cuidado de los Animales de Laboratorio” (Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional de Medicina) y la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999.

8.2 GRUPOS EXPERIMENTALES

Se utilizaron 8 grupos experimentales de 5 ratas cada uno:

1. **Sedentarias o grupo control (S).** Ratas de 24 meses (m), sin ningún tratamiento.
2. **Sedentarias + MTF-12m (SM12).** Grupo de ratas sedentarias a las que se les administró metformina (100 mg/kg) diariamente, iniciando el tratamiento a los 12 meses de edad y lo continuaron por 12 meses más (un año), hasta cumplir los 24 meses de edad.
3. **Sedentarias + MTF-18m (SM18).** Grupo de ratas sedentarias a las que se les administró metformina (100 mg/Kg) diariamente, iniciando el tratamiento a los 18 meses de edad y lo continuaron por 6 meses más, hasta cumplir los 24 meses de edad.
4. **Ejercicio 4m (E).** Grupo de ratas que realizaron su rutina de ejercicios (25 cm/s, 30 minutos al día, 5 días a la semana), desde los 4 meses hasta los 24 meses de edad.
5. **Ejercicio 4m + MTF-12m (EM12).** Grupo de ratas que realizó ejercicio desde los 4 meses de edad hasta los 24 meses y que además fueron tratadas con MTF por un año (de los 12 a los 24 meses).
6. **Ejercicio 4m + MTF-18m (EM18).** Grupo de ratas que realizó ejercicio desde los 4 meses hasta los 24 meses y que además fueron tratadas con MTF por seis meses (de los 18 a los 24 meses).

NOTA: Para algunos experimentos se usaron cuádriceps de ratas jóvenes de 4 meses sin ningún tratamiento, como control de animal joven.

8.3 RUTINA DE EJERCICIO

Antes de iniciar su rutina de ejercicio, las ratas fueron pre-acondicionadas por 8 semanas, como se muestra a continuación

Pre-acondicionamiento				
No. De Semana	Días	Velocidad	Tiempo	Toques eléctricos
Semana 1	3 días	10 cm/s	10 min	No
Semana 1	2 días	15 cm/s	10 min	Sí
Semana 2	3 días	15 cm/s	15 min	Sí
Semana 2	2 días	20 cm/s	20 min	Sí
Semana 3	5 días	15 cm/s	20 min	Sí
		20 cm/s	10 min	Sí
Semana 4	5 días	20 cm/s	15 min	Sí
		25 cm/s	15 min	Sí
Semana 5	5 días	25 cm/s	15 min	Sí
		30 cm/s	15 min	Sí
Semana 6	5 días	30 cm/s	10 min	Sí
		35 cm/s	20 min	Sí
Semana 7	5 días	30 cm/s	10 min	Sí
		35 cm/s	10 min	Sí
		40 cm/s	10 min	Sí

Semana 8	5 días	40 cm/s	30 min	Sí
----------	--------	---------	--------	----

Después del pre-acondicionamiento las ratas de los diferentes grupos de ejercicio y de ejercicio + MTF, comenzaron a correr 25 cm/s, 30 minutos al día, 5 veces a la semana.

8.4 TRATAMIENTO CON METFORMINA

La MTF que se utilizó para el tratamiento fue de la marca PreDial en solución y se administró a una dosis de 100 mg/kg, una vez al día, por 7 días a la semana, vía oral, ya sea por un año o por seis meses, como se describió arriba.

Al término de los tratamientos, los animales fueron sacrificados por el método de decapitación y se obtuvieron los músculos cuádriceps. El resto de los órganos se usaron en otros protocolos del laboratorio para diferentes proyectos de investigación.

8.5 AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS

Las mitocondrias del músculo esquelético de cuádriceps se aislaron mediante centrifugación diferencial de la siguiente manera. Se obtuvo el músculo esquelético cuádriceps, el cual se lavó con Buffer Chappell-Perry I (KCl 100 mM, Tris- HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM y EDTA 1 mM, pH 7.2) con ATP 1 mM (Grado II, Sigma), se fragmentó y se incubó 1.5 mg de proteasa durante 10 minutos y luego se

homogenizó. El homogenizado se centrifugó a 600 g durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante, se filtró seguido de una centrifugación a 14,000 g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en el Buffer Chappell-Perry II (KCl 100 mM, Tris- HCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM y EDTA 0,2 mM, pH 7.2) con ATP 0.2 mM y albúmina sérica bovina (100 mg/100 ml, Sigma) y se centrifugó a 7,000 g durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en Buffer Chappell-Perry II con ATP y se centrifugó dos veces a 3,500 g. El pellet final se resuspendió en 500 µl de Buffer Chappell-Perry II y se utilizó para los ensayos mitocondriales.

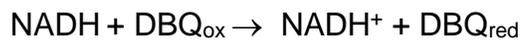
8.6 RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL

El consumo mitocondrial de oxígeno se determinó usando un electrodo de Clark (unidad de control de electrodos de oxígeno Oxytherm, Hansatech Instruments Ltd.). Brevemente, las mitocondrias se resuspendieron en amortiguador de respiración (sacarosa 250 mM, KH₂PO₄ 10 mM, EGTA 1 mM, Tris 10 mM, pH 7.4) con albúmina sérica bovina al 0.3% (BSA). Se utilizó glutamato/malato o succinato (10 mM) como sustrato respiratorio. La respiración del estado 3 se inició con la adición de 0.45 mM ADP. La respiración del estado 4 se cuantificó como el consumo de oxígeno después del consumo de ADP. La relación de control respiratorio se calculó con las tasas de respiración del estado 3/ estado 4 (Pilliam et al., 2014).

8.7 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA MITOCONDRIAL

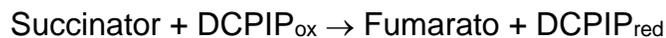
Complejo I: la actividad se determinó espectrofotométricamente a 340 nm con la oxidación de NADH 150 μM (ϵ_{NADH} : $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Las mitocondrias se permeabilizaron con 0.5% de Triton X-100, se incubaron con KH_2PO_4 30 mM, MgCl_2 5 mM, EGTA 1 mM, KCl 120 mM, 2,6-Dimetoxi- 1,4-benzoquinona (DBQ) 20 mM, pH 7.4.

La reacción que representa la actividad evaluada es la siguiente



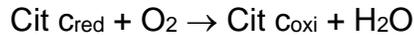
Complejo II: la actividad se determinó espectrofotométricamente a 600 nm con 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP 50 μM ; ϵ_{DCPIP} : $21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Las mitocondrias se permeabilizaron con 0.5% de Triton X-100, se incubaron con KH_2PO_4 5 mM, MgCl_2 5 mM, EGTA 1 mM, KCl 20 mM, PMS 200 μM , pH 7.4.

La reacción que representa la actividad evaluada es la siguiente



Complejo IV: la actividad se determinó en un electrodo tipo Clark, las mitocondrias se resuspendieron en un amortiguador de respiración (sacarosa 250 mM, KH_2PO_4 10 mM, EGTA 1 mM, Tris 10 mM, pH 7.4), suplementado con citocromo c 540 nM, ascorbato 3 mM, TMPD 500 nM.

La reacción que representa la actividad evaluada es la siguiente



Síntesis de ATP por el Complejo V: se usó un ensayo acoplado a la reducción de (NADP⁺ $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6.2 \text{ mm}^{-1} \text{cm}^{-1}$). La mezcla de reacción tenía NADP⁺ 50 mM, ADP 5 mM, 6 unidades / ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 16 unidades / ml de hexocinasa, 10 mM de succinato, 100 μM P1, P5-Di (adenosina-5') pentafofato penta-amonio, 100 μM glucosa, 250 mM sacarosa, 20 mM MgCl₂ y KH₂PO₄ 20 mM, pH 7.5.

Hidrólisis de ATP por el Complejo V: se cuantificó espectrofotométricamente usando un ensayo acoplado a la oxidación de (NADH $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6.2 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$). El medio de ensayo tenía HEPES 50 mM, pH 8,0, MgSO₄ 1 mM, KCl 90 mM; el sistema de regeneración de ATP fue fosfoenolpiruvato 5 mM (PEP), NADH 0,2 mM, 50 unidades / ml de piruvato quinasa (PK) y 30 unidades / ml de lactato deshidrogenasa (LDH).

8.8 SUPERCOMPLEJOS

Para la obtención de supercomplejos y complejos mitocondriales se solubilizaron las mitocondriales con el detergente digitonina (2 g/g proteína) en una solución de Bis-Tris 50 mM, ácido aminocapróico 500 mM, pH 7.0, succinato 10 mM y ATP 10 mM. El detergente (stock 500 mg/ml en DMSO) se agregó gota a gota y la solución se incubó durante 30 min a 4°C; posteriormente se ultracentrifugaron a 100 000 xg durante 35 min a 4°C. Los complejos y supercomplejos respiratorios se recuperaron en el sobrenadante (Schägger *et al.*, 1991).

8.9 ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NATIVAS

Los complejos respiratorios se resolvieron por medio de electroforesis azul en condiciones nativas (BN- PAGE) en geles de gradiente de poliacrilamida (4-10%) (Wittig et al., 2006). El amortiguador del ánodo fue bis-tris HCl 50 mM, pH 7.0; el amortiguador del cátodo fue tricina 50 mM, bis-tris 15 mM, pH 7.0 y el colorante aniónico Coomassie G250 (0.02%). La electroforesis se corrió a 30 V durante 16 horas a 4°C. El peso molecular de los complejos respiratorios y supercomplejos fue determinado por su movilidad electroforética y el revelado de su actividad catalítica en gel, utilizando como marcador de peso molecular y actividad a los complejos mitocondriales de corazón de bovino solubilizados con digitonina en las mismas condiciones.

8.10 ACTIVIDAD EN GEL DE LOS COMPLEJOS Y SUPERCOMPLEJOS RESPIRATORIOS

Actividad de NADH deshidrogenasa. Al finalizar la electroforesis nativa, los geles se incubaron en una solución de tris-HCl 10 mM, pH 7.4, NADH 0.5 mM como sustrato y bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) 1.2 mM como agente oxidante. En esta reacción el NADH es oxidado por la flavina unida a la deshidrogenada y esta última reduce directamente a tetrazolio. Mediante esta tinción es posible detectar la actividad del complejo I. La actividad se observó como un depósito violeta y la reacción se detuvo con una solución de 40% de metanol y 10% de ácido acético.

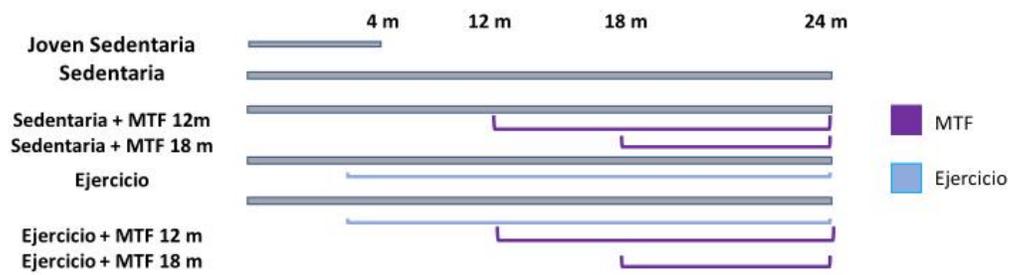
Actividad de citocromo C oxidasa. La actividad en gel del complejo IV se determinó utilizando 3, 3'-diaminobencidina (DAB) como agente reductor y al citocromo c como acarreador de los electrones (Zerbetto *et al.*, 1997). El gel se incubó en una solución de 10 mM de KH_2PO_4 pH 7.4, 4.66 mM de DAB, 4 mg de citocromo C y 1.8 KU de catalasa, esta última se añade para evitar que peróxidos contaminantes oxiden a la diaminobencidina; evitando que la reacción sea inespecífica. La actividad del CIV se observó como un depósito café. La reacción se detuvo con una solución de 40% de metanol y 10% de ácido acético.

Actividad de ATPasa. La ubicación en el gel de los oligómeros del complejo V fue determinada por medio de su actividad de hidrólisis de ATP. El gel se incubó en glicina 50 mM, MgCl_2 10 mM, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 0.2%, ATP 5 mM, pH 8.0; ajustando el pH con trietanolamina para evitar la precipitación inespecífica del plomo. La actividad de hidrólisis de ATP se observó como un depósito blanco del fosfato de plomo, sobre un fondo oscuro. La reacción se detuvo con una solución de 40% de metanol. (Jung *et al.*, 2000).

8.11 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Cada experimento se realizó al menos por triplicado en eventos independientes. El análisis estadístico de los resultados fue por análisis de varianza (ANOVA) seguida por la prueba de Tukey. Se usó un nivel de probabilidad de $p < 0.05$ como criterio mínimo de significancia.

8.12 DISEÑO EXPERIMENTAL



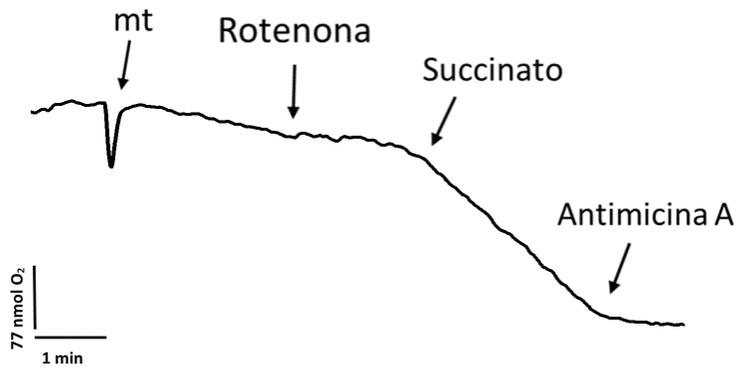
9. RESULTADOS

9.1 CONSUMO DE OXÍGENO

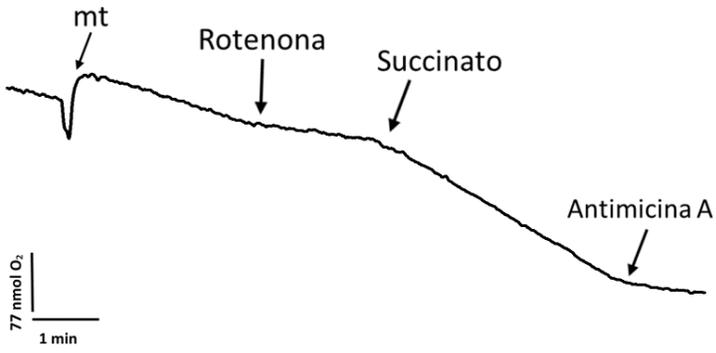
En la figura 1 se muestran los trazos representativos del consumo mitocondrial de oxígeno para cada uno de los tratamientos. El consumo de oxígeno en el estado 2 (el estado 2 evalúa cuanto oxígeno se consume por la mitocondria en ausencia de ADP). Para ello se utilizó como sustrato glutamato- malato, para ver indirectamente el funcionamiento del complejo I. Para iniciar el trazo se agregaron las mitocondrias (mt). El consumo de oxígeno que se cuantificó se muestra en la tabla 1. La rotenona, que es un inhibidor del complejo I, inhibe el consumo de oxígeno. Posteriormente se agregó al succinato que es un sustrato del complejo II, con lo cual vuelve a estimularse el consumo de oxígeno. Finalmente, la adición de la antimicina A frena totalmente el consumo de oxígeno, ya que este inhibe el transporte de electrones del complejo III al IV, por lo tanto, no existe un consumo de oxígeno por la CTE (Figura 1).

Se evaluó el consumo de oxígeno en estado 2 para determinar si la MTF inhibe el complejo I de la CTE. Aunque diversos estudios, así lo han reportado, nuestros resultados no se muestra una disminución en el consumo de oxígeno utilizando como sustrato glutamato- malato, al contrario, se presenta un aumento en la respiración en los grupos tratados con MTF a los 12 y 18 meses. La cuantificación de los consumos de oxígeno y el promedio de las mitocondrias aisladas de los animales de cada uno de los tratamientos, se detallan en la tabla 1.

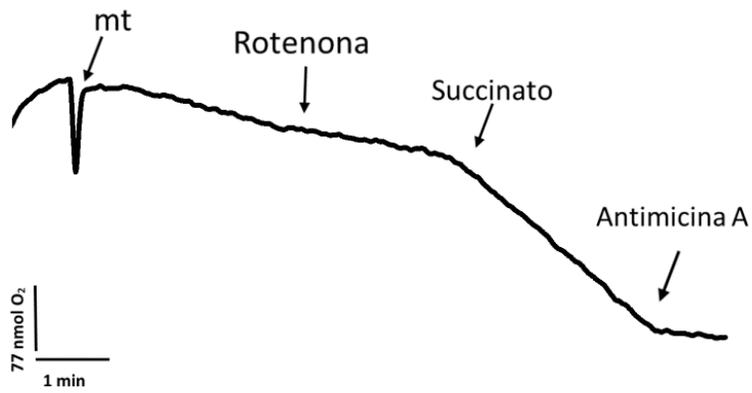
a) Sedentaria Joven



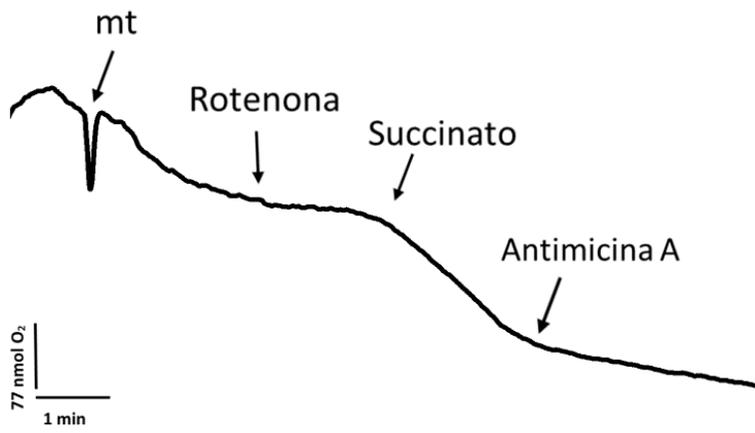
b) Sedentaria



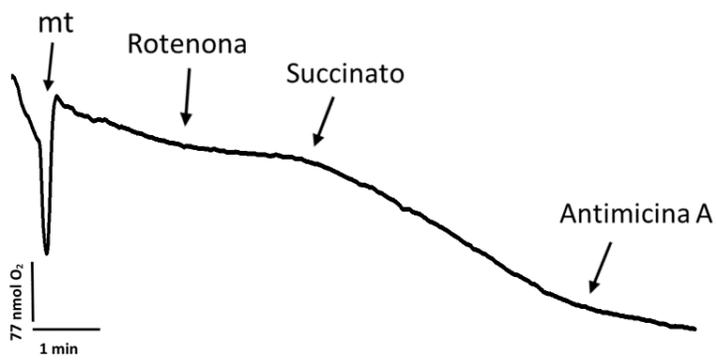
c) Sedentaria + Metformina 12m



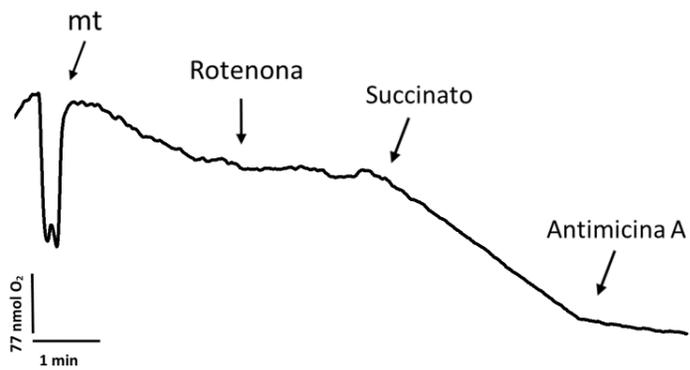
d) Sedentaria + Metformina 18m



e) Ejercicio 4m



f) Ejercicio + Metformina 12m



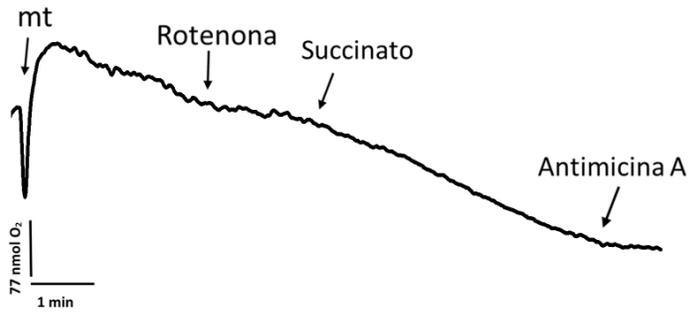


Figura 1. Oximetría de las mitocondrias (mt) aisladas de cuádriceps (n=4). Se utilizó como sustrato glutamato-malato y succinato, los inhibidores utilizados fueron rotenona y antimicina A. Se muestra el consumo de oxígeno en ausencia de ADP, cuantificado el consumo de oxígeno después de agregar el succinato.

CONSUMO DE OXIGENO, ESTADO 2

Grupos	nmol O ₂ /mg/min
SJ	3.8 ± 0.17
S	7.2 ± 1.15 ^{d m}
SM12	6.4 ± 0.36 ^{e g}
SM18	10.3 ± 2.48 ^{a b e}
E	2.7 ± 0.62 ^{a c d g}
EM12	3.7 ± 0.92 ^{b k m}
EM18	7.5 ± 0.58 ^{c k}

Tabla 1. Consumo mitocondrial de oxígeno en estado 2 utilizando como sustrato glutamato-malato. Los datos son la media \pm DE (n= 3). Diferente ^aSM18m vs E, ^bSM18m vs EM12m, ^cEM18m vs E, ^dS vs E, ^eSM18 vs SM12, ^fSM12 vs E, ^kEM18 vs EM12, ^mS vs EM12. Holm-Sidak p < 0.05

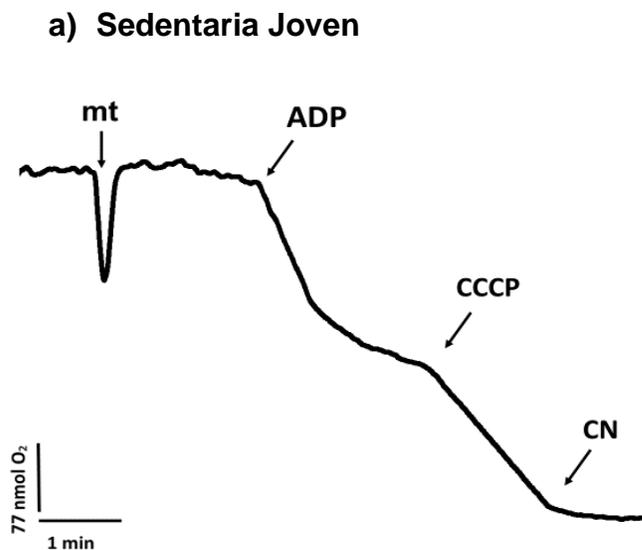
En la figura 2 se muestran los trazos representativos del consumo de oxígeno en estado 3 y 4. Cabe aclarar que cuando existen sustratos disponibles y oxígeno suficiente, el flujo de electrones a través de la CTE es continuo, por lo tanto, si se agrega una concentración conocida de ADP y existe fósforo inorgánico disponible en el medio de respiración, se generará potencial electroquímico de protón, haciendo que el flujo de protones a través de la ATP sintasa sea elevado y se sintetice ATP. A este consumo de oxígeno continuo en presencia de sustrato y ADP se le conoce como estado 3. Cuando el ADP se agota, la CTE se desacelera y el consumo de oxígeno disminuye, puesto que ya no puede haber síntesis de ATP. Al consumo de oxígeno en este momento se le conoce como estado 4. Para evaluar dichos estados se utilizó al glutamato- malato como sustrato, y se agregaron las mitocondrias (mt) para iniciar el trazo. Posteriormente se indujo el estado 3 con 2.25 μ moles de ADP. Una vez observados el estado 3 y 4 se adicionó CCCP, que es un desacoplante y provoca un aumento en la conductividad de protones y el consumo de oxígeno. Para finalizar se utilizó CN, que es un inhibidor del complejo IV, y no permite la reducción del oxígeno a agua.

Las mitocondrias de ratas SM12 y SM18 muestran un aumento en el consumo de oxígeno de 87% y 53% respectivamente comparado con los grupos control

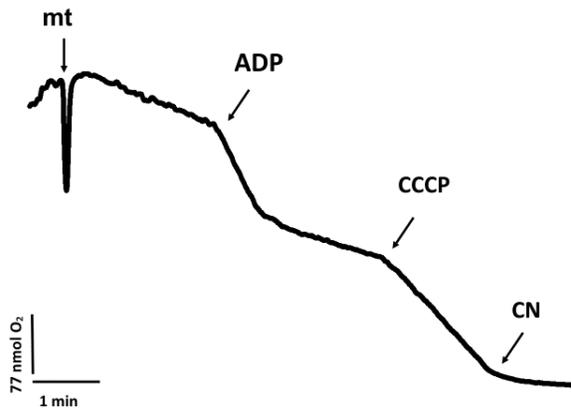
(Sedentaria Joven y Sedentaria) así como los grupos de ejercicio E, y ejercicio más MTF, EM12 y EM18 (figura 3A).

Como se mencionó arriba, durante el consumo de oxígeno en el estado 4, la actividad de la CTE disminuye, lo que se observa como un descenso en el consumo de oxígeno. Esto pasa, siempre y cuando la CTE esté acoplada con la síntesis de ATP y si la CTE no está acoplada a la síntesis de ATP, el consumo de oxígeno en el estado 4 no se modificará con respecto al estado 3.

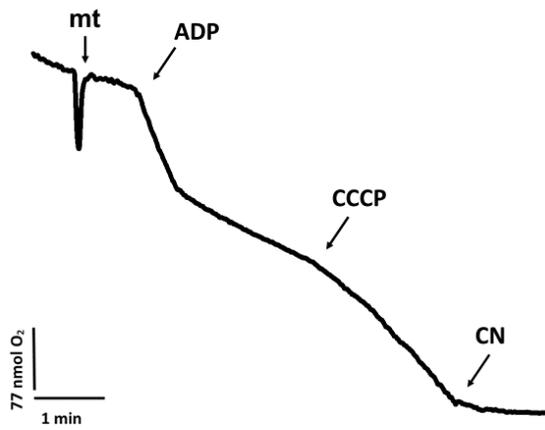
En la figura 3B, se muestra un aumento en el consumo de oxígeno en el grupo de SM12 de un 66% comparado con los grupos controles y así como una disminución en el consumo de oxígeno en los grupos que realizaban ejercicio y ejercicio + MTF de un 30 % comparado con los controles.



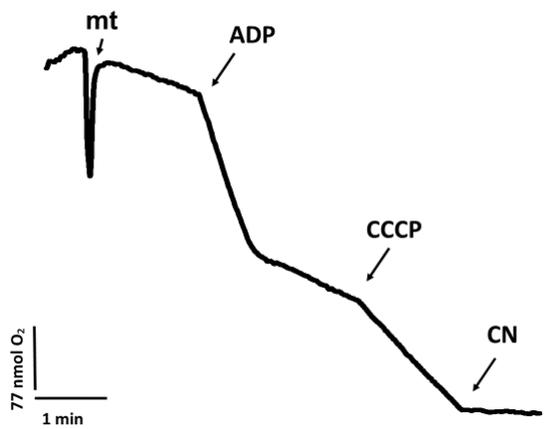
b) Sedentaria



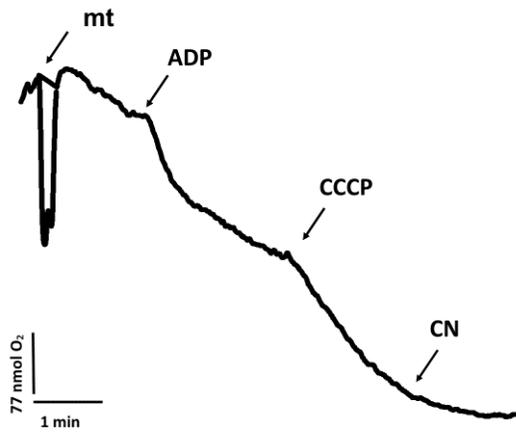
c) Sedentaria + MTF 12m



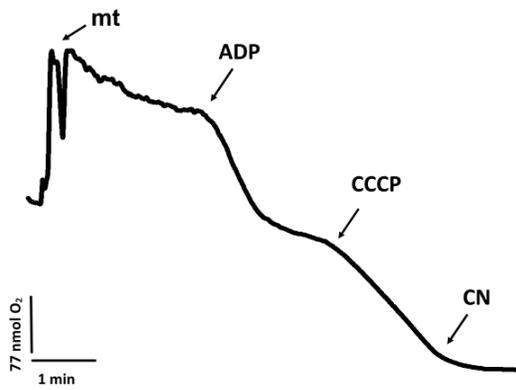
d) Sedentaria + MTF 18m



e) Ejercicio



f) Ejercicio + MTF 12m



g) Ejercicio + MTF 18m

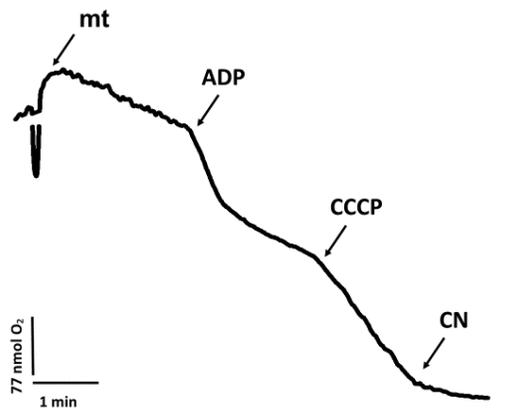
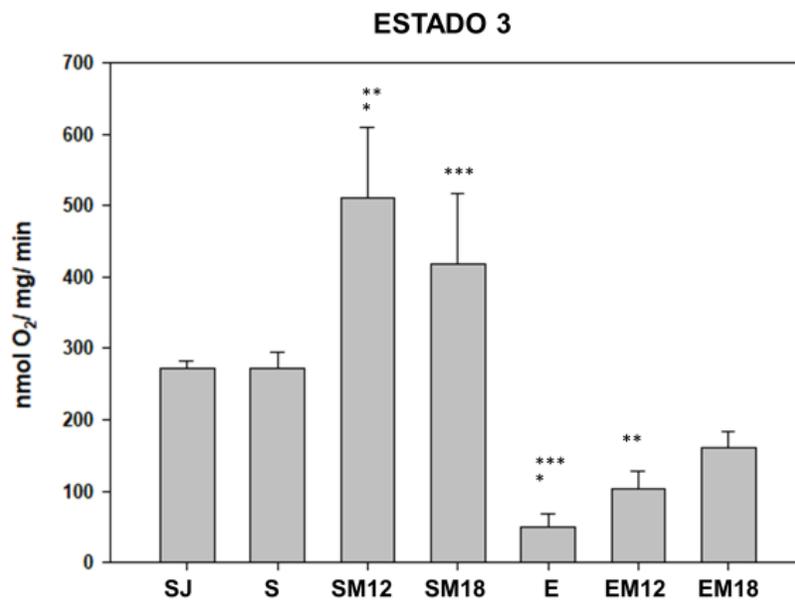


Figura 2. Oximetría de mitocondrias aisladas de cuádriceps (n=4). Se utilizó como sustrato glutamato-malato, como desacoplante el carbonilcianuro m-clorofenilhidrazona (CCCP), cianuro (CN) como inhibidor. Se indujo el estado 3 en presencia de 2.25 μ moles de ADP.

A)



B)

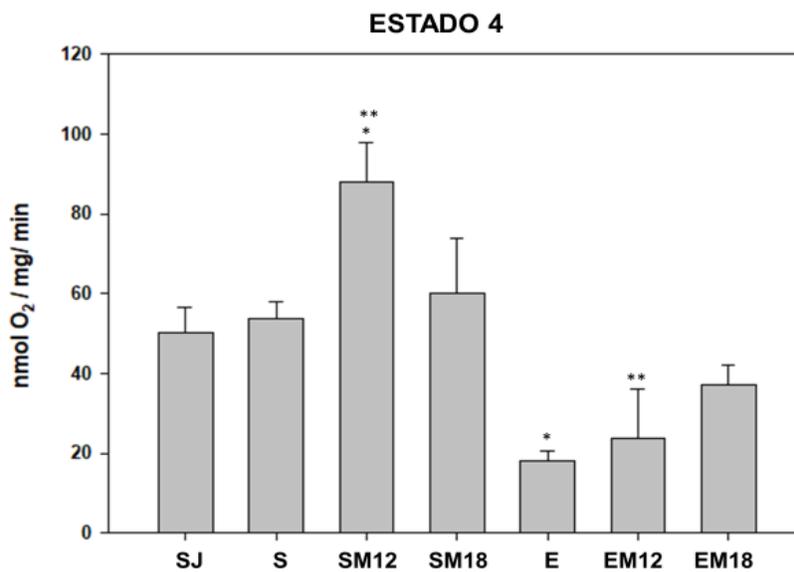


Figura 3. A) Consumo de oxígeno en estado 3. Se utilizó como sustrato glutamato-malato y fue inducido con 2.25 μ moles de ADP. B) Consumo de oxígeno en estado 4. Los datos son la mediana \pm DE n= 4.

Estado 3: Diferente *SM12 vs E, ** SM12 vs EM12, *** SM18 vs E. Dunn p < 0.05

Estado 4: Diferente *SM12 vs E, **SM12 vs EM12. Tukey Test p < 0.05

CONTROL RESPIRATORIO Y COCIENTE P/ O

GRUPOS	CR	P/ O
SJ	3.5 \pm 1.07	2.6 \pm 0.13
S	5.4 \pm 0.51 ³	2.2 \pm 0.08 **
SM12	6.1 \pm 0.45 ^{b k 3}	2.2 \pm 0.08 *
SM18	6.5 \pm 0.57 ^{a d e}	2.6 \pm 0.15
E	2.5 \pm 0.38 ^{a b 3 g m}	7.4 \pm 1.04 ***
EM12	4.5 \pm 0.39 ^{e g 3}	3.7 \pm 0.4
EM18	4.3 \pm 0.41 ^{d k m}	3.4 \pm 0.42

Tabla 2. El índice de control respiratorio (CR) = [respiración en estado 3]/[respiración en estado 4]. P/O= relación de la cantidad de ADP y consumo total de oxígeno en el estado 3 de la respiración. El CR y P/O se determinaron utilizando como sustrato glutamato-malato, la respiración fue inducida con 2.25 μ moles de ADP.

En CR: Diferente ^aSM18 vs E, ^bSM12 vs E, ^cS vs E, ^dSM18 vs EM18, ^eSM18 vs EM12, ^fEM12 vs E, ^gSM12 vs EM18, ^hEM18 vs E, ⁱSM12 vs EM12. Holm- Sidak p < 0.05

En P/O: Diferente *E vs SM12, ** E vs S. Dunn p < 0.05

9.2 CONTROL RESPIRATORIO Y COCIENTE P/ O

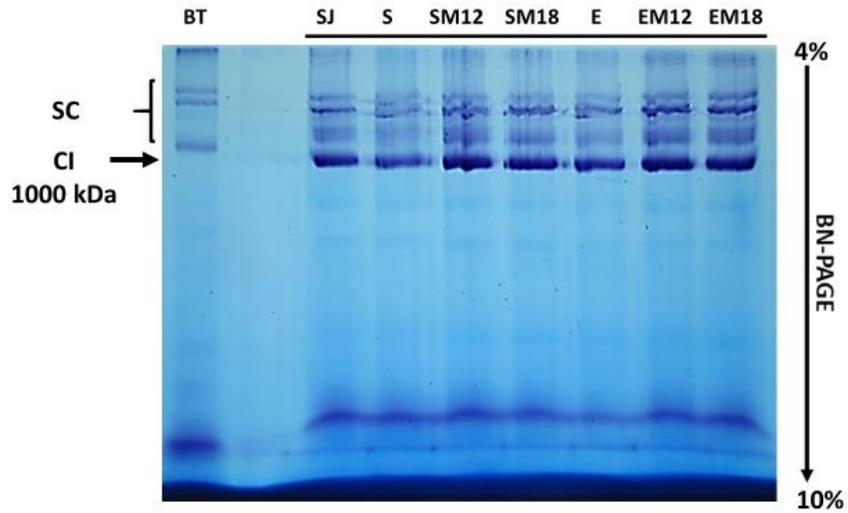
Nuestros resultados mostraron un control respiratorio alto en los grupos SM12 y SM18, sin embargo, sus cocientes P/O fueron menores, comparados con los grupos que realizaban únicamente ejercicio o un tratamiento en conjunto con metformina (P < 0.002). El cociente P/ O es la relación entre la síntesis de ATP por oxígeno consumido. Los grupos con una o dos intervenciones (E o EM12, EM18) mostraron niveles bajos de consumo de oxígeno en estado 3 y 4, así como de los controles respiratorios.

9.3 ACTIVIDAD NADH-UBIQUINONA OXIDORREDUCTASA

El complejo I está constituido por 45 subunidades que suman un peso molecular de casi 1000 kDa, contiene flavín mononucleótido (FMN) y varios centros hierro azufre, los cuales van a ser ocupados para la oxidación del NADH, reducción de las ubiquinonas y el bombeo de 4 H⁺ al espacio intermembranal. En la figura 4A se muestra la actividad en gel de los complejos y supercomplejos. Se observó un mismo patrón de supercomplejos independientemente del tratamiento. En el panel B) se muestra la actividad enzimática del complejo I evaluada

espectrofotométricamente. Se observa una actividad significativamente menor ($P < 0.003$) en el grupo de SM18 y el grupo de EM12; por otro lado, los grupos de SM12 y EM18 mostraron un comportamiento parecido a las ratas S.

A)



B)

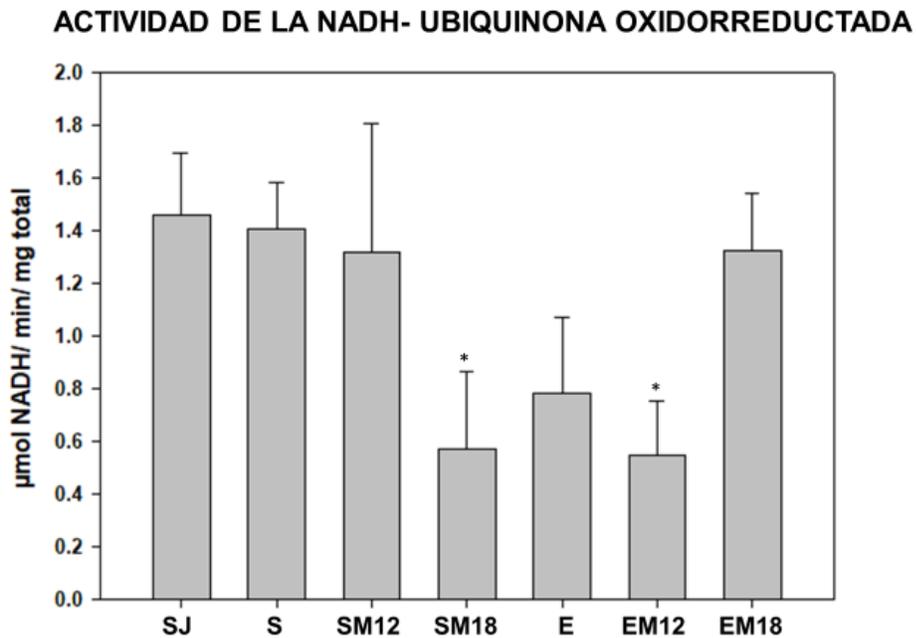


Figura 4. A) actividad en gel e identificación de complejo I libre y asociado a los supercomplejos en geles nativos. B) Actividad enzimática de complejo I evaluada por espectrofotometría. Los datos son la mediana \pm DE, n= 3. Diferente *SM18 vs EM12, SC= supercomplejos. Holm- Sidak $p < 0.05$

9.4 ACTIVIDAD DE SUCCINATO- UBIQUINONA OXIDORREDUCTASA

El complejo II es un tetrámero de 140 kDa, su grupo prostético es FAD y presenta 3 centros hierro azufre; es una enzima que forma parte del ciclo de Krebs y oxida al succinato a fumarato. Hay que comentar que el CII generalmente no forma parte de los supercomplejos, por lo que no se evaluó el patrón de supercomplejos sino únicamente la actividad enzimática por espectrofotometría.

En la figura 5 podemos ver que la actividad de esta enzima, en los grupos M12 y M18 tienen una actividad significativamente menor ($P < 0.001$) del complejo II comparado con aquellos que hacían solo ejercicio (E) o que no tuvieron alguna intervención (S). Los grupos experimentales SM12 y SM18 fueron los que presentaron menor actividad enzimática sólo del 30% en comparación al grupo S.

ACTIVIDAD DE LA SUCCINATO- UBIQUINONA OXIDORREDUCTASA

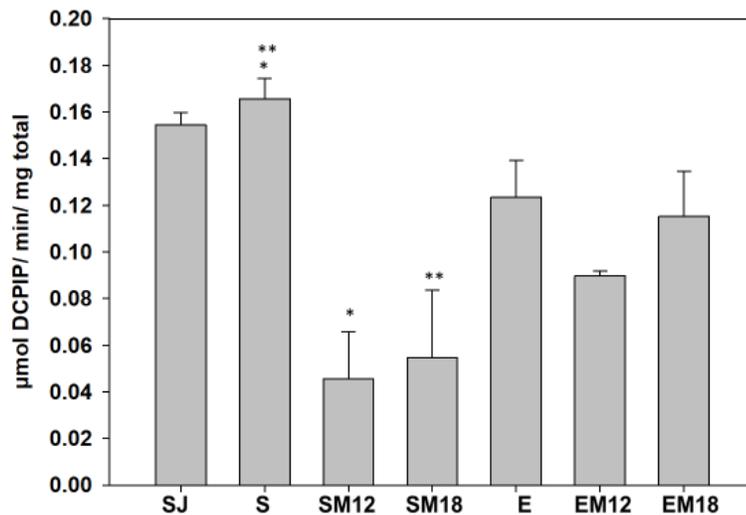


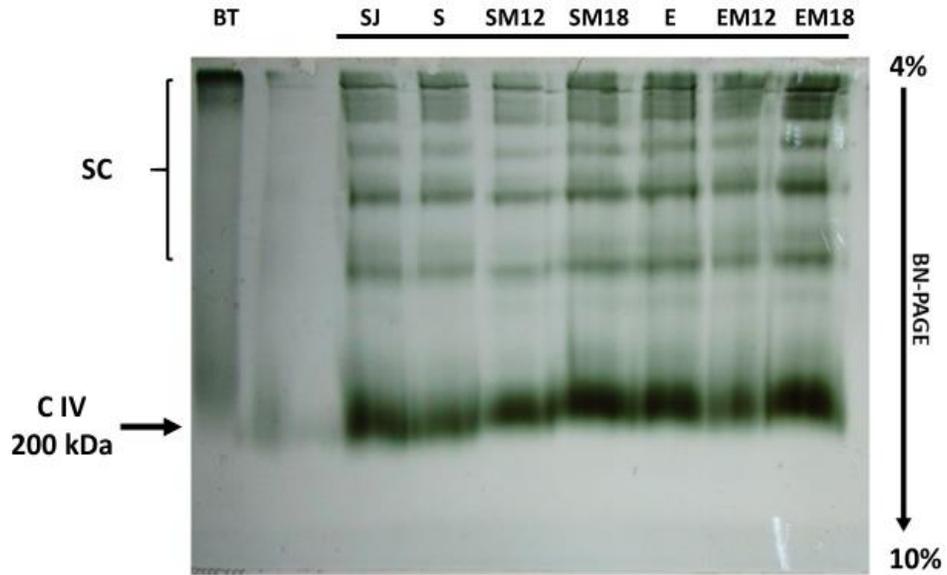
Figura 5. Actividad enzimática de la succinato- ubiquinona oxidorreductasa. Los datos son la mediana \pm DE, $n=3$ ($P < 0.001$). Diferente * S vs SM12, ** S vs SM18. Holm- Sidak $p < 0.05$

9.5 ACTIVIDAD DE CITOCROMO C OXIDASA

El complejo IV está formado por 13 subunidades que suman 200 kDa, contienen los 2 grupos prostéticos que llevan a cabo el transporte de electrones (citocromos a y a_3) y 2 núcleos que contienen iones Cu^{2+} (centros Cu_A y Cu_B). El complejo IV oxida al citocromo c , bombea H^+ al espacio intermembrana y reduce al oxígeno molecular. La citocromo c oxidasa es el complejo que presentó mayor actividad comparado con los demás complejos. Los grupos E y EM18 presentaron una actividad significativamente mayor ($P < 0.006$), y aquellos grupos que sólo tenían un tratamiento de MTF sin ejercicio, disminuyeron su actividad (Figura 6B). No se

observó cambio en el bandeo de los supercomplejos o el complejo IV libre (figura 6A).

A)



B)

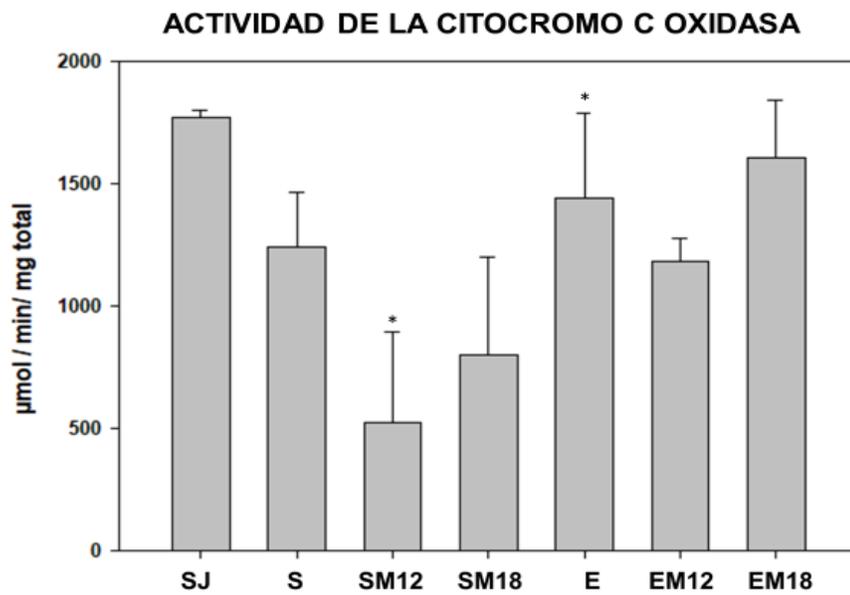


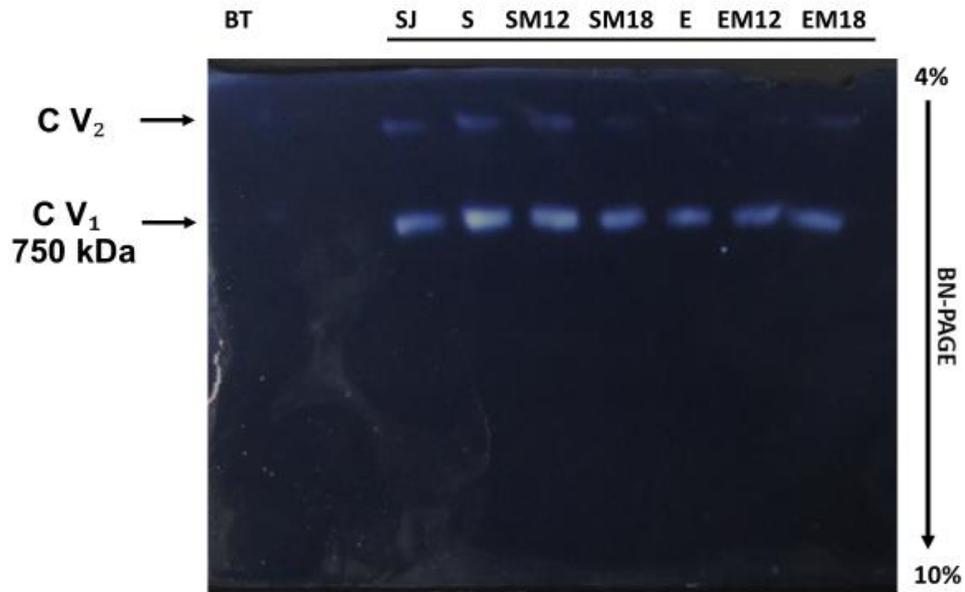
Figura 6. A) actividad en gel e identificación de complejo IV libre y asociado a los supercomplejos en geles nativos. B) Actividad enzimática de complejo IV. Los datos son la mediana \pm DS, n= 3. Diferente *E vs SM12. SC= supercomplejos. Holm- Sidak $p < 0.05$

9.6 SÍNTESIS E HIDRÓLISIS DE ATP

La F_1F_0 -ATP sintasa cataliza la síntesis de ATP en el paso terminal de la OXPHOS, esta enzima también puede hidrolizar ATP. La hidrólisis y la síntesis de ATP se producen en tres sitios catalíticos en el sector F1, fuera de la membrana mientras que el transporte de protones ocurre a través de la F0 que se encuentra embebida en la membrana interna mitocondrial. Este complejo normalmente forma dímeros o hasta homo-oligómeros y tienen un papel importante en la arquitectura mitocondrial para la formación de las crestas.

En la figura 7A se muestra la actividad de ATPasa del monómero de la F_1F_0 -ATP sintasa, así como la presencia del dímero. El grupo de EM18 mostró una actividad de hidrólisis de ATP significativamente mayor que el grupo S ($P < 0.006$) y el grupo SM18 una actividad de hidrolisis significativamente menor que el grupo S ($H_6= 14.234$, $P < 0.027$) (figura 7B). Mientras que el grupo de E mostró mayor actividad en la síntesis de ATP, siendo las S las de menos actividad (figura 8).

A)



B)

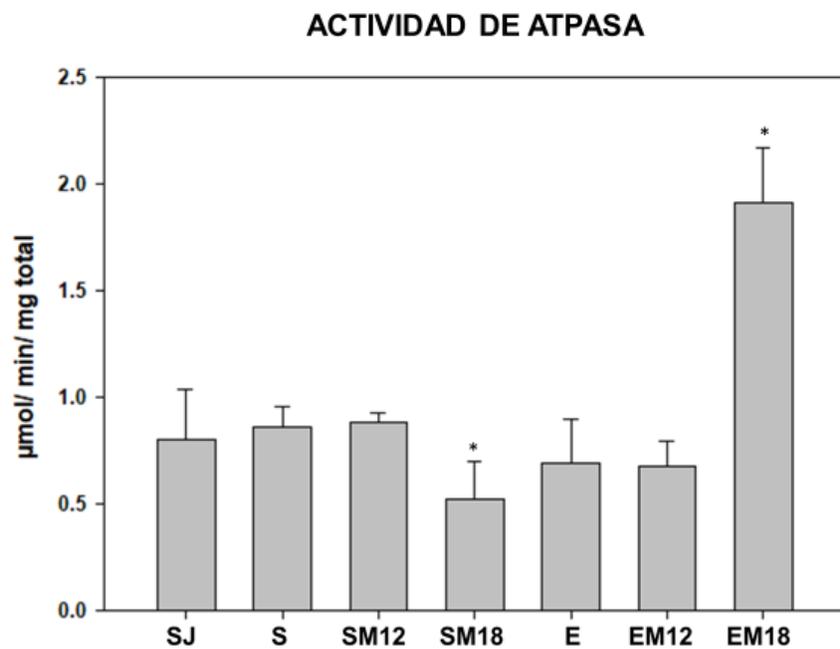


Figura 7. A) actividad en gel e identificación del monómero y dímero del complejo V. B) Actividad ATPasa del complejo V. Los datos son la mediana \pm DE n= 3. Diferente * EM18 vs SM18. Tukey Test $p < 0.05$

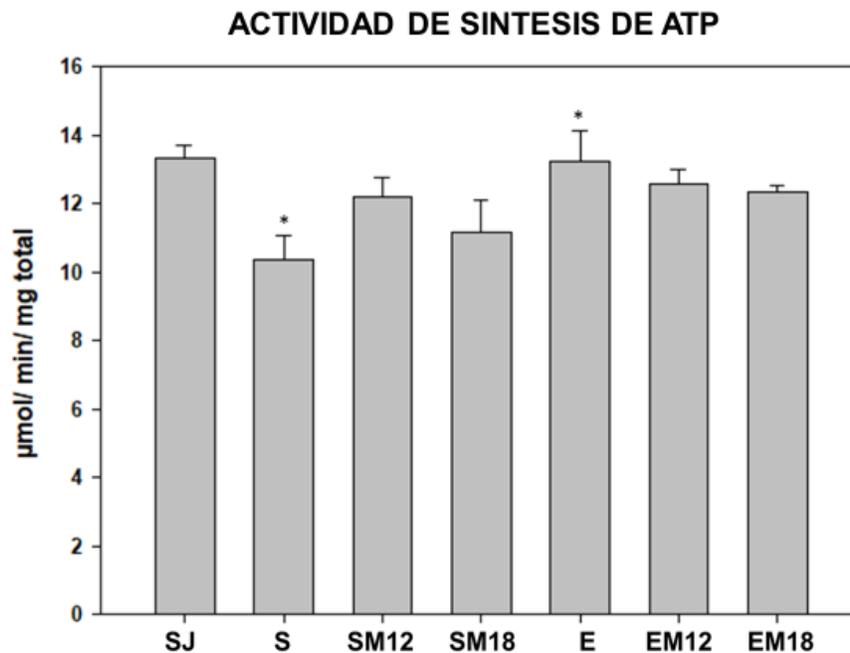


Figura 8. Síntesis mitocondrial de ATP. Los datos son la media \pm DE n= 3.

Diferente *E vs S. Holm- Sidak $p < 0.05$.

10. DISCUSIÓN

El envejecimiento es un fenómeno complejo caracterizado por la pérdida progresiva de las funciones fisiológicas y el aumento de la mortalidad que a menudo acompaña la aparición de enfermedades como la sarcopenia que es la atrofia del músculo esquelético. En consecuencia, la disminución de la fuerza muscular es un sello distintivo del proceso de envejecimiento (Cui et al., 2012). El fenotipo sarcopénico se caracteriza por una reducción de la masa y la calidad muscular, un cambio en la distribución del tipo de fibra, cambios en la síntesis de proteínas, disfunción mitocondrial, reducción de la regeneración de células satélite, reemplazo

de fibras musculares con grasa y un aumento de la fibrosis. La acumulación de estas disfunciones se ha relacionado con diferentes teorías del envejecimiento, como la teoría de los radicales libres relacionada a la disfunción mitocondrial. Esta teoría especula que la disfunción mitocondrial genera radicales libres, que dañan a la célula, lo que se asocia con el envejecimiento (Christiakov et al., 2014).

Se cree que la disfunción mitocondrial, incluida la capacidad oxidativa y el aumento del daño oxidante, contribuyen al envejecimiento biológico. La teoría mitocondrial del envejecimiento se basa en un aumento en las mutaciones del mtDNA, esto puede generar efectos adversos en los componentes de la cadena respiratoria, presentando una función inadecuada. Las alteraciones en los componentes de la cadena respiratorio mitocondrial, puede llevar al incremento en la fuga de electrones y a la consecuente formación de especies reactivas de oxígeno, creando un círculo vicioso, que perpetúa el daño. El daño a las membranas promueve la reentrada de protones independiente de la ATP sintasa. Esto hace que la cadena respiratoria sea menos eficiente.

Nuestros resultados muestran niveles altos en los valores de los controles respiratorios (CR) de los grupos que fueron tratados con MTF a diferencia del grupo que realizaba ejercicio (E). Sin embargo, esto no se reflejó en la eficiencia de sintetizar ATP (cociente P/O), ya que las mitocondrias que resultaron ser las más eficientes fueron las de aquellos grupos que realizaban ejercicio, ya sea sólo o en combinación con metformina (E y EM). En cambio, los grupos de ratas sedentarias + MTF mostraron un mayor consumo de oxígeno en estado 3 y 4, y un mejor control respiratorio (CR), pero no un P/O tan eficiente. Es decir, aunque aparentemente respiraban mejor, no eran tan eficientes en sintetizar ATP. Esto podría estar

relacionado con varios reportes que indican que el efecto primario de la MTF es la inhibición del complejo I, dado por la carga positiva de la biguanida que permite su acumulación en la matriz mitocondrial. Lo anterior disminuye el potencial de membrana mitocondrial y conduce a un estrés energético al disminuir la síntesis de ATP por la fosforilación oxidativa (Bridgest et al., 2014). Sin embargo, nuestros resultados muestran un funcionamiento adecuado del complejo I con el sustrato glutamato-malato, sin embargo, los valores altos en el estado 3 y CR en las ratas sedentarias + MTF, pero los bajos niveles de P/O si podrían favorecer el mecanismo hormético por el cual podría funcionar la MTF, ya que al modificarse el cociente AMP/ATP se activaría la enzima AMPK.

Al cuantificar el consumo de oxígeno en estado 2 (ausencia de ADP), se encontró que la MTF podría tener un efecto adicional, al observarse un aumento de consumo de oxígeno durante la respiración basal en los grupos tratados. Robb et al., 2018 y Cameron et al., 2018 reportaron que la MTF podría funcionar como ionóforo, de manera parecida a la nigericina, que un antiportador de H⁺/catión, y así presentar una mayor actividad en el consumo de oxígeno. Lo anterior concuerda con lo propuesto arriba, puesto que se aumentaría el consumo de oxígeno sin aumentar el P/O y la síntesis de ATP.

Como se ha mencionado, la acumulación de defectos en la CTE es un sello distintivo asociado a la edad. Se ha sugerido que este deterioro se debe en parte a la disociación de los supercomplejos de la CTE. Aunque se ha reportado una disminución de la formación de supercomplejos durante el envejecimiento en algunos órganos como el cerebro, el corazón, el músculo esquelético y el hígado (Schängger et al 2004). Nuestros resultados no se observan un cambio en la

estequiometría de los SC, pero sí su actividad. Al parecer se observa más activos los complejos OXPHOS en los grupos de E, EM12 y EM18. Esto es interesante ya que, aunque no hay cambios aparentes en la formación de los supercomplejos, si se encontraron cambios en la actividad de los complejos respiratorios de manera independiente.

Existen reportes donde indican una disminución en la actividad de los complejos I y IV en el músculo envejecido (Short et al., 2005), se piensa que puede ser porque estos complejos contienen subunidades codificadas por el mtDNA, que es más vulnerable a las ERO derivadas de la cadena respiratoria. Lo anterior se exagera como consecuencia de una inactividad física (Conley et al., 2000). Nuestros resultados son muy interesantes, ya que no encontramos diferencias entre la actividad de los CI, CII y CIV entre las mitocondrias de ratas sedentarias viejas (S) contra las ratas control jóvenes (SJ), pero si hubo una disminución de la actividad de dichos complejos en la sedentarias tratadas con MTF, en especial las de 12 meses (SM12). Por lo que es posible que la metformina por un tiempo largo esté teniendo efectos opuestos en los animales.

Así mismo, entre los factores de estilo de vida modificables, se sabe que la actividad física es la intervención más efectiva para atenuar la pérdida de fuerza y masa muscular (Menshikova et al., 2007). Además, aumenta las fibras musculares tipo II y la actividad de la citocromo c oxidasa, disminuye el daño oxidativo al DNA y aumenta el contenido mitocondrial. Este mismo efecto se ha reportado no solo en animales y personas jóvenes sino también en los adultos mayores (Greggio et al., 2017). Nuestros resultados mostraron una disminución de la actividad de todos los complejos en los grupos de animales sedentarios + MTF (SM12 y SM18). Se ha

descrito que la MTF podría interactuar con otros complejos de la OXPHOS y disminuir la actividad del complejo II y IV (Drahota et al. 2014).

Finalmente, en el caso de la actividad de la ATP sintasa, no se encontraron cambios significativos en la síntesis de ATP en la mayoría de los grupos, pero fue muy interesante encontrar que en estos experimentos si hubo una disminución en la capacidad de síntesis por parte de la ATP sintasa en los grupos de animales viejos sedentarios (S) y un aumento significativo en esa capacidad en los animales que hacían ejercicio (E). Por otro lado, se observó una mayor actividad en la hidrólisis de ATP en el grupo de EM18, sugiriendo que el ejercicio podría mejorar el acoplamiento de la enzima. Sin embargo, esta actividad disminuyó en las ratas tratadas con MTF por 18 meses (SM18). Hay muy pocos reportes al respecto, pero recientemente se sugirió que la biguanida se une a la ATP sintasa e inhibe la hidrólisis de ATP y no la síntesis, sin embargo, aunque nuestro resultados concuerdan con ese reporte, aún se desconoce su mecanismo inhibitorio unidireccional (Bridges et al., 2014).

11. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo son interesantes, no obstante, abren muchas más interrogantes referentes al efecto que puedan tener los tratamientos largos MTF y ejercicio a nivel mitocondrial, tanto sólo como en combinación. Un dato interesante es el efecto de la MTF sobre el complejo I, ya que, aunque se ha informado de que MTF inhibe al CI, las mitocondrias aisladas de ratas con el

tratamiento con MTF mostraron un mejor acoplamiento de los complejos OXPHOS y aumento en el consumo de oxígeno en el estado 2, lo que sugiere que podría tener un efecto adicional sobre el metabolismo.

Otro hallazgo interesante fue que las ratas que se ejercitaron mostraron un CR más bajo en comparación con las tratadas con MTF, pero un mejor cociente P/O y sin embargo no hubo grandes cambios en la actividad de síntesis de ATP y en el patrón de supercomplejos.

Finalmente, los grupos de sedentarias + MTF mostraron una disminución en las actividades los complejos respiratorios que mejoraba con el ejercicio o los grupos que presentaban dos intervenciones.

12. PERSPECTIVAS

- Evaluar la expresión de proteínas relacionadas a la biogénesis mitocondrial y dinámica mitocondrial, como DRP1, FIS1, PGC1-alfa.
- Evaluar la expresión de proteínas relacionadas la respuesta a cambios en los niveles de síntesis de ATP, como AMPK.
- Cuantificar la producción de especies reactivas de oxígeno (peróxido de hidrogeno) por la mitocondria.
- Cuantificar la carbonilación de proteínas mitocondriales como evidencia de daño oxidativo.

14. REFERENCIAS

Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., & Enriquez, J. A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Molecular cell*, 32(4), 529-539.

Andrzejewski, S., Gravel, S. P., Pollak, M., & St-Pierre, J. (2014). Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer & metabolism*, 2(1), 12.

Angulo, J., El Assar, M., Rodríguez-Mañas, L. (2016). Frailty and sarcopenia as the basis for the phenotypic manifestation of chronic diseases in older adults. *Molecular aspects of medicine*, 50, 1-32.

Bo, H., Zhang, Y., Ji, L. L. (2010). Redefining the role of mitochondria in exercise: a dynamic remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1201(1), 121-128.

Boekema, E. J., & Braun, H. P. (2006). Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *Journal of Biological Chemistry*.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, (72):248-254.

Bridges, H. R., Jones, A. J., Pollak, M. N., Hirst, J. (2014). Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochemical Journal*, 462(3), 475-487.

Bridges, H. R., Jones, A. J., Pollak, M. N., & Hirst, J. (2014). Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochemical Journal*, 462(3), 475-487.

Cameron, A. R., Logie, L., Patel, K., Erhardt, S., Bacon, S., Middleton, P., ... & Curry, H. (2018). Metformin selectively targets redox control of complex I energy transduction. *Redox biology*, 14, 187-197.

Chistiakov, Dimitry A., et al. "Mitochondrial aging and age-related dysfunction of mitochondria." *BioMed research international* 2014 (2014).

Cogliati, S., Enriquez, J. A., & Scorrano, L. (2016). Mitochondrial cristae: where beauty meets functionality. *Trends in biochemical sciences*, 41(3), 261-273.

Conley, Kevin E., Sharon A. Jubrias, and Peter C. Esselman. "Oxidative capacity and ageing in human muscle." *The Journal of physiology* 526.1 (2000): 203-210.

Cui, Hang, Yahui Kong, and Hong Zhang. "Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging." *Journal of signal transduction* 2012 (2012).

Carter, H. N., Chen, C. C., Hood, D. A. (2015). Mitochondria, muscle health, and exercise with advancing age. *Physiology*, 30(3), 208-223.

Drahota, Z., Palenickova, E., Endlicher, R., Milerova, M., Brejchova, J., Vosahlikova, M., ... & Cahova, M. (2014). Biguanides inhibit complex I, II and IV of rat liver mitochondria and modify their functional properties. *Physiological research*, 63(1).

Drake, J. C., Wilson, R. J., & Yan, Z. (2015). Molecular mechanisms for mitochondrial adaptation to exercise training in skeletal muscle. *The FASEB Journal*, 30(1), 13-22.

Dudkina, N. V., Folea, I. M., & Boekema, E. J. (2015). Towards structural and functional characterization of photosynthetic and mitochondrial supercomplexes. *Micron*, 72, 39-51.

Greggio, C., Jha, P., Kulkarni, S. S., Lagarrigue, S., Broskey, N. T., Boutant, M., ... & Cantó, C. (2017). Enhanced respiratory chain supercomplex formation in response to exercise in human skeletal muscle. *Cell metabolism*, 25(2), 301-311.

Gu, J., Wu, M., Guo, R., Yan, K., Lei, J., Gao, N., & Yang, M. (2016). The architecture of the mammalian respirasome. *Nature*, 537(7622), 639.

Hur, K. Y., Lee, M. S. (2015). New mechanisms of metformin action: Focusing on mitochondria and the gut. *Journal of diabetes investigation*, 6(6), 600-609.

INEGi, X. I. I. (2017). Censo General de población y Vivienda 2017. Página Web: <http://www.inegi.gob.mx/est/default.asp>.

Jackson, M. J. (2016). Reactive oxygen species in sarcopenia: Should we focus on excess oxidative damage or defective redox signalling?. *Molecular aspects of medicine*, 50, 33-40.

Jaimovich, E., Casas, M., Eisner, V., Tevy, M. F., Figueroa, R., Campos, C. A., del Campo, A. (2018). Muscle function decline and mitochondria changes in middle age precede sarcopenia in mice. *Aging*, 10(1), 34-55.

Ji, L. L., Kang, C. (2015). Role of PGC-1 α in sarcopenia: Etiology and potential intervention-A mini-review. *Gerontology*, 61(2), 139-148.

Jones, T. E., Baar, K., Ojuka, E., Chen, M., Holloszy, J. O. (2003). Exercise induces an increase in muscle UCP3 as a component of the increase in mitochondrial biogenesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 284(1), E96-E101.

Joseph, A. M., Adhietty, P. J., Leeuwenburgh, C. (2016). Beneficial effects of exercise on age-related mitochondrial dysfunction and oxidative stress in skeletal muscle. *The Journal of physiology*, 594(18), 5105-5123.

Kandarian, S. C., Jackman, R. W. (2006). Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle & nerve*, 33(2), 155-165.

Kim, J. A., Wei, Y., Sowers, J. R. (2008). Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circulation research*, 102(4), 401-414.

Kim, Y. C., Guan, K. L. (2015). mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *The Journal of clinical investigation*, 125(1), 25-32.

Kim, Y., Triolo, M., Hood, D. A. (2017). Impact of aging and exercise on mitochondrial quality control in skeletal muscle. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.

Kjøbsted, R., Hingst, J. R., Fentz, J., Foretz, M., Sanz, M. N., Pehmøller, C., Wojtaszewski, J. F. (2017). AMPK in skeletal muscle function and metabolism. *The FASEB Journal*, fj-201700442R.

Langone, F., Cannata, S., Fuoco, C., Barbato, D. L., Testa, S., Nardoza, A. P., Cesareni, G. (2014). Metformin protects skeletal muscle from cardiotoxin induced degeneration. *PloS one*, 9(12), e114018.

Lawler, J. M., Rodriguez, D. A., Hord, J. M. (2016). Mitochondria in the middle: exercise preconditioning protection of striated muscle. *The Journal of physiology*, 594(18), 5161-5183.

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194-1217.

López-Otín, C., Galluzzi, L., Freije, J. M., Madeo, F., Kroemer, G. (2016). Metabolic control of longevity. *Cell*, 166(4), 802-821.

Martin-Montalvo, A., Mercken, E. M., Mitchell, S. J., Palacios, H. H., Mote, P. L., Scheibye-Knudsen, M., Schwab, M. (2013). Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nature communications*, 4, 2192.

Martins, E. L., Ricardo, J. C., de-Souza-Ferreira, E., Camacho-Pereira, J., Ramos-Filho, D., Galina, A. (2018). Rapid regulation of substrate use for oxidative phosphorylation during a single session of high intensity interval or aerobic exercises in different rat skeletal muscles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 217, 40-50.

McKenzie, M., Lazarou, M., Thorburn, D. R., Ryan, M. T. (2006). Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients. *Journal of molecular biology*, 361(3), 462-469.

Mennes, E., Dungan, C. M., Frendo-Cumbo, S., Williamson, D. L., Wright, D. C. (2013). Aging-associated reductions in lipolytic and mitochondrial proteins in mouse adipose tissue are not rescued by metformin treatment. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 69(9), 1060-1068.

Menshikova, E. V., Ritov, V. B., Ferrell, R. E., Azuma, K., Goodpaster, B. H., & Kelley, D. E. (2007). Characteristics of skeletal muscle mitochondrial biogenesis induced by moderate-intensity exercise and weight loss in obesity. *Journal of Applied physiology*, 103(1), 21-27.

Mesquita, C. S., Oliveira, R., Bento, F., Geraldo, D., Rodrigues, J. V., Marcos, J. C. (2014). Simplified 2, 4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for

quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical biochemistry*, 458, 69-71.

Miskin R, Masos T, Yahav S, Shinder D, and Globerson A. AlphaMUPA mice: a transgenic model for increased life span. *Neurobiol. Aging* 20: 555-564, 1999.

Moreira, O. C., Estébanez, B., Martínez-Florez, S., Paz, J. A. D., Cuevas, M. J., González-Gallego, J. (2017). Mitochondrial function and mitophagy in the elderly: Effects of exercise. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.

O'Neill, H. M., Lally, J. S., Galic, S., Pulinilkunnil, T., Ford, R. J., Dyck, J. R., Steinberg, G. R. (2015). Skeletal muscle ACC2 S212 phosphorylation is not required for the control of fatty acid oxidation during exercise. *Physiological reports*, 3(7), e12444.

Pestronk, A., Keeling, R., & Choksi, R. (2017). Sarcopenia, age, atrophy, and myopathy: Mitochondrial oxidative enzyme activities. *Muscle & nerve*, 56(1), 122-128.

Pulliam, D. A., Deepa, S. S., Liu, Y., Hill, S., Lin, A. L., Bhattacharya, A., Van Remmen, H. (2014). Complex IV-deficient *Surf1*^{-/-} mice initiate mitochondrial stress responses. *Biochemical Journal*, 462(2), 359-371.

Ramos, E. S., Larsson, N. G., & Mourier, A. (2016). Bioenergetic roles of mitochondrial fusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1857(8), 1277-1283.

Robb, E. L., Hall, A. R., Prime, T. A., Eaton, S., Szibor, M., Viscomi, C., ... & Murphy, M. P. (2018). Control of mitochondrial superoxide production by reverse electron transport at complex I. *Journal of Biological Chemistry*, 293(25), 9869-9879.

Roy, M., Reddy, P. H., Iijima, M., & Sesaki, H. (2015). Mitochondrial division and fusion in metabolism. *Current opinion in cell biology*, 33, 111-118.

Schägger H, de Coo R, Bauer MF, Hofmann S, Godinot C, and Brandt U. Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 279: 36349-36353, 2004.

Schägger, H. (1995). [12] Native electrophoresis for isolation of mitochondrial oxidative phosphorylation protein complexes. In *Methods in enzymology* (Vol. 260, pp. 190-202). Academic Press.

Schlagowski, A. I., Isner-Horobeti, M. E., Dufour, S. P., Rasseneur, L., Enache, I., Lonsdorfer-Wolf, E., Charles, A. L. (2016). Mitochondrial function following downhill and/or uphill exercise training in rats. *Muscle & nerve*, 54(5), 925-935.

Senesi, P., Montesano, A., Luzi, L., Codella, R., Benedini, S., Terruzzi, I. (2016). Metformin treatment prevents sedentariness related damages in mice. *Journal of diabetes research*, 2016.

Sharoff, C. G., Hagobian, T. A., Malin, S. K., Chipkin, S. R., Yu, H., Hirshman, M. F., Braun, B. (2010). Combining short-term metformin treatment and one bout of exercise does not increase insulin action in insulin-resistant individuals. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 298(4), E815-E823.

Short KR, Bigelow ML, Kahl J, Singh R, Coenen-Schimke J, Raghavakaimal S, et al. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 5618– 5623.

Soto Estrada, G., Moreno Altamirano, L., Pahua-Díaz, D. (2016). Panorama epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad. *Revista de la Facultad de Medicina. UNAM*, 59(6), 8-22.

Suwa, M., Egashira, T., Nakano, H., Sasaki, H., Kumagai, S. (2006). Metformin increases the PGC-1 α protein and oxidative enzyme activities possibly via AMPK phosphorylation in skeletal muscle in vivo. *Journal of Applied Physiology*, 101(6), 1685-1692.

Trewin, A. J., Berry, B. J., Wojtovich, A. P. (2018). Exercise and Mitochondrial Dynamics: Keeping in Shape with ROS and AMPK. *Antioxidants*, 7(1), 7.

Venditti, P., Bari, A., Di Stefano, L., Di Meo, S. (2007). Role of mitochondria in exercise-induced oxidative stress in skeletal muscle from hyperthyroid rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 463(1), 12-18.

Verdijk, L. B., Koopman, R., Schaart, G., Meijer, K., Savelberg, H. H., van Loon, L. J. (2007). Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 292(1), E151-E157.

Vytla, V. S., Ochs, R. S. (2013). Metformin increases mitochondrial energy formation in L6 muscle cell cultures. *Journal of Biological Chemistry*, 288(28), 20369-20377.

Wallace, D. C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.*, 39, 359-407.

Wenz, T., Rossi, S. G., Rotundo, R. L., Spiegelman, B. M., Moraes, C. T. (2009). Increased muscle PGC-1 α expression protects from sarcopenia and metabolic

disease during aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(48), 20405-20410.

Wessels, B., Ciapaite, J., van den Broek, N. M., Nicolay, K., Prompers, J. J. (2014). Metformin impairs mitochondrial function in skeletal muscle of both lean and diabetic rats in a dose-dependent manner. *PloS one*, 9(6), e100525.

Wittig, I., Karas, M., Schägger, H. (2007). High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(7), 1215-1225.

Yang, Z., Chen, X., Chen, Y., Zhao, Q. (2015). PGC-1 mediates the regulation of metformin in muscle irisin expression and function. *American journal of translational research*, 7(10), 1850.



EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON METFORMINA Y EJERCICIO MODERADO, SOBRE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 29 del mes de noviembre del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO
- DR. ARMANDO LUNA LOPEZ
- DRA. ANA CECILIA ZAZUETA MENDIZABAL
- DR. OSCAR FLORES HERRERA



STEFANIE PAOLA LOPEZ CERVANTES
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

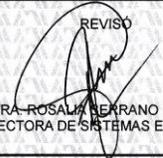
MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: STEFANIE PAOLA LOPEZ CERVANTES

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

Aprobar

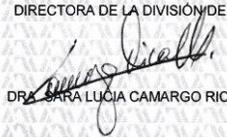
REVISÓ



MTRA. ROSALVA BERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

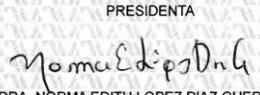
Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS



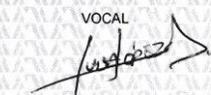
DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA



DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO

VOCAL



DR. ARMANDO LUNA LOPEZ

VOCAL



DRA. ANA CECILIA ZAZUETA MENDIZABAL

SECRETARIO



DR. OSCAR FLORES HERRERA