



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“EFECTO DEL EJERCICIO MODERADO ASOCIADO AL TRATAMIENTO CON METFORMINA COMO ESTRATEGIA PARA LA PREVENCIÓN DE SARCOPENIA EN EL ENVEJECIMIENTO”

T E S I S
QUE PRESENTA

M. en C.G. David Hernández Álvarez
Matrícula 2171801257

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Jurado:

DIRECTORES DE TESIS:

Dra. Mina Konigsberg Fainstein Presidente Investigador titular “C” Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud Universidad Autónoma Metropolitana	Dr. Armando Luna López Secretario Investigador en Ciencias Médicas “E” Departamento de Investigación Básica Instituto Nacional de Geriátria
--	--

ASESORA:

Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero
Vocal

Investigador titular “C” Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana

Dra. María Cristina González Torres Vocal Investigador titular “C” Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud Universidad Autónoma Metropolitana	Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizábal Vocal Investigador en Ciencias Médicas “F” del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.
--	---

Iztapalapa, Ciudad de México, abril 2021.

El presente trabajo fue realizado en los Laboratorios de “Bioenergética y envejecimiento celular” e “Investigación Biomédica”, el primero del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, bajo la dirección de la Dra. Mina Konigsberg Fainstein y del Dr. Armando Luna López del Departamento de Ciencias Médicas del Instituto Nacional de Geriátrica. El asesoramiento del presente trabajo estuvo a cargo de la Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para mis estudios de doctorado, con el número de registro 486203, que comprendió del periodo de 01-01-2017 al 31-12-2020. El doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de excelencia del CONACyT y además, cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis que presentó:

Nombre del alumno: David Hernández Álvarez

Fecha de aprobación de la tesis 24 de marzo 2021

JURADO:

Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Presidente

Dr. Armando Luna López

Secretario

Dra. Norma Edith López Díaz Guerrero

Vocal 1

Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizábal

Vocal 2

Dra. María Cristina González Torres

Vocal 3

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Mina** por acogerme en su grupo de trabajo y darme la oportunidad de integrarme en este hermoso proyecto. Agradezco profundamente todos sus consejos, así como su forma de compartir sus conocimientos y experiencias; siempre de forma accesible, contribuyendo a aclarar todas mis dudas.

Al **Dr. Armando** por haberme asesorado desde la maestría en la emocionante área del estrés oxidante y traído de regreso a mi casa de estudios, para laborar en el grupo de investigación de la Dra. Mina. Dr. Armando es usted todo un ejemplo de constancia, trabajo duro y pensamiento crítico; modelo a seguir. Mi más profundo agradecimiento.

A la **Dra. Norma** por su calidad humana y por todos sus acertados consejos para sacar adelante este proyecto y estar dispuesta a ayudarme en cada momento. Mil gracias.

A la **Dra. Adriana** por el apoyo, el tiempo y las aportaciones que me brindó para culminar este trabajo

A las **Dras. Cecilia y Cristina** por aceptar formar parte del jurado y acceder a revisar el presente escrito, por sus comentarios, sugerencias y correcciones; siempre mostrando la mejor disposición para ayudarme.

A mis amigos de laboratorio **Bety, Gibrán, Rafa, Paola, Roberto, Edith, Ula, Pedro, Nathy, Elisa, Vero, Samael, Alfredo, Royer, Silvia, Giovana y Ale**, a todos ustedes mi más sentido agradecimiento por su apoyo y por todos esos momentos de convivencia y alegría.

DEDICATORIA

A mi esposa y compañera de vida por alentarme a seguir adelante, por nunca soltarme de la mano y estar siempre conmigo en las buenas y malas. Eres el pilar de nuestra familia, mujer inquebrantable, constante y estudiosa. Gracias por todo amor, siempre serás el amor de mi vida.

A mi hijo el motor de mi vida mi más grande orgullo, me has llenado de las más grandes satisfacciones mi niño universitario. Te amo.

A mis padres por enseñarme a trabajar duro y que para obtener lo que quieres hay que esforzarse y dar un poco más de lo que normalmente se puede, muchas gracias los amo.

A mis suegros por enseñarme a dar todo sin condiciones, gracias por todo su apoyo.

A mi hermana y cuñados por esos momentos de alegría los quiero mucho.

Índice

1.	Introducción	1
1.1	Envejecimiento	1
1.1.1	Contexto social del envejecimiento	1
1.1.2	Epidemiología del envejecimiento	2
1.2	Sarcopenia	3
1.2.1	Criterios de diagnóstico y clasificación de la sarcopenia	4
1.2.2	Sarcopenia y su asociación con el envejecimiento celular	5
1.2.3	Procesos celulares asociados a la sarcopenia	8
1.2.4	Tratamiento y prevención de la sarcopenia	11
1.3	Generalidades del músculo esquelético	13
1.3.1	Anatomía funcional del músculo esquelético	14
1.3.2	Contracción muscular	16
1.3.3	Fibras musculares	17
1.4	Ejercicio	18
1.4.1	Fisiología y bioquímica del ejercicio	20
1.5	Metformina	23

1.5.1 Eliminación de la metformina	24
1.5.2 Farmacodinamia de la metformina	25
1.6 Especies Reactivas de Oxígeno y sistema de defensa antioxidante	26
1.6.1 Estrés oxidante y daño a biomoléculas	27
1.6.2 Estrés oxidante y metformina	28
1.6.3 Ejercicio y estrés oxidante	29
1.7 Hormesis	29
2. Justificación	31
3. Pregunta de investigación	32
4. Hipótesis	32
5. Objetivos	33
5.1 Objetivo general	33
5.2 Objetivos particulares	33
6. Material y Métodos	34
6.1 Grupos experimentales	34
6.2 Parámetros morfométricos y bioquímicos en sangre	36

6.3 Determinación de fuerza	36
6.4 Absorciometría con Rayos X de Doble Energía (DXA)	36
6.5 Obtención del gastrocnemio para cortes histológicos y pruebas bioquímicas	37
6.6 Determinación del estado redox en gastrocnemio (GSH/GSSG)	37
6.7 Histología, Hematoxilina-Eosina	38
6.8 Extracción y cuantificación de proteínas	38
6.9 Daño a proteínas por estrés oxidante	39
6.10 Determinación de Nrf2	40
6.11 Análisis estadístico	40
7. Resultados	41
7.1 Determinaciones bioquímicas	41
7.2 Análisis morfométrico y absorciometría de rayos X de doble energía (DXA)	43
7.3 Fuerza de agarre	54
7.4 Histología	55
7.5 Cociente GSH/GSSG	57
7.6 Curvas de Kaplan-Meier	59

7.7 Daño oxidante a proteínas	60
7.8 Expresión de la proteína Nrf2	61
8. Discusión	63
9. Conclusiones	71
10. Perspectivas	72
11. Referencias	73
12. Artículos	94
12.1 Artículo original	94
12.2 Artículo revisión	108

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Fig. 1 Proyección de población adulta mayor en México al 2050	3
Fig.2 Esquema de los mecanismos etiológicos de la sarcopenia y sus consecuencias	11
Fig. 3 Estructura del músculo esquelético	14
Fig. 4 Esquema miofibrillas de una fibra con retículo sarcoplásmico	15
Fig 5. Esquema de la contracción muscular	17
Fig. 6 Regulación fisiológica en respuesta al ejercicio	21
Fig. 7 Productos de algunas enzimas con función antioxidante	27
Fig. 8 Peso Corporal	44
Fig. 9 Talla	45
Fig. 10 Índice de Masa Corporal	46
Fig. 11 Índice de Masa Corporal por grupos	48
Fig. 12 Composición corporal por DXA: porcentaje de grasa	49
Fig. 13 Composición corporal por DXA: porcentaje de hueso	51
Fig.14 Composición corporal por DXA: masa magra libre de hueso (MMSH)	52
Fig. 15 Composición corporal por DXA: masa magra libre de hueso en gastrocnemio	53

Fig. 16 Fuerza de agarre	55
Fig. 17 Histología, H&E	56
Fig. 18 Cociente GSH / GSSG	57
Fig. 19 Cociente GSH / GSSG por individuo	58
Fig. 20 Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier	60
Fig. 21 Daño oxidativo de las proteínas	61
Fig. 22 Expresión relativa de Nrf2	62
Tabla 1. Clasificación de la intensidad del ejercicio	19
Tabla 2. Grupos ratas <i>Wistar</i> hembras nulíparas	35
Tabla 3. Parámetros bioquímicos	42

ABREVIATURAS

ALT	Alanino-aminotransferasa
AMPK	Cinasa activada por AMP
AST	Aspartato-aminotransferasa
CAT	Catalasa
CONAPO	Consejo Nacional de Población
CS	Células Satélite
DXA	Absorción de Rayos X de Doble Energía
E	Ratas ejercitadas
EM12	Ratas Ejercitadas que iniciaron tratamiento con Metformina a los 12 meses
EM18	Ratas Ejercitadas que iniciaron tratamiento con Metformina a los 18 meses
ENADID	Encuesta Nacional de la Dinámica Demográfica
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
GH	Hormona de Crecimiento
Glutación	GSH
GPx	Glutación peroxidasa

GSSG	Disulfuro de glutatión
HDL	Lipopolisacáridos de alta densidad
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina
IMC	Índice de masa corporal
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
MMSH	Masa Magra sin Hueso
MTF	Metformina
OMS	Organización Mundial de la Salud
S	Ratas Sedentarias
SM12	Ratas Sedentarias que iniciaron tratamiento con Metformina a los 12 meses
SM18	Ratas Sedentarias que iniciaron tratamiento con Metformina a los 18 meses
SOD	Superóxido Dismutasa

RESUMEN

La Sarcopenia es un síndrome caracterizado por la generalizada y progresiva pérdida de masa y fuerza muscular esquelética asociada con el envejecimiento. Por su parte, un estilo de vida sedentario contribuye a este padecimiento, exacerbando y convirtiéndose en un círculo vicioso entre dificultad de realizar tareas de la vida cotidiana y discapacidad, que puede llevar a la dependencia total en incluso la muerte. El ejercicio es una de las principales estrategias para prevenir, retrasar y tratar la sarcopenia generada por el envejecimiento, por su parte la metformina ha sido considerado un fármaco anti envejecimiento, que se ha probado disminuir los daños ocasionados por el sedentarismo. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del ejercicio moderado asociado al tratamiento con MTF sobre la composición corporal, fuerza, estado redox y tasa de supervivencia de ratas *Wistar* hembras. Para ello, las ratas se dividieron en seis grupos: ratas sedentarias "S", ratas sedentarias tratadas con MTF desde los 12 y 18 meses de edad (SM12 y SM18 respectivamente), hasta su sacrificio a los 24 meses de edad. Las ratas ejercitadas "E", realizaron rutinas de ejercicio desde los 4 hasta los 24 meses de edad y al igual que las ratas sedentarias iniciaron su tratamiento con MTF desde los 12 y 18 meses (EM12 y EM18 respectivamente) de edad hasta su sacrificio a los "24" meses de edad. La composición corporal se determinó usando un escáner de absorción de rayos X de doble energía (DXA) y la fuerza de agarre se determinó usando un dinamómetro. Se evaluó el estado redox por HPLC, calculando la relación GSH / GSSG en el músculo gastrocnemio, así como el daño a proteínas. Los resultados muestran que las ratas ejercitadas, tienen una mayor proporción de masa magra sin hueso (músculo) con disminución en el contenido grasa corporal en comparación con el grupo de ratas "S". El tratamiento de 6 meses con MTF en ratas sedentarias SM18 mostró una proporción de músculo similar a las ratas ejercitadas a los 24 meses de edad. Por otro lado, las ratas ejercitadas mostraron mayor fuerza de agarre en comparación con el grupo "S", por su parte, las ratas sedentarias que tomaron MTF (SM12 y SM18) mostraron un rango de fuerza similar a las ratas ejercitadas. El incremento de fuerza en ratas tratadas con MTF posiblemente se deba a que este medicamento ayuda a preservar la estructura del tejido muscular, viéndose reflejado con la presencia de fascículos musculares más grandes y una reducción en el daño a proteínas.

ABSTRACT

Sarcopenia is a syndrome characterized by the generalized and progressive loss of skeletal muscle mass and strength associated with aging. A sedentary lifestyle contributes to this condition, exacerbating and becoming a vicious cycle between difficulty in performing daily life tasks and disability, leading to total dependence and even death. Exercise is one of the main strategies to prevent, delay, and treat sarcopenia caused by aging; for its part, metformin has been considered an anti-aging drug, which has been proven to reduce the damage caused by a sedentary lifestyle. The present study aimed to evaluate the effect of moderate exercise associated with MTF treatment on the body composition, strength, redox status, and survival rate of female *Wistar* rats. For this, the rats were divided into six groups: sedentary rats "S", sedentary rats treated with MTF from 12 and 18 months of age (SM12 and SM18 respectively), until their sacrifice at 24 months of age. The "E" exercised rats performed exercise routines from 4 to 24 months of age and, like the sedentary rats, began their treatment with MTF from 12 and 18 months (EM12 and EM18 respectively) of age until their sacrifice to the "24" months of age. Body composition was determined using a dual-energy X-ray absorption (DXA) scanner, and grip strength was determined using a dynamometer. The redox status was evaluated by HPLC, calculating the GSH / GSSG ratio in the gastrocnemius muscle, as well as the protein damage. The results show that the exercised rats have a higher proportion of lean boneless mass (muscle) with a decrease in body fat content than the group of "S" rats. Surprisingly, the 6-month treatment with MTF in SM18 sedentary rats showed a similar muscle ratio to rats exercised at 24 months of age. On the other hand, the exercised rats showed greater grip strength compared to the "S" group. Curiously, the sedentary rats that took MTF (SM12 and SM18) showed a range of strength similar to the exercised rats. The increase in strength in rats treated with MTF is possibly due to the fact that this drug helps to preserve the structure of muscle tissue, is reflected in the presence of larger muscle bundles, and a reduction in protein damage.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Envejecimiento

El envejecimiento es un proceso gradual caracterizado por la disminución de la respuesta homeostática; donde existen cambios fisiológicos, morfológicos, bioquímicos y psicológicos propiciados por cambios inherentes a la edad, los cuales se hacen evidentes a partir de la quinta década de vida. Sin embargo, no todas las personas envejecen de la misma manera, ni al mismo ritmo [Mendoza-Núñez et al., 2013] y en organismos envejecidos cualquier modificación en el medio externo, puede comprometer la capacidad de respuesta frente a dicho cambio [Pomatto y Davies, 2017].

1.1.1 Contexto social del envejecimiento

Es muy importante tomar en cuenta el contexto social del envejecimiento, ya que puede conducir a un deterioro conductual marcado. El contexto social del envejecimiento, se refiere al papel que desempeñan las personas adultas mayores en un ambiente cultural, por lo que, puede cambiar a medida que se modifican las costumbres. Con la edad, aumentan las dificultades físicas y mentales para adaptarse a una nueva situación y los cambios pueden ser adversos a nivel cognitivo e intelectual; mostrando dificultades para afrontar situaciones novedosas de la vida diaria [Dziechciaż y Filip, 2014; Arranz et al., 2009]. El aislamiento social es una situación frecuente en personas adultas mayores, agravándose por la carencia de relaciones sociales de calidad [Arranz, et al., 2009], ya que es complicado en esa etapa de la vida mantener sus redes sociales [Cornwell, 2009], propiciando su aislamiento social, depresión y trastornos personales [Findlay, 2003]. Por

lo tanto, el envejecimiento activo propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS por sus siglas en inglés WHO) en 1999, tiene la finalidad de motivar la participación continua de las personas adultas mayores, ya sea en forma individual o colectiva, en aspectos sociales, económicos, culturales, espirituales y cívicos para promover el envejecimiento saludable [WHO, 1999].

1.1.2 Epidemiología del envejecimiento

Según la encuesta intercensal del Consejo Nacional de Población (CONAPO), el envejecimiento de la población mexicana empezó a ser evidente a mediados de los años 90 del siglo pasado [Ramos, 2016]. En ese entonces la población adulta mayor representó el 5.3% de la población total, mientras que en 2010 ya era del 10.1 %; y la Encuesta Nacional de la Dinámica Demográfica (ENADID) del 2018 se reporta que dicho grupo etario constituyó el 12.3% de la población total. Ahora bien, conforme a las proyecciones de población señaladas por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en el 2018, se prevé que más de 7.9 millones de individuos serán adultos mayores en los próximos 10 años; llegando a 20.4 millones en 2030 y a 33.36 millones para el 2050. Por lo tanto, más del 20% de la población de nuestro país pertenecerá a este grupo etario [INEGI, 2018]. Los datos demográficos muestran, que dicho incremento se debe principalmente al aumento en la esperanza de vida como resultado de los avances científicos y tecnológicos para la reducción de las enfermedades mortales de la niñez, la mortalidad materna y de las personas adultas mayores; que en 2019 se estimó de 75.1 años [Secretaría de Gobernación, 2019]. Sin embargo, estos datos pueden tornarse preocupantes para los

responsables de formular las políticas sanitarias, dado que nuestro país no está preparado para satisfacer las necesidades de atención a la salud, de ingresos o de confrontar la discapacidad y dependencia, asociadas con el adulto mayor.

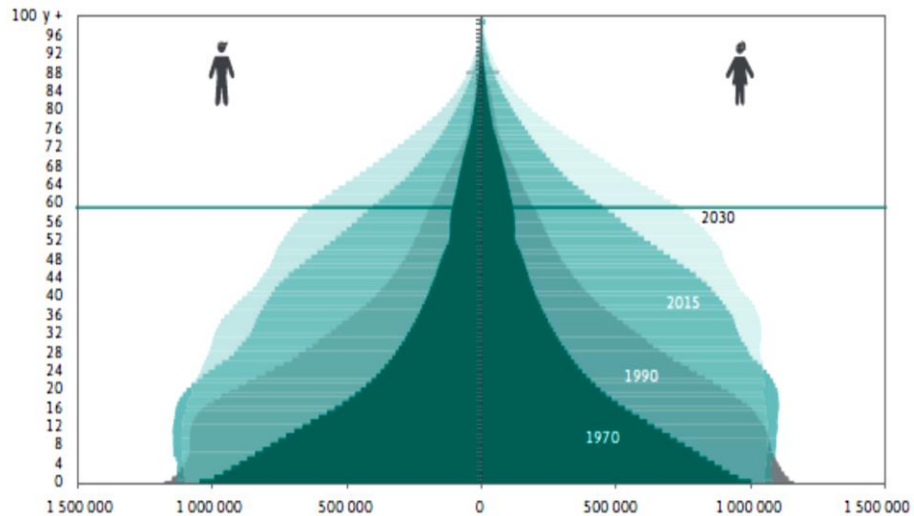


Fig. 1 Proyección de población adulta mayor en México al 2050. Se puede apreciar el incremento de la población adulta mayor por década y la proyección para las décadas a 2030-2050. [Ramos, 2016].

1.2 Sarcopenia

Como se ha mencionado, el deterioro funcional asociado al envejecimiento genera dificultad para el desempeño de las actividades de la vida cotidiana y se manifiesta, en gran medida, por la pérdida gradual de la independencia física. De acuerdo con la ENADID 2018, el 27.1% de las personas de edad avanzada que viven solas, tienen discapacidad y el 42.3% tiene alguna limitación para realizar actividades consideradas básicas, por ejemplo caminar, subir o bajar escaleras, etc [ENADID, 2018]. Lo anterior se asocia a la pérdida de fuerza y masa muscular esquelética denominado sarcopenia.

La sarcopenia es un síndrome caracterizado por la pérdida progresiva y generalizada de masa muscular, potencia muscular esquelética y de rendimiento físico; fuertemente asociada con el envejecimiento [Rosenberg, 1989; Montero y Serra, 2013; Serra, 2006], aunque esta relación puede diferir según el sexo y la edad [Tanimoto et al., 2014]. La sarcopenia puede conducir a discapacidad física, alteraciones en la marcha y caídas que provocan la pérdida de independencia funcional; incrementando el costo sanitario y eventualmente un incremento en el riesgo de mortalidad [Baumgartner et al., 1998; Cruz et al., 2010; Kim y Choi, 2015]. La disminución de la masa muscular en personas sanas se produce a partir de los 40 años de edad con una pérdida de aproximadamente 8% por década, hasta llegar a los 70 años, donde la pérdida se incrementa en un 15% por década [Grimby et al., 1984].

1.2.1 Criterios de diagnóstico y clasificación de la sarcopenia

La Sociedad de Medicina Geriátrica de la Unión Europea (EUGMS, por sus siglas en inglés) desarrolló definiciones operativas y criterios de diagnóstico para la sarcopenia [Cruz et al., 2010]. El documento fue distribuido a tres organizaciones: Sociedad Europea de Nutrición Clínica y Metabolismo (ESPEN, por sus siglas en inglés), a la Asociación Internacional de Gerontología y Geriatria - Región Europea (IAGG-ER, por sus siglas en inglés) y a la Academia Internacional de Nutrición y Envejecimiento (IANA, por sus siglas en inglés) [Cruz et al., 2010]. Las cuales, en conjunto conformaron el Grupo de Trabajo Europeo sobre Sarcopenia en Personas Mayores (EWGSOP, por sus siglas en inglés), con la finalidad de unificar los criterios para el diagnóstico de sarcopenia. EWGSOP recomienda verificar la

pérdida de masa muscular y baja función muscular; ésta última se subdivide en disminución de la fuerza muscular y reducción del rendimiento físico; por lo tanto, para el diagnóstico correcto de sarcopenia se requiere de la presencia del primer criterio y de al menos uno de los dos criterios de la función muscular [Cruz et al., 2010 y 2019].

Por otra parte, dependiendo del estado de gravedad y de deterioro muscular, la sarcopenia también se puede clasificar en pre-sarcopenia, sarcopenia y sarcopenia severa. La etapa de pre-sarcopenia se caracteriza por la disminución de la masa muscular sin tener algún impacto sobre la fuerza y rendimiento físico. La sarcopenia se caracteriza por una disminución de la masa muscular y fuerza muscular o bajo rendimiento físico. Finalmente, la sarcopenia severa es la etapa en la que se encuentran presentes los tres criterios antes mencionados [Cruz et al., 2010]. Así mismo la sarcopenia se clasifica como primaria o secundaria. El criterio para el diagnóstico de la sarcopenia primaria se establece sólo si se presenta asociada al envejecimiento y la secundaria, si está relacionada con falta de actividad física, con enfermedad o con un estado nutricional deficiente [Cruz et al., 2019].

1.2.2 Sarcopenia y su asociación con el envejecimiento celular

Actualmente se sabe que la homeostasis de las células y de los organismos dependen de la interacción de múltiples factores ambientales con los eventos de señalización molecular y celular, y que las alteraciones en estos eventos pueden predisponer a los organismos a desarrollar enfermedades crónicas asociadas al envejecimiento [Hartl, 2016]. En cuanto al envejecimiento a nivel celular y molecular, López-Otín y colaboradores propusieron nueve características o sellos distintivos del envejecimiento en mamíferos, los cuales son:

inestabilidad genómica, erosión de telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de proteostasis, desregulación en la detección de nutrientes, disfunción mitocondrial, senescencia celular, agotamiento de las células madre y alteración en la comunicación intercelular [López-Otín et al., 2013].

La inestabilidad genómica tiene un papel preponderante como factor causal del envejecimiento, ya que las células somáticas están continuamente expuestas a diversas fuentes de daño del ADN, como son especies reactivas de oxígeno (ERO), radiación UV y mutágenos ambientales [Vijg y Suh, 2013]. Para contender contra ello, se han desarrollado múltiples sistemas de defensa que incluyen la reducción o eliminación de moléculas dañinas, la reparación del daño del ADN, la inducción de senescencia y la apoptosis en respuesta al daño persistente del ADN [Petr et al., 2020], etc. En el caso particular de la sarcopenia, se ha visto que el músculo esquelético es muy propenso a acumular daño en el ADN ya que es el tejido con mayor masa en el cuerpo y consta de células posmitóticas [RadEk et al., 2001].

En cuanto al acortamiento de los telómeros, este representa un mecanismo intrínseco de la célula que al llegar a cierto punto, conduce a la activación de puntos de control que dan como resultado la inducción de la senescencia celular y detención permanente del ciclo celular [von Figura et al., 2009]. El acortamiento telomérico relacionado con la edad en tejidos altamente proliferativos se debe principalmente al proceso de replicación, como el músculo esquelético es un tejido poco proliferativo, el acortamiento es mínimo y la mayor

erosión de los telómeros se debe principalmente a la inactividad física [Venturelli et al., 2014].

Por otra parte la metilación del ADN, las modificaciones de histonas y los ARN no codificantes son los tres pilares de la regulación epigenética. Las alteraciones de estos mecanismos afectan la gran mayoría de los procesos nucleares los cuales incluyen la transcripción, el silenciamiento de genes, la replicación, reparación del ADN, la progresión del ciclo celular, la estructura y función de los telómeros [Gonzalo, 2010]. La metilación del ADN es un mecanismo que modifica la expresión génica. La metilación de secuencias cerca de elementos reguladores puede suprimir la expresión génica, ya que pueden tener efectos sobre proteínas de unión al ADN y efectos sobre la estructura de la cromatina. El aumento, y la disminución de la metilación se producen con el envejecimiento y dependen del tipo de tejido y del gen involucrado [Richardson, 2003]. Durante el envejecimiento del músculo esquelético se ha observado hipermetilación en los genes de los componentes de la cadena transportadora de electrones en NADH y COX7A1 con una disminución en su expresión génica, la cual pudiera estar contribuyendo al deterioro muscular [Ling, et al., 2007; Rönn et al., 2008].

Otra característica del envejecimiento es la pérdida de la proteostasis (homeostasis de las proteínas) causada por la desregulación entre la síntesis de proteínas, el plegamiento de las mismas y los mecanismos de degradación o simplemente por el deterioro de uno en detrimento del otro [Fernando et al., 2019]. El mantenimiento de la proteostasis se logra a través de la coordinación de éstos sistemas que corrigen rápidamente los cambios

proteómicos no deseados. Las chaperonas, el sistema proteasómico de ubiquitina (UPS) y la autofagia, se encargan del mantenimiento de la proteostasis intracelular. Por un lado las chaperonas ayudan a las proteínas recién sintetizadas y a las proteínas desplegadas a alcanzar su estabilidad de plegamiento; si no se logra un buen plegamiento, las chaperonas dirigen a la proteína a su degradación en el proteosoma. Las proteínas solubles individuales pueden llegar a la luz lisosomal en la autofagia mediada por chaperona, si las proteínas mal plegadas se organizan en oligómeros la única opción para su eliminación del citosol es a través de macroautofagia o son expulsadas fuera de la célula por medio de exosomas [Kaushik y Cuervo, 2015]. En el músculo esquelético envejecido existen alteraciones tanto en la síntesis, como en la degradación de las proteínas, si bien hay diversos informes de la pérdida de proteostasis en músculo, se han encontrado informes contradictorios. Un estudio mostró que en ratas de 4, 8, 24, 29 y 34 meses de edad, la actividad proteosomal incrementa con la edad hasta los 29 meses y disminuye a los 34 meses de edad, sin embargo otro estudio mostró que ratas sarcopénicas de 30 meses de edad tenían aún, un mayor contenido proteosomal 26S [Hepple et al., 2008; Altun et al., 2010].

1.2.3 Procesos celulares asociados a la sarcopenia

Los músculos sarcopénicos muestran un número reducido de miofibrillas, infiltración de tejido adiposo y, en etapas posteriores, un número reducido de células satélite [Verdijk et al., 2014]. Estudios realizados en diferentes tipos musculares muestran que el número de fibras alcanza un rango máximo poco después de nacer y se mantienen sin cambios

durante el desarrollo [Tabary et al., 1972]; por lo que el aumento del peso de los músculos conforme se llega a la madurez sólo se limita a cambios en el tamaño de la sección transversal de las fibras musculares y disminuye con el envejecimiento [Alnaqeeb y Goldspink, 1987; Siparsky et al., 2014]. Por otra parte, el tamaño máximo de la fibra muscular que persiste hasta la edad adulta, se alcanza entre los 12 a los 15 años de edad [Miljkovic et al., 2015] y la fuerza aumenta linealmente hasta la pubertad, alcanzando su punto máximo en la madurez y disminuye pasando los 40 años de edad. Como se mencionó anteriormente, desde el nacimiento y hasta los 15 años de edad el tamaño de la fibra muscular aumenta considerablemente, mientras que el contenido de células satélite (CS) va disminuyendo con la edad [Verdijk et al., 2014]. Las CS adultas son necesarias para el mantenimiento de la masa muscular, en caso de tensión o lesión muscular se activan y migran a los sitios dañados para diferenciarse en miocitos con la finalidad de formar miofibrillas nuevas o fusionarse con la fibra dañada para repararla [Riuzzi et al., 2018]. La disminución de las CS en el envejecimiento y la reducida función regenerativa de las CS son factores importantes asociado a la sarcopenia en ancianos [Lukjanenko et al., 2019].

Con el envejecimiento la composición corporal cambia, la cantidad de masa magra disminuye y se incrementa la grasa corporal [Grimby et al., 1984; Flegal et al., 2012]. Los niveles de ácidos grasos en sangre incrementan la cantidad de lípidos inter e intramusculares, los cuales pueden deteriorar la biogénesis y función mitocondrial, disminución de los procesos de lipólisis y β -oxidación; así como, incremento en la producción de ERO y un estado inflamatorio crónico. Lo cual puede generar lipotoxicidad, y que en conjunto, conducen a resistencia a la insulina [Kalinkovich y Livshits, 2017]. La

resistencia a la insulina tiene un alto impacto en el metabolismo muscular, donde el aumento de tejido adiposo actúa de manera sinérgica para el desarrollo final de sarcopenia [Perez-Sousa et al., 2019].

Además de lo anterior existen otros factores asociados a la sarcopenia, dentro de los que se encuentran la pérdida de unidades motoras alfa de la médula espinal, factores hormonales y humorales e inflamación [Serra, 2006] (Figura 2). Dentro de los factores hormonales, el envejecimiento trae consigo una serie de alteraciones tales como disminución de la hormona de crecimiento (GH, por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1), así como la reducción en los niveles de testosterona y estrógenos; que conllevan a cambios en la composición corporal. Así mismo, la inflamación sistémica de bajo grado, donde los niveles circulantes de citocinas proinflamatorias se encuentran elevados de dos a cuatro veces, es un mecanismo subyacente al envejecimiento [Zembron-Lacny et al., 2014] ya que se ha observado un aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6), que pueden repercutir en la disminución en la síntesis de proteínas del músculo y el aumento de la degradación de proteínas miofibrilares [Serra, 2006]. A su vez, la pérdida progresiva del músculo esquelético y la fuerza, se han asociado a la disfunción mitocondrial, debido a la presencia de mutaciones en su ADN (ADNmt), oxidación de lípidos y proteínas, producto del daño ocasionado por las ERO [Hiona y Leeuwenburgh, 2008].

encontrado que los niveles séricos de testosterona e IGF-1 (implicado en muchas vías anabólicas en el músculo esquelético), en hombres de edad avanzada disminuyen con la edad [Baumgartner et al., 1998]. El tratamiento con testosterona en ratones envejecidos (22 meses de edad) revierte la sarcopenia, a través de la supresión de los niveles de miostatina y estrés oxidante (EOx) entre otros [Kovacheva et al., 2010]. El tratamiento con hormona de crecimiento en ratas *Wistar* macho de 22 meses de edad, mostró aumento en la síntesis de proteínas del músculo esquelético y en las vías de biogénesis mitocondrial [Brioché et al., 2014]. Las mujeres de la tercera edad son comúnmente más obesas con una reducida masa magra apendicular, en comparación con mujeres de la misma edad de países occidentales. Sin embargo el estudio comparativo de mujeres jóvenes y adultas mayores asiáticas, no mostró diferencias en el contenido de masa magra apendicular, por lo que, la disminución de la fuerza de agarre y deterioro de la función física, pudiera deberse a la cantidad de estrógenos que repercuten en la calidad de masa muscular [Oliveira et al., 2011; Chen et al., 2017]. Se ha observado que el tratamiento con β -estradiol atenúa la tasa de atrofia muscular por desuso y se ha demostrado que puede estar relacionado con el aumento de células satélite en ratas hembra ovacteriomizadas, con incremento en la proliferación de músculo esquelético en comparación con ratas no tratadas, también tiene efecto sobre la actividad de las células satélite mediado por el receptor de estrógenos α [Velders y Diel, 2013].

1.3 Generalidades del músculo esquelético

Los músculos componen aproximadamente el 50% del peso corporal y se pueden clasificar basados en tres criterios:

1. Anatómicamente: Esquelético, cardíaco y visceral
2. Histológicamente: Liso y estriado
3. Control: Voluntario e involuntario

El 40 % de la composición corporal es de músculo esquelético y el otro 10% corresponde a músculo liso y cardíaco [Guyton et al., 1999]. Los músculos esqueléticos son los responsables de la posición del cuerpo así como de movimientos necesarios para caminar, correr, levantar objetos pesados, y la realización movimientos finos; todos estos llevados a cabo de forma voluntaria. Los músculos esqueléticos producen calor con el temblor (contracción involuntaria) en respuesta a una temperatura corporal menor a la normal, con la finalidad de mantener la homeostasis térmica [Hammel y Pierce 1968]. El músculo esquelético tiene múltiples propiedades como la excitabilidad, contractibilidad, elasticidad, extensibilidad y plasticidad muscular. La excitabilidad es la facultad de percibir un estímulo y responder al mismo, originando la contracción muscular o contractibilidad. Las fibras musculares tienen la capacidad para acortarse y recuperar su longitud en descanso, después del estiramiento, y cuando se relajan pueden estirarse más allá de la longitud de descanso lo que denominan extensibilidad [Gajdosik, 2001]. Por otra parte, el músculo se adapta al tipo de esfuerzo que se realice y determinar el tipo de fibras musculares para cada tipo de entrenamiento.

1.3.1 Anatomía funcional del músculo esquelético

El músculo esquelético, también llamado estriado, está conformado por células largas y delgadas de tamaño variable de 1 a 50mm de longitud, el diámetro ronda alrededor de las 40 a 50 micras. Las células musculares o fibras musculares se forman a partir de múltiples células embrionarias, por tanto son multinucleadas y están rodeadas por una membrana llamada sarcolema, que a su vez está limitada por tejido conectivo llamado endomisio. El músculo consta de varios haces de musculo esquelético conocidos como fascículos, los cuales están limitados por el perimisio y éste se continua con tejido conectivo tosco que cubre al músculo y lleva por nombre epimisio [Jacob, 1988; Exeter y Connell, 2010] (**Figura 6**).

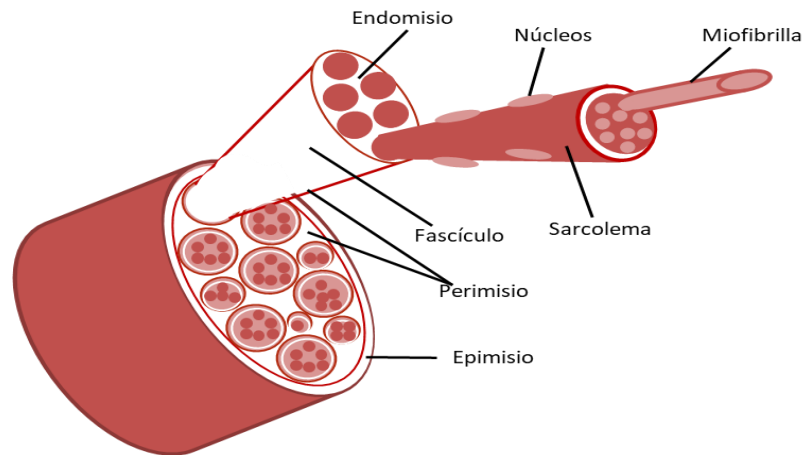


Fig. 3 Estructura del músculo esquelético. La imagen muestra los componentes del músculo esquelético (Elaboración propia).

Cada fibra muscular está formada por miles de miofibrillas y cada miofibrilla está compuesta por múltiples subunidades llamados sarcómeros; el sarcómero es la unidad más simple de una miofibrilla y constituye la base de la contracción [Guyton et al., 1999; Exeter y Connell, 2010]. Las miofibrillas nacen de la disposición de filamentos gruesos y

delgados. Los filamentos gruesos se componen de la proteína miosina y los filamentos delgados de actina, tropomiosina y troponina. El músculo esquelético visto desde el microscopio electrónico muestra estrías y, estas se denotan con letras así como bandas y líneas **Figura 7** [Jacob, 1988; Guyton et al., 1999; Exeter y Connell, 2010]. La banda oscura o “A” corresponde al filamento grueso superpuesto a cualquier extremo de los filamentos delgados, la banda clara o “I” corresponde a la porción no superpuesta de filamentos delgados y la banda “H” se localiza en la porción central de cada banda “A”; el área entre dos líneas “Z” se llama sarcómero. Las miofibrillas están rodeadas de vesículas y túbulos; los túbulos “T” son transversos que actúan como una red de comunicación y su principal función es transmitir el impulso eléctrico al retículo sarcoplásmico activando la liberación de calcio para llevar a cabo la contracción muscular (**Figura 7**) [Francone, 1988; Exeter y Connell, 2010]. Según la teoría de “Filamento deslizante”, en la contracción la anchura de la banda “I” (filamentos delgados) se acorta al mismo tiempo que la línea “Z”, sin generar cambios en la banda “A” (filamentos gruesos) [Jacob, 1988].

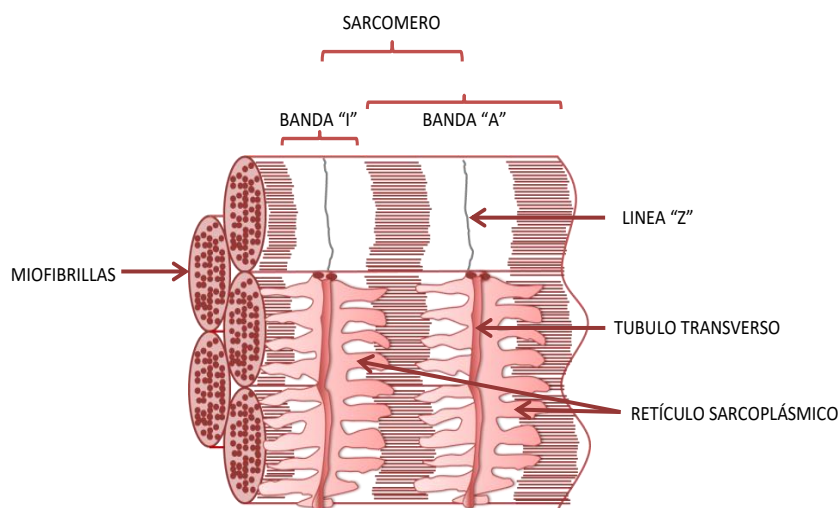


Fig. 4 Esquema miofibrillas de una fibra con retículo sarcoplásmico. Fuente: elaboración propia

1.3.2 Contracción muscular

El proceso de contracción muscular se inicia cuando la célula muscular se despolariza lo suficiente como para que se produzca un potencial de acción, con ello las motoneuronas adyacentes a las células musculares activan receptores nicotínicos para abrir canales de sodio/potasio provocando así la despolarización [Jacob, 1988]. El potencial de acción viaja a lo largo del sarcolema y desciende por el túbulo transverso, activando canales de calcio (tipo "L") en el sarcolema, así como receptores de rianodina en el retículo sarcoplásmico; esto puede aumentar la concentración de calcio citosólico de 100 nM en reposo a alrededor de 1 μ M [Bootman, 2012]. El calcio intracelular elevado se une a troponina en los filamentos de actina, provocando el desplazamiento de la tropomiosina exponiendo los sitios de unión a miosina [Kuo y Ehrlich, 2015]. En la contracción muscular, las proteínas de actina y miosina se deslizan entre sí mediante la interacción de las cabezas globulares y la producción de fuerza proviene del ADP en la miosina, que se unen fuertemente a la actina. La cabeza de miosina se activa con la unión de ATP antes de que inicie el mecanismo de la contracción. La hidrólisis de ATP generará ADP y Pi, lo que activará la unión de la miosina a la actina y con ello la liberación de Pi haciendo más fuerte su unión. El golpe de fuerza se da cuando el ADP se libera y la cabeza de miosina desplaza el filamento de actina hacia la línea media, posteriormente se une otro ATP debilitando la unión de miosina-actina separándose pudiéndose repetir otro ciclo con la hidrólisis de ATP [Wulf et al; 2016].

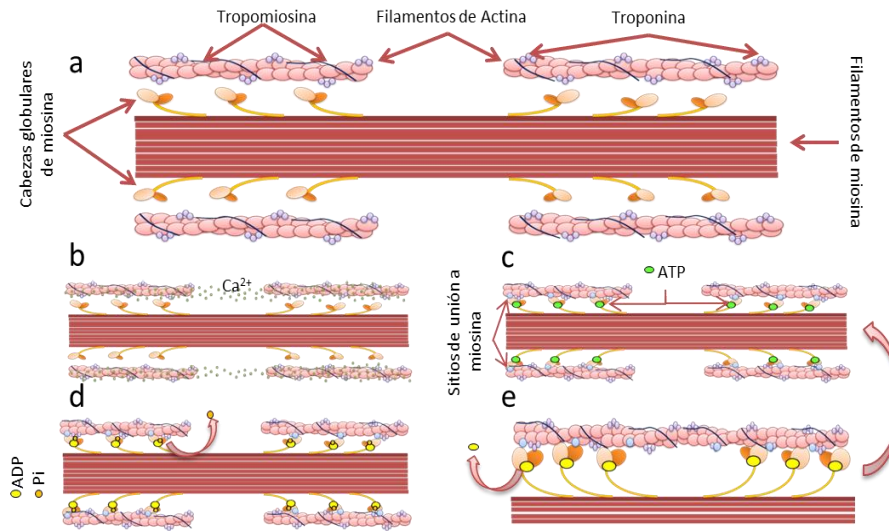


Fig 5. Esquema de la contracción muscular. a) Componentes que llevan a cabo la contracción muscular, b) activación troponina, c) desplazamiento de tropomiosina, exposición del sitio de unión a miosina y activación cabeza de miosina a través de ATP, d) hidrólisis de ATP y eliminación de Pi, e) golpe de fuerza con la salida de ADP. Fuente: elaboración propia.

1.3.3 Fibras musculares

La generación de fuerza depende del tamaño y composición del tipo de fibra muscular, existen cuatro tipos de fibras musculares, las fibras de contracción lenta (Tipo I) y de contracción rápida (Tipo II), que a su vez se subdividen en los subtipos IIA, IIB y IIX. [Rubinstein y Kelly, 2004]. Las fibras de contracción lenta son resistentes a la fatiga, están altamente vascularizadas, presentan un alto contenido de enzimas mitocondriales y oxidativas, se encuentran en mayor proporción en atletas de resistencia; como los maratonistas. Las fibras rápidas o tipo II tienen tiempos de contracción rápida, con alta actividad anaeróbica en corto tiempo, su alta capacidad glucolítica garantiza la generación adecuada de ATP. Se encuentra presente en mayor proporción en atletas de fuerza y

velocistas, éste tipo de fibra muscular se fatigan rápidamente. Las fibras rápidas están dotadas de una poderosa maquinaria contráctil principalmente debido a las diferentes isoformas de miosina (MYH2 en IIA, MYH4 en IIB y MYH1 en fibras IIX) que exhiben una velocidad de acortamiento sarcomérico rápido y una mayor potencia mecánica [Schiaffino, 2011]. Con el envejecimiento las fibras musculares del tipo IIA y IIB se ven disminuidas tanto en el número de fibras como en su área transversal, mientras que las fibras de Tipo I aumentan, tanto en el área transversal como en el número de fibras.

1.4 Ejercicio

El ejercicio es la realización de actividad física de forma regular, la cual tiene que ser repetitiva, estructurada y planificada, destinada a mejorar el estado físico [Caspersen, 1986]. El ejercicio puede prevenir los efectos nocivos del envejecimiento al evitar la disminución de la respiración mitocondrial, mitigar la pérdida de masa muscular relacionada con el envejecimiento y mejorar la sensibilidad a la insulina [Cartee et al, 2016]. La actividad física realizada de forma regular induce una respuesta coordinada de múltiples sistemas y órganos. En el sistema músculo esquelético, una mayor actividad de la ATPasa es directamente proporcional a una mayor velocidad de contracción, y en ejercicios de sobrecarga progresiva existirá hipertrofia; lo que provocará que el músculo se adapte a la creciente carga [Patel y Zwibel, 2020]. Por otra parte se ha informado que el ejercicio de alta intensidad puede incrementar el contenido de la hormona de crecimiento [Felsing et al, 1992] y que ésta podría contribuir a la ganancia de masa magra. La clasificación del ejercicio se basa en el grado de intensidad, fuerza y duración. El ejercicio

exhaustivo ejecutado una vez es un ejercicio agudo o de corta duración, mientras que el entrenamiento de resistencia es crónico o de larga duración y se repite con regularidad [Huang et al., 2010]. La intensidad se define como el grado de esfuerzo que exige un ejercicio y es igual a la potencia necesaria para realizar la actividad física.

Tabla 1. Clasificación de la intensidad del ejercicio

Clasificación de la intensidad de ejercicio			
	Intensidad relativa		Tasa de ejercicio
Clasificación	FC máx	% VO₂ máx R o FCR	escala de Borg
Muy ligera	<35	<20	<10
Ligera	35-54	20-39	10-11
Moderada	55-69	40-59	12-13
Fuerte	70-89	60-84	14-16
Muy fuerte	≥90	≥85	17-19
Máxima	100	100	20

La duración se define como el número de minutos de entrenamiento por sesión y puede oscilar entre 10 y 60 minutos dependiendo de la intensidad, se recomienda sesiones de 20 a 30 minutos de ejercicio leve a moderado para aumentar la utilización de grasa como generador de energía [Aleman et al., 2014].

1.4.1 Fisiología y bioquímica del ejercicio

Con el ejercicio existen cambios importantes a nivel fisiológico por la demanda que éste requiere y va a depender del tipo de ejercicio realizado, pero en general existe un aumento sustancial de la demanda del cuerpo, en comparación con el estado de reposo. En reposo, el sistema nervioso parasimpático mantiene estable la frecuencia respiratoria, el gasto cardíaco y varios procesos metabólicos. Por otra parte, el ejercicio estimula el sistema nervioso simpático, el cual induce una respuesta integral para mantener un nivel apropiado de homeostasis, con el fin de satisfacer los requerimientos de la demanda provocada por el esfuerzo físico, metabólico, respiratorio y cardiovascular [Patel y Zwibel, 2020]. Los cambios relacionados por la demanda del esfuerzo físico en el sistema cardiovascular, conllevan al incremento en el consumo de oxígeno y eliminación de dióxido de carbono; con ello, los niveles de eritropoyetina provocan un aumento en la producción de glóbulos rojos e incremento en la vascularización de los músculos, mejorando el intercambio de gases. El sistema respiratorio se encuentra muy asociado con el sistema circulatorio, los pulmones reciben todo el gasto cardíaco e incrementan la superficie alveolar manteniendo así en equilibrio el intercambio de gases (**Figura 6**). A nivel endócrino la hormona de crecimiento y los niveles de testosterona incrementan para mejorar el crecimiento de huesos, músculos y otros tejidos, así como la sensibilidad a la insulina [Yan et al., 2011].

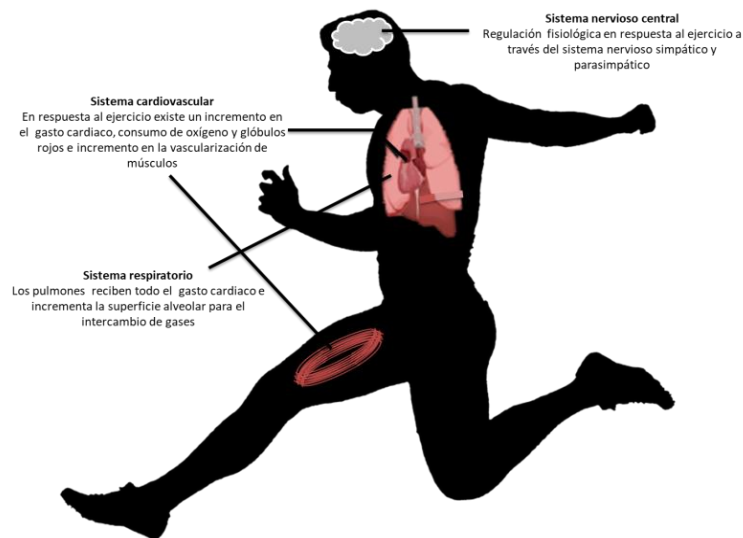


Fig. 6 Regulación fisiológica en respuesta al ejercicio. Fuente: elaboración propia.

La actividad física ha mostrado ser de las intervenciones más importantes para tratar la sarcopenia, ya que ayuda a mejorar la estructura y función muscular, previniendo la discapacidad y la fragilidad en las personas adultas mayores; teniendo efectos benéficos sobre enfermedades metabólicas y cardiovasculares [Phu et al., 2015]. El músculo esquelético, exhibe una excelente plasticidad en respuesta a los cambios de las demandas funcionales. El aumento crónico de la contracción muscular esquelética, como el ejercicio de resistencia, conducen a una variedad de adaptaciones fisiológicas y bioquímicas en el músculo esquelético, incluida la biogénesis mitocondrial, la angiogénesis y la transformación del tipo de fibra. Estos cambios adaptativos son la base para la mejora del rendimiento físico y otros beneficios para la salud [Qaisar et al., 2016]. El ejercicio de resistencia aeróbico, activa la regulación positiva de enzimas mitocondriales implicadas en el ciclo de Krebs, cadena de transporte de electrones, enzimas implicadas en la oxidación de ácidos grasos y las proteínas para la incorporación de glucosa, mejorando la producción

de ATP de forma aeróbica; permitiendo rutinas de ejercicio más largas. Estas adaptaciones permiten al atleta ejercitarse durante mucho tiempo para una intensidad determinada o aumentar la intensidad durante un tiempo determinado de forma eficiente [Beas-Jiménez et al., 2011; Law et al., 2016; Qaisar et al., 2016].

El ejercicio de resistencia-fuerza, implica contracciones de alta intensidad y baja frecuencia, tomando como objetivo la contracción al levantar una fuerza externa para aumentar la masa muscular. Este tipo de ejercicio conduce a la hipertrofia de fibras tipo II mostrando una mayor plasticidad en el tamaño, en comparación con las fibras de tipo I en respuesta a diversos estímulos mecánicos y a diferencia del ejercicio de resistencia aeróbica, tiene un efecto menor sobre el volumen mitocondrial. En estudios recientes, se ha observado que el ejercicio de resistencia aeróbica (ciclismo), el área transversal de las fibras tipo I y II, mientras que en ejercicio de fuerza (levantamiento de pesas) sólo aumentaron las fibras tipo II; en tanto que la expresión de proteínas Akt y mTOR incrementaron para el grupo de ejercicio de resistencia, mientras que para el grupo de fuerza sólo se eleva mTOR después del entrenamiento de fuerza. También se observó una disminución de los niveles de MAFbx e incremento de los niveles de MuRF-1 [Kazior et al., 2016]. Aunque ambos tipos de ejercicio retrasan la pérdida de fuerza y masa muscular esquelética, los efectos del ejercicio aeróbico son menores que el ejercicio de fuerza para el tratamiento de sarcopenia [Qaisar et al., 2016]. Creemos que la combinación de ambos tipos de ejercicio sería un tratamiento más saludable para las personas adultas mayores.

Como se mencionó anteriormente el IGF 1 es una de las principales vías de señalización para el crecimiento muscular, la cual estimula la actividad del objetivo en mamíferos de la rapamicina (mTOR) y el crecimiento muscular a través de PI3K-Akt. La fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K), convierte el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) en fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (PIP3), el cual interactúa con AKT en la membrana celular donde se fosforila y activa [Downward y Weigelt, 2012]. AKT cumple una variedad de funciones celulares con efectos sobre el metabolismo y supervivencia celular, mediante la activación indirecta de mTOR que controla la proliferación celular, traducción de proteínas y autofagia.

También la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) se considera un importante regulador del metabolismo del músculo esquelético durante el ejercicio. De hecho, la AMPK se activa durante el ejercicio y la activación de AMPK por el 5 - aminoimidazol - 4 - carboxiamida - ribonucleósido (AICAR) aumenta la captación de glucosa del músculo esquelético y la oxidación de grasas [Thomson, 2018].

1.5 Metformina

La Metformina (MTF), es un medicamento perteneciente a la familia de las biguadinas, aislada de los extractos de *Galeana officinalis* con efecto antidiabético, sus efectos terapéuticos van desde el tratamiento de la diabetes tipo II, hasta efectos pleiotrópicos como cardio-protección, efectos antiproliferativos, antioxidantes y se ha observado que tiene la capacidad de prolongar la vida de roedores tratados con éste medicamento, así como atenuar la encefalomiелitis autoinmune experimental [Ursini et al., 2018; Nath et al., 2009]. Los primeros estudios mostraron que los sitios potenciales de acción de la MTF

son el receptor de insulina y los transportadores de glucosa, donde se observó que individuos diabéticos hay mayor captación de glucosa en el músculo esquelético y adipocitos; en comparación con individuos no diabéticos, sugiriendo mayor acción de éste fármaco en estado hiperglucémico [Klip y Leiter, 1990]. Este medicamento es altamente prescrito para el tratamiento de la diabetes tipo II [Wessels et al., 2014]. Los pacientes con diabetes tipo II en ayunas presentan elevadas concentraciones de glucosa en plasma, atribuido al aumento de aproximadamente tres veces la tasa de gluconeogénesis y la MTF actúa inhibiendo esta tasa [Hundal et al., 2000]. También se ha encontrado que la MTF inhibe el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial con una reducción en la producción de ATP. Al disminuir la producción de ATP se activa la autofagia celular, mecanismo que favorece a la célula y mejora su funcionamiento. La MTF tiene potencial para uso en el tratamiento de diversas condiciones inflamatorias, ya que inhibe la inflamación inducida por carragenina, así mismo, la MTF mantiene la homeostasis según lo indicado por los niveles casi normales de marcadores de estrés oxidante como glutatión (GSH), sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) (Pandey y Kumar, 2016).

1.5.1 Eliminación de la metformina

La MTF no se metaboliza sino que se excreta sin cambios en la orina, tiene una vida media de aproximadamente 5 horas y su eliminación es a través de la orina. La MTF es absorbida por las células intestinales en la parte apical de la membrana por medio del transportador de monoaminas SLC29A4 (PMAT) y SLC22A3 (OCT3), pasa a torrente sanguíneo por medio

de SLC22A1 (OCT1), que se expresa en la membrana basolateral y apical de los enterocitos para facilitar la transferencia al líquido intersticial. La MTF es incorporada en el hígado mediante OCT1, que se expresa en la membrana basolateral de los hepatocitos, donde reduce la tasa de gluconeogénesis y se elimina del hígado mediante SLC47A1 (MATE1). La eliminación renal también se da por MATE1 y MATE2 que también se expresan en la membrana apical de las células del túbulo proximal renal [Gong et al., 2012].

1.5.2 Farmacodinamia de la MTF

La MTF disminuye la concentración de glucosa suprimiendo la producción hepática mediante la inhibición de la gluconeogénesis, también aumenta la captación de glucosa, señalización de insulina y beta oxidación de ácidos grasos. También participa en la disminución de síntesis de ácidos grasos y triglicéridos [Gong et al., 2012].

La MTF entra a las células por medio del transportador OCT1, además pasa por la membrana plasmática y la membrana interna mitocondrial debido al potencial de membrana. La MTF se acumula dentro de las mitocondrias e inhibe el Complejo I, disminuyendo la producción a ATP, incrementando las proporciones de ADP/ATP y AMP/ATP activando a AMPK [Hawley et al., 2010]. La activación de AMPK, fosforila a las acetil-CoA carboxilasas 1 y 2 (ACC1 y ACC2) las cuales, catalizan la síntesis de malonil-CoA; sustrato para la síntesis de ácidos grasos y regulan de la oxidación de ácidos grasos [Wakil y Abu-Elheiga, 2009]. La fosforilación de estas proteínas inhibe la síntesis de proteínas y promueven la oxidación de grasas, reduciendo así las reservas de lípidos y mejora la sensibilidad a la insulina [Fullerton et al., 2013]. Por otra parte AMPK también activa a

PDE4B, reduciendo cAMP la cual a su vez regula el metabolismo de lípidos y glucosa tras la activación de PKA [Rena et al., 2017]. PKA fosforila numerosas enzimas metabólicas incluidas la glucógeno sintasa, que inhibe la síntesis de glucógeno y la fosforilasa cinasa, que inhibe la síntesis de glucógeno, así como la acetil CoA carboxilasa que inhibe la síntesis de lípidos [Sassone-Corsi, 2012]. En músculo esquelético la activación de AMPK resulta en un aumento en la captación de glucosa por GLUT4.

1.6 Especies Reactivas de Oxígeno y sistema de defensa antioxidante

En organismos aerobios y aerotolerantes existe un balance entre la producción de ERO y el sistema de defensa antioxidante que mantiene la homeostasis, regulando así el estado redox intracelular. Las ERO incluyen el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH\cdot$). Los antioxidantes se pueden dividir en dos clases: los enzimáticos y no enzimáticos: dentro de los enzimáticos existen la SOD, CAT y glutatión peroxidasa (GPx); mientras que en los no enzimáticos se encuentran las vitaminas C y E, así como β -carotenos, ácido úrico y el tripéptido GSH [Birben et al., 2012].

El O_2^- generado en los tejidos a través del metabolismo o reacciones en las células, se convierte catalíticamente en H_2O_2 y O_2 por la SOD. El H_2O_2 cuando se acumula es tóxico para los tejidos y células del cuerpo en presencia de Fe^{2+} , se convierte en el radical $OH\cdot$ a través de la reacción de Fenton. Para prevenir este fenómeno, la catalasa descompone el H_2O_2 en agua y O_2 , lo que reduce el daño inducido por los radicales libres. La catalasa está ausente en las mitocondrias, por lo que la reducción del H_2O_2 a agua, se lleva a cabo mediante GPx [Ighodaro y Akinloye, 2018; Kulbacka *et al.*, 2012].

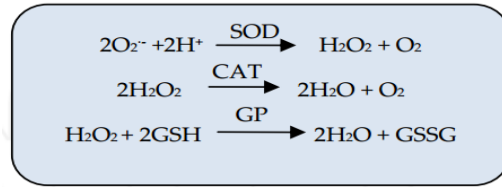


Fig. 7 Productos de algunas enzimas con función antioxidante. SOD tiene la capacidad de dismutar al O_2^- para convertirlo en H_2O_2 , CAT transforma H_2O_2 en H_2O y O_2 ; GPx reduce al H_2O_2 y ROOH para formar H_2O [Kulbacka *et al.*, 2012].

El factor de transcripción Nrf2 regula la expresión de genes de enzimas antioxidantes anteriormente mencionadas, ayudando a la desintoxicar el exceso de ERO, mediante su unión a la secuencia conocida como ARE (de sus siglas en inglés: "Antioxidant Response Element") en el ADN. Nrf2 se encuentra secuestrada por el homodímero Keap1 en el citosol y degradada por ubiquitinación. En respuesta a tensiones endógenas o exógenas, la degradación se detiene y Nrf2 puede pasar al núcleo para transcribir genes que codifican para enzimas con función antioxidante.

1.6.1 Estrés oxidante y daño a biomoléculas

La pérdida de la homeostasis provoca el estado de estrés oxidante, que puede conducir a la formación de daños en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que eventualmente induce alteraciones en las funciones metabólicas e inclusive la muerte (Venereo, 2002; Marnett *et al.*, 2003). Por otra parte, la proporción entre glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG) es un parámetro importante en el estrés oxidante. La alta proporción de GSH/GSSG es importante proteger a la célula del daño por estrés oxidante. Dentro de los principales daños que se generan en el ADN por parte de ERO son el rompimiento de

cadena sencilla, de doble cadena, así como la formación de aductos, como la 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG), la cual ha sido utilizada como marcador de daño al ADN por estrés oxidante. La oxidación de proteínas es particularmente perjudicial ya que los daños resultantes y / o los cambios conformacionales inducidos en las estructuras de las proteínas pueden hacer que las proteínas oxidadas sean inactivas y dar lugar a anomalías funcionales celulares. En proteínas las ERO pueden causar fragmentación de la cadena peptídica, alteraciones en su carga, entrecruzamientos proteicos y oxidación de aminoácidos y conducir a la proteólisis [Kelly y Mudway, 2003].

1.6.2 Estrés oxidante y metformina

La hiperglucemia da como resultado un incremento de las ERO, lo que conduce al incremento de estrés oxidante. La resistencia a la insulina también es causada por factores adquiridos como la obesidad y el estilo de vida sedentario que, en conjunto, son causales de la diabetes tipo 2, que se caracteriza por la sobreproducción de glucosa hepática, disminución de la secreción de insulina y resistencia a la insulina [Evans, et al., 2002]. En la diabetes no controlada los niveles de superóxido dismutasa (SOD) disminuyen, y se ha asociado a la deficiencia de catalasa con una mayor frecuencia de diabetes. La MTF tiene un potencial para su uso en el tratamiento de diversas condiciones inflamatorias ya que inhibe la inflamación inducida por carragenina, así mismo, la MTF mantiene la homeostasis según lo indicado por los niveles casi normales de marcadores de estrés oxidante como el GSH, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, CAT y SOD (Pandey y Kumar, 2016).

1.6.3 Ejercicio y estrés oxidante

El ejercicio aeróbico de alta intensidad, produce una mayor cantidad de ERO que el ejercicio con intensidad moderada, ya que un mayor consumo de oxígeno en las fibras musculares reduce la tensión de oxígeno intracelular durante el ejercicio, lo que puede promover una mayor producción de ERO [Clanton, 2007]. Lo anterior puede afectar a tejidos no preparados para éste evento (sedentarios), sin embargo, puede activar respuestas adaptativas al estrés oxidante mediante una regulación positiva; por ejemplo con el ejercicio se activa Nrf2 e induce la transcripción de genes de enzimas antioxidantes como MnSOD mitocondrial. El ejercicio regular también se ha reportado que aumenta SOD y GPx, para adaptarse a las tensiones de estrés más fuertes [Franco et al., 1999]. Éste es uno de los hallazgos más importantes, ya que la contracción muscular puede activar vías de transducción de señales sensibles al estado redox y regular la homeostasis de ERO [Ji, et al., 2010].

1.7 Hormesis

La hormesis está definida como el proceso por el cual, la exposición a agente químico o bien un factor ambiental que es dañino a dosis altas, a dosis bajas y repetidas, induce una respuesta adaptativa y/o un efecto benéfico en la célula u el organismo [López-Otín et al., 2013]; éste fenómeno es llamado “hormesis acondicionadora”. Durante la hormesis los desafíos estresantes leves, pueden regular al alza, vías de defensa o reparación con una mejora subsiguiente al estímulo. Otro tipo de hormesis es la “hormesis acondicionadora posterior a la exposición”, donde después de la exposición a altas concentraciones del

tóxico éste puede experimentar mejoras cuando se vuelve a exponer a bajas concentraciones del tóxico [Kyriazis, 2016]. Existe una clara evidencia de que una serie aguda de ejercicio intenso genera suficientes ERO para desafiar el sistema de defensa antioxidante del cuerpo, la activación de vías sensibles al estado redox generalmente da como resultado productos génicos que restauran la hemeostasis oxidante-antioxidante intracelular, como son la expresión de genes que codifican para SOD y GPx [Ji et al., 2010].

2. Justificación

La población mundial está envejeciendo, pero eso no es un indicativo que el aumento de la longevidad esté acompañada de buena salud, y normalmente viene acompañada de enfermedades crónicas y discapacidad. Es por ello que, es importante implementar estrategias para prevenir, tratar y retrasar las enfermedades que aquejan al adulto mayor. La principal discapacidad en las personas adultas mayores está asociada al movimiento y éste generalmente se debe a la pérdida de masa y fuerza muscular esquelética. Una de las principales estrategias para el tratamiento y prevención de discapacidad asociado con el movimiento y la realización de actividades cotidianas en el envejecimiento, es la realización de ejercicio. Sin embargo muchas de las personas adultas mayores no tiene la capacidad de realizar actividad física “*per se*” y se deben de hallar estrategias farmacéuticas para la prevención y tratamiento. La MTF ha sido considerada un fármaco geroprotector anti envejecimiento, ya que muchos estudios mostraron efectos positivos en la vida útil de gusanos, moscas, ratones y ratas, además de que a pacientes diabéticos y con enfermedades cardiovasculares tienen mayor tasa de supervivencia. Por lo que éste estudio, pretende mostrar el efecto del ejercicio moderado asociado al tratamiento con MTF en la prevención de la masa y fuerza muscular asociada al envejecimiento.

3. Pregunta de investigación

¿El ejercicio asociado al tratamiento con MTF retardará la aparición de sarcopenia durante el envejecimiento en ratas hembras de la cepa Wistar?

4. Hipótesis

Se sabe que el ejercicio es un factor que retrasa el desarrollo de la sarcopenia, por lo que si se combina con la administración de la MTF, se espera que se prevenga el desarrollo de la sarcopenia durante el envejecimiento.

5. objetivos

5.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto del ejercicio moderado en conjunto con la administración de MTF como medida preventiva de la sarcopenia en ratas hembras viejas de la cepa Wistar.

5.2 Objetivos particulares

- Evaluar si el tratamiento de MTF sola o en combinación con el ejercicio moderado modifica los parámetros morfométricos, así como los parámetros bioquímicos de la sangre de las ratas.
- Evaluar la capacidad del tratamiento de MTF sola o en combinación con el ejercicio moderado para prevenir la pérdida de la masa ósea, de músculo, la fuerza de agarre, así como el aumento de la grasa corporal.
- Evaluar el estado redox y el daño oxidante a proteínas en el músculo gastrocnemio después del tratamiento de MTF sola o en combinación con el ejercicio moderado.

6. Material y Métodos

Todos los procedimientos con animales se realizaron estrictamente de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud y los Principios de la Norma Oficial Mexicana de Ética 062-ZOO-1999 y la Norma para la disposición de desechos biológicos (NOM- 087-ECOL-1995).

6.1 Grupos experimentales

Se utilizaron ciento sesenta ratas hembra de la cepa *Wistar* nulíparas de 4 meses de edad, la cuales fueron divididas en 6 grupos:

1. S-Ratas sedentarias, que no tuvieron ningún tratamiento y que se eutanizaron a los 24 meses de edad.
2. SM12- Ratas sedentarias a las cuales se les administró MTF por un año, de los 12 a los 24 meses de edad, momento en el cual se realizó la eutanasia.
3. SM18- Ratas sedentarias a las cuales se les administró MTF por seis meses, de los 18 a los 24 meses de edad, momento en el cual se realizó la eutanasia.
4. E- Ratas que realizaron ejercicio por 20 meses (de los 4 a los 24 meses).
5. EM12- Ratas que realizaron ejercicio por 20 meses (de los 4 a los 24 meses) y que además fueron tratadas con MTF de los 12 a los 24 meses de edad.
6. EM18- Ratas que realizaron ejercicio por 20 meses (de los 4 a los 24 meses) y que además fueron tratadas con MTF por seis meses, de los 18 a los 24 meses de edad.

Las ratas de los grupo “E”, realizaron una rutina de ejercicio desde los 4 meses de edad en la caminadora para animales pequeños (Panlab / Harvard Apparatus) a una velocidad controlada de 25 cm/s, 30 min al día, por 5 días a la semana durante 20 meses.

La MTF se administró diariamente por vía oral a una concentración de 100 mg/kg de peso corporal [Cheng et al., 2006; Amini et al., 2012].

Todas la ratas fueron proporcionadas por el bioterio de la UAM-I y mantenidas bajo condiciones de luz-oscuridad invertida (L12/O12), a una temperatura de 25°C con agua y alimento (Harlan 2018S, EE. UU.) *ad libitum*. Las ratas fueron alojadas en jaulas de policarbonato con un máximo de 5 y un mínimo de 4 ratas por caja.

Tabla 2. Grupos ratas *Wistar hembras nulíparas*. Obtención muestras, edades de inicio y término del experimento.

Grupo	Tratamiento	Obtención muestras	Inicio Meses (m)	Término Meses (m)
(1) S		12, 18 y 24	-	-
(2) SM12	Sedentaria + MTF	24	12	24
(3) SM18	Sedentaria + MTF	24	18	24
(4) E	Ejercicio	12, 18 y 24	4	24
(5) EM12	Ejercicio + MTF	24	12	24
(6) EM18	Ejercicio + MTF	24	18	24

Sedentarias (S), Ejercicio (E), Metformina (MTF), los números junto a la letra representan el inicio de tratamiento.

6.2 Parámetros morfométricos y bioquímicos en sangre

Para obtener las dimensiones morfométricas, los animales se pesaron y midieron cada 4 meses. Para las determinaciones bioquímicas, la sangre se extrajo durante el sacrificio y se realizaron tomas de muestras intermedias sin sacrificio por goteo, realizando una pequeña incisión de 0.5 cm en la parte media de la cola del animal. El suero se obtuvo por centrifugación a 3500 rpm durante 10 min. Posteriormente, se determinaron glucosa, colesterol, triglicéridos, creatinina, AST, ALT y HDL utilizando el analizador químico SPOTCHEM EZ SP-4430.

6.3 Determinación de fuerza

Se evaluó la fuerza de agarre utilizando un dinamómetro digital Rhino BAC-20 (PKCh) con un rango de medición entre 0.1 y 200 Newton (N). El dinamómetro se instaló verticalmente sobre una pantalla de policarbonato y una rejilla de acero inoxidable para registrar la fuerza máxima de agarre. Para evaluar la fuerza máxima de agarre, la rata se dispuso en la parte superior de la rejilla y después de asegurarse que estaba bien sujeta, se jaló de la cola en dirección vertical hacia abajo y se tomó la lectura en el momento en que la rata se soltó de la rejilla. Los resultados se expresaron como N / kg de peso de rata.

6.4 Absorciometría con Rayos X de Doble Energía (DXA)

Para la exploración corporal mediante absorciometría de doble emisión de rayos X (DXA) (Serie Discovery QDR, Hologic® Discover) se requirió sedación química. Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla que contenía ketamina (100 mg / kg; Anesket® Pisa

Farmacéutica Mexicana) y xilacina (5 mg / kg; Procin® Pisa Farmacéutica Mexicana) administrada vía intramuscular. Se realizaron mediciones de todos los grupos cada 4 meses (4, 8, 12, 16 y 20), hasta su sacrificio a los 24 m de edad. Antes de cada evaluación, el equipo se calibró con "Hologic Rat Step Phantom P / N 010-0758" y se obtuvieron resultados de la proporción corporal total y de la región de las extremidades posteriores, el análisis arrojó la cantidad de masa magra, ósea y grasa corporal.

6.5 Obtención de gastrocnemio para cortes histológicos y pruebas bioquímicas

Las ratas fueron eutanizadas a los 24 meses de edad de los grupos "S", "E", "SM12", "SM18", "EM12" y "EM18" por decapitación. Se disectó el músculo gastrocnemio, se guardaron alícuotas de 100 mg de músculo gastrocnemio para realizar cortes histológicos y realizar pruebas bioquímicas.

6.6 Determinación del estado redox en gastrocnemio (GSH/GSSG)

El contenido de GSH y disulfuro de glutatión (GSSG) se determinó por la técnica high-performance liquid chromatography (HPLC) siguiendo el protocolo descrito por (Fariss, 1987; Gómez-Quiroz, 2008), con algunas modificaciones. Se tomaron 100 mg de tejido, se adicionó 1 mL de ácido perclórico/BPDS (APC/BPDS 1mM) y se disgregó con el sistema POLYTRON PT 1600 E "ECO LINE" sobre hielo durante 30 s; la suspensión se centrifugó a 10,000 x g durante 5 min a 4°C. Se utilizó el extracto puro a una dilución 1:10 con PBS, sin derivatizar. Se tomaron 100 µL de cada muestra e inyectaran al sistema de HPLC [Waters] y separados por una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 de 4.6 x 250 mm y 5 µm de

partícula, utilizando como fase móvil acetonitrilo al 1% y buffer de fosfato de potasio (KH₂PO₄) a pH = 2.7 (20 mM). Los eluidos fueron analizados por detección ultravioleta a 265 nm. El área bajo la curva se determinó mediante el uso de estándares de GSH/GSSG partiendo de diferentes concentraciones [10, 25, 50, 100, 200 y 400 µM].

6.7 Histología, Hematoxilina-Eosina

Se tomaron 100 mg de músculo gastrocnemio y se fijaron inmediatamente en formalina neutra al 10% durante 1 mes. Se lavaron con solución de alcohol etílico al 70%, se deshidrataron en baños sucesivos en soluciones con concentración crecientes de alcohol etílico (80%, 96% y etanol absoluto), una vez deshidratados se aclararon con xilol y fueron incluidos en parafina. Se obtuvieron cortes de 5 µm por medio del micrótopo (Leica Instruments GmbH) y se realizó la tinción H-E. Los cortes fueron visualizados en un microscopio óptico AXIOVERT 100 (Zeiss).

6.8 Extracción y cuantificación de proteínas

Se disgregaron 100 mg de músculo gastrocnemio para la obtención de proteínas totales, para ello se prepararon 10 mL de buffer de lisis T-PER suplementado con DL-ditiotreitol (DTT) 1 M, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.1 M y una pastilla cocktail minicomplete. Se agregó al tejido 200 µL de buffer de lisis T-Per, suplementado. Se incubó el homogenizado durante 5 min en hielo, posteriormente se centrifugó a 14 000 xg por 20

min y se recuperó el sobrenadante. Se cuantificaron las proteínas totales por medio del método de Bradford en placas de 96 pozos.

6.9 Daño a proteínas por estrés oxidante

Las proteínas carboniladas son el resultado de diversas reacciones oxidantes, su estructura es dañada por los radicales libres originando un grupo carbonilo (aldehído o cetona) en las cadenas laterales de los aminoácidos, por lo tanto, son un marcador estándar del estrés oxidante. La concentración de proteínas carboniladas, se determinó mediante el empleo de la 2, 4 dinitrofenilhidrazina (DNPH), donde los grupos carbonilos (aldehídos y cetonas) reaccionan con este compuesto formando fenilhidrazona precipitando en color amarillo. Se prepararon 10 mL de la solución de DNPH (10mM) en ácido fosfórico H₃PO₄ (0.5 M). En la solución se formó un sedimento nuboso el cual fue filtrado con papel Whatman (11 μm). Para la evaluación de oxidación de proteínas se adicionó 20 μL de la solución de DNPH a 20 μL de muestra, en placas de 96 pozos y se dejó incubar 10 min en oscuridad con agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaran 10 μL de NaOH (6 M) y se incubó nuevamente durante 10 min con agitación constante a temperatura ambiente.

La lectura de la placa se realizará en el lector de ELISA H Reader 1[®] (HLAB) a una longitud de onda de 450 nm. Para calcular la concentración de proteínas oxidadas se utilizará el coeficiente de extinción molar de 22,308 M⁻¹cm⁻¹ [Mezquita et al., 2014]. La concentración de proteínas oxidadas, fue normalizada con la cuantificación de proteínas totales por medio de Bradford.

6.10 Determinación de Nrf2

Se determinó el contenido de la proteína Nrf2 (Santa Cruz Biotechnology sc-722) en tejido muscular esquelético del gastrocnemio por medio de la técnica de Western Blot; utilizando como control de carga actina. Se cargaron 30 µg de proteína (previamente obtenida y cuantificada) en un gel SDS-PAGE al 12%. Fueron separadas y transferidas a una membrana de PVDF activada con metanol con el equipo Trans-Blot Turbo Transfer System (BIO RAD). Una vez transferidas las proteínas, las membranas fueron bloqueadas con TBS-Tween 0.1%, 0.5% leche libre de grasa durante 1 hora, pasado este tiempo las membranas fueron lavadas con lavadas TBS-Tween 0.1% tres veces cada lavado con una duración de 15 minutos, posteriormente se incubaron con el anticuerpo Nrf2 a una dilución 1:1000 durante 2 horas. Las membranas fueron lavadas nuevamente tres veces con TBS-tween e incubadas la solución de bloqueo TBS-Tween-Leche durante 1 hora, se volvió a lavar con la solución de lavado y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario HRP mouse anti rabbit (sc-2357) a una dilución 1:1000, pasado este tiempo las membranas fueron se lavadas tres veces más y los blots fueron revelados utilizando un reactivo quimioluminiscente comercial (Supersignal, USA).

6.11 Análisis estadístico

Los datos se presentan como media \pm desviación estándar de cada grupo de animales (n = 5). Las curvas de crecimiento de la población se establecieron mediante correlaciones polinomiales. Las diferencias entre los grupos se determinaron mediante análisis multivariado (MANOVA). Las diferencias en el estado redox se determinaron mediante un

ANOVA seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. En todos los casos, se menciona el significado utilizado. Para los carbonilos se usó la prueba de Kruskal-Wallis.

7. RESULTADOS

7.1 Determinaciones bioquímicas

Se evaluó el contenido de las transaminasas Aspartato Aminotransferasa (AST) y Alanina Amino Transaminasa (ALT), así como otros parámetros como colesterol total, HDL, triglicéridos, creatinina y niveles de glucosa en ayunas a los 24 meses de edad, cuando los animales fueron eutanizados. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3. Se observa que aunque hubo algunos cambios significativos en algunos parámetros, todos los datos obtenidos se mantienen en los rangos reportados como normales por los Parámetros de Laboratorio Clínico para ratas Wistar [Gikins y Clifford, 2008]. De manera que ni el tratamiento con MTF, ni el ejercicio solo o el tratamiento combinado, modificaron los parámetros evaluados. Entre los parámetros que aumentaron en comparación con el grupo S, se encuentran los niveles de creatinina en animales ejercitados y los niveles de AST en todos los grupos. Sin embargo, aunque fue interesante, ninguno de ellos estaba fuera de los rangos normales informados [Gikins y Clifford, 2008].

Tabla 3. Parámetros bioquímicos. La tabla muestra el contenido de los parámetros bioquímicos evaluados a los 24 meses de edad.

Prueba	S	SM 12-24	SM 18-24	E	EM 12-24	EM 18-24
Glucosa (89-163 mg/dL)	97.33 ± 33.29	96.25 ± 6.02 a= 0.72	89.25 ± 20.56 a=0.70	92.8 ± 24.23 a=0.82	97.5 ± 6.85 a=0.72	70 ± 26.20 a=0.29
Colesterol Total (23-97 mg/dL)	69.66 ± 22.14	84.25 ± 21.18 a= 0.42	101 ± 43.61 a=0.27	107.4 ± 26.99 a=0.10	113 ± 60.45 a=0.16	83.8 ± 27.99 a=0.46
HDL (32.8 mg/dL)	20.66 ± 7.37	21.5 ± 5 a= 0.85	22.75 ± 10.53 a=0.72	32 ± 9.02 a=0.11	32.5 ± 11.21 a=0.15	25.2 ± 9.83 a=0.52
Triglicéridos (16-175 mg/dL)	98.66 ± 42.12	126.66 ± 37.28 a= 0.43	127.4 ± 87.80 a=0.55	117.6 ± 20.67 a=0.52	110.5 ± 43.74 a=0.73	163.2 ± 58.91 a=0.12
Creatinina (0.3-0.6 mg/dL)	0.2 ± 0	0.25 ± 0.057 a= 0.17	0.2 ± 0 a=1.000	0.62 ± 0.08 a=0.0001	0.525 ± 0.22 a=0.037	0.42 ± 0.31 a=0.24
AST (64-222 U/L)	55.66 ± 47.96	163.25 ± 42.07 a= 0.03	155 ± 23.84 a=0.014	183.2 ± 28.23 a=0.011	223.5 ± 48.67 a=0.007	187.75 ± 55.37 a=0.02
ALT (14-64 U/L)	15.33 ± 9.23	31 ± 2.94 a= 0.03	29.25 ± 8.95 a=0.07	26.6 ± 14.58 a=0.23	27.75 ± 10.62 a=0.16	25 ± 12.51 a=0.26

7.2 Análisis morfométrico y absorciometría de rayos X de doble energía (DXA)

Con el fin de analizar mejor nuestros grupos de estudio y comparar el comportamiento de algunas variables importantes, decidimos transformar los datos como grupos poblacionales para compararlos longitudinalmente y se realizó una curva de correlación polinomial para describir las etapas de desarrollo de la rata. En primer lugar, realizamos un análisis multivariado de las variables morfométricas: peso corporal, longitud nasorectal e índice de masa corporal (IMC), comparando solo las ratas ejercitadas vs. las ratas sedentarias a los 8, 12, 18, 20 y 24 meses de edad. En la **Figura 8** se puede observar un aumento del peso corporal de las ratas sedentarias con respecto a la edad, con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9879$. Las ratas ejercitadas mostraron un aumento de peso corporal similar con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9353$. Ambos grupos presentaron dos etapas donde se observaron incrementos significativos. El primero fue entre los 8 y 12 meses de edad, donde se determinó un aumento significativo de peso corporal, 16.39% para ratas sedentarias ($p = 0.012$) y 15% para ratas ejercitadas ($p = 0.025$). La segunda etapa fue entre los 12 y 18 meses, en la que los animales sedentarios mostraron un aumento de peso corporal del 15.49% ($p = 0.035$) y los animales ejercitados del 13.04% ($p = 0.05$). Las curvas de peso mostraron que las ratas sedentarias eran más pesadas que las ratas ejercitadas.

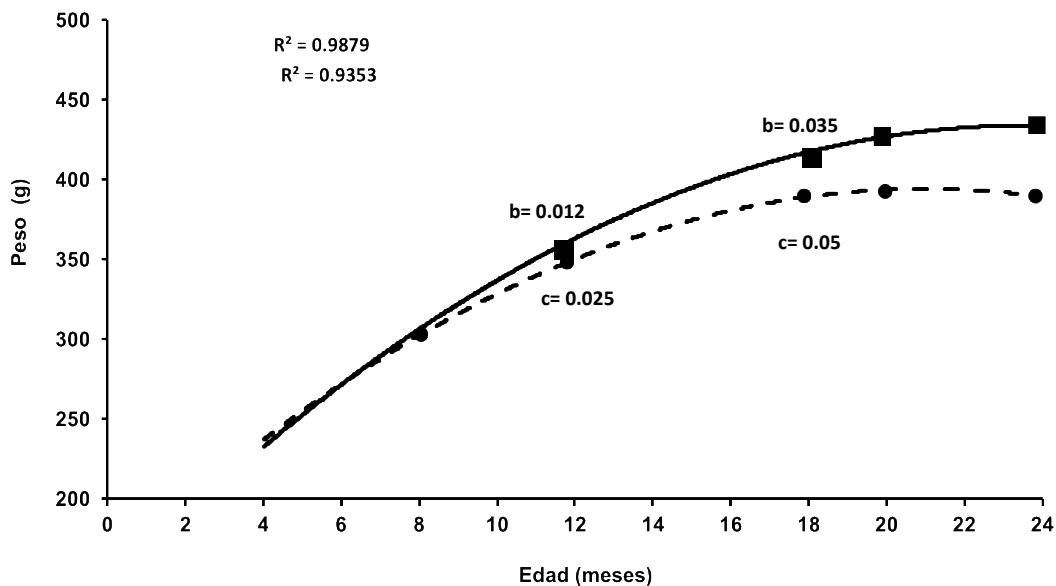


Fig. 8 Peso Corporal. La curva de crecimiento se realizó evaluando el peso corporal de los animales sedentarios (línea sólida) y ejercitados (línea punteada). Las mediciones se determinaron cada 4 meses (4, 8, 12, 18, 20 y 24 meses) en ratas sedentarias (S) y ejercitadas (E). Cada punto de la curva representa la media de todos los experimentos independientes realizados en cada grupo de animales ($n = 5$); las curvas de crecimiento se establecieron mediante un ajuste polinomial (R^2). Las diferencias entre edades se determinaron comparando cada edad con su predecesora y se indican como (b) para las ratas sedentarias y (c) para las ratas ejercitadas.

La **Figura 9**, ilustra los resultados obtenidos para las medidas de longitud naso-rectal. En ambos grupos, la longitud aumentó con la edad durante los mismos períodos de tiempo en los que aumentó el peso. De 8 a 12 meses de edad los animales sedentarios crecieron 5.18% ($p = 0.012$) y los ejercitaron 4.24% ($p = 0.015$); mientras que de 12 a 18 meses de edad las ratas sedentarias aumentaron su longitud 3.13% ($p = 0.005$) y las ratas ejercitadas 2.26% ($p = 0.01$). Las curvas longitudinales naso-rectales mostraron coeficientes de correlación de $R^2 = 0.927$ para las ratas sedentarias y $R^2 = 0.74$ para las ratas ejercitadas.

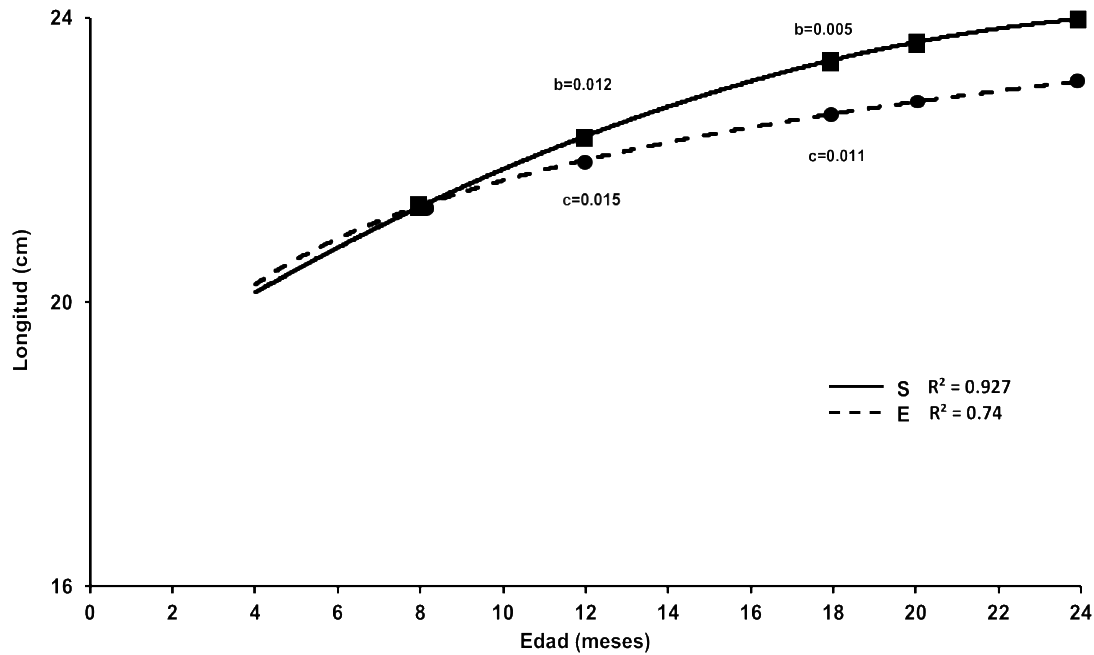


Fig. 9 Talla. La curva de talla se realizó evaluando la longitud naso-rectal de los animales sedentarios (línea sólida) y ejercitados (línea punteada). Las mediciones se determinaron cada 4 meses (4, 8, 12, 18, 20 y 24 meses) en ratas sedentarias (S) y ejercitadas (E). Cada punto de la curva representa la media de todos los experimentos independientes realizados en cada grupo de animales ($n = 5$); las curvas de crecimiento se establecieron mediante un ajuste polinomial (R^2). El valor de probabilidad exacto se indica en el gráfico. Las diferencias entre edades se determinaron comparando cada edad con su predecesora y se indican como (b) para las ratas sedentarias y (c) para las ratas ejercitadas. Las comparaciones se establecieron mediante una prueba multivariante y se corroboraron con una prueba t-student.

A continuación, se evaluó el IMC. Este parámetro se usa comúnmente para determinar el estado nutricional y el desarrollo de los organismos y proporciona información indirecta sobre la composición corporal. La población analizada mostró resultados muy interesantes, tanto las ratas sedentarias como las ejercitadas presentaron tres etapas en las que cambió el IMC (**Figura 10**). El primero fue entre los 4-8 meses de edad, donde se observó un incremento en el IMC, 8.5% para ratas sedentarias ($p = 0.023$) y 7.5% para

ratas ejercitadas ($p = 0.019$). La segunda etapa fue entre 8 y 12 meses, donde el IMC aumentó un 16% para las ratas sedentarias ($p = 0.045$) y un 13% ($p = 0.015$) para las que hacían ejercicio. En la tercera etapa (de 18 a 24 meses de edad) el incremento del IMC para ratas sedentarias fue del 8% ($p = 0.037$) y del 10% ($p = 0.025$) para las ejercitadas. El IMC fue similar en ambos grupos hasta los 24 meses de edad. Este parámetro es relevante ya que indica la relación entre altura y masa en los grupos experimentales de manera más objetiva, por lo que se utilizó éste parámetro para comparar los otros grupos experimentales.

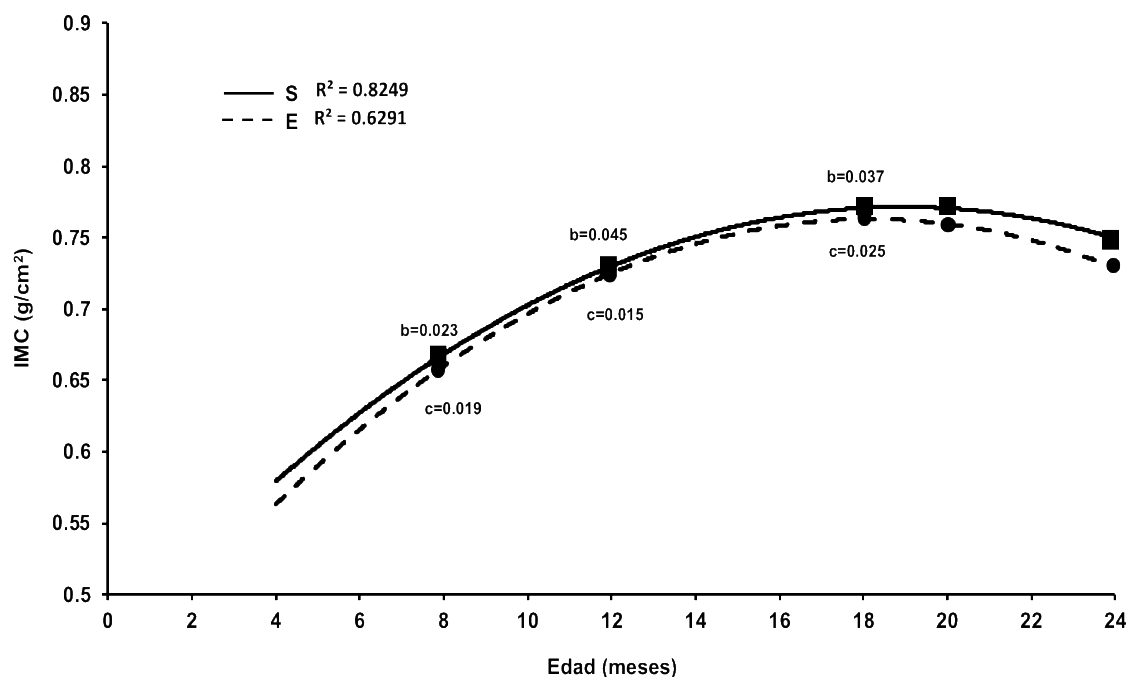


Fig. 10 Índice de Masa Corporal. La curva de los animales sedentarios (línea sólida) y ejercitados (línea punteada). Las mediciones se determinaron cada 4 meses (4, 8, 12, 18, 20 y 24 meses) en ratas sedentarias (S) y ejercitadas (E). Cada punto de la curva representa la media de todos los experimentos independientes realizados en cada grupo de animales ($n = 5$); las curvas de crecimiento se establecieron mediante un ajuste polinomial (R^2). Las diferencias entre edades se determinaron comparando cada edad con su predecesora y se indican como (b) para las ratas sedentarias y (c) para las ratas

ejercitadas. El valor de probabilidad exacto se indica en el gráfico. Las comparaciones se establecieron mediante una prueba multivariante y se corroboraron con una prueba t-student.

Debido a que se observaron diferencias importantes en el IMC a los 12 y 18 meses de edad, y dado que esas edades se consideran la edad media (12 meses) y el inicio de la vejez (18 meses), se administró MTF a las ratas sedentarias y ejercitadas a partir de los 12 o 18 meses de edad. Los animales sedentarios que fueron tratados con MTF a partir de los 12 meses de edad hasta su eutanasia a los 24 meses (tratamiento de un año) serán referidos como SM12, mientras que las ratas sedentarias que fueron tratadas con MTF a partir de los 18 meses de edad hasta su eutanasia a los 24 meses (Tratamiento de 6 meses) se denominará SM18. En cuanto a las ratas ejercitadas que fueron tratadas simultáneamente con MTF, las que hicieron ejercicio durante 20 meses (de 4 a 24) y que tomaron MTF de 12 a 24 meses serán referidas como EM12, y las que tomaron MTF de 18 a 24 meses y también ejercitado durante 20 meses se llamará EM18.

Como se muestra en la **Figura 11**, nuestros resultados indican que las ratas EM12 disminuyeron su IMC en un 9.97% a los 18 meses ($p = 0.023$), 9.93% a los 20 meses ($p = 0.019$) y 7.5% a los 24 meses ($p = 0.043$) en comparación con las ratas sedentarias (S). Asimismo, las ratas SM18 disminuyeron su IMC en un 8% a los 20 meses ($p = 0.045$) y en un 13% a los 24 meses ($p = 0.005$) vs S. Los otros grupos experimentales no mostraron diferencias significativas en su IMC con respecto a las sedentarias.

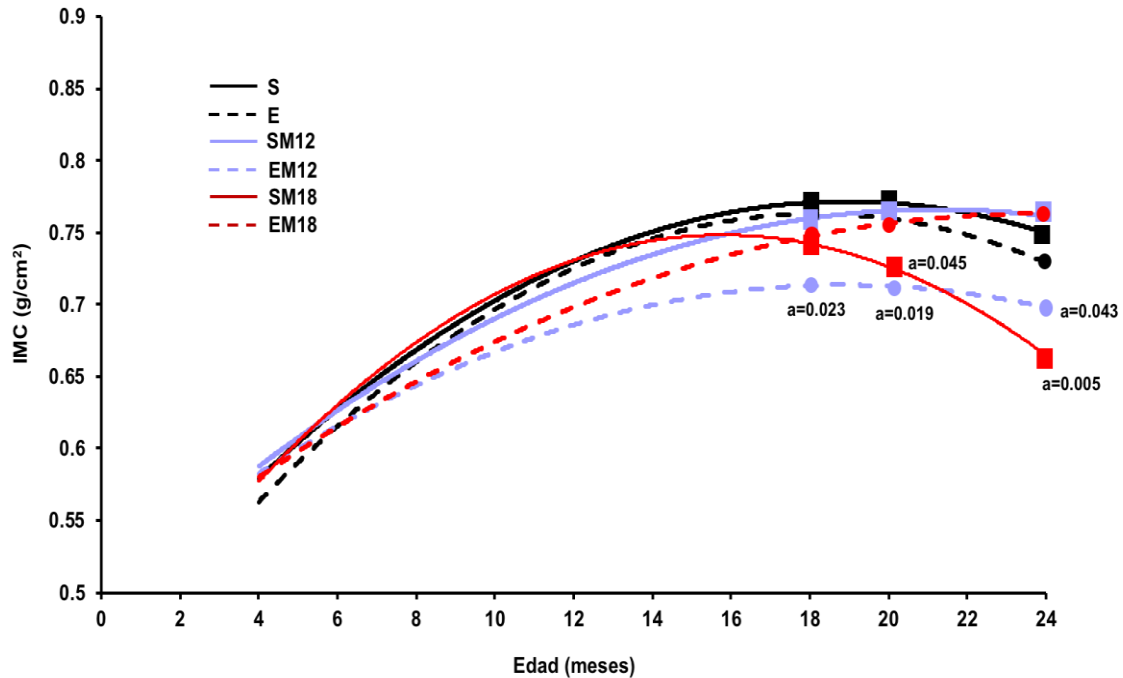


Fig. 11 Índice de Masa Corporal por grupos. Las mediciones se determinaron a los 18, 20 y 24 meses en ratas S, E, SM12, EM12, SM18, EM18. Cada punto de la curva representa la media de todos los experimentos independientes realizados en cada grupo de animales ($n = 5$); las curvas de crecimiento se establecieron mediante un ajuste polinomial (R^2). Las diferencias entre los grupos experimentales con respecto al grupo sedentario (S) están marcadas con la letra (a). El valor de probabilidad exacto se indica en el gráfico.

A continuación, evaluamos la composición corporal de todos los grupos experimentales mediante absorciometría de rayos X de doble energía (DXA). Primero, determinamos el porcentaje de grasa corporal. Los resultados que se muestran en la **Figura 12** indican que los grupos de ejercicio exhibieron un 26.58% menos de grasa corporal que las ratas sedentarias ($p = 0.015$) a la edad de 12 meses. Esta diferencia de peso se atribuye exclusivamente al ejercicio, debido a que los tratamientos de MTF aún no habían comenzado, ya que comenzaron a los 12 o 18 meses respectivamente. Las mediciones del porcentaje de grasa corporal a los 18 meses de edad revelaron que los grupos de ratas

que hacían ejercicio todavía presentaban un 21,05% menos de grasa corporal que el grupo sedentario ($p = 0.023$ y $p = 0.025$). Esto se atribuye nuevamente solo al ejercicio, ya que en el momento de la determinación de la DXA de 18 meses, las ratas EM18 aún no habían comenzado con el tratamiento con metformina. Para el grupo de ratas EM12 que recibieron metformina durante 6 meses mostraron una disminución del 34.21% en la grasa corporal con respecto a las ratas sedentarias ($p = 0.011$). El porcentaje de grasa corporal a los 20 meses de edad determinado para los grupos E y EM18 disminuyó 18,91% con respecto al grupo S ($p = 0.028$). Mientras que el grupo EM12 disminuyó un 30.41% ($p = 0.014$). A los 24 meses, el porcentaje de grasa en las ratas que hicieron ejercicio (E) disminuyó en 16.69% con respecto al grupo S ($p = 0.039$); el grupo EM12 disminuyó 16.78% ($p = 0.033$), mientras que el grupo SM18 disminuyó 12.44% ($p = 0.049$). Los otros grupos analizados no presentaron diferencias significativas, como se puede observar en la

Figura 12.

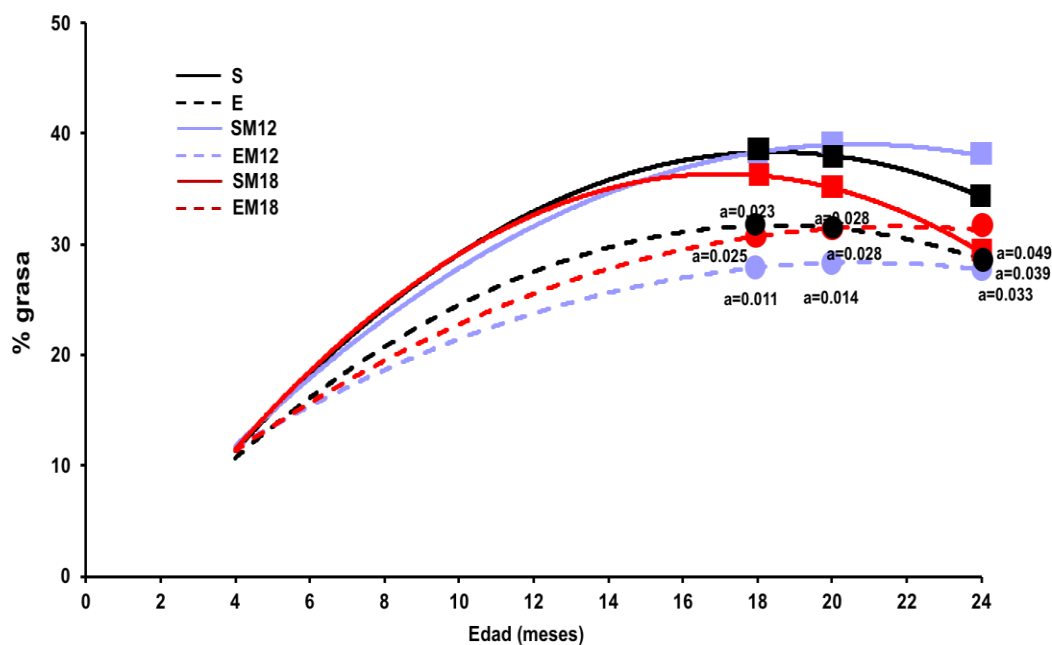


Fig. 12 Composición corporal por DXA: porcentaje de grasa. Las mediciones se determinaron a los 18, 20 y 24 meses en ratas S, E, SM12, EM12, SM18, EM18. Cada punto de la curva representa la media de todos los experimentos independientes realizados en cada grupo de animales ($n = 5$); las curvas de crecimiento se establecieron mediante un ajuste polinomial (R^2). Las diferencias entre los grupos experimentales con respecto al grupo sedentario (S) están marcadas con la letra (a). El valor de probabilidad exacto se indica en el gráfico

El análisis de las curvas de composición ósea a los 12 meses de edad (**Figura 13**) reveló, un incremento del 8,1% ($p = 0.006$) de hueso para el grupo E, con respecto al grupo S de la misma edad. Las determinaciones a los 18 meses indicaron que la composición ósea fue mayor en el grupo E (6.75%; $p = 0.026$), y en el grupo EM12 (12.16%; $p = 0.009$) con respecto al grupo S. A los 20 meses, los grupos E, EM12, EM18 y SM18 mostraron un incremento en el porcentaje de hueso de 6.9, 11.55, 7.1 y 4.5% respectivamente, con respecto al control ($p = 0.042$, $p = 0.009$, $p = 0.030$ y $p = 0.047$). Finalmente, el análisis de la composición del porcentaje de hueso a los 24 meses en los grupos E, EM12, EM18 y SM18 mostró un incremento de 6.45, 7.5, 6.65 y 12.5% con respecto al grupo sedentario ($p = 0.027$, $p = 0.034$, $p = 0,030$ y $p = 0,029$).

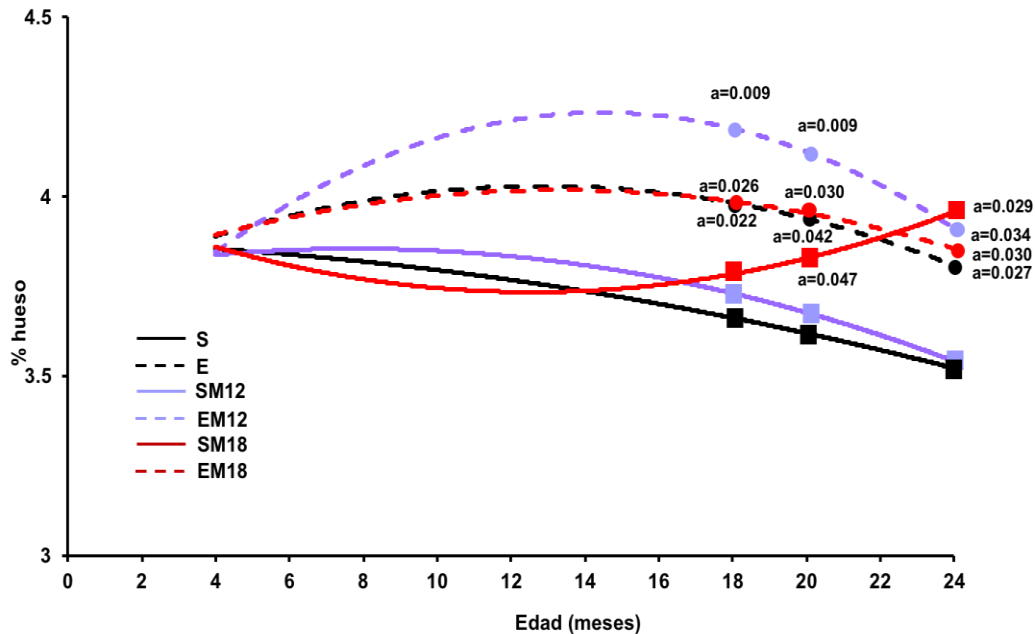


Fig. 13 Composición corporal por DXA: porcentaje de hueso. Las mediciones se determinaron a los 18, 20 y 24 meses en ratas S, E, SM12, EM12, SM18, EM18. Cada punto de la curva representa la media de todos los experimentos independientes realizados en cada grupo de animales ($n = 5$); las curvas de crecimiento se establecieron mediante un ajuste polinomial (R^2). Las diferencias entre los grupos experimentales con respecto al grupo sedentario (S) están marcadas con la letra (a). El valor de probabilidad exacto se indica en el gráfico.

La masa magra sin hueso (MMSH), es una forma indirecta de evaluar la masa muscular, por lo que se determinó el contenido de MMSH para comprender el efecto del ejercicio y el tratamiento con MTF en la pérdida de masa muscular (**Figura 14**). A los 12 meses de edad, las ratas ejercitadas (E, EM12 y EM18) mostraron un 12,24% más de MMSH que las ratas sedentarias ($p = 0.019$). La determinación a los 18 meses reveló que los grupos E y EM18 tenían 12% y 11.95% más MMSH con respecto al grupo S ($p = 0.019$ y 0.021). Mientras que EM12 mostró un aumento de MMSH del 19.65% con respecto al grupo S de

la misma edad ($p = 0.010$). Finalmente, a los 24 meses de edad, el grupo E presentaba un 8.02% más MMSH que el grupo S ($p = 0.045$), mientras que el grupo SM18 presentó un 5.72% más MMSH ($p = 0.049$). El grupo EM12 mostró la mayor diferencia a esta edad, un 15.2% más que el grupo S ($p = 0.009$). En el grupo SM12 se observó un 8.13% menos de MMSH con respecto al grupo S ($p = 0.049$). Estos resultados mostraron que las diferencias encontradas en el IMC de los grupos experimentales estaban directamente relacionadas con la composición corporal, donde se observaron cambios en la composición de grasa, hueso y MMSH.

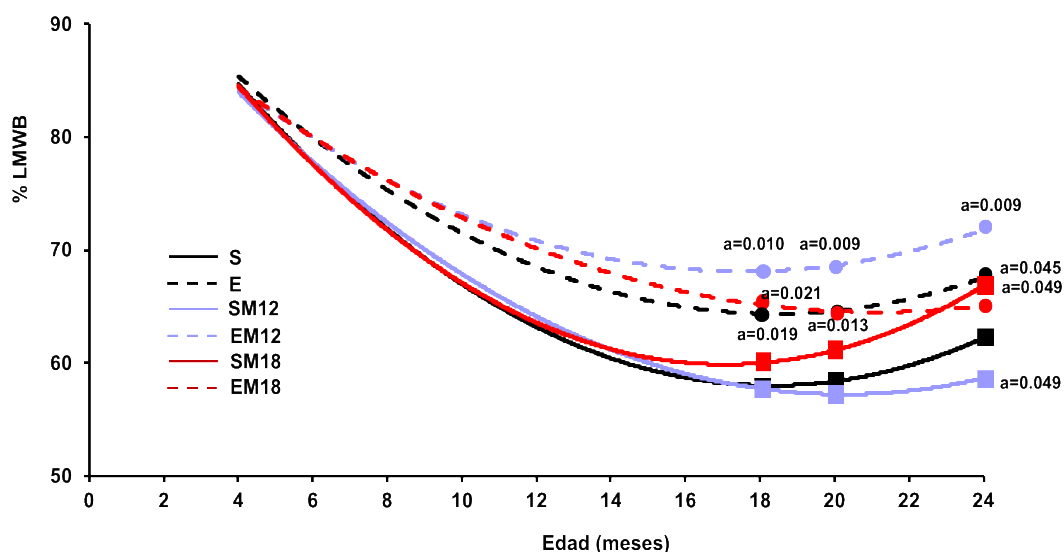


Fig.14 Composición corporal por DXA: masa magra libre de hueso (MMSH). Las mediciones se determinaron a los 18, 20 y 24 meses en ratas S, E, SM12, EM12, SM18, EM18. Cada punto de la curva representa la media de todos los experimentos independientes realizados en cada grupo de animales ($n = 5$); las curvas de crecimiento se establecieron mediante un ajuste polinomial (R^2). Las diferencias entre los grupos experimentales con respecto al grupo sedentario (S) están marcadas con la letra (a). El valor de probabilidad exacto se indica en el gráfico.

Para evaluar más específicamente la composición de MMSH, se determinó la masa del músculo gastrocnemio (**Figura 15**). La composición de la masa magra sin hueso en músculo gastrocnemio fue similar a la observada en el análisis corporal total. A los 18 meses se observó que el grupo E aumentó un 10,31% su MMSH en comparación con el grupo S ($p = 0.020$); el grupo EM18 mostró un 12,69% más MMSH que el grupo S ($p = 0.013$) y las ratas EM12 mostraron un 15.07% más MMSH ($p = 0.007$). A los 20 meses, el análisis de la composición de MMSH reveló que los grupos E y EM18 tenían un 12.9% más de proporción de MMSH que las ratas S ($p = 0.017$). Por último, la composición del músculo gastrocnemio a los 24 meses reveló que los grupos E, EM18 y SM18, presentaron 13% ($p = 0.017$), 16% ($p = 0.017$) y 12% ($p = 0.019$) más MMSH, que el grupo S respectivamente.

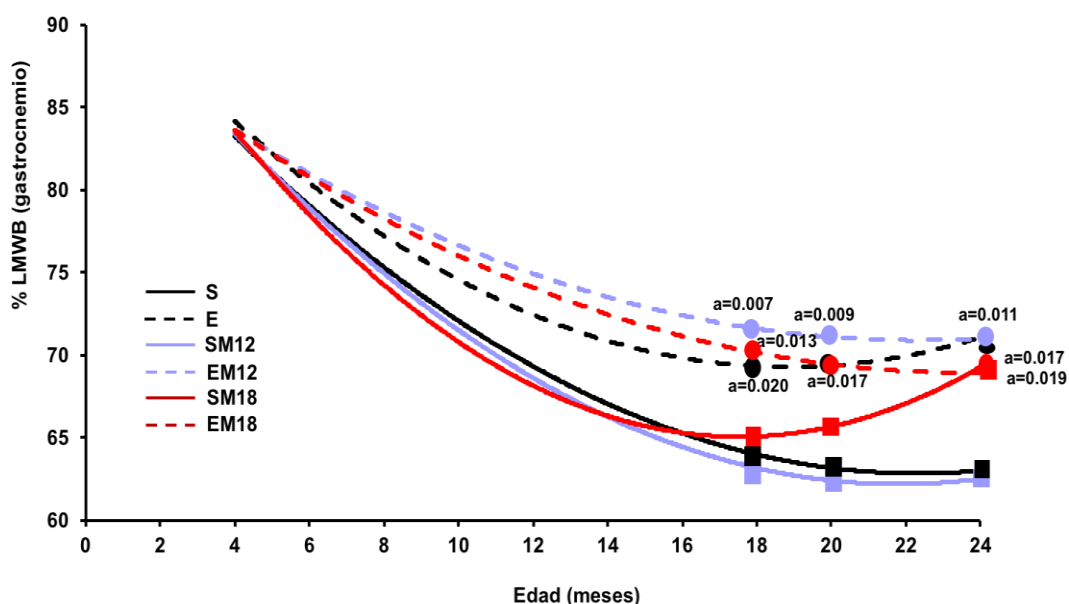


Fig. 15 Composición corporal por DXA: masa magra libre de hueso en gastrocnemio (MMSH). Las mediciones se determinaron a los 18, 20 y 24 meses en ratas S, E, SM12,

EM12, SM18, EM18. Cada punto de la curva representa la media de todos los experimentos independientes realizados en cada grupo de animales ($n = 5$); las curvas de crecimiento se establecieron mediante un ajuste polinomial (R^2). Las diferencias entre los grupos experimentales con respecto al grupo sedentario (S) están marcadas con la letra (a). El valor de probabilidad exacto se indica en el gráfico.

7.3 Fuerza de agarre

Para apoyar los datos de la evaluación de la composición corporal y del músculo gastrocnemio, se determinó la fuerza mediante dinamometría, como parámetro que sirve para comprender la funcionalidad del músculo esquelético (**Figura 16**). Nuestros resultados mostraron que a partir de los 12 meses los grupos de ejercicio (E, EM12 y EM18) tenían un 34% más de fuerza que los animales sedentarios ($p = 0.0001$). Esta diferencia se hizo mayor a los 18 meses, ya que los animales de los grupos E, EM18 y EM12 mostraron más fuerza que los del grupo S ya que el grupo E aumentó un 47.55% ($p = 0.0014$), EM18 y EM12 en un 59% ($p = 0.0014$; 0,0011 y 0.001 respectivamente). A los 20 meses se puede observar que el tratamiento con MTF en ratas SM12 y SM18 incrementó su fuerza en 8.7 y 16.15% con respecto al grupo S ($p = 0.017$ y 0.014). Mientras que las ratas que hicieron ejercicio (E, EM12 y EM18) mejoraron la fuerza en un 44.63, 56.4 y 55.7% con respecto al grupo S ($p = 0.0012$, 0.0007 y 0.0007). A los 24 meses todos los grupos presentaron diferencias significativas con respecto al grupo S, los incrementos de fuerza fueron de 30 y 46.1% en los grupos sedentarios (SM12 y SM18) ($p = 0.0066$ y 0.0011), mientras que los grupos ejercitados (E, EM12 y EM18) incrementaron su fuerza con respecto a la S en 29.78, 42 y 48.16% ($p = 0.008$, 0.0019 y 0.004) respectivamente.

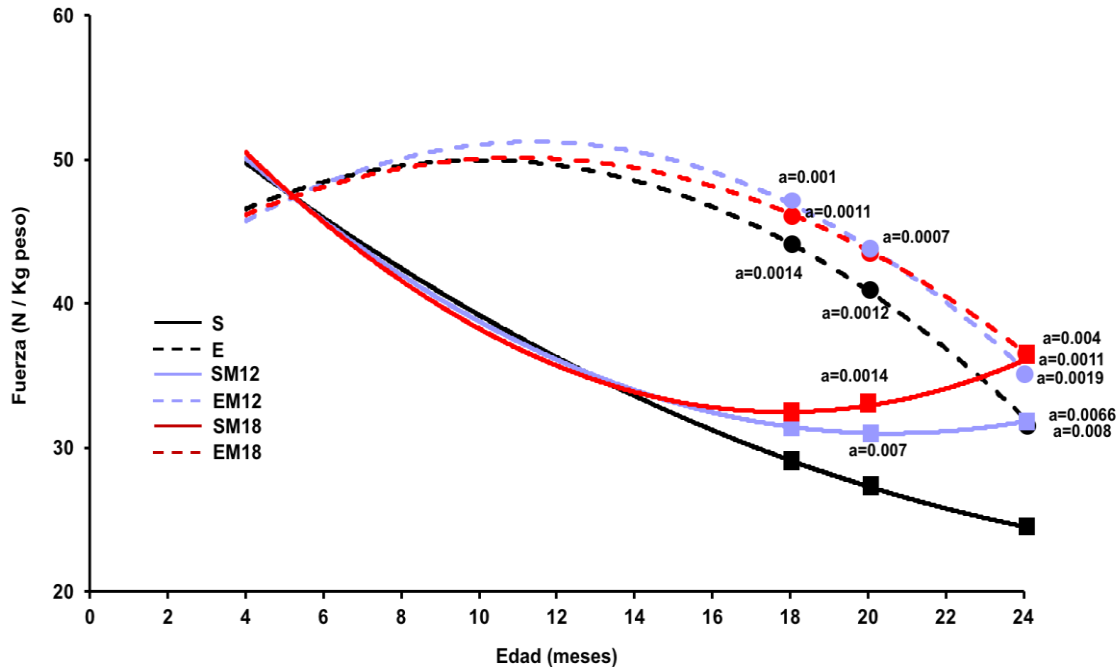


Fig. 16 Fuerza de agarre. Las mediciones se determinaron a los 18, 20 y 24 meses en ratas S, E, SM12, EM12, SM18, EM18. Cada punto de la curva representa la media de todos los experimentos independientes realizados en cada grupo de animales ($n = 5$); las curvas de crecimiento se establecieron mediante un ajuste polinomial (R^2). Las diferencias entre los grupos experimentales con respecto al grupo sedentario (S) están marcadas con la letra (a). El valor de probabilidad exacto se indica en el gráfico.

7.4 Histología

La **Figura 17** muestra la tinción H&E realizada en los cortes de músculo gastrocnemio a los 24 meses de edad, para los seis grupos de animales. El grupo sedentario mostró una desorganización total de las fibras musculares, ya que no se observan fascículos musculares. Además, existe una acumulación de tejido adiposo e infiltrados inflamatorios. Los grupos que hicieron ejercicio (E, EM12 y EM18) presentaron una adecuada disposición de las fibras musculares, y aún se pueden observar los fascículos musculares y las

miofibrillas que los componen. Sin embargo, también se puede observar la acumulación de tejido graso e infiltrados inflamatorios, pero en menor proporción que en el grupo sedentario. En cuanto a la estructura del tejido muscular de los grupos sedentarios tratados con MTF (SM12 y SM18), se puede observar que los fascículos musculares son más grandes en comparación con los tejidos de los animales que realizaron ejercicio, y además tienen menos endomisio. Al igual que los tejidos de los otros grupos, mostraron infiltración inflamatoria y acumulación de tejido adiposo.

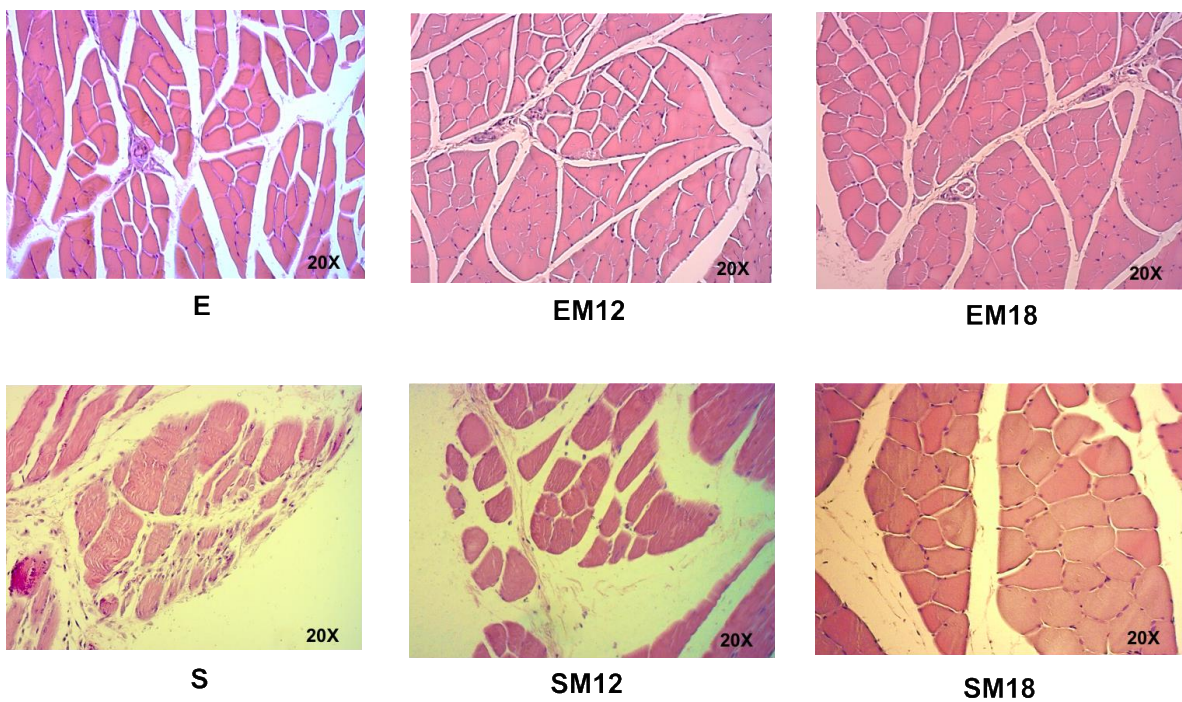


Fig. 17 Histología, H&E. Las imágenes muestran el análisis morfológico de la arquitectura del músculo gastrocnemio en cortes transversales. Se evaluó la presencia de infiltrados inflamatorios y la disposición de las fibras musculares en los diferentes grupos experimentales. Las micrografías son imágenes representativas (amplificación 20X).

7.5 Cociente GSH/GSSG

Para demostrar que la MTF, el ejercicio y el tratamiento combinado reduce el estrés oxidante asociado al envejecimiento y al sedentarismo, evaluamos la relación GSH/GSSG en el tejido muscular, como indicativo del estado redox tisular. Los resultados ilustrados en la **Figura 18** muestran que los grupos sedentarios (S, SM12 y SM18) no presentaron diferencias significativas en el cociente GSH/GSSG. Sin embargo, los grupos de ejercicio (E, EM12 y EM18) presentaron valores aumentados de GSH/GSSG. Se puede observar que las ratas del grupo E tenían un cociente GSH/GSSG 3.5 veces mayor en comparación con las ratas del grupo S ($p = 0.0001$). Mientras que el grupo EM12 aumentó 3.45 veces más su relación ($p = 0.031$), y el grupo EM18 aumentó la ración GSH/GSSG 3.08 veces ($p = 0.045$).

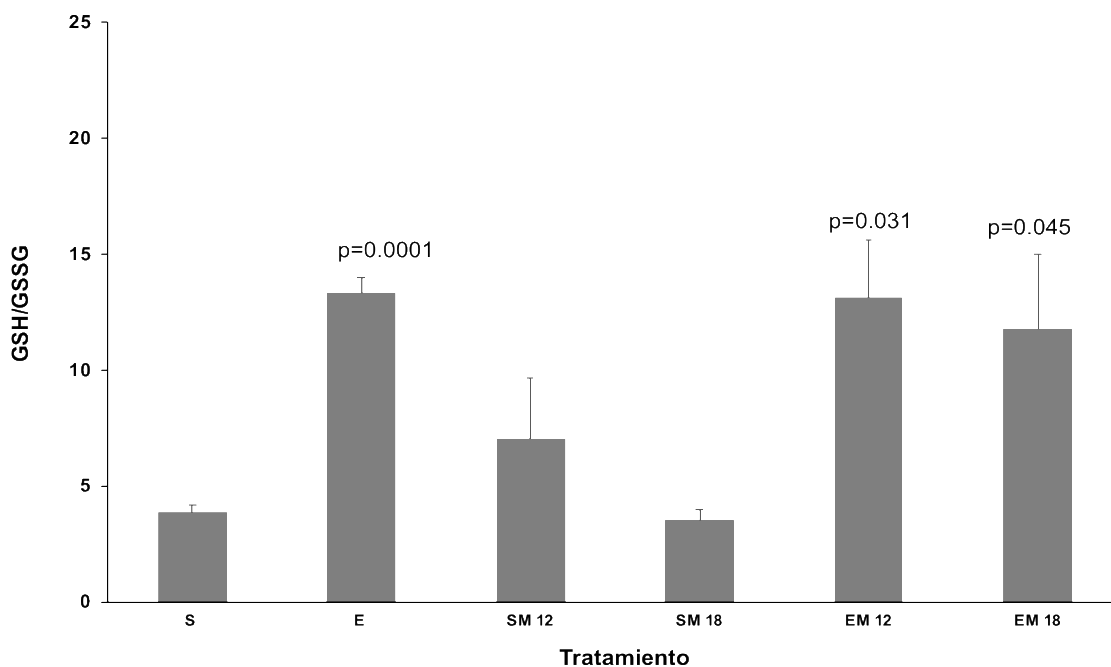


Fig. 18 Cociente GSH / GSSG. Las concentraciones de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) se determinaron por HPLC utilizando el músculo gastrocnemio obtenido de animales de los 6 grupos experimentales en su eutanasia (24 meses), como se describe

en materiales y métodos. La relación GSH / GSSG es la media \pm S.D. (n = 5). Para comparar los grupos se utilizó la prueba ANOVA seguida de una prueba post hoc de Tukey-Kramer. El valor de probabilidad exacto se indica en cada barra de los grupos que presentaron diferencias.

Cuando se analizó el cociente GSH/GSSG de manera separada para cada individuo dentro de los grupos experimentales (ejercicio, tratamientos MTF y el tratamiento combinado)

Figura 19, se puede observar que el 20% de los individuos en el grupo SM12 mostraron un aumento del cociente GSH/GSSG. Por el contrario, el mismo efecto benéfico no se observó completamente en los grupos EM12 y EM18, ya que solo el 60% y el 40% de la población respectivamente, tenían niveles más altos del valor medio del cociente GSH/GSSG. Lo anterior sugiere que la administración de MTF en combinación con ejercicio podría ser un mecanismo que involucre una capacidad adaptativa para contrarrestar el estrés que podría ser diferente para cada individuo de la población.

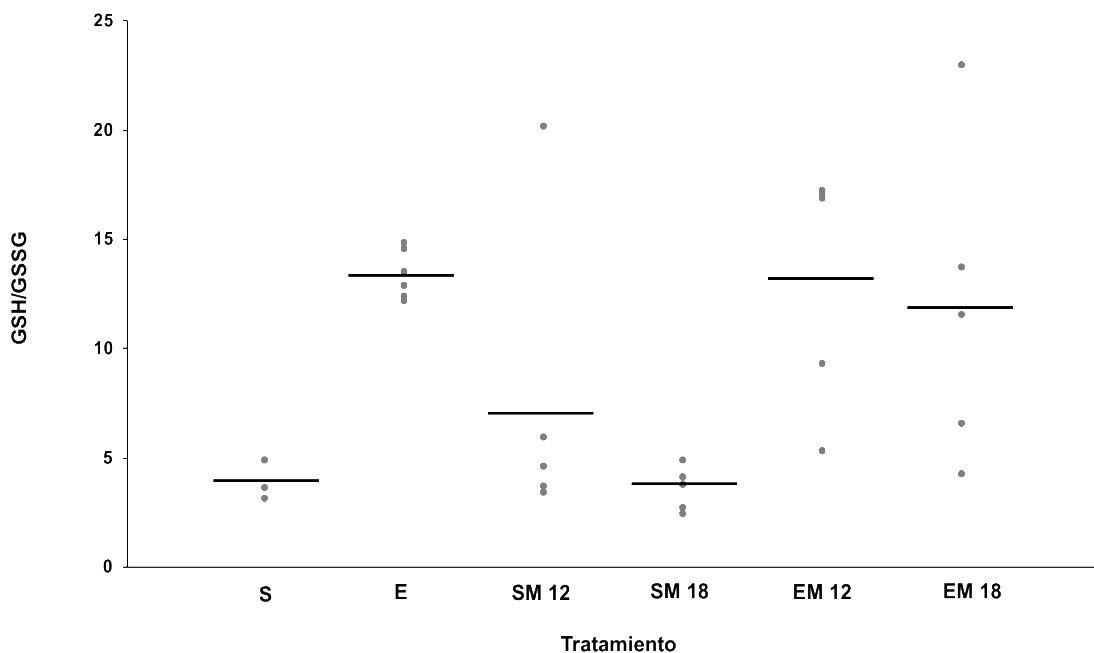


Fig. 19 Cociente GSH / GSSG por individuo. Las concentraciones de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) se determinaron por HPLC utilizando el músculo gastrocnemio obtenido de animales de los 6 grupos experimentales en su eutanasia (24 meses), como se describe en materiales y métodos. La línea horizontal representa el valor promedio en cada grupo.

7.6 Curvas de Kaplan-Meier

Para determinar el efecto de la MTF, el ejercicio y el tratamiento combinado sobre la supervivencia animal, realizamos una curva de Kaplan Meier. Los resultados muestran que la tasa de supervivencia más baja (hasta 24 meses) se encontró en el grupo de ratas sedentarias, con un 30% de supervivencia, mientras que los grupos de ratas SM12 y SM18 tuvieron una tasa de supervivencia del 40%. Lo que significa un aumento del 33% en comparación con las ratas sedentarias. Con respecto a los grupos que hicieron ejercicio, se observó que las ratas E y EM18 tuvieron una supervivencia del 50%, lo que significa un aumento del 66% con respecto a las sedentarias. El grupo EM12 tuvo el mayor porcentaje de supervivencia 60%, lo que representa un aumento del 100% en comparación con las ratas S (**Figura 20**). Estos resultados son muy interesantes ya que muestran que el tratamiento con MTF solo o en combinación con ejercicio podría aumentar la supervivencia.

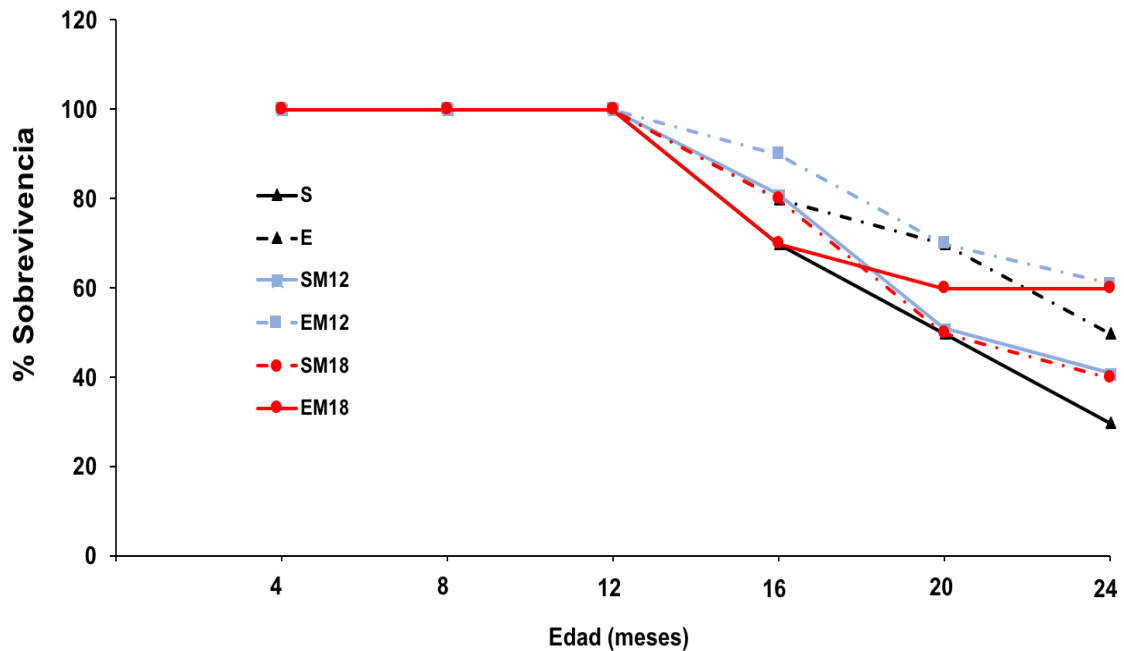


Fig. 20 Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. Para evaluar el efecto del ejercicio, el tratamiento con MTF y la combinación de ambos sobre la supervivencia animal, se realizó una curva de Kaplan-Meier. El número total de animales evaluados fue 160.

7.7 Daño oxidante a proteínas

El contenido de carbonilo se determinó para evaluar el efecto de los tratamientos y los cambios en el estado redox sobre la oxidación de proteínas. Nuestros resultados muestran (**Figura 21**), que el contenido de carbonilo fue significativamente mayor en las ratas de S24, en comparación con las ratas de SM12, SM18, EM12 y EM18.

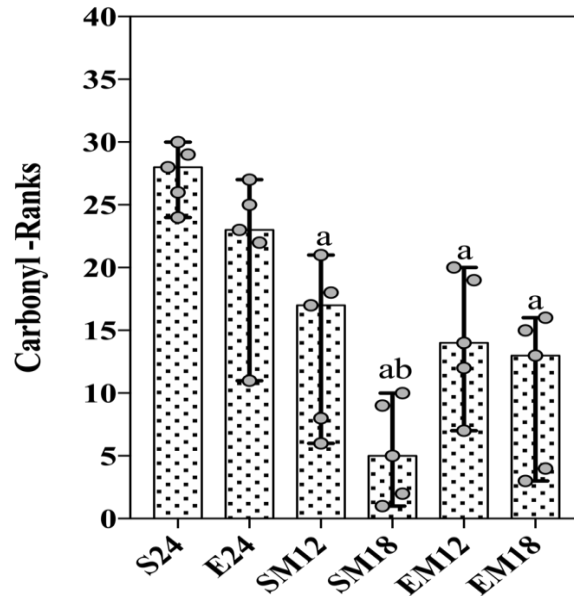


Fig. 21 Daño oxidativo de las proteínas. El contenido de carbonilo se determinó utilizando proteínas aisladas del gastrocnemio de las ratas sometidas a los diferentes tratamientos descritos en la sección de materiales y métodos. La prueba de Kruskal-Wallis compara grupos transformando los datos en rangos (las puntuaciones se ordenan de menor a mayor, ignorando el grupo al que pertenece la puntuación. A la puntuación más baja se le asigna el rango de 1, al siguiente más alto un rango de 2 hasta el más alto el rango se asigna a la puntuación más alta. Una vez que se han calculado los rangos dentro de cada grupo, se calcula la estadística de prueba H). Aquí graficamos los valores de rango en lugar de los valores brutos para facilitar la interpretación visual de las diferencias significativas. La letra a representa una diferencia significativa contra S24 ($p < 0.05$); la letra b representa una diferencia significativa contra E24 ($p < 0.05$).

7.8 Expresión de la proteína Nrf2

Nrf2 es un factor de transcripción que se activa como respuesta a oxidantes y xenobióticos y activa la respuesta antioxidante (Dinkova-Kostova et al. 2017). Dado que nuestros datos muestran un aumento en la respuesta antioxidante en los animales tratados, se evaluaron los niveles de Nrf2 en los músculos gastrocnemios (**Figura 22**). Los resultados mostraron que la expresión de Nrf2 no fue significativamente diferente entre los grupos.

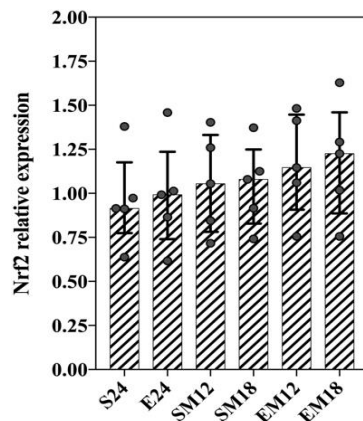
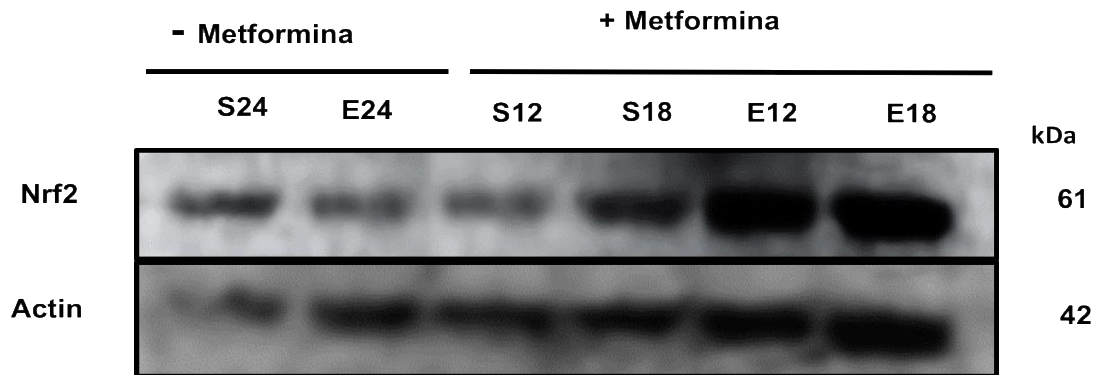


Fig. 22 Expresión relativa de Nrf2. Blot representativo para Nrf2 realizado con proteínas aisladas del gastrocnemio de las ratas sometidas a los diferentes tratamientos descritos en la sección de materiales y métodos. Análisis densitométrico realizado para la transferencia y normalizado frente al control de actina. Cada barra representa la media \pm D.E. de los resultados obtenidos para 5 animales en cada grupo tratado (puntos).

8. Discusión

Una condición particular de fragilidad que se presenta ampliamente en las personas adultas mayores es la atrofia del músculo esquelético o sarcopenia [Brooks y Faulkner, 1994; Figueiredo et al., 2009]. Aunque la sarcopenia es una de las causas de fragilidad, pero de manera similar, no todas las personas frágiles son sarcopénicas y no todas las personas sarcopénicas son frágiles [Morley, 2016]. La pérdida progresiva de masa muscular produce una disminución tanto de la fuerza como de la función del tejido. Desafortunadamente, hay una disminución notable en la regeneración y el rendimiento muscular después de 40 años, y este tejido se vuelve típicamente disfuncional después de la séptima década [Waltz et al., 2018]. La incapacidad para moverse da como resultado el deterioro de la calidad de vida, por lo que la sarcopenia se ha considerado como una de las enfermedades que más aumenta la fragilidad y por tanto la invalidez de las personas adultas mayores.

Desde hace algunas décadas se sabe que el ejercicio es la intervención más eficaz para retrasar la aparición de sarcopenia en personas mayores y modelos murinos [Ávila -Funes y García-Mayo, 2004; Phu et al., 2015]. Estudios recientes han mostrado que el ejercicio previene enfermedades crónicas no transmisibles, desempeñando un papel importante en su retraso [Pedersen & Saltin, 2006; Booth et al., 2011]. Sin embargo la inadecuada práctica de ejercicio puede conllevar a daños en la salud física como lo son: aumento de lesiones físicas y lo que es peor, puede sobrecargar el sistema circulatorio provocando insuficiencia renal aguda, paro cardíaco y la interrupción del flujo sanguíneo cerebral [Dores et al., 2018; Qiu et al., 2017].

Aún se desconoce qué tipo de ejercicio es mejor para prevenir y tratar la sarcopenia, por una parte el ejercicio aeróbico incrementa la producción de ATP, síntesis de proteínas musculares, biogénesis y dinámica mitocondrial, con la disminución en la expresión de genes catabólicos [Erllich et al., 2016; Konopka y Harber, 2014], mientras que el ejercicio de fuerza incrementa la hipertrofia muscular y mejorar la adaptación neuromuscular [Paddon-Jones et al., 2004]. Sin embargo, aunque se sabe que el ejercicio aumenta tanto la fuerza como la masa muscular, los mecanismos por los que se lleva a cabo no están del todo claros. Se ha propuesto que la respuesta anabólica mejora varias vías de señalización, sobre todo las vías AMPK y AKT / mTOR [Fujita et al., 2007]. El ejercicio también aumenta la biogénesis mitocondrial al activar a PGC-1 alfa y también reduce la secreción de citocinas proinflamatorias [Kohut et al., 2006]. También disminuye la muerte de las células satélite, conservando la capacidad miogénica durante el envejecimiento [Shefer et al., 2006] e incluso aumenta la capacidad antioxidante muscular [Johnson et al., 2015].

Los resultados obtenidos en este trabajo con los grupos de ratas que realizaron ejercicio confirman que el ejercicio continuo a lo largo de la vida mejoró todos los parámetros evaluados y retrasó en gran medida la sarcopenia, ya que evitó la pérdida de músculo y hueso, evitó la ganancia de grasa así como la infiltración inflamatoria en el tejido muscular, y protegió contra los rompimientos de los haces de fibras musculares. Además, el ejercicio previno la pérdida de fuerza de agarre y mostró un estado más bajo de estrés oxidante (evaluado por el cociente GSH/GSSG).

La disminución de la fuerza muscular y masa ósea que se produce en las ratas *Wistar* sedentarias envejecidas, es acompañada y puede deberse a la acumulación de tejido adiposo, ya que estudios recientes han informado que la infiltración de grasa dentro del tejido intermuscular e intramuscular en el envejecimiento, influye en la fuerza muscular y movilidad en hombres y mujeres adultos mayores; así como la presencia de adipocitos en médula ósea [Marcus et al., 2010; Hamrick et al., 2016; Rosen & Bouxsein 2006]. Por su parte, el ejercicio moderado asociado al tratamiento con MTF pudiera estar participando en el mantenimiento de la masa muscular esquelética y ósea; a consecuencia de la disminución de masa grasa, ya que se ha reportado que el tejido adiposo genera un estado proinflamatorio sistémico crónico de bajo grado, con aumento de los niveles de citocinas inflamatorias como TNF- α , IL -1 β y IL-6. Estas citocinas se han relacionado con el deterioro funcional muscular y con la pérdida de fuerza, en un mecanismo que involucra un estado de estrés oxidante (McArdle et al., 2013, Casanova et al., 2019).

Lo anterior es relevante ya que recientemente se aprobaron dos ensayos clínicos para evaluar la capacidad anti-envejecimiento de la MTF en personas mayores, uno con prediabéticos [Piskovatska et al., 2019] y otro con personas sanas [Justice et al., 2018, Barzilai et al., 2016]; por lo tanto, el conocimiento aportado por este trabajo, donde se usó un modelo animal con un tratamiento de MTF a largo plazo y se encontró que no se anuló el efecto benéfico proporcionado por el ejercicio, apoya el uso de MTF para otros efectos anti-envejecimiento.

Con respecto a los grupos de animales sedentarios en los que se administró MTF, se encontraron resultados interesantes. La administración de MTF a ratas adultas durante un

período de 12 meses (de los 12 a los 24 meses de edad) no indujo una disminución del IMC o de la grasa corporal, ni impidió o redujo la disminución del tejido muscular u óseo. Sin embargo, cuando se administró MTF a ratas viejas durante solo 6 meses a una edad avanzada (de 18 a 24 meses de edad), se encontró una disminución significativa en el IMC y el porcentaje de grasa, así como un aumento en el porcentaje de músculo y hueso. Aunque se ha reportado que los tratamientos prolongados con MTF reducen la composición de la grasa corporal, estos resultados son bastante controvertidos. Podemos referirnos a un metaanálisis interesante realizado con más de 50 estudios en adultos humanos, y en donde se encontró que solo 10 de esos estudios cumplieron estrictamente los criterios para la evaluación de la grasa corporal. Por lo tanto, solo tres de ellos concluyeron que el MTF tiene efectos moderados sobre la reducción de la masa corporal [Berstein, 2012].

Un estudio en hombres adultos sanos tratados con dos dosis diarias de MTF (850 mg) durante 15 días, no mostró cambios en el peso ni la grasa corporal, aunque los niveles de glucosa plasmática, insulina e IGF-1 sí disminuyeron [Fruehwald et al., 2002]. En otro estudio realizado en mujeres adultas obesas sin resistencia a la insulina, a las que se les administraron 500 mg de MTF dos veces al día durante tres meses, tampoco se encontraron diferencias en el peso y la grasa corporal y los niveles de presión arterial, ni cambios en los niveles plasmáticos de la glucosa, la insulina y el IGF 1 plasmáticos [Kujawska-Luczak et al., 2018]. Un metaanálisis reciente [Solymár et al., 2018] mostró que el tratamiento con MTF en humanos de edad avanzada disminuye moderadamente el peso corporal, junto con una disminución significativa del colesterol sérico y LDL, lo que

podría sugerir una reducción en el riesgo de eventos coronarios mayores y de mortalidad en poblaciones diabéticas ancianas.

En relación a lo anterior, las diferencias observadas en las respuestas entre las ratas adultas de 12 meses y las de 18 meses a las que se les administró solo con MTF, podrían tener varias explicaciones; una de ellas podría estar relacionada con los niveles de hormonas sexuales que se encuentran presentes en estas dos etapas diferentes de la vida del animal. En especial los estrógenos y el estradiol, una hormona que se ha relacionado con la preservación de la masa muscular y ósea, así como con la acumulación de tejido graso [Tagliaferri et al., 2015]. Además, se ha reportado que la administración de MTF reduce los niveles de estradiol. Campagnoli y colaboradores demostraron que 1500 mg de MTF al día durante 9 meses disminuyeron los niveles de estradiol en mujeres no diabéticas, en un mecanismo que implica la reducción de los niveles de insulina [Campagnoli et al., 2013]. Por lo tanto, este efecto podría estar relacionado con la pérdida de masa muscular y ósea, observada en el tratamiento con MTF durante 12 meses en ratas sedentarias adultas. Algo interesante que se observó fue que, el tratamiento con MTF durante solo 6 meses en una etapa de edad avanzada (de 18 a 24 meses de edad), podría tener un mecanismo de acción diferente. Por lo tanto, los niveles hormonales podrían jugar un papel importante que debería ser considerado y que sería importante estudiar como una perspectiva para el futuro.

Los resultados observados en las microscopías, muestran que las ratas sedentarias tienen una mayor cantidad de tejido conectivo (fibrosis) que rodea los haces de fibras musculares (epimisio, perimisio y endomisio). El endomisio rodea cada miofibrilla, el perimisio rodea

al número de miofibrillas que conforman un fascículo y el epimisio rodea todo el músculo; en conjunto se encargan de mantener la integridad, promueven la miogénesis, la regeneración muscular, transmiten la fuerza de los músculos a los tendones y conectan a los tendones a los huesos [Jacob, 1988; Exeter y Connell, 2010]. Sin embargo, la fibrosis definida como la acumulación excesiva de tejido conectivo, ya sea por una sobreproducción o alguna alteración en la degradación; perjudica la función muscular, afectando negativamente la regeneración después de una lesión y aumenta la susceptibilidad de los músculos a una nueva lesión, por lo tanto, se considera una de las principales causas de debilidad muscular [Mahdy, 2019]. Esto se vio reflejado en la fuerza de agarre en el grupo de ratas sedentarias, las cuales presentaron una menor fuerza en comparación de las ratas ejercitadas, las cuales muestran estructuras de fascículos de fibras musculares bien definidos así como miofibrillas. Algo interesante que se puede observar, es en los grupos de ratas ejercitadas tratadas con MTF durante 6 y 12 meses presentan una mejor estructura muscular, con una menor cantidad de tejido fibroso en el perimisio. De la misma forma las ratas sedentarias tratadas con MTF muestran una disposición definida de fascículos y miofibrillas en comparación con las ratas sedentarias; esta disposición puede verse reflejada en la fuerza de agarre de ratas sedentarias tratadas con MTF por 12 y 18 meses, donde se puede observar una mayor fuerza de agarre en comparación con el grupo de ratas sedentarias.

Un resultado muy interesante que se encontró en este trabajo, fue la respuesta adaptativa que tiene cada individuo frente a cambios adversos en el entorno, que pueden provocar variaciones en la expresión génica que permite que cada uno de ellos sobreviva, lo que se

conoce como hormesis. Este término, de origen farmacológico, se refiere a “el proceso por el cual una exposición a una dosis baja de un agente químico o un factor ambiental, que es nocivo en dosis elevadas, induce una respuesta adaptativa y / o un efecto beneficioso sobre la célula u organismo” [Calabrese et al., 2007; Calabrese, 2008; Luna-López et al., 2014]. En este sentido, se ha reportado que la MTF puede inducir la respuesta hormética por sobreproducción de ERO en un mecanismo que involucra a las mitocondrias y se conoce como "mitohormesis", lo que se ha relacionado con el aumento de la longevidad [De Haes et al., 2014]. Además, se ha reportado que esta respuesta hormética es capaz de disminuir la secreción de citocinas inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, porque se anula la translocación y activación nuclear del factor de transcripción NF- κ B [Isoda et al., 2006]. Además de la MTF como agente hormético, nuestro modelo tiene otro estímulo capaz de inducir la respuesta adaptativa, que es el ejercicio. Se ha reportado que durante la actividad física moderada, las mitocondrias de las células musculares aumentan su producción de ERO con el fin de modificar el estado redox para promover una respuesta adaptativa en lugar de un daño oxidante.

Los beneficios de esta respuesta hormética incluyen un incremento en la respuesta antioxidante para contrarrestar el daño del ambiente, así como la capacidad de reparar el daño generado por la respuesta inflamatoria, incluida la inflamación crónica de bajo grado inducida por el tejido adiposo [Webb et al., 2017]. Es importante señalar que durante la hormesis existen distintos umbrales de respuesta, que están en función de la intensidad del estímulo. En este modelo utilizamos dos inductores horméticos, así como su

combinación, para producir ERO, y así modificar el estado redox e inducir la respuesta adaptativa que tiene el efecto de incrementar la supervivencia. Nuestros resultados mostraron que algunos animales de los grupos EM12 y EM18 mejoraron su cociente GSH / GSSG en un 60 y 40% respectivamente, aumentando su estado redox reducido para contrarrestar el estrés oxidante asociado al envejecimiento.

Esta diferencia en el cociente GSH / GSSG podría estar relacionada con un proceso hormético adaptativo inducido por la MTF, que está respaldado por el incremento en la supervivencia de la población, que fue del 66% para el grupo EM18 y del 100% para el grupo EM12, en comparación con ratas sedentarias (S) (**Figura 20**).

El aumento de la supervivencia también se observó en los grupos tratados solo con la MTF, SM12 y SM18, donde se observó un aumento del 33% en la supervivencia con respecto al grupo S. Así mismo se encontró un ligero aumento en el cociente GSH / GSSG en estos grupos, por lo que se sugiere que la MTF es un agente hormético capaz de inducir tal respuesta. Las diferencias en la respuesta hormética pueden estar relacionadas con varios factores relacionados con las propias capacidades del individuo, incluida la capacidad de reparar el daño inducido por el estrés, la capacidad de mantener la homeostasis, el estado nutricional y la base genética.

En conclusión, nuestro trabajo demuestra por primera vez en un estudio longitudinal a largo plazo, con animales sanos, que el tratamiento con MTF no elimina los efectos beneficiosos que aporta el ejercicio a lo largo de la vida. La MTF podría inducir una respuesta hormética positiva que proteja a los animales contra daños y modificaciones en

el estado redox, lo que a su vez podría mejorar la vida útil, sin eliminar otros efectos valiosos como los que se obtienen con el ejercicio.

9. Conclusiones

Nuestros resultados muestran que la MET no inhibe o reduce los efectos favorables generados por el entrenamiento de ejercicio moderado, sino que coadyuva a mejorar la condición en cuanto al incremento de la masa muscular, masa ósea y fuerza de las ratas ejercitadas en comparación con las sedentarias, viéndose también reflejado en la preservación del tejido muscular, así como con el incremento en la supervivencia y el estado físico de las ratas; esto asociado a una disminución en el estrés oxidante que puede estar claramente relacionado con el modelo hormético propuesto.

Por otra parte, la MTF por sí sola ayuda a mantener la estructura de las fibras musculares con fascículos musculares más grandes y una menor cantidad de endomisio; que pudiera contribuir al incremento la fuerza muscular en ratas sedentarias tratadas con éste fármaco.

10. Perspectivas

Algunos puntos que valdría la pena evaluar en el futuro para comprender la interacción entre ejercicio y la MTF a nivel molecular serían:

Determinar la relación ATP / AMP que podrían estar activando la enzima AMPK, que es un vínculo interesante que está regulado por el tratamiento con MTF y por el ejercicio.

Evaluar otras funciones metabólicas que podrían estar participando en la respuesta general, como las funciones hepática y renal.

11. Referencias

- Alemán, J. A., de Baranda Andujar, P. S., & Ortín, E. J. O. (2014). Guía para la prescripción de ejercicio físico en pacientes con riesgo cardiovascular. Murcia: Industrias Gráficas Libecom.
- Alnaqeeb, M. A., & Goldspink, G. (1987). Changes in fibre type, number and diameter in developing and ageing skeletal muscle. *Journal of Anatomy*, 153, 31.
- Altun, M., Besche, H. C., Overkleeft, H. S., Piccirillo, R., Edelmann, M. J., Kessler, B. M., ... & Ulfhake, B. (2010). Muscle wasting in aged, sarcopenic rats is associated with enhanced activity of the ubiquitin proteasome pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 285(51), 39597-39608.
- Amini, F. G., Rafieian-Kopaei, M., Nematbakhsh, M., Baradaran, A., & Nasri, H. (2012). Ameliorative effects of metformin on renal histologic and biochemical alterations of gentamicin-induced renal toxicity in Wistar rats. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 17(7), 621.
- Arranz, L., Giménez-Llort, L., De Castro, N. M., Baeza, I., & De la Fuente, M. (2009). El aislamiento social durante la vejez empeora el deterioro cognitivo, conductual e inmunitario. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, 44(3), 137-142.
- Arranz, L., Giménez-Llort, L., De Castro, N. M., Baeza, I., & De la Fuente, M. (2009). El aislamiento social durante la vejez empeora el deterioro cognitivo, conductual e inmunitario. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, 44(3), 137-142.

- Ávila-Funes, J. A., & García-Mayo, E. J. (2004). The benefits of doing exercise in the elderly. *Gaceta Médica de México*, 140(4), 431-436.
- Barzilai, N., Crandall, J. P., Kritchevsky, S. B., & Espeland, M. A. (2016). Metformin as a tool to target aging. *Cell Metabolism*, 23(6), 1060-1065.
- Baumgartner, R. N., Koehler, K. M., Gallagher, D., Romero, L., Heymsfield, S. B., Ross, R. R., ... & Lindeman, R. D. (1998). Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *American Journal of Epidemiology*, 147(8), 755-763.
- Beas-Jiménez, J. D. D., López-Lluch, G., Sánchez-Martínez, I., Muro-Jiménez, A., Rodríguez-Bies, E., & Navas, P. (2011). Sarcopenia: implications of physical exercise in its pathophysiology, prevention and treatment. *Revista Andaluza de Medicina del Deporte*, 4(4), 158-166.
- Berstein, L. M. (2012). Metformin in obesity, cancer and aging: addressing controversies. *Aging (Albany NY)*, 4(5), 320.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal*, 5(1), 9–19.
<https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Booth, F. W., Roberts, C. K., & Laye, M. J. (2011). Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Comprehensive physiology*, 2(2), 1143-1211.
- Bootman, M. D. (2012). Calcium signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(7), a011171.
- Brioche, T., Kireev, R. A., Cuesta, S., Gratas-Delamarche, A., Tresguerres, J. A., Gomez-Cabrera, M. C., & Vina, J. (2014). Growth hormone replacement therapy

prevents sarcopenia by a dual mechanism: improvement of protein balance and of antioxidant defenses. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 69(10), 1186-1198.

- Brooks, S. V., & Faulkner, J. A. (1994). Skeletal muscle weakness in old age: underlying mechanisms. *Medicine and science in sports and exercise*, 26(4), 432-439.
- Calabrese, E. J. (2008). Converging concepts: adaptive response, preconditioning, and the Yerkes–Dodson Law are manifestations of hormesis. *Ageing research reviews*, 7(1), 8-20.
- Calabrese, E. J., Bachmann, K. A., Bailer, A. J., Bolger, P. M., Borak, J., Cai, L., ... & Cook, R. R. (2007). Biological stress response terminology: integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose–response framework. *Toxicology and applied pharmacology*, 222(1), 122-128.
- Campagnoli, C., Berrino, F., Venturelli, E., Abbà, C., Biglia, N., Brucato, T., ... & Pasanisi, P. (2013). Metformin decreases circulating androgen and estrogen levels in nondiabetic women with breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 13(6), 433-438.
- Cartee, G. D., Hepple, R. T., Bamman, M. M., & Zierath, J. R. (2016). Exercise promotes healthy aging of skeletal muscle. *Cell metabolism*, 23(6), 1034-1047.
- Casanova, E., Salvadó, J., Crescenti, A., & Gibert-Ramos, A. (2019). Epigallocatechin gallate modulates muscle homeostasis in type 2 diabetes and obesity by targeting energetic and redox pathways: a narrative review. *International Journal of molecular Sciences*, 20(3), 532.

- Caspersen, C. J., Christenson, G. M., & Pollard, R. A. (1986). Status of the 1990 physical fitness and exercise objectives--evidence from NHIS 1985. *Public health reports*, 101(6), 587.
- Chen, L., Xia, J., Xu, Z., Chen, Y., & Yang, Y. (2017). Evaluation of sarcopenia in elderly women of China. *International Journal of Gerontology*, 11(3), 149-153.
- Cheng, J. T., Huang, C. C., Liu, I. M., Tzeng, T. F., & Chang, C. J. (2006). Novel mechanism for plasma glucose-lowering action of metformin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, 55(3), 819-825.
- Clanton, T. L. (2007). Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *Journal of applied physiology*, 102(6), 2379-2388.
- Cornwell, B. (2009). Good health and the bridging of structural holes. *Social Networks*, 31(1), 92-103.
- Cruz-Jentoft, A. J., Baeyens, J. P., Bauer, J. M., Boirie, Y., Cederholm, T., Landi, F., ... & Topinková, E. (2010). Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older. *Age and ageing*, 39(4), 412-423.
- Cruz-Jentoft, A. J., Bahat, G., Bauer, J., Boirie, Y., Bruyère, O., Cederholm, T., ... & Schneider, S. M. (2019). Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age and ageing*, 48(1), 16-31.
- De Haes, W., Froninckx, L., Van Assche, R., Smolders, A., Depuydt, G., Billen, J., ... & Temmerman, L. (2014). Metformin promotes lifespan through mitohormesis via

the peroxiredoxin PRDX-2. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(24), E2501-E2509.

- Dinkova-Kostova AT, Fahey JW, Kostov RV, Kensler TW (2017) KEAP1 and done? Targeting the NRF2 pathway with sulforaphane. Trends Food Sci Technol 69:257–269.
- Dores, H., de Araújo Gonçalves, P., Cardim, N., & Neuparth, N. (2018). Coronary artery disease in athletes: an adverse effect of intense exercise?. Revista Portuguesa de Cardiologia (English Edition), 37(1), 77-85.
- Downward, J., & Weigelt, B. (2012). Genomic determinants of PI3K pathway inhibitor response in cancer. Frontiers in oncology, 2, 109.
- Dziechciaż, M., & Filip, R. (2014). Biological psychological and social determinants of old age: Bio-psycho-social aspects of human aging. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 21(4).
- ENADID (2018). Principales resultados de la Encuesta Nacional de la Dinámica Demográfica (ENADID) 2018 Nota técnica. Obtenido Diciembre 2019 de https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/enadid/2018/doc/nota_tec_ena
- Envejecimiento activo y saludable. Fundamentos y estrategias desde la gerontología comunitaria. México: FES Zaragoza, UNAM.
- Erlich, A. T., Tryon, L. D., Crilly, M. J., Memme, J. M., Moosavi, Z., Oliveira, A. N., Beyfuss, K., & Hood, D. A. (2016). Function of specialized regulatory proteins and signaling pathways in exercise-induced muscle mitochondrial biogenesis. Integrative medicine research, 5(3), 187–197.

- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., & Grodsky, G. M. (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine reviews*, 23(5), 599-622.
- Exeter, D., & Connell, D. A. (2010). Skeletal muscle: functional anatomy and pathophysiology. In *Seminars in musculoskeletal radiology* (Vol. 14, No. 02, pp. 097-105).
- Fainstein, M. K. (2007). Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica*, 26(1), 18-25.
- Felsing, N. E., Brasel, J. A., & Cooper, D. M. (1992). Effect of low and high intensity exercise on circulating growth hormone in men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 75(1), 157-162.
- Fernando, R., Drescher, C., Nowotny, K., Grune, T., & Castro, J. P. (2019). Impaired proteostasis during skeletal muscle aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 132, 58-66.
- Figueiredo, P. A., Powers, S. K., Ferreira, R. M., Appell, H. J., & Duarte, J. A. (2009). Aging impairs skeletal muscle mitochondrial bioenergetic function. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 64(1), 21-33.
- Findlay, R. A. (2003). Interventions to reduce social isolation amongst older people: where is the evidence?. *Ageing & Society*, 23(5), 647-658.
- Flegal, K. M., Carroll, M. D., Kit, B. K., & Ogden, C. L. (2012). Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *Jama*, 307(5), 491-497.

- Franco, A.A., Odom, R.S., Rando, T.A., 1999. Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 1122–1132.
- Fruehwald-Schultes, B., Oltmanns, K. M., Toschek, B., Sopke, S., Kern, W., Born, J., ... & Peters, A. (2002). Short-term treatment with metformin decreases serum leptin concentration without affecting body weight and body fat content in normal-weight healthy men. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 51(4), 531-536.
- Fujita, S., Rasmussen, B. B., Cadenas, J. G., Drummond, M. J., Glynn, E. L., Sattler, F. R., & Volpi, E. (2007). Aerobic exercise overcomes the age-related insulin resistance of muscle protein metabolism by improving endothelial function and Akt/mammalian target of rapamycin signaling. *Diabetes*, 56(6), 1615-1622.
- Fullerton, M. D., Galic, S., Marcinko, K., Sikkema, S., Pulinilkunnil, T., Chen, Z. P., y Hardie, D. G. (2013). Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nature medicine*, 19(12), 1649-1654.
- Gajdosik, R. L. (2001). Passive extensibility of skeletal muscle: review of the literature with clinical implications. *Clinical biomechanics*, 16(2), 87-101.
- Gong, L., Goswami, S., Giacomini, K. M., Altman, R. B., & Klein, T. E. (2012). Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenetics and genomics*, 22(11), 820–827.

- Gonzalo, S. (2010). Epigenetic alterations in aging. *Journal of applied physiology*, 109(2), 586-597.
- Grimby, G., Aniansson, A., Zetterberg, C., & Saltin, B. (1984). Is there a change in relative muscle fibre composition with age?. *Clinical physiology*, 4(2), 189-194.
- Guyton, AC, Hall, JE, Zocchi, L. y Aicardi, G. (1999). *Fisiologia medica* (págs. 1001-1015). EdiSES.
- Hammel, H. T., & Pierce, J. B. (1968). Regulation of internal body temperature. *Annual review of physiology*, 30(1), 641-710.
- Hamrick, M. W., McGee-Lawrence, M. E., & Frechette, D. M. (2016). Fatty Infiltration of Skeletal Muscle: Mechanisms and Comparisons with Bone Marrow Adiposity. *Frontiers in endocrinology*, 7, 69.
- Hartl, F. U. (2016). Cellular homeostasis and aging. *Annual review of biochemistry*, 85, 1-4.
- Hawley, S. A., Ross, F. A., Chevtzoff, C., Green, K. A., Evans, A., Fogarty, S., y Hardie, D. G. (2010). Use of cells expressing γ subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell metabolism*, 11(6), 554-565.
- Hepple, R. T., Qin, M., Nakamoto, H., & Goto, S. (2008). Caloric restriction optimizes the proteasome pathway with aging in rat plantaris muscle: implications for sarcopenia. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295(4), R1231-R1237.

- Hiona, A., & Leeuwenburgh, C. (2008). The role of mitochondrial DNA mutations in aging and sarcopenia: implications for the mitochondrial vicious cycle theory of aging. *Experimental gerontology*, 43(1), 24-33.
- Huang, C. C., Lin, W. T., Hsu, F. L., Tsai, P. W., & Hou, C. C. (2010). Metabolomics investigation of exercise-modulated changes in metabolism in rat liver after exhaustive and endurance exercises. *European journal of applied physiology*, 108(3), 557-566.
- Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, Inzucchi SE, Schumann WC, Petersen KF, Landau BR, Shulman GI. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2000 Dec;49(12):2063-9. doi: 10.2337/diabetes.49.12.2063. PMID: 11118008; PMCID: PMC2995498.
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 287-293.
- INEGI, 2018. www.inegi.org.mx > 2018 > doc > nota_tec_enadid_18
- Isoda, K., Young, J. L., Zirlik, A., MacFarlane, L. A., Tsuboi, N., Gerdes, N., ... & Libby, P. (2006). Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor- κ B in human vascular wall cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26(3), 611-617.

- Jacob W. S., Francone A. C., Lossow J. W. (1988). *Anatomía y Fisiología Humana*. México: Interamericana
- Ji, L. L., Dickman, J. R., Kang, C., y Koenig, R. (2010). Exercise-induced hormesis may help healthy aging. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*, 8(1), 73–79.
- Johnson, M. L., Irving, B. A., Lanza, I. R., Vendelbo, M. H., Konopka, A. R., Robinson, M. M., ... & Bergen III, H. R. (2015). Differential effect of endurance training on mitochondrial protein damage, degradation, and acetylation in the context of aging. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 70(11), 1386-1393.
- Justice, J. N., Niedernhofer, L., Robbins, P. D., Aroda, V. R., Espeland, M. A., Kritchevsky, S. B., ... & Barzilai, N. (2018). Development of clinical trials to extend healthy lifespan. *Cardiovascular endocrinology & metabolism*, 7(4), 80.
- Kalinkovich, A., & Livshits, G. (2017). Sarcopenic obesity or obese sarcopenia: a cross talk between age-associated adipose tissue and skeletal muscle inflammation as a main mechanism of the pathogenesis. *Ageing research reviews*, 35, 200-221.
- Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2015). Proteostasis and aging. *Nature medicine*, 21(12), 1406-1415.
- Kazior, Z., Willis, S. J., Moberg, M., Apró, W., Calbet, J. A., Holmberg, H. C., & Blomstrand, E. (2016). Endurance Exercise Enhances the Effect of Strength Training on Muscle Fiber Size and Protein Expression of Akt and mTOR. *PloS one*, 11(2), e0149082.

- Kelly, F. J., y Mudway, I. S. (2003). Protein oxidation at the air-lung interface. *Amino acids*, 25(3-4), 375–396. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0024-x>
- Khor, S. C., Abdul Karim, N., Wan Ngah, W. Z., Mohd Yusof, Y. A., & Makpol, S. (2014). Vitamin E in sarcopenia: current evidences on its role in prevention and treatment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014.
- Kim, T. N., & Choi, K. M. (2015). The implications of sarcopenia and sarcopenic obesity on cardiometabolic disease. *Journal of cellular biochemistry*, 116(7), 1171-1178.
- Klip, A., y Leiter, L. A. (1990). Cellular mechanism of action of metformin. *Diabetes care*, 13(6), 696-704.
- Kohut, M. L., McCann, D. A., Russell, D. W., Konopka, D. N., Cunnick, J. E., Franke, W. D., ... & Vanderah, E. (2006). Aerobic exercise, but not flexibility/resistance exercise, reduces serum IL-18, CRP, and IL-6 independent of β -blockers, BMI, and psychosocial factors in older adults. *Brain, behavior, and immunity*, 20(3), 201-209.
- Konopka, A. R., & Harber, M. P. (2014). Skeletal muscle hypertrophy after aerobic exercise training. *Exercise and sport sciences reviews*, 42(2), 53–61.
- Kovacheva, E. L., Sinha Hikim, A. P., Shen, R., Sinha, I., & Sinha-Hikim, I. (2010). Testosterone supplementation reverses sarcopenia in aging through regulation of myostatin, c-Jun NH2-terminal kinase, Notch, and Akt signaling pathways. *Endocrinology*, 151(2), 628-638.
- Kujawska-Luczak, M., Szulinska, M., Skrypnik, D., Musialik, K., Swora-Cwynar, E., Kregielska-Narozna, M., ... & Bogdanski, P. (2018). The influence of orlistat,

metformin and diet on serum levels of insulin-like growth factor-1 in obese women with and without insulin resistance. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, 69(5).

- Kulbacka, J., Saczko, J., Chwilkowska, A., Choromańska, A., & Skołucka, N. (2012). Apoptosis, free radicals and antioxidant defense in antitumor therapy. *Antioxidant enzyme*, 265-302.
- Kuo, I. Y., & Ehrlich, B. E. (2015). Signaling in muscle contraction. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(2), a006023.
- Kyriazis, M. (2016). Challenging Aging The Anti-senescence Effects of Hormesis, Environmental Enrichment and Information Exposure (Vol. 1). Bentham Science
- Law, T. D., Clark, L. A., y Clark, B. C. (2016). Resistance Exercise to Prevent and Manage Sarcopenia and Dynapenia. *Annual review of gerontology y geriatrics*, 36(1), 205–228.
- Lee, W. S., Cheung, W. H., Qin, L., Tang, N., & Leung, K. S. (2006). Age-associated Decrease of Type IIA/B Human Skeletal Muscle Fibers. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*
- Ling, C., Poulsen, P., Simonsson, S., Rönn, T., Holmkvist, J., Almgren, P., ... & Vaag, A. (2007). Genetic and epigenetic factors are associated with expression of respiratory chain component NDUFB6 in human skeletal muscle. *The Journal of clinical investigation*, 117(11), 3427-3435.

- López-Diazguerrero, N. E., González, V. Y., Hernández-Bautista, R. J., Alarcón-Aguilar, A., Luna-López, A., y Königsberg, M. (2013). Hormesis: lo que no mata, fortalece. *Gaceta médica de México*, 149(4), 438-447.
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217.
- Lukjanenko, L., Karaz, S., Stuelsatz, P., Gurriaran-Rodriguez, U., Michaud, J., Dammone, G., ... & Liot, S. (2019). Aging disrupts muscle stem cell function by impairing matricellular WISP1 secretion from fibro-adipogenic progenitors. *Cell Stem Cell*, 24(3), 433-446.
- Luna-López, A., González-Puertos, V. Y., López-Diazguerrero, N. E., & Königsberg, M. (2014). New considerations on hormetic response against oxidative stress. *Journal of cell communication and signaling*, 8(4), 323-331.
- M. L. A. Gikins and C. B. Clifford (2008). *Clinical Laboratory Parameters for Crl:WI(Han) Rats*, vol. 1, Publisher Charles River Laboratories International, Wilmington, MA.
- Mahdy, M. A. (2019). Skeletal muscle fibrosis: an overview. *Cell and tissue research*, 375(3), 575-588.
- Marcus, R. L., Addison, O., Kidde, J. P., Dibble, L. E., & Lastayo, P. C. (2010). Skeletal muscle fat infiltration: impact of age, inactivity, and exercise. *The journal of nutrition, health & aging*, 14(5), 362–366. <https://doi.org/10.1007/s12603-010-0081-2>

- Marnett, L. J., Riggins, J. N., & West, J. D. (2003). Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *The Journal of clinical investigation*, 111(5), 583-593.
- McArdle, M. A., Finucane, O. M., Connaughton, R. M., McMorrow, A. M., & Roche, H. M. (2013). Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Frontiers in endocrinology*, 4, 52.
- Mendoza-Núñez, V.M., Martínez-Maldonado M.L., Vargas-Guadarrama, L.A. (2013).
- Mesquita CS, Oliveira R, Bento F, Geraldo D, Rodrigues JV, Marcos JC. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Anal Biochem*. 2014 Aug 1;458:69-71. doi: 10.1016/j.ab.2014.04.034. Epub 2014 May 6. PMID: 24814294.
- Miljkovic, N., Lim, J. Y., Miljkovic, I., & Frontera, W. R. (2015). Aging of skeletal muscle fibers. *Annals of rehabilitation medicine*, 39(2), 155.
- Montero FN & Serra RJ (2013). Role of exercise on sarcopenia in the elderly. *Eur J PhysRehabilMed*; 49: 131-43.
- Morley, J. E., Kaiser, F. E., Perry III, H. M., Patrick, P., Morley, P. M., Stauber, P. M., ... & Garry, P. J. (1997). Longitudinal changes in testosterone, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone in healthy older men. *Metabolism*, 46(4), 410-413.

- Morley J. E. (2016). Frailty and Sarcopenia: The New Geriatric Giants. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*, 68(2), 59–67.
- Nath, N., Khan, M., Paintlia, M. K., Singh, I., Hoda, M. N., & Giri, S. (2009). Metformin attenuated the autoimmune disease of the central nervous system in animal models of multiple sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(12), 8005–8014.
- Oliveira, R. J. D., Bottaro, M., Junior, J. T., Farinatti, P. T. V., Bezerra, L. A., y Lima, R. M. (2011). Identification of sarcopenic obesity in postmenopausal women: a cutoff proposal. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44(11), 1171-1176.
- Paddon-Jones, D., Sheffield-Moore, M., Zhang, X. J., Volpi, E., Wolf, S. E., Aarsland, A., ... & Wolfe, R. R. (2004). Amino acid ingestion improves muscle protein synthesis in the young and elderly. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 286(3), E321-E328.
- Pandey, A., & Kumar, V. L. (2016). Protective effect of metformin against acute inflammation and oxidative stress in rat. *Drug Development Research*, 77(6), 278-284.
- Patel, P. N., & Zwibel, H. (2020). *Physiology, exercise*. StatPearls [Internet].
- Perez-Sousa, M. A., Venegas-Sanabria, L. C., Chavarro-Carvajal, D. A., Cano-Gutierrez, C. A., Izquierdo, M., Correa-Bautista, J. E., & Ramírez-Vélez, R. (2019). Gait speed as a mediator of the effect of sarcopenia on dependency in activities of daily living. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 10(5), 1009-1015.

- Pedersen, B. K., & Saltin, B. (2006). Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 16(S1), 3-63.
- Petr, M. A., Tulika, T., Carmona-Marin, L. M., & Scheibye-Knudsen, M. (2020). Protecting the Aging Genome. *Trends in Cell Biology*, 30(2), 117-132.
- Phu, S., Boersma, D., & Duque, G. (2015). Exercise and sarcopenia. *Journal of Clinical Densitometry*, 18(4), 488-492.
- Piskovatska, V., Stefanyshyn, N., Storey, K. B., Vaiserman, A. M., & Lushchak, O. (2019). Metformin as a geroprotector: experimental and clinical evidence. *Biogerontology*, 20(1), 33-48.
- Pomatto, L. C., & Davies, K. J. (2017). The role of declining adaptive homeostasis in ageing. *The Journal of physiology*, 595(24), 7275-7309.
- Qaisar, R., Bhaskaran, S., & Van Remmen, H. (2016). Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. *Free Radical Biology and Medicine*, 98, 56-67.
- Qiu, Z., Zheng, K., Zhang, H., Feng, J., Wang, L., & Zhou, H. (2017). Physical exercise and patients with chronic renal failure: a meta-analysis. *BioMed research international*, 2017.
- RadEk Z, Taylor AW, Ohno H, Goto S (2001) Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immun Rev* 7:90–107
- Ramos E. (2016). Análisis de la participación laboral de los adultos mayores con base en un modelo logit. *Situación demográfica de México: Consejo Nacional de Población*.

- Rena, G., Hardie, D. G., & Pearson, E. R. (2017). The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*, 60(9), 1577–1585. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z>
- Richardson, B. (2003). Impact of aging on DNA methylation. *Ageing research reviews*, 2(3), 245-261.
- Riuzzi, F., Sorci, G., Sgheddu, R., Chiappalupi, S., Salvadori, L., & Donato, R. (2018). RAGE in the pathophysiology of skeletal muscle. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 9(7), 1213-1234.
- Rönn, T., Poulsen, P., Hansson, O., Holmkvist, J., Almgren, P., Nilsson, P., ... & Ling, C. (2008). Age influences DNA methylation and gene expression of COX7A1 in human skeletal muscle. *Diabetologia*, 51(7), 1159.
- Rosen, C. J., & Bouxsein, M. L. (2006). Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone?. *Nature clinical practice Rheumatology*, 2(1), 35-43.
- Rosenberg IH, 1989. Comentarios resumidos. *Soy J Clin Nutr* 50:1231-1233.
- Rubinstein, N.A., Kelly, A.M., 2004. The diversity of muscle fiber types and its origin during development. In: Engel, A.E., FranziniArmstrong, C. (Eds.), *Myology*, 3rd ed. McGraw-Hill, New York, pp. 87 – 103.
- Sassone-Corsi P. (2012). The cyclic AMP pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(12), a011148. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011148>
- Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological reviews*, 91(4), 1447-1531.

- Secretaría de Gobernación. (2019). Informa Conapo sobre la esperanza de vida de la población mexicana. Consejo Nacional de Población. Boletín 295, <https://www.gob.mx/segob/prensa/informa-conapo-sobre-la-esperanza-de-vida-de-la-poblacion>.
- Serra RJ. Consecuencias Clínicas de la sarcopenia (2006). *Nutr. Hosp.*; 21 (3): 46-50.
- Shefer, G., Van de Mark, DP, Richardson, JB y Yablonka-Reuveni, Z. (2006). El tamaño del grupo de células satélite sí importa: definir la potencia miogénica del músculo esquelético envejecido. *Biología del desarrollo*, 294 (1), 50-66.
- Siparsky, P. N., Kirkendall, D. T., & Garrett Jr, W. E. (2014). Muscle changes in aging: understanding sarcopenia. *Sports health*, 6(1), 36-40.
- Solymár, M., Ivic, I., Pótó, L., Hegyi, P., Garami, A., Hartmann, P., ... & Sarlós, P. (2018). Metformin induces significant reduction of body weight, total cholesterol and LDL levels in the elderly—A meta-analysis. *PloS one*, 13(11), e0207947.
- Tabary, J. C., Tabary, C., Tardieu, C., Tardieu, G., & Goldspink, G. (1972). Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization at different lengths by plaster casts. *The Journal of physiology*, 224(1), 231-244.
- Tagliaferri, C., Salles, J., Landrier, J. F., Giraudet, C., Patrac, V., Lebecque, P., ... & Huertas, A. (2015). Increased body fat mass and tissue lipotoxicity associated with ovariectomy or high-fat diet differentially affects bone and skeletal muscle metabolism in rats. *European journal of nutrition*, 54(7), 1139-1149.

- Tanimoto, Y., Watanabe, M., Sun, W., Sugiura, Y., Hayashida, I., Kusabiraki, T., & Tamaki, J. (2014). Sarcopenia and falls in community-dwelling elderly subjects in Japan: Defining sarcopenia according to criteria of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Archives of gerontology and geriatrics*, 59(2), 295-299.
- Thomson D. M. (2018). The Role of AMPK in the Regulation of Skeletal Muscle Size, Hypertrophy, and Regeneration. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 3125. <https://doi.org/10.3390/ijms19103125>
- Ursini, F., Russo, E., Pellino, G., D'Angelo, S., Chiaravalloti, A., De Sarro, G., Manfredini, R., & De Giorgio, R. (2018). Metformin and Autoimmunity: A "New Deal" of an Old Drug. *Frontiers in immunology*, 9, 1236.
- Velders, M., y Diel, P. (2013). How sex hormones promote skeletal muscle regeneration. *Sports medicine*, 43(11), 1089-1100.
- Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de medicina militar*, 31(2), 126-133.
- Venturelli, M., Morgan, G. R., Donato, A. J., Reese, V., Bottura, R., Tarperi, C., Milanese, C., Schena, F., Reggiani, C., Naro, F., Cawthon, R. M., & Richardson, R. S. (2014). Cellular aging of skeletal muscle: telomeric and free radical evidence that physical inactivity is responsible and not age. *Clinical science (London, England : 1979)*, 127(6), 415–421.
- Verdijk, L. B., Snijders, T., Drost, M., Delhaas, T., Kadi, F., & Van Loon, L. J. (2014). Satellite cells in human skeletal muscle; from birth to old age. *Age*, 36(2), 545-557.

- Vijg, J., y Suh, Y. (2013). Genome instability and aging. *Annual review of physiology*, 75, 645-668.
- von Figura, G., Hartmann, D., Song, Z., & Rudolph, K. L. (2009). Role of telomere dysfunction in aging and its detection by biomarkers. *Journal of molecular medicine*, 87(12), 1165-1171.
- Wakil, S. J., y Abu-Elheiga, L. A. (2009). Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *Journal of lipid research*, 50 Suppl(Suppl), S138–S143.
<https://doi.org/10.1194/jlr.R800079-JLR200>
- Waltz TB, Fivenson EM, Morevati M, Li C, Becker KG, Bohr VA, et al (2018). Sarcopenia, aging and prospective interventional strategies. *Curr Med Chem*.25:5588–96.
- Webb, R., Hughes, M. G., Thomas, A. W., & Morris, K. (2017). The ability of exercise-associated oxidative stress to trigger redox-sensitive signalling responses. *Antioxidants*, 6(3), 63.
- 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.
- WHO 1999 https://www.who.int/ageing/publications/alc_elmanual.pdf
- Wulf, S. F., Ropars, V., Fujita-Becker, S., Oster, M., Hofhaus, G., Trabuco, L. G., ... & Schröder, R. R. (2016). Force-producing ADP state of myosin bound to actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(13), E1844-E1852.

- Yan, Z., Okutsu, M., Akhtar, Y. N., y Lira, V. A. (2011). Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. *Journal of applied physiology*, 110(1), 264-274.
- Yarasheski, K. E., Zachwieja, J. J., & Bier, D. M. (1993). Acute effects of resistance exercise on muscle protein synthesis rate in young and elderly men and women. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 265(2), E210-E214.
- Zembroń-Lacny, A., Dziubek, W., Rogowski, Ł., Skorupka, E., & Dąbrowska, G. (2014). Sarcopenia: monitoring, molecular mechanisms, and physical intervention. *Physiological research*, 63(6).

12. Artículos



12.1 Artículo original

Hindawi
Oxidative Medicine and Cellular Longevity
Volume 2019, Article ID 3428543, 14 pages
<http://doi.org/10.1155/2019/3428543>



Research Article

Long-Term Moderate Exercise Combined with Metformin Treatment Induces an Hormetic Response That Prevents Strength and Muscle Mass Loss in Old Female Wistar Rats

David Hernández-Álvarez,^{1,2} Beatriz Mena-Montes,^{1,3,4} Rafael Toledo-Pérez,^{1,4} Gibrán Pedraza-Vázquez,^{1,4} Stefanie Paola López-Cervantes,^{1,4} Alfredo Morales-Salazar,¹ Edith Hernández-Cruz,¹ Roberto Lazzarini-Lechuga,⁵ Roman Royer Vázquez-Cárdenas,¹ Silvia Vilchis-DeLaRosa,¹ Pedro Posadas-Rodríguez,^{1,4} Roberto Santín-Márquez,^{1,4} Oscar Rosas-Carrasco ,³ Alejandra Ibañez-Contreras,^{6,7} Adriana Alarcón-Aguilar,¹ Norma Edith López-Diazguerrero,¹ Armando Luna-López,³ and Mina Königsberg ¹

¹Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México 09340, Mexico

²Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México 09340, Mexico

³Instituto Nacional de Geriátrica, SSA, Ciudad de México 10200, Mexico

⁴Posgrado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México 09340, Mexico

⁵Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México 09340, Mexico

⁶APREXIO S.A.S. de C.V., Mexico

⁷Investigación Biomédica Aplicada (INBIOMA) S.A.S de C.V., Mexico

Correspondence should be addressed to Mina Königsberg; mkf@xanum.uam.mx

Received 2 August 2019; Accepted 18 September 2019; Published 11 November 2019

Academic Editor: Laura Bravo

Copyright © 2019 David Hernández-Álvarez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Sarcopenia is a syndrome characterized by a progressive and generalized skeletal muscle mass and strength loss, as well as a poor physical performance, which is strongly associated with aging. Sedentary lifestyle in the elderly contributes to this condition; however, physical activity improves health, reducing morbidity and mortality. Recent studies have shown that metformin (MTF) can also prevent muscle damage promoting muscular performance. To date, there is great controversy if MTF treatment combined with exercise training improves or nullifies the benefits provided by physical activity. This study is aimed at evaluating the effect of long-term moderate exercise combined with MTF treatment on body composition, strength, redox state, and survival rate during the life of female Wistar rats. In this study, rats performed moderate exercise during 20 of their 24 months of life and were treated with MTF for one year or for 6 months, i.e., from 12 to 24 months old and 18 to 24 months old. The body composition (percentage of fat, bone, and lean mass) was determined using a dual-energy X-ray absorption scanner (DXA), and grip strength was determined using a dynamometer. Likewise, medial and tibial nerve somatosensory evoked potentials were evaluated and the redox state was measured by HPLC, calculating the GSH/GSSG ratio in the gastrocnemius muscle. Our results suggest that the MTF administration, both in the sedentary and the exercise groups, might activate a mechanism that is directly related to the induction of the hormetic response through the redox state modulation. MTF treatment does not eliminate the beneficial effects of exercise throughout life, and although MTF does not increase muscle mass, it increases longevity.

1. Introduction

Aging is a gradual process characterized by a decrease in the overall homeostatic response, which leads to the accumulation of a wide variety of molecular and cellular damages associated with a gradual decline in physical and mental abilities [1, 2]. Likewise, aging is associated with profound changes in body composition; one of the main changes is the loss of skeletal muscle mass called sarcopenia [3, 4].

Sarcopenia is a syndrome that can lead to physical disability, walk disturbances, and falls that cause the loss of functional independence, increasing the health cost and eventually favors mortality risk [5, 6]. The etiology of sarcopenia is multifactorial, since it involves changes in both muscular and endocrine metabolism, nutritional aspects, as well as mitochondrial, oxidative stress, and genetic factors [7, 8]. The decrease of the physical activity and the functional limitations during aging favors a sedentary lifestyle reducing, in this way, the yield and muscular force, which predisposes the body to an increased risk of disability and disease [9]. Physical inactivity is clearly related to the loss of muscle mass and strength; conversely increased levels of physical activity can have protective effects [10]. Several longitudinal studies have shown that regular exercise can extend life expectancy and reduce the morbidity of the elderly [9]. The difference in prevalence of sarcopenia between men and women is somewhat controversial; some reports suggest that men have a higher incidence, while others propose the contrary [11–13]. However, it is known that in women, there is a special relationship between sarcopenia and osteoporosis. It has been reported that 68% of women diagnosed with sarcopenia have osteoporosis, while 20% of women aged diagnosed with osteoporosis have sarcopenia. Something similar happens in elderly men, but to a less extend [13, 14]. Therefore, in this study, we decided to use female rats as our experimental group.

Metformin (MTF) is a drug that belongs to the biguanide family; this medication has been highly prescribed for the type II diabetes treatment in the past 60 years [15]. Although its mechanism of action has not been fully elucidated, it is known that MTF inhibits hepatic gluconeogenesis by decreasing glucose plasma levels [16]. It has also been found that MTF inhibits mitochondrial respiratory chain complex I and generates low levels of oxidants, which induce the antioxidant response producing a hormetic effect. At the same time, reduced ATP levels activate AMPK, which activates diverse protective pathways [17]. It has been proposed that MTF prevents the damage caused by sedentary lifestyle by increasing the capacity of muscular performance [18], so MTF has been proposed as a geroprotective drug that can decrease the rate of aging [19, 20].

To date, there is great controversy if MTF treatment combined with exercise improves or nullifies the benefits provided by physical activity. There are reports in elderly people where the combined treatment eliminated the increase in mitochondrial respiration and insulin sensitivity given by exercise, without modifying the rate of protein synthesis, thereby abrogating the benefits of exercise on mitochondrial function [21]. Likewise, treatment with MTF

significantly decreased exercise capacity in newly diagnosed patients with metabolic syndrome [22]. Other studies showed that MTF did not alter oxygen consumption or anaerobic threshold when administered to people who exercise, but it decreased the heart rate, exercise test duration, and respiratory rate ratio and increased rating of perceived exertion [23]. However, it has been reported that supplementing exercise with MTF (but not exercise alone), lowered proinsulin concentrations and increased insulin clearance in adults with prediabetes [24] suggesting a synergistic effect of both treatments. Similarly, combination treatment improved glucose tolerance and other parameters in women with polycystic ovary syndrome [25]. Eltonsy et al. also reported an improvement in glycated hemoglobin, functional capacity, lipid profile, quality of life, and body weight when using the combined treatment [26].

The problem with these great discrepancies is that the studies were performed for a short time in patients with or without different metabolic disorders; therefore, it is difficult to compare them. In this study, we used healthy Wistar female rats, which were treated and evaluated longitudinally throughout life. The rats performed moderate exercise for 20 of their 24 months of life (from 4 to 24 months old) and were administered with MTF either for one year or for 6 months (from 12 to 24 months old and from 18 to 24 months old). Their size and weight were measured, as well as the percentage of fat, bone, and lean mass using a dual-energy X-ray absorption scanner (DXA). Grip strength and nerve somatosensory evoked potentials were also evaluated, as well as redox state by GSH/GSSG determination.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals. All chemicals and reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). The reagents obtained from other sources are detailed throughout the text.

2.2. Animals. One hundred sixty Wistar female rats (*Rattus norvegicus*) were used in this study. The animals were provided by the closed breeding colony from the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa and were housed five per cage in polycarbonate cages, with reversed light-dark cycles and provided with standard commercial rat diet (Harlan 2018S, USA) and water *ad libitum*. All procedures with animals were strictly carried out according to the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Principles of the Mexican Official Ethics Standard 062-ZOO-1999 and the Standard for the disposal of biological waste (NOM-087-ECOL-1995). Chemical sedation was required for the application of the evoked potential tests and the DXA scan. The rats were anesthetized using an anesthetic mixture, which contained ketamine (100 mg/kg; Anesket® Pisa Farmacéutica Mexicana) and xylazine (5 mg/kg; Procin® Pisa Farmacéutica Mexicana) by intramuscular administration.

2.3. Experimental Groups. Rats were divided into 6 groups ($n = 5$): (1) sedentary rats (S), (2) sedentary rats that were treated with MTF from 12 months of age until their

euthanasia at 24 months (one year of MTF treatment) (SM12), (3) sedentary rats that were treated with MTF from 18 months of age until their euthanasia at 24 months (six months of MTF treatment) (SM18), (4) rats that began their exercise routine from the age of 4 months and continued training until their euthanasia at 24 months (animals exercised for 20 months) (E); (5) rats that began their exercise routine from the age of 4 months and continued training until their euthanasia at 24 months and that were also treated with MTF for one year (from 12 to 24 months) (EM12), and rats that began their exercise routine at 4 months of age and continued training until their euthanasia at 24 months and that were also treated with MTF for six month (from 18 to 24 months) (EM18). MTF was daily administered orally at an already reported dose of 100 mg/kg body weight [27]. Since there are very few longitudinal studies to understand the effects of MTF at long-term treatment and, in particular, in combination with exercise training, our aim was to evaluate the long-term effect of that combined intervention and evaluate the differences when MTF treatment started at middle age or at old age. Our results related to the BMI and grip force showed that there are important changes at 12 and 18 months of age; consequently, those ages were considered to be middle age (12 months) and the beginning of old age (18 months). So MTF was administered to the sedentary and exercised rats starting at those ages.

2.4. Exercise Routine. Although there are different exercise training schemes, such as aerobic exercise, progressive resistance exercise, flexibility, and balance [28], our group has shown that moderate exercise throughout life is a good intervention to prevent sarcopenia in advanced ages [29]. This type of exercise simulates a light walk for half an hour and is suitable for old animals or elderly people where arduous exercise is difficult to perform. Consequently, here, the rats performed a mild exercise regimen, which started at 4 months of age and continued until their euthanasia at 24 months. The exercise routine was performed on the small animal treadmill (Panlab/Harvard Apparatus) at a controlled rate of 25 cm/s for 30 min a day, for 5 days a week during 20 months, as described by Mena-Montes and coworkers [29].

2.5. Morphometric and Biochemical Determinations. Animals were weighed and measured every 4 months in order to obtain the morphometric dimensions. For the biochemical determinations, the blood was collected during the animal euthanasia. Serum was obtained by centrifugation at 3500 rpm for 10 min. Subsequently, glucose, cholesterol, triglycerides, creatinine, GOT, GPT, GGT, and HDL were determined using the SPOTCHEM EZ SP-4430 chemistry analyzer.

2.6. Dual-Energy X-Ray Absorptiometry (DXA Scan). The body composition was determined using the DXA scan (Serie Discovery QDR, Hologic® Discovery), at different ages (4, 8, 12, 18, 20, and 24 months of age). Prior to each evaluation, the equipment was calibrated with Hologic Rat Step Phantom P/N 010-0758. The body mass index, the total fat, the

total bone, the total lean mass, and the gastrocnemius lean mass were obtained as described previously [29].

2.7. Histology. In order to evaluate muscle structure and integrity, hematoxylin and eosin (H/E) staining was performed in histological sections of the gastrocnemius muscle as described before [30].

2.8. Grip Strength. The grip strength was evaluated using a Rhino BAC-20 digital dynamometer (PKCh) with a measuring range between 0.1 N and 200 N (Newton). The dynamometer was vertically attached to a stainless steel grid, and the maximum gripping force was recorded at the time when a rat was released from the grid. The results are reported as N/kg-rat weight.

2.9. Evoked Potentials. In order to analyze another parameter related to movement functional deterioration, a non-invasive test that evaluates the neural sensory processing was performed. The evoked potentials (EP) were obtained in the six animal groups at 24 months of age, prior to their euthanasia, at APREXBIO's Neurophysiology Laboratory. EP were recorded in a NEURONICA 5® equipment (Neuronic®, La Habana, Cuba) using subcutaneous needle electrodes (Ambu®, Spain) located according with the 10/20 International System. The electrophysiological assays were registered employing $<5 \Omega$ impedances. Medial nerve somatosensory evoked potentials (MNSSEP) and tibial nerve somatosensory evoked potentials (TNSSEP) were obtained. To monitor MNSSEP, electrodes were placed at the 7° cervical vertebrae (C7) (-) and the contralateral superior somatosensory cortex (C3' or C4') (-) to the stimulated limb, referenced to Fz (+), and ground was placed at the mastoid. For TNSSEP registration, electrodes were placed at the following derivations: lumbar vertebrae (L5) (-) and the contralateral somatosensory cortex (C3' or C4') (-) to the stimulated limb, referenced to Fz (+), and ground was placed at the mastoid. The stimulus was a 100 μ s monophasic electric squared pulse, at 0.5-1.1 stimulus/s frequency, which was applied behind the medial malleolus. The filters used were from 5 to 2500 Hz, at a 1.5 mA intensity, and the response was replicated at least once to ensure the event reproducibility [31].

2.10. GSH/GSSG Determination by HPLC. The concentrations of GSH and GSSG in the gastrocnemius muscle, obtained from the six animal groups at 24 months of age, were determined as follows. Two hundred milligrams of the tissue was homogenized with 800 μ l of lysis buffer, 10% HCl, and 10 mM bathophenanthrolinedisulfonic acid (BPDS). Subsequently, the homogenate was centrifuged at 14000 rpm for 5 min at 4°C. Then, the supernatant was recovered and injected into the chromatographic system, which consisted of a binary 1525 pump (Waters, MA) connected to a Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent, CA) reverse-phase column (250 \times 4.6 mm i.d., particle size 5 μ m). The mobile phase consisted of acetonitrile (1%) and 20 mM potassium monobasic phosphate buffer, pH 7.0 (99%) at a 1 ml/min flow rate. GSH and GSSG were detected at 210 nm using a 2489

UV/Vis detector (Waters, MA). To determine GSH and GSSG concentration in the samples, standard curves were made using commercial standards at 5, 10, 25, 50, 100, 200, and 400 μM for each reagent.

2.11. Statistical Analysis. Data are presented as a mean \pm standard deviation of each animal group ($n = 5$). The population growth curves were established by polynomial correlations. The differences between the groups were determined by multivariate analysis (MANOVA). The differences in the redox state were determined by an ANOVA followed by a multiple comparison test of Tukey-Kramer. In all cases, the significance used is mentioned.

3. Results

3.1. Biochemical Determinations. The content of the transaminases Aspartate Aminotransferase (AST) and Alanine Amino Transaminase (ALT), as well as other parameters such as total cholesterol, HDL, triglycerides, creatinine, and fasting glucose levels, were evaluated at 24 months, when the animals were euthanized. The results obtained (Supplemental material, Table 1) reveal that neither the treatment with MTF nor the exercise modified these parameters, which remained in the ranges reported by the Clinical Laboratory Parameters for Wistar rats [32].

Remarkably, only two parameters increased in comparison to the S group, the creatinine levels in exercised animals, and AST levels in all groups. However, neither of those parameters were out of the normal ranges reported [32].

3.2. Morphometric Analysis and Dual-Energy X-Ray Absorptiometry (DXA Scan). In order to better analyze our study groups and to compare the behavior of some important variables, we decided to transform the data as population groups that can be compared longitudinally and we made a polynomial correlation curve to describe the developmental stages of the rat. First, we performed a multivariate analysis of the morphometric variables body weight, nasorectal length, and body/mass index (BMI), comparing only the exercised rats vs. the sedentary rats at 8, 12, 18, 20, and 24 months of age (Figures 1(a)–1(c)). Then, a comparative analysis of the BMI including also the MTF treatment as a variable at 12, 18, 20, and 24 months of age was performed (Figure 1(d)).

In Figure 1(a), an increase in sedentary rats' body weight (BW) can be observed with respect to age with a correlation coefficient of $R^2 = 0.9879$. Exercised rats showed a similar BW increase with a correlation coefficient of $R^2 = 0.9353$. Both groups showed two stages where significant increases were observed. The first one was between 8 and 12 months of age, where a significant BW increase was determined, 16.39% for sedentary rats ($p = 0.012$) and 15% for exercised rats ($p = 0.025$). The second staged was between 12 and 18 months, in which the sedentary animals showed a BW increase of 15.49% ($p = 0.035$) and the exercised animals of 13.04% ($p = 0.05$). The BM curves showed that sedentary rats were heavier than exercised rats.

Figure 1(b) illustrates the results obtained for the nasorectal length measurements. In both groups, the length increased with the age during the same periods of time where the weight augmented. From 8 to 12 months of age, the sedentary animals grew 5.18% ($p = 0.012$) and the exercised 4.24% ($p = 0.015$), while from 12 to 18 months of age, the sedentary rats increased their length 3.13% ($p = 0.005$) and the exercised rats 2.26% ($p = 0.01$). The nasorectal longitudinal curves showed correlation coefficients of $R^2 = 0.927$ for the sedentary rats and $R^2 = 0.74$ for the exercised rats.

Next, the BMI was evaluated. This parameter is commonly used to determine the nutritional status and development of organisms and provides indirect information about body composition.

The population analyzed showed very interesting results; both sedentary and exercised rats presented three stages in which the BMI changed (Figure 1(c)). The first one was between the 4 and 8 months of age, where an increase in BMI was observed, 8.5% for sedentary rats ($p = 0.023$) and 7.5% for exercised rats ($p = 0.019$). The second stage was between 8 and 12 months, where the BMI increased 16% for sedentary rats ($p = 0.045$) and 13% ($p = 0.015$) for those who exercised. In the third stage (from 18 to 24 months of age), the BMI increase for sedentary rats was 8% ($p = 0.037$) and 10% ($p = 0.025$) for exercised ones. The BMI was similar in both groups until 24 months of age. This parameter is relevant since it indicates the relationship between height and mass in the experimental groups in a more objective way, so it was the parameter that we used to compare the other experimental groups.

Due to the fact that important differences in the BMI were observed at 12 and 18 months of age and since those ages are considered to be middle age (12 months) and the beginning of old age (18 months), MTF was administered to the sedentary and exercised rats starting at 12 or 18 months of age. Sedentary animals that were treated with MTF starting at 12 months of age until their euthanasia at 24 months (one-year treatment) will be referred as SM12, while sedentary rats that were treated with MTF starting at 18 months of age until their euthanasia at 24 months (6-month treatment) will be referred as SM18. As regards to the exercised rats that were simultaneously treated with MTF, the ones that exercised for 20 months (from 4 to 24) and that took MTF from 12 to 24 months will be referred as EM12 and the ones that took MTF from 18 to 24 months and also exercised for 20 months will be called EM18.

As shown in Figure 1(d), our results indicate that the EM12 rats decreased their BMI by 9.97% at 18 months ($p = 0.023$), 9.93% at 20 months ($p = 0.019$), and 7.5% at 24 months ($p = 0.043$) when compared with the sedentary rats (S). Likewise, the SM18 rats decreased their BMI by 8% at 20 months ($p = 0.045$) and 13% at 24 months ($p = 0.005$) vs. S. The other experimental groups did not show significant differences in their BMI with respect to the sedentary group.

Next, we evaluated the body composition of all experimental groups using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA scan). First, we determined the percentage of body fat. The results shown in Figure 2(a) indicate that the exercise

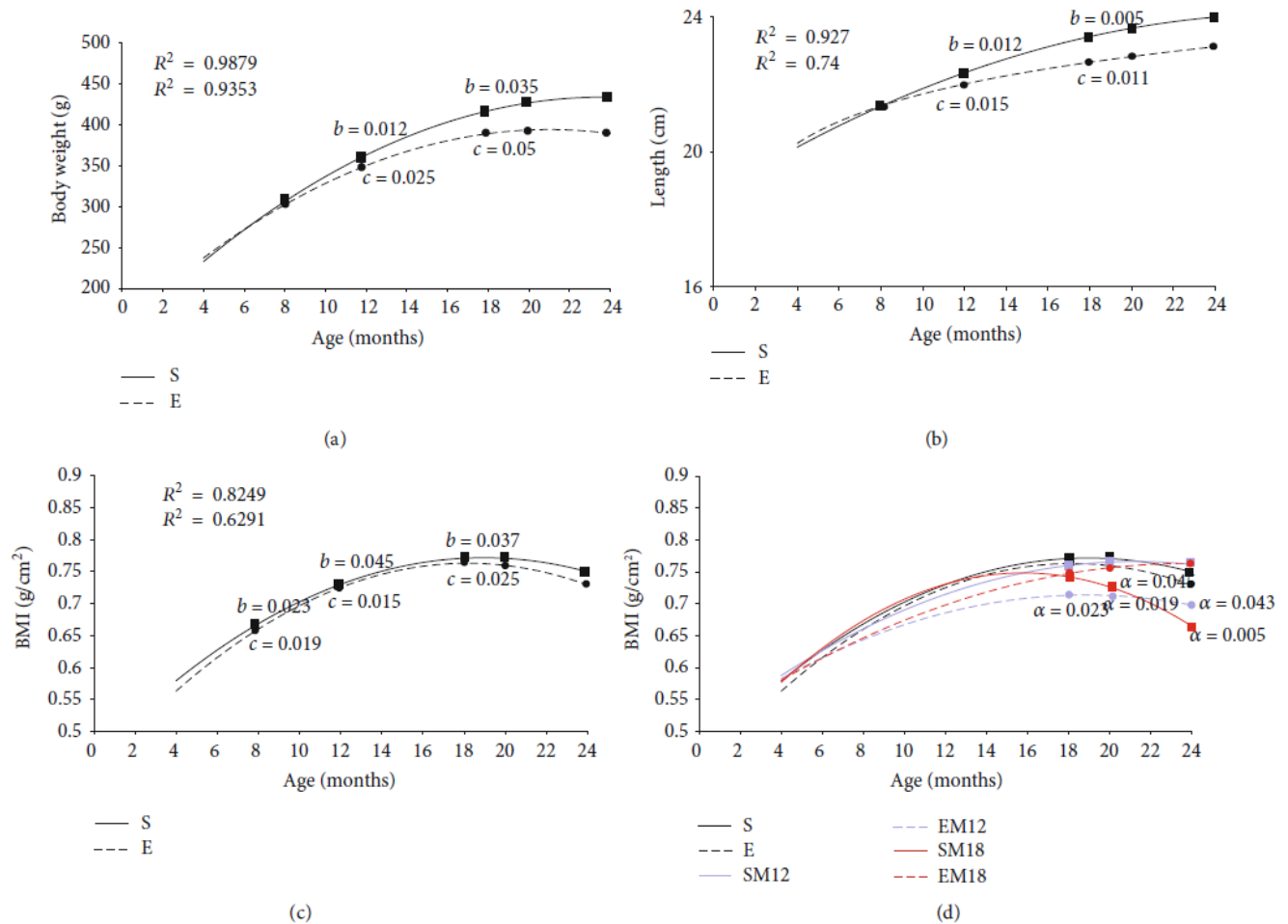


FIGURE 1: Body weight, length, and BMI. Wistar rat growth curves were performed by evaluating the body weight (a) and the nasorectal length (b). Using these data, the BMI for each group was obtained (c). Measurements were determined every 4 months (4, 8, 12, 18, 20, and 24 months) in sedentary (S) and exercised (E) rats. Each point in the curve represents the mean of all independent experiments carried out in each group of animals ($n = 5$); the growth curves were established using a polynomial adjustment (R^2). Since the best parameter to define the different growth stages of Wistar rats is the BMI, this parameter was used to compare the different experimental groups (d). The experimental groups evaluated (S, E, SM12, EM12, SM18, and EM18) are described in detail in Materials and Methods. The differences between the experimental groups with respect to the sedentary group (S) are marked with the letter *a*. The exact probability value is indicated in the graph. The differences between ages were determined by comparing each age with its predecessor and are denoted as *b* for the sedentary rats and *c* for the exercised rats. The exact probability value is indicated in the graph. The comparisons were established by a multivariate test and corroborated with a Student *t*-test.

groups exhibited 26.58% less body fat than the sedentary rats ($p = 0.015$) at the age of 12 months. This difference in weight is attributed exclusively to the exercise, because the MTF treatments had not yet started, since they started at 12 or at 18 months, respectively. The measurements of body fat percentage at 18 months of age revealed that the groups of rats that exercised still presented 21.05% less body fat than the sedentary group ($p = 0.023$ and $p = 0.025$). This is again attributed only to the exercise, since at the time of the 18-month DXA determination, the EM18 rats had not started yet with the metformin treatment. Interestingly, the EM12 rats given metformin for 6 months showed a 34.21% decrease in body fat with respect to sedentary rats ($p = 0.011$).

The body fat percentage at 20 months of age determined for the E and EM18 groups decreased 18.91% with respect to the S group ($p = 0.028$), while the EM12 group decreased

30.41% ($p = 0.014$). At 24 months, the fat percentage in the rats that exercised (E) decreased by 16.69% with respect to the S group ($p = 0.039$) and the EM12 group diminished by 16.78% ($p = 0.033$), while the SM18 group decreased 12.44% ($p = 0.049$). The other analyzed groups did not present significant differences, as can be seen in Figure 2(a).

The analysis of the curves of bone composition (Figure 2(b)) revealed an increase in 8.1% ($p = 0.006$) of bone in the E group and of 13.51% ($p = 0.001$) in the EM12 group with respect to the S group at 12 months of age. The determinations at 18 months indicated that the bone composition was higher in the E and EM18 groups (6.75%; $p = 0.026$ and $p = 0.022$) and in the EM12 group (12.16%; $p = 0.009$) with respect to the S group. At 20 months, the groups E, EM12, EM18, and SM18 showed an increase in bone percentage of 6.9, 11.55, 7.1, and 4.5%, respectively, with respect to

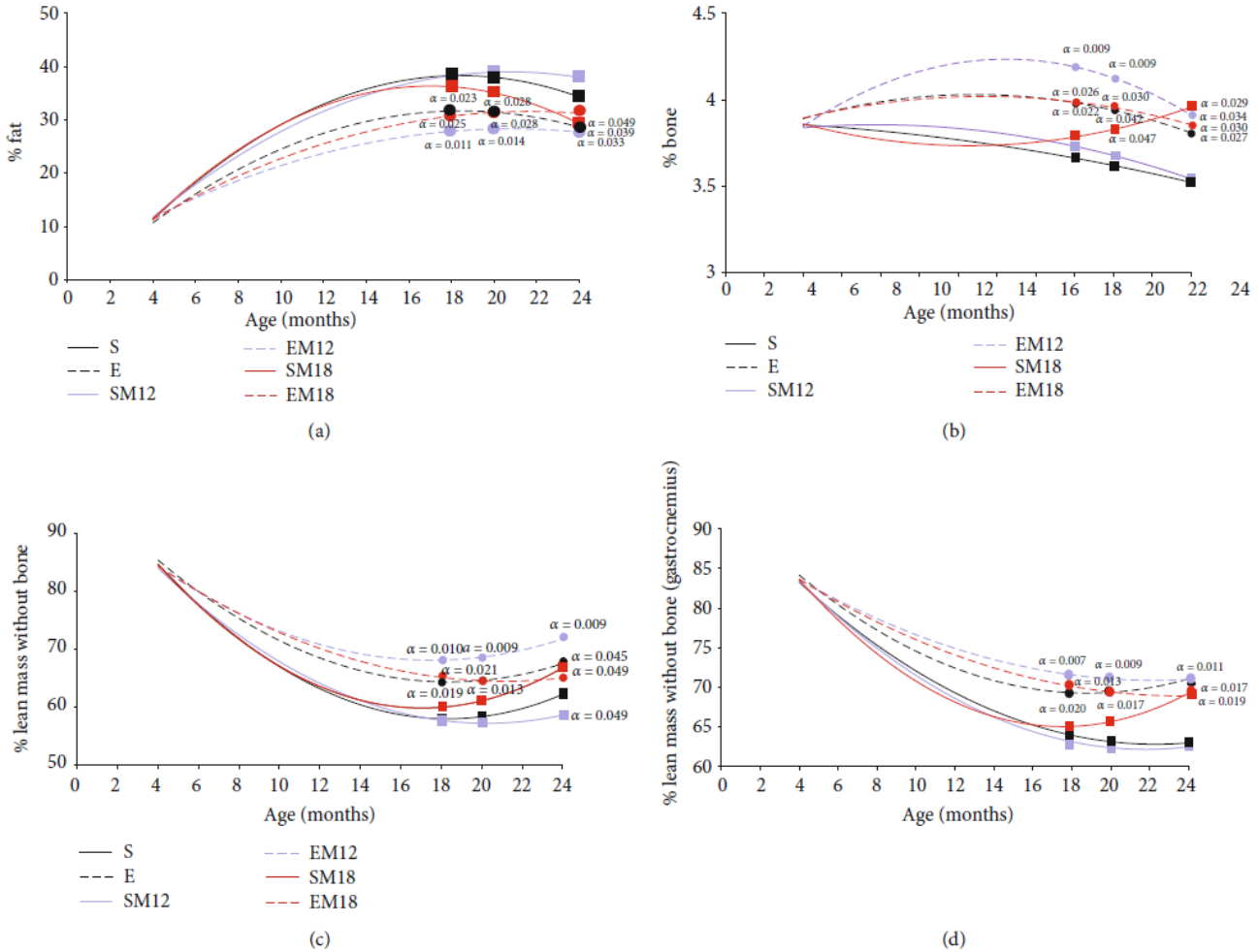


FIGURE 2: Body composition by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA scan). The DXA scan was used to evaluate the percentage of the total body fat (a), bone (b), and whole *body* lean tissue *mass* or lean mass free of bone (LMWB) (c) as described in Materials and Methods. Gastrocnemius muscle LMWB was also determined (d). Each point in the curve represents the mean of all independent experiments carried out in each group of animals ($n = 5$); the growth curves were established using a polynomial adjustment (R^2). Comparisons were made in the different ages and treatments with respect to the sedentary rats (a); the exact probability value is indicated in the graph. The comparisons were established by a multivariate test and corroborated with a Student *t*-test.

the control ($p = 0.042$, $p = 0.009$, $p = 0.030$, and $p = 0.047$, respectively). Finally, the analysis of the composition of bone percentage at 24 months in the groups E, EM12, EM18, and SM18 showed an increase of 6.45, 7.5, 6.65, and 12.5%, respectively, with respect to the sedentary group ($p = 0.027$, $p = 0.034$, $p = 0.030$, and $p = 0.029$, respectively).

Whole *body* lean tissue *mass* (LMWB) or lean mass free of bone is an indirect way to evaluate muscle mass, so LMWB content was determined in order to understand the effect of exercise and MTF treatment on the muscle mass loss (Figure 2(c)). At 12 months of age, the exercised rats (E, EM12, and EM18) showed 12.24% more LMWB than the sedentary rats ($p = 0.019$). The determination at 18 months revealed that the E and EM18 groups had 12% and 11.95% more LMWB with respect to S group ($p = 0.019$ and 0.021), while EM12 showed an increase in LMWB of 19.65% with respect to the S group of the same age ($p = 0.010$). Groups E and EM18 maintained the difference of 12% in LMWB

with respect to sedentary rats ($p = 0.013$ in both groups). A similar behavior was observed in the EM12 group with an increase of 19.60% with respect to the sedentary ones ($p = 0.009$). Finally, at 24 months, the E group had 8.02% more LMWB than the S group ($p = 0.045$), while the SM18 group presented 5.72% more LMWB ($p = 0.049$). The EM12 group showed the greatest difference at this age, 15.2% more than the S group ($p = 0.009$). Interestingly, the SM12 group showed 8.13% less LMWB with respect to the S group ($p = 0.049$). These results showed that the differences found in the BMI of the experimental groups were directly related to the body composition, where changes in the composition of fat, bone, and LMWB were observed.

In order to evaluate more specifically the LMWB composition, the gastrocnemius muscle mass was determined (Figure 2(d)). The gastrocnemius muscle mass composition was similar to that observed in the total body analysis. At 18 months, it was observed that the E group increased

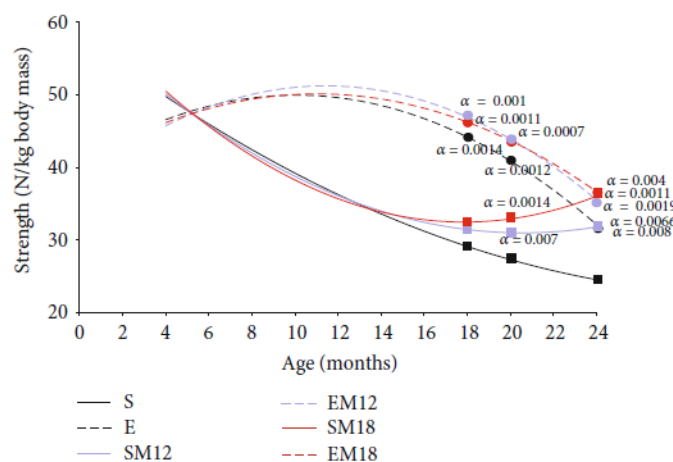


FIGURE 3: Grip strength. Grip strength was determined by dynamometry as described in Materials and Methods. The measurements are expressed in Newton per kilogram of rat weight. The data represented are the mean of 3 determinations in 5 different rats for each experimental group. The curve was adjusted by means of a polynomial regression. Comparisons were made in the different ages and treatments with respect to the sedentary rats (*a*); the exact probability value is indicated in the graph. The comparisons were established by a multivariate test and corroborated with a Student *t*-test.

10.31% LMWB compared to the S group ($p = 0.020$), the EM18 group showed 12.69% more LMWB than the S group ($p = 0.013$), and the EM12 rats showed 15.07% more LMWB ($p = 0.007$). At 20 months, the analysis of the LMWB composition revealed that the groups E and EM18 had 12.9% more proportion of LMWB than the S rats ($p = 0.017$). Lastly, the gastrocnemius muscle composition at 24 months revealed that the E, the EM18, and the SM18 groups presented 13% ($p = 0.017$), 16% ($p = 0.017$), and 12% ($p = 0.019$) more LMWB than the S group, respectively.

3.3. Grip Strength. To support the evaluation of the body composition and the gastrocnemius muscle, the strength was determined by dynamometry, as a parameter that helps to understand the skeletal muscle functionality (Figure 3). Our results showed that from 12 months the exercise groups (E, EM12, and EM18) had 34% more strength than the sedentary animals ($p = 0.0001$). This difference became greater at 18 months, since the animals in groups E, EM18, and EM12 showed more strength than those of group S. The E group increased 47.55% ($p = 0.0014$) and EM18 and EM12 by 59% ($p = 0.0014$, 0.0011, and 0.001, respectively). At 20 months, it can be observed that the MTF treatment in rats SM12 and SM18 increased their strength in 8.7 and 16.15%, respectively, with respect to the S group ($p = 0.017$ and 0.014), while the rats that exercised (E, EM12, and EM18) improved the strength in 44.63, 56.4, and 55.7%, respectively, with respect to the S group ($p = 0.0012$, 0.0007, and 0.0007, respectively). At 24 months, all the groups presented significant differences with respect to the S group and the increases in strength were 30 and 46.1% in the sedentary groups (SM12 and SM18) ($p = 0.0066$ and 0.0011), while the exercise groups (E, EM12, and EM18) increased their strength with respect to the S group in 29.78, 42, and 48.16% ($p = 0.008$, 0.0019, and 0.004), respectively.

3.4. Histology. Figure 4 shows the H&E staining performed to the gastrocnemius muscle slices at 24 months of age, for the six animal groups. The sedentary group showed a total disorganization of the muscle fibers, since muscle fascicles are not observed. In addition, there is an adipose tissue accumulation and inflammatory infiltrates (Figure 4(d)). The groups that exercised (E, EM12, and EM18) presented an adequate arrangement of the muscle fibers, and the muscle fascicles and the myofibrils that compose them can still be observed. Interestingly, the accumulation of fatty tissue and inflammatory infiltrates can also be observed but in a lesser proportion than in the sedentary group (Figures 4(a)–4(c)). Regarding the structure of muscle tissue of sedentary groups treated with MTF (SM12 and SM18), it can be seen that muscle fascicles are larger compared to the tissues of the animals that performed exercise and also have less endomysium. Like the tissues of the other groups, they showed inflammatory infiltration and adipose tissue accumulation (Figures 4(e) and 4(f)).

3.5. Medial Nerve Somatosensory Evoked Potentials (MNSSEP) and Tibial Nerve Somatosensory Evoked Potentials (TNSSEP). In order to evaluate another physiological characteristic of movement functional decline, we evaluated the MNSSEP and TNSSEP, which provide detailed information of the neural sensory processing time, by determining the electrophysiological responses when the nerves in the posterior and anterior extremities are stimulated. In this way, the neurophysiological assay complements the densitometric and grip strength studies.

Four components were obtained for the MNSSEP: CxP1, CxN1, C7P1, and C7N1. These waves reproduce the upper limb cortical pathway. As shown in Figure 5(a), all four latencies increased with age when compared to the young rats used as controls (4 months of age). This

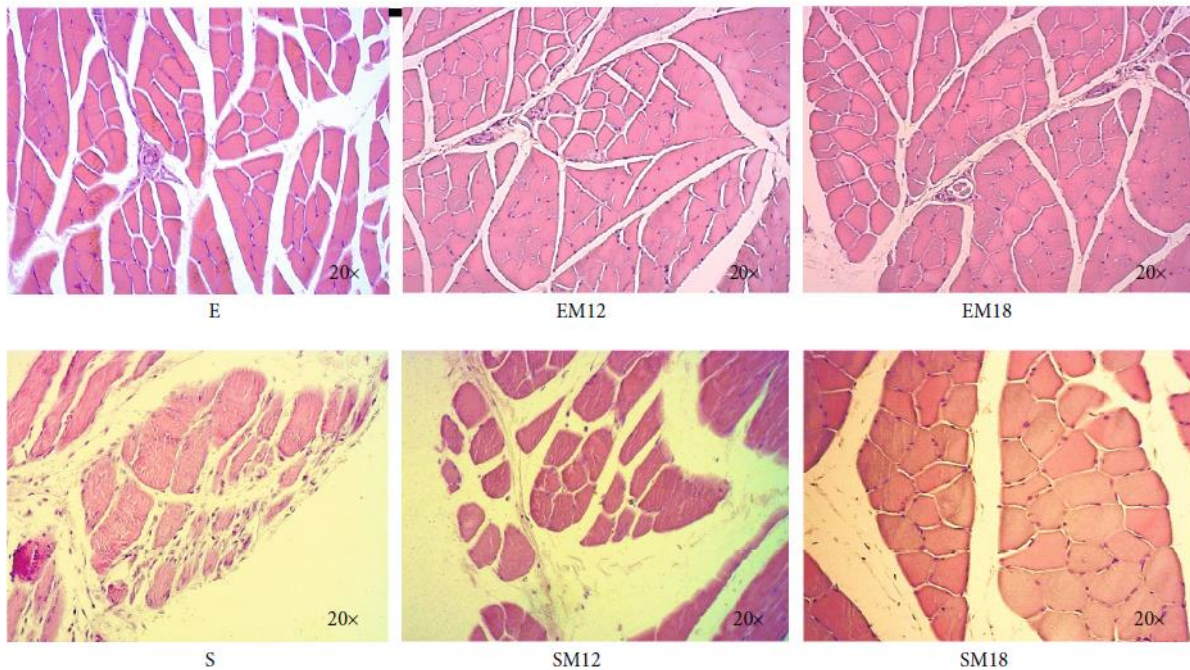


FIGURE 4: Histology, H&E. The images show the morphological analysis of the gastrocnemius muscle architecture in transversal sections. The presence of inflammatory infiltrates and the arrangement of muscle fibers in the different experimental groups were evaluated. The micrographs are representative images (20x amplification).

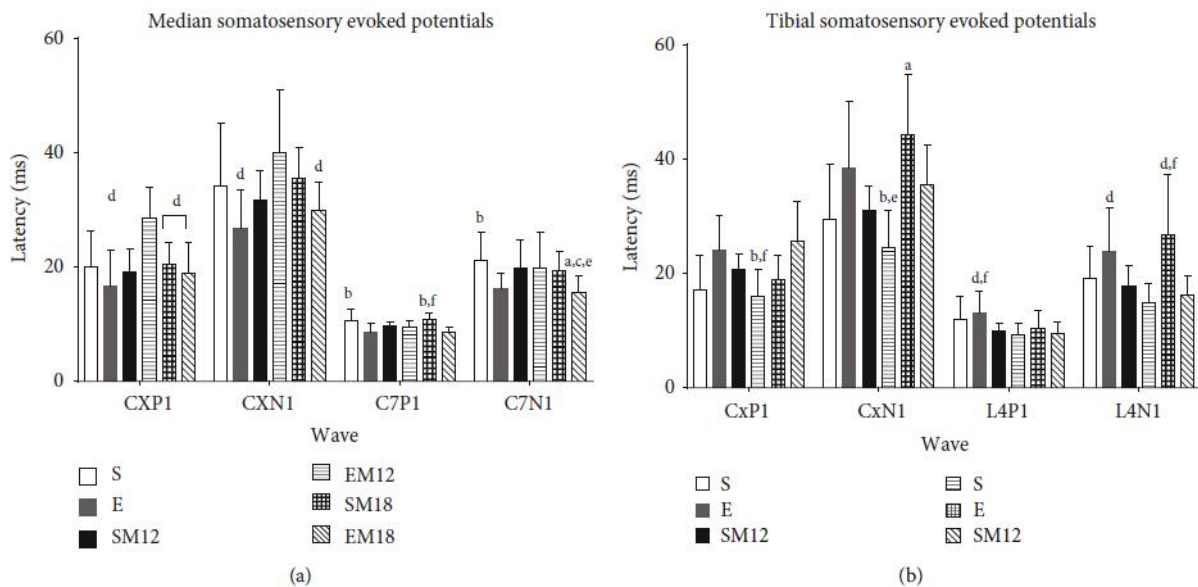


FIGURE 5: Somatosensory evoked potentials. Medial (a) and tibial (b) somatosensory evoked potentials were evaluated as described in Materials and Methods. Each bar represents the mean \pm SD of all independent experiments carried out in each group of animals ($n = 5$). The Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test were used to compare the data. The significance level is expressed as follows: (a) $p < 0.05$ vs. S, (b) $p < 0.05$ vs. E, (c) $p < 0.05$ vs. SM12, (d) $p < 0.05$ vs. EM12, (e) $p < 0.05$ vs. SM18, and (f) $p < 0.05$ vs. EM18.

was expected since the nerve response becomes slower with age. However, no important differences were observed in the treated animals with respect to the S group in the upper limbs.

As regards to the lower limbs, the four components for the TNSSEP were also determined (CxP1, CxN1, L4P1, and

L4N1) (Figure 5(b)). These waves reproduce the lower limb cortical pathway, and in this case, a more robust effect was observed in the improvement of the conduction velocity in the L4N1 wave in the rats that were treated with MTF and exercised, suggesting that these treatments might also impact, at least in part, the neural sensory processing.

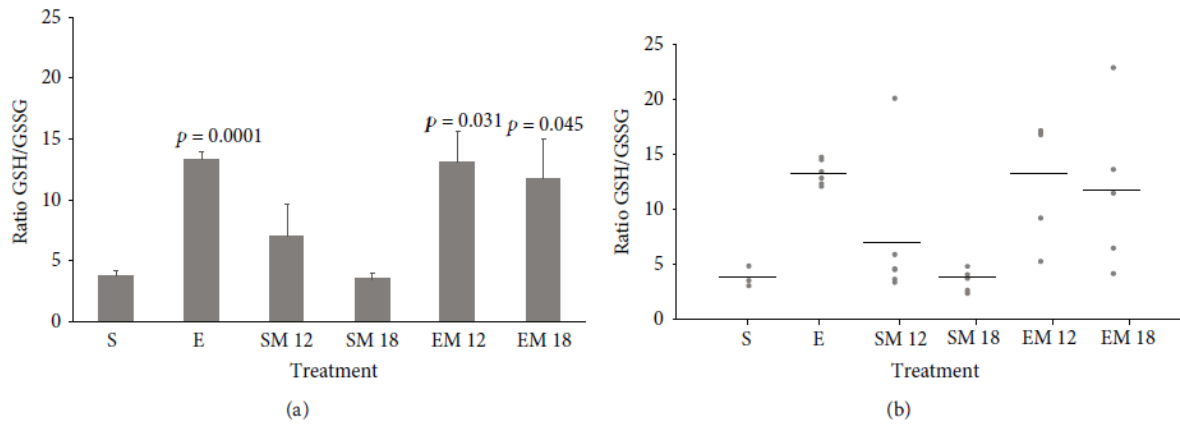


FIGURE 6: GSH/GSSG ratio. The concentrations of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) were determined by HPLC using the gastrocnemius muscle obtained from animals of the 6 experimental groups at their euthanasia (24 months), as described in Materials and Methods. (a) The GSH/GSSG ratio is the mean \pm SD ($n=5$). (b) GSH/GSSG ratio for each of the analyzed animals. The horizontal line represents the average value in each group. To compare the groups, the ANOVA test was used followed by a Tukey-Kramer *post hoc* test. The exact probability value is indicated in each bar of the groups that presented differences.

3.6. GSH/GSSG Ratio. To demonstrate that MTF, exercise, and the combined treatment participate in a mechanism that reduces oxidative stress associated to aging and sedentary lifestyle, we evaluated the GSH/GSSG ratio in muscle tissue, as an indicative of the tissue redox state. The results illustrated in Figure 6(a) show that the sedentary groups (S, SM12, and SM18) did not present significant differences in the GSH/GSSG ratio. However, the exercise groups (E, EM12, and EM18) presented increased GSH/GSSG ratio values.

It can be observed that the E group rats had a 3.5 times higher GSH/GSSG ratio compared with the S group rats ($p=0.0001$), while group EM12 increased 3.45 times more its ratio ($p=0.031$) and the EM18 group augmented the GSH/GSSG ratio 3.08 times ($p=0.045$). Interestingly, when the GSH/GSSG ratio was analyzed for each individual within the experimental groups (exercise, MTF treatments, and the combined treatment), it can be observed that 20% of the individuals in the group SM12 showed an increase in the GSH/GSSG ratio. Conversely, the same beneficial effect was not completely observed in the EM12 and EM18 groups, since only 60% and 40% of the population had higher levels of the mean value of the GSH/GSSG quotient (Figure 6(b)). The above suggests that MTF administration in combination with exercise might be a mechanism which involves an adaptive capacity to counteract stress which might be different for each individual in the population.

3.7. Kaplan-Meier Curves. To determine the effect of MTF, exercise, and the combined treatment on animal survival, we performed a Kaplan Meier curve. The results show that the lowest survival rate (up to 24 months) was found in the group of sedentary rats, with 30% survival, while groups of rats SM12 and SM18 had a 40% survival rate, which means an increase of 33% compared to the sedentary rats. With regard to the groups that exercised, it was observed that rats E and EM18 had a survival rate of 50%, which means an

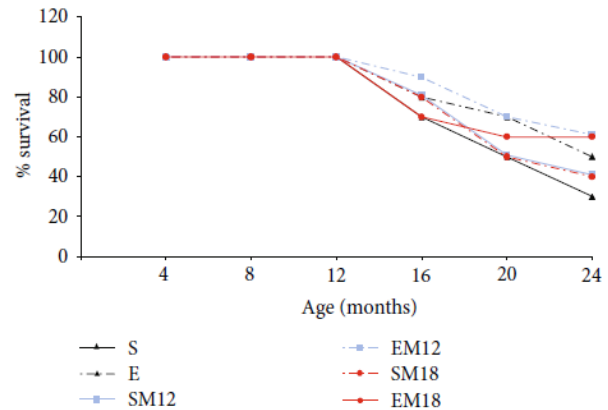


FIGURE 7: Kaplan-Meier survival curves. To evaluate the effect of exercise, MTF treatment, and the combination of both on animal survival, a Kaplan-Meier curve was performed. The total number of evaluated animals was 160.

increase of 66% with respect to the sedentary group. The EM12 group had the highest percentage of survival, 60%, which represents an increase of 100% compared to the S rats (Figure 7). These results are very interesting since they show that treatment with MTF alone or in combination with exercise might increase survival.

3.8. Hormetic Response and Animal Survival. To determine the intensity and homogeneity of the hormetic response and their effect on survival, we established a model where we qualitatively related the redox state (GSH/GSSG) to the rats' survival at 24 months of age.

In Figure 8, the area of the “hormetic response” was delimited taking the minimum and the maximum values of the GSH/GSSG ratio and the survival percentage in each of the experimental groups (dotted lines). Arbitrarily, we established the area obtained for the sedentary rats as the reference

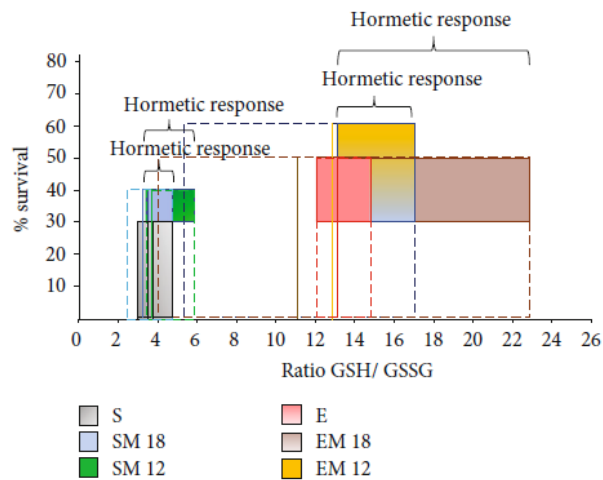


FIGURE 8: Hormetic response and animal survival. To relate animal survival with the GSH/GSSG ratio and to evaluate the effect that exercise, MTF treatment, and the combination of both might have on them, the hormetic response was analyzed. In order to do it, a “hormetic response” area was established using the minimum and maximum values obtained for the GSH/GSSG ratio with respect to the survival percentage at 24 months of age, in each group. The “hormetic response” area obtained for the sedentary group (S) was established as the reference standard. In the experimental groups, the dotted line represents the total area of the response induced with the different treatments. The shaded area represents the “hormetic response” induced with the treatments, that was determined as the area representing the values higher than the average of the GSH/GSSG ratio, both of the sedentary groups and of the exercise groups. The mean value of each treatment is represented by the continuous vertical line in each experimental group.

area for survival vs. GSH/GSSG (i.e., SURV vs. GSH/GSSG). Subsequently, we determined the area of the “hormetic response” by plotting an area from the GSH/GSSG ratio mean value (continuous black line) of the sedentary rats and towards the maximum value of each of the treatments (shaded area). Our qualitative evaluation showed that the SURV vs. GSH/GSSG areas for the MTF treated groups (SM12 and SM18) were higher than those of the sedentary ones. Moreover, the SM12 group had a larger area than the SM18 group, suggesting that the redox state improves with the time of MTF administration, along with a homogeneity in the hormetic response, since the GSH/GSSG ratio interval was small. The same analysis of the SURV area vs. GSH/GSSG was made for the exercise groups. Group E was established as the reference area. The same thing was done as in the sedentary group. Our results revealed very interesting information, group EM18 presented a greater hormetic response area in relation to group E. However, the GSH/GSSG ratio interval was very large, suggesting that the hormetic response might be very heterogeneous and that the individuals in that group did not respond in the same way to the MTF treatment and exercise. With respect to the EM12 group, the results also showed a greater “hormetic response” area than the E group and a lower GSH/GSSG ratio interval than that the EM18 group, so this result suggests a

more homogeneous adaptive response. In general, our analysis suggests that the time of MTF administration, both in the sedentary and the exercise groups, might activate a mechanism that is directly related to the induction of the hormetic response through the redox state modulation.

4. Discussion

A particular condition of frailty in the elderly is skeletal muscle atrophy or sarcopenia [33, 34]. The progressive loss of muscle mass produces a decline in both the force and the function of the tissue. The inability to move results in the deterioration of the quality of life, which is why sarcopenia has been considered as one of the illnesses that most increases fragility and therefore the disabling of the elderly.

For some decades, it has been known that exercise is the most effective intervention to delay the onset of sarcopenia in elderly people and murine models [35, 36]. However, although it is known that exercise increases both strength and muscle mass, the mechanisms by which this is carried out are not completely clear. It has been proposed that the anabolic response improves several signaling pathways, most notably the AMPK and AKT/mTOR pathways [37]. Exercise also increases mitochondrial biogenesis by activating PGC-1 α and also reduces the secretion of proinflammatory cytokines [38]. It also decreases satellite cell death, preserving the myogenic capacity during aging [39], and it even increases the muscle antioxidant capacity [40].

Our results obtained with the exercise groups confirm that continuous exercise throughout life improved all the parameters evaluated and delayed sarcopenia to a great extent, since it prevented the loss of muscle and bone, avoided fat gain as well as inflammatory infiltration in muscle tissue, and protected against the disruption of fiber bundles. In addition, exercise prevented the loss of grip strength and showed lower state of oxidative stress (evaluated by the ratio of GSH/GSSG). The above could be related mainly to the loss of body fat, since it has been reported that adipose tissue generates a chronic, low-grade systemic proinflammatory state, with an increase in the levels of inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , and IL-6. These cytokines have been related to the muscle functional deterioration and to the strength loss, in a mechanism that involves a state of oxidative stress [41, 42]. However, the combined treatment with MTF for 12 or 6 months did not improve any of these parameters beyond what had already been preserved by the training alone (E groups), but interestingly it neither nullified nor eliminated them.

This is very important since recently two trials to evaluate MTF antiaging capacity with elderly people were approved, one with prediabetic [43] and the other one with healthy people [44, 45]; hence, knowing that, in an animal model, long-term MTF treatment used did not nullify the beneficial effect given by exercise supports the use of MTF for other antiaging effects.

With respect to the sedentary groups in which MTF was administered, interesting results were found. Administering MTF to adult rats for a period of 12 months did not induce BMI or body fat decrease, nor did it impede or reduces the

decrease in muscle or bone tissue. However, when MTF was administered to old rats for only 6 months at an old age (from 18 to 24 months of age), a significant decrease in BMI and fat percentage was found, as well as an increase in the percentage of muscle and bone tissues. Even though it has been reported that prolonged treatments with MTF decrease the body fat composition, this is rather controversial. An interesting meta-analysis using more than 50 studies in human adults was carried out, and only 10 of those studies strictly fulfilled the criteria for evaluation of body fat. Hence, only three of them concluded that MTF has moderate effects on the reduction of body mass [46].

A study in healthy adult men treated with two daily doses of MTF (850 mg) for 15 days showed no changes in body weight or body fat, although plasma glucose, insulin, and IGF-1 levels decreased [47]. In another study done in adult obese women without resistance to insulin, who were given 500 mg of MTF twice a day for three months, no differences were found in body weight, body fat, and blood pressure levels, neither did the glucose, insulin, and IGF-1 plasma levels decreased [48]. A recent meta-analysis [49] showed that MTF treatment in elderly humans moderately diminishes body weight, along with a significant decrease in serum cholesterol and LDL, which could suggest a reduction in the risk of major coronary events and of mortality in elderly diabetic populations.

In relation to the above, the differences observed in the responses between adult (12 months) and old (18 months) rats that were administered only with MTF could have several explanations; one of them might be related to the levels of sexual hormones that occur in these two different stages, estrogen and especially estradiol, a hormone that has been linked to the preservation of muscle and bone mass, as well as the accumulation of fat tissue [50]. Moreover, it has been reported that MTF administration reduces estradiol levels. Campagnoli and coworkers showed that 1500 mg of MTF daily for 9 months decreased estradiol levels in nondiabetic women, in a mechanism that involves the reduction of insulin levels [51]. Therefore, this effect could be related to the muscle and bone mass loss, observed in the treatment with MTF during 12 months in adult rats; interestingly, the MTF treatment for only 6 months at an elderly stage (from 18 to 24 months of age) might have a different mechanism of action. Thus, the hormonal levels might play an important role, which was beyond our study, but that should be analyzed in the future.

A very interesting observation was the adaptive response that each individual has against adverse changes in the environment, which can cause variations in gene expression that allows each one of them to survive, which is known as hormesis. This term, of pharmacological origin, refers to “the process by which an exposure to a low dose of a chemical agent or an environmental factor, which is harmful at high doses, induces an adaptive response and/or a beneficial effect on the cell or organism” [52–54]. In this sense, it has been reported that MTF can induce the hormetic response by ROS overproduction in a mechanism that involves the mitochondria and is known as “mitohormesis,” which has been related to the increase in longevity [55]. Moreover, it has

been reported that this hormetic response is able to decrease the secretion of inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , and IL-6, because NF- κ B nuclear translocation and activation is abrogated [56]. In addition to MTF as a hormetic agent, our model has another stimulus capable of inducing the adaptive response, which is exercise. It has been reported that during moderate physical activity, muscle mitochondria increase their ROS production in order to modify redox state to promote an adaptive response rather an oxidative damage.

The benefits of this hormetic response include an increment in the antioxidant response to counteract environmental damage, as well as the ability to repair the damage generated by the inflammatory response, including low-grade chronic inflammation induced by adipose tissue [57]. It is important to note that during hormesis there are different response thresholds, which are in function of the stimulus intensity. In this model, we used two hormetic inducers, as well as their combination, to produce ROS and thereby modify the redox state and induce the adaptive response that has the effect of increasing survival. Interestingly, our results showed that some members of the groups EM12 and EM18 improved their GSH/GSSG ratio by 60 and 40%, respectively, increasing their reduced redox state to counteract the oxidative stress associated to aging.

This difference in the GSH/GSSG ratio could be linked to an adaptive hormetic process induced by MTF, which is supported by the increase in the population survival, which was 66% for the EM18 group and 100% for the EM12 group, when compared to sedentary rats (S) (Figure 7).

The increase in survival was also observed in the groups treated only with MTF, SM12 and SM18, where a 33% increase in survival was observed with respect to S group. A slight increase in the GSH/GSSG ratio was also found in these groups, which is why it is suggested that MTF is a hormetic agent capable of inducing such response. The differences in the hormetic response may be related to several factors linked to the individual's own capacities, including the ability to repair stress-induced damage, the ability to maintain homeostasis, the nutritional status, and the genetic background.

Finally, although there are some studies of diabetic neuropathies which suggested that MTF could recuperate nerve function [58, 59], our results of evoked potentials only showed an improvement in just one of the neural generators of the hind limbs in the animals treated with MTF, suggesting a very slight effect on the improvement of nervous conduction. In agreement with that, Caron et al. [60] reported that aging is associated to a decrease in muscle electrically induced fatigue, but that exercise training was unable to restore the responses. Since the evaluation with the EP only showed a slight effect, to elucidate this question, it would be desirable to conduct electromyography studies on the affected muscles such as gastrocnemius and quadriceps.

Some points that would be worth evaluating in the future to understand the interaction between exercise and MTF at the molecular level would be, first of all, the mitochondrial function, the ROS generation, and the ATP levels produced during these treatments, since the energy levels given by the ATP/AMP ratio might be activating the enzyme AMPK, which is an interesting link that is regulated by the MTF

treatment [61] and by the exercise [62]. It would also be interesting to evaluate other metabolic functions that might be participating in the overall response such as hepatic and renal functions.

In conclusion, our work shows for the first time in a long-term longitudinal study, with healthy animals, that treatment with MTF does not eliminate the beneficial effects given by exercise throughout life. MTF might induce a positive hormonal response that protects the animals against damage and modifications in redox state, which in turn might improve lifespan, without eliminating other valuable effects such as the ones attained by exercise.

Data Availability

The data used to support the findings of this study (morphometric and biochemical determinations, DXA-scan, histology, grip strength, evoked potentials, and GSH/GSSG) are included within the article.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no competing interests and that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Ángeles Guerrero and Dr. Rocío González from UAM-I for the animal supply and Dr. Braulio Hernández from Laboratorio de Neurofisiología, INBIOMA S.A.S. de C.V., for the use of their facilities. This project was supported by a grant from the Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación de la Ciudad de México SECITI/042/2018 “Red Colaborativa de Investigación Traslacional para el Envejecimiento Saludable de la Ciudad de México (RECITES)” as well as by CONACYT grants: MKF: FOSSIS-272256 and ALL: FOSSIS-262302. Hernández-Álvarez, Pedraza-Vázquez, López-Cervantes, Posadas-Rodríguez, Toledo-Pérez, and Santín-Márquez are CONACYT scholarship holders.

Supplementary Materials

Table 1: biochemical parameters. (*Supplementary Materials*)

References

- [1] World Health Organization, *World Report on Ageing and Health*, World Health Organization, Geneva, 2015.
- [2] C. López-Otín, M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, and G. Kroemer, “The hallmarks of aging,” *Cell*, vol. 153, no. 6, pp. 1194–1217, 2013.
- [3] A. J. Cruz-Jentoft, F. Landi, E. Topinková, and J.-P. Michel, “Understanding sarcopenia as a geriatric syndrome,” *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, vol. 13, no. 1, pp. 1–7, 2010.
- [4] T. N. Kim and K. M. Choi, “Sarcopenia: definition, epidemiology, and pathophysiology,” *Journal of Bone Metabolism*, vol. 20, no. 1, pp. 1–10, 2013.
- [5] R. J. Serra, “Consecuencias clínicas de la sarcopenia,” *Nutrición Hospitalaria*, vol. 21, pp. 46–50, 2006.
- [6] M. C. Espinel-Bermúdez, S. Sánchez-García, C. García-Peña et al., “Associated factors with sarcopenia among Mexican elderly: 2012 National Health and Nutrition Survey,” *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, vol. 56, Suppl 1, pp. S46–S53, 2018.
- [7] M. Gonzalez-Freire, F. Adelnia, R. Moaddel, and L. Ferrucci, “Searching for a mitochondrial root to the decline in muscle function with ageing,” *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle*, vol. 9, no. 3, pp. 435–440, 2018.
- [8] S. K. Mishra and V. Misra, “Muscle sarcopenia: an overview,” *Acta Myologica: myopathies and cardiomyopathies: official journal of the Mediterranean Society of Myology*, vol. 22, no. 2, pp. 43–47, 2003.
- [9] S. Zampieri, S. Mosole, S. Löfler et al., “Physical exercise in aging: nine weeks of leg press or electrical stimulation training in 70 years old sedentary elderly people,” *European Journal of Translational Myology*, vol. 25, no. 4, pp. 237–242, 2015.
- [10] H. J. Denison, C. Cooper, A. A. Sayer, and S. M. Robinson, “Prevention and optimal management of sarcopenia: a review of combined exercise and nutrition interventions to improve muscle outcomes in older people,” *Clinical Interventions in Aging*, vol. 10, pp. 859–869, 2015.
- [11] M. Kim and C. W. Won, “Prevalence of sarcopenia in community-dwelling older adults using the definition of the European Working Group on Sarcopenia in Older People 2: findings from the Korean Frailty and Aging Cohort Study,” *Age and Ageing*, vol. 48, no. 6, pp. 910–916, 2019.
- [12] K. Kobayashi, S. Imagama, K. Ando et al., “Epidemiology and effect on physical function of osteosarcopenia in community-dwelling elderly people in Japan,” *Modern Rheumatology*, vol. 17, pp. 1–6, 2019.
- [13] A. Frisoli Jr., F. G. Martin, A. C. D. C. Carvalho, J. Borges, A. T. Paes, and S. J. M. Ingham, “Sex effects on the association between sarcopenia EWGSOP and osteoporosis in outpatient older adults: data from the SARCOS study,” *Archives of Endocrinology and Metabolism*, vol. 62, no. 6, pp. 615–622, 2018.
- [14] R. Harris, Y. Chang, K. Beavers et al., “Risk of fracture in women with sarcopenia, low bone mass, or both,” *Journal of the American Geriatrics Society*, vol. 65, no. 12, pp. 2673–2678, 2017.
- [15] B. Wessels, J. Ciapaite, N. M. A. van den Broek, K. Nicolay, and J. J. Prompers, “Metformin impairs mitochondrial function in skeletal muscle of both lean and diabetic rats in a dose-dependent manner,” *PLoS One*, vol. 9, no. 6, p. e100525, 2014.
- [16] R. S. Hundal, M. Krssak, S. Dufour et al., “Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes,” *Diabetes*, vol. 49, no. 12, pp. 2063–2069, 2000.
- [17] A. Pandey and V. L. Kumar, “Protective effect of metformin against acute inflammation and oxidative stress in rat,” *Drug Development Research*, vol. 77, no. 6, pp. 278–284, 2016.
- [18] P. Senesi, A. Montesano, L. Luzi, R. Codella, S. Benedini, and I. Terruzzi, “Metformin treatment prevents sedentary-related damages in mice,” *Journal of Diabetes Research*, vol. 2016, Article ID 8274689, 11 pages, 2016.
- [19] S. Bulterijs, “Metformin as a geroprotector,” *Rejuvenation Research*, vol. 14, no. 5, pp. 469–482, 2011.

- [20] J. M. Campbell, S. M. Bellman, M. D. Stephenson, and K. Lisy, "Metformin reduces all-cause mortality and diseases of ageing independent of its effect on diabetes control: a systematic review and meta-analysis," *Ageing Research Reviews*, vol. 40, pp. 31–44, 2017.
- [21] A. R. Konopka, J. L. Laurin, H. M. Schoenberg et al., "Metformin inhibits mitochondrial adaptations to aerobic exercise training in older adults," *Aging Cell*, vol. 18, no. 1, pp. 1–12, 2018.
- [22] A. A. Paul, S. A. Dkhar, S. Kamalanathan et al., "Effect of metformin on exercise capacity in metabolic syndrome," *Diabetes Metabolic Syndrome*, vol. 11, pp. S403–S406, 2017.
- [23] S. Das, S. K. Behera, A. Srinivasan et al., "Effect of metformin on exercise capacity: a meta-analysis," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 144, article S0168822718310064, pp. 270–278, 2018.
- [24] R. Viskochil, S. K. Malin, J. M. Blankenship, and B. Braun, "Exercise training and metformin, but not exercise training alone, decreases insulin production and increases insulin clearance in adults with prediabetes," *Journal of Applied Physiology*, vol. 123, no. 1, pp. 243–248, 2017.
- [25] N. Tiwari, S. Pasrija, and S. Jain, "Randomised controlled trial to study the efficacy of exercise with and without metformin on women with polycystic ovary syndrome," *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, vol. 234, pp. 149–154, 2019.
- [26] S. Eltonsy, M. Dufour Doiron, P. Simard et al., "Effects of the combination of metformin and exercise on glycated hemoglobin, functional capacity, lipid profile, quality of life, and body weight," *Journal of International Medical Research*, vol. 47, no. 3, pp. 1131–1145, 2019.
- [27] J. T. Cheng, C. C. Huang, I. M. Liu, T. F. Tzeng, and C. J. Chang, "Novel mechanism for plasma glucose-lowering action of metformin in streptozotocin-induced diabetic rats," *Diabetes*, vol. 55, no. 3, pp. 819–825, 2006.
- [28] N. Montero-Fernández and J. A. Serra-Rexach, "Role of exercise on sarcopenia in the elderly," *European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine*, vol. 49, no. 1, pp. 131–143, 2013.
- [29] B. Mena-Montes, N. E. López-DíazGuerrero, D. Hernández-Álvarez et al., "Low intensity and long-term training prevents sarcopenic obesity in Wistar female rats," *Submitted*, 2019.
- [30] B. M. Andrade, M. R. Baldanza, K. C. Ribeiro et al., "Bone marrow mesenchymal cells improve muscle function in a skeletal muscle re-injury model," *PLoS One*, vol. 10, pp. 1–13, 2015.
- [31] A. Ibáñez-Contreras, U. Hernández-Arciga, A. Poblano et al., "Electrical activity of sensory pathways in female and male geriatric Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*), and its relation to oxidative stress," *Experimental Gerontology*, vol. 101, pp. 80–94, 2018.
- [32] M. L. A. Gikins and C. B. Clifford, *Clinical Laboratory Parameters for Crl:WI(Han) Rats*, vol. 1, Publisher Charles River Laboratories International, Wilmington, MA, 2008.
- [33] S. V. Brooks and J. A. Faulkner, "Skeletal muscle weakness in old age: underlying mechanisms," *Medicine and Science in Sports and Exercise*, vol. 26, no. 4, pp. 432–439, 1994.
- [34] P. A. Figueiredo, S. K. Powers, R. M. Ferreira, H. J. Appell, and J. A. Duarte, "Aging impairs skeletal muscle mitochondrial bioenergetic function," *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, vol. 64, no. 1, pp. 21–33, 2009.
- [35] J. A. Avila-Funes and E. J. García-Mayo, "The benefits of doing exercise in the elderly," *Gaceta medica de Mexico*, vol. 140, no. 4, pp. 431–436, 2004.
- [36] S. Phu, D. Boersma, and G. Duque, "Exercise and sarcopenia," *Journal of Clinical Densitometry*, vol. 18, no. 4, pp. 488–492, 2015.
- [37] S. Fujita, B. B. Rasmussen, J. G. Cadenas et al., "Aerobic Exercise Overcomes the Age-Related Insulin Resistance of Muscle Protein Metabolism by Improving Endothelial Function and Akt/Mammalian Target of Rapamycin Signaling," *Diabetes*, vol. 56, no. 6, pp. 1615–1622, 2007.
- [38] M. L. Kohut, D. A. McCann, D. W. Russell et al., "Aerobic exercise, but not flexibility/resistance exercise, reduces serum IL-18, CRP, and IL-6 independent of β -blockers, BMI, and psychosocial factors in older adults," *Brain, Behavior, and Immunity*, vol. 20, no. 3, pp. 201–209, 2006.
- [39] G. Shefer, D. P. van de Mark, J. B. Richardson, and Z. Yablonka-Reuveni, "Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle," *Developmental Biology*, vol. 294, no. 1, pp. 50–66, 2006.
- [40] M. L. Johnson, B. A. Irving, I. R. Lanza et al., "Differential effect of endurance training on mitochondrial protein damage, degradation, and acetylation in the context of aging," *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, vol. 70, no. 11, pp. 1386–1393, 2015.
- [41] M. A. McArdle, O. M. Finucane, R. M. Connaughton, A. M. McMorrow, and H. M. Roche, "Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies," *Frontiers in Endocrinology*, vol. 4, 2013.
- [42] E. Casanova, J. Salvadó, A. Crescenti, and A. Gibert-Ramos, "Epigallocatechin gallate modulates muscle homeostasis in type 2 diabetes and obesity by targeting energetic and redox pathways: a narrative review," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 3, p. 532, 2019.
- [43] V. Piskovatska, N. Stefanyshyn, K. B. Storey, A. M. Vaiserman, and O. Lushchak, "Metformin as a geroprotector: experimental and clinical evidence," *Biogerontology*, vol. 20, no. 1, pp. 33–48, 2019.
- [44] J. N. Justice, L. Niedermhofer, P. D. Robbins et al., "Development of clinical trials to extend healthy lifespan," *Cardiovascular Endocrinology Metabolism*, vol. 7, no. 4, pp. 80–83, 2018.
- [45] N. Barzilai, J. P. Crandall, S. B. Kritchevsky, and M. A. Espeland, "Metformin as a tool to target aging," *Cell Metabolism*, vol. 23, no. 6, pp. 1060–1065, 2016.
- [46] L. M. Berstein, "Metformin in obesity, cancer and aging: addressing controversies," *Aging*, vol. 4, no. 5, pp. 320–329, 2012.
- [47] B. Fruehwald-Schultes, K. M. Oltmanns, B. Toschek et al., "Short-term treatment with metformin decreases serum leptin concentration without affecting body weight and body fat content in normal-weight healthy men," *Metabolism*, vol. 51, no. 4, pp. 531–536, 2002.
- [48] M. Kujawska-Luczak, M. Szulinska, D. Skrypnik et al., "The influence of orlistat, metformin and diet on serum levels of insulin-like growth factor-1 in obese women with and without insulin resistance," *Journal Physiology and Pharmacology*, vol. 69, no. 5, pp. 737–745, 2018.
- [49] M. Solymár, I. Ivic, L. Pótó et al., "Metformin induces significant reduction of body weight, total cholesterol and LDL levels

- in the elderly – A meta-analysis,” *PLoS One*, vol. 13, no. 11, p. e0207947, 2018.
- [50] C. Tagliaferri, J. Salles, J. F. Landrier et al., “Increased body fat mass and tissue lipotoxicity associated with ovariectomy or high-fat diet differentially affects bone and skeletal muscle metabolism in rats,” *European Journal of Nutrition*, vol. 54, no. 7, article 790, pp. 1139–1149, 2015.
- [51] C. Campagnoli, F. Berrino, E. Venturelli et al., “Metformin decreases circulating androgen and estrogen levels in nondiabetic women with breast cancer,” *Clinical Breast Cancer*, vol. 13, no. 6, pp. 433–438, 2013.
- [52] E. J. Calabrese, K. A. Bachmann, A. J. Bailer et al., “Biological stress response terminology: integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework,” *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 222, no. 1, pp. 122–128, 2007.
- [53] E. J. Calabrese, “Converging concepts: Adaptive response, preconditioning, and the Yerkes-Dodson Law are manifestations of hormesis,” *Ageing Research Reviews*, vol. 7, no. 1, pp. 8–20, 2008.
- [54] A. Luna-López, V. Y. González-Puertos, N. E. López-Diazguerrero, and M. Königsberg, “New considerations on hormetic response against oxidative stress,” *Journal of Cell Communication and Signaling*, vol. 8, no. 4, article 248, pp. 323–331, 2014.
- [55] W. De Haes, L. Froominckx, R. Van Assche et al., “Metformin promotes lifespan through mitohormesis via the peroxiredoxin PRDX-2,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, no. 24, 2014.
- [56] K. Isoda, J. L. Young, A. Zirlik et al., “Metformin inhibits pro-inflammatory responses and nuclear Factor- κ B in human vascular wall cells,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 26, no. 3, pp. 611–617, 2006.
- [57] R. Webb, M. Hughes, A. Thomas, and K. Morris, “The ability of exercise-associated oxidative stress to trigger redox-sensitive Signalling responses,” *Antioxidants*, vol. 6, no. 3, p. 63, 2017.
- [58] J. Ma, J. Liu, H. Yu, Y. Chen, Q. Wang, and L. Xiang, “Beneficial effect of metformin on nerve regeneration and functional recovery after sciatic nerve crush injury in diabetic rats,” *Neurochemical Research*, vol. 41, no. 5, pp. 1130–1137, 2016.
- [59] S. S. Oda, “Metformin protects against experimental acrylamide neuropathy in rats,” *Drug Development Research*, vol. 78, no. 7, pp. 349–359, 2017.
- [60] G. Caron, P. Decherchi, and T. Marqueste, “Alteration of metabosensitive afferent responses with aging: exercised versus non-exercised rats,” *Frontiers in Aging Neuroscience*, vol. 12, 2018.
- [61] G. Zhou, R. Myers, Y. Li et al., “Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 108, no. 8, pp. 1167–1174, 2001.
- [62] E. A. Richter and N. B. Ruderman, “AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease,” *The Biochemical Journal*, vol. 418, no. 2, pp. 261–275, 2009.

EJERCICIO Y METFORMINA: DOS MECANISMOS QUE CONVERGEN PARA LA PREVENCIÓN DE LA SARCOPENIA EN EL ENVEJECIMIENTO. UNA MIRADA AL CONTEXTO SOCIAL Y MOLECULAR*

David Hernández-Álvarez^{1,3}, Norma Edith López-Díazguerrero¹, Armando Luna-López², Mina Konigsberg^{**1}

¹Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Ciudad de México. México. ²Departamento de Investigación Básica, Instituto Nacional de Geriátría, SSA. Ciudad de México, México.

³ Posgrado en Biología Experimental. UAM-I.

**Autor de correspondencia correo E: mkf@xanum.uam.mx

RESUMEN

El sedentarismo que impera en la vida moderna predispone al organismo a enfermedades crónico-degenerativas durante el envejecimiento. La pérdida del músculo esquelético o sarcopenia genera discapacidad física, pérdida de la independencia, y favorece el riesgo de mortalidad. Para prevenirla se estudian intervenciones como el ejercicio y el uso de medicamentos como la metformina, que activan interesantes vías metabólicas de protección.

ABSTRACT

Sedentary lifestyle that prevails in modern life predisposes the organism to chronic-degenerative diseases during aging. Loss of skeletal muscle mass or sarcopenia, generates physical disability, loss of independence, and favors the risk of mortality. To prevent it, interventions like exercise and the use of medications such as metformin, which activate interesting metabolic pathways of protection, are studied.

PALABRAS

CLAVE:

Músculo, deterioro, sedentarismo, adulto mayor.

KEY WORDS:

Muscle, deterioration, sedentary lifestyle, elderly.

Introducción

El concepto de "estilo de vida", se asocia con distintas ideas de comportamiento individual y patrones de conducta, así como con aspectos que dependen de los sistemas socio-educativos que van cambiando según la época (1). Los avances tecnológicos y el crecimiento de las grandes urbes modernas, han modificado los estilos de vida tradicionales y los han vuelto más complejos y acelerados (2). En México, la difícil situación de la vida moderna en las ciudades, aunado a las problemáticas condiciones del sistema de salud, los problemas económicos de las personas, así como la influencia extranjera de vicios, modas poco saludables y el sedentarismo, han orillado a que los nuevos estilos de vida se asocien con un deterioro progresivo en la salud (2).

La Encuesta Intercensal 2015 realizada por el INEGI, determinó que existen aproximadamente 12.4 millones de personas de 60 años y más, lo que representa 10.4% de la población total. Por lo que se ha estimado que en 2030 dicha población aumentará 14.8%, lo que significa un monto de 20.4 millones de personas (3) y se espera que en 2050 se incremente a 21.5 % (4). Por su parte, la Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares (ENIGH) 2012 (5), señala que 1 de cada 3 adultos mayores, tienen algún tipo de discapacidad; dentro de las que se encuentran ver, oír, hablar, aprender, limitación mental, caminar y moverse. En particular, la dificultad que reportan con mayor frecuencia (69.8% hombres y 73.5% mujeres) es la de caminar, así como subir o bajar usando sus piernas (Fig. 1).

*Recibido: 27 de junio de 2018 Aceptado: 21 de noviembre de 2018

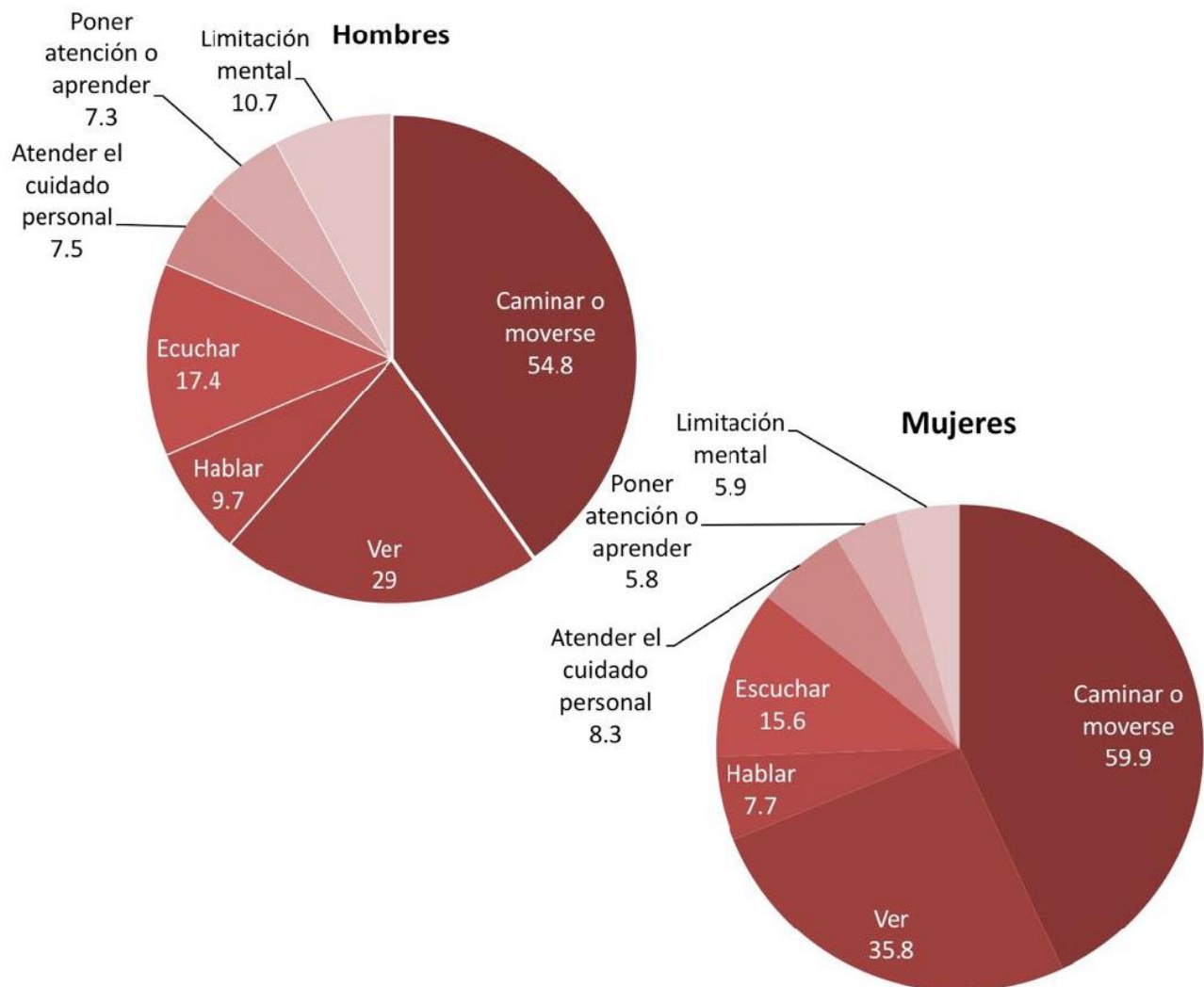


Figura 1. El 33% de la población mexicana de 60 y más años padece algún tipo de discapacidad (ENIGH 2012). La figura representa la distribución porcentual, en cuanto al tipo de discapacidad, que se presenta en dicha población, evaluada el año 2015 y el 2017.

Estudios realizados por el Módulo de Práctica Deportiva y Ejercicio Físico (MOPRADEF)(6) revelan que el 56% de la población mexicana adulta en las áreas urbanas, es físicamente inactiva. De manera interesante, el nivel de instrucción o estudios se refleja en la población que practica alguna actividad físico-deportiva. Entre quienes no concluyeron la educación básica, solo el 34% es físicamente activo, mientras que el porcentaje de aquellos que estudiaron al menos un grado de educación superior es de 54.7% (Fig. 2) (6).

El sedentarismo, que se agrava con la edad, es uno de los factores que predisponen hacia las enfermedades crónico-degenerativas, en particular durante la vejez.

Así, el envejecimiento puede definirse como un proceso gradual, caracterizado por una disminución relativa de la respuesta homeostática (equilibrio que le permite al organismo mantener un funcionamiento adecuado), debida a las modificaciones morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y psicológicas, propiciadas por los cambios inherentes a la edad y al desgaste acumulado ante los retos que enfrenta el organismo a lo largo de la historia del individuo en un ambiente determinado (7).

Actualmente se sabe que este tipo de deterioro asociado al movimiento se debe a la pérdida de masa muscular con la edad, fenómeno conocido como sarcopenia (del cual se hablará más adelante). Es importante mencionar que recientemente

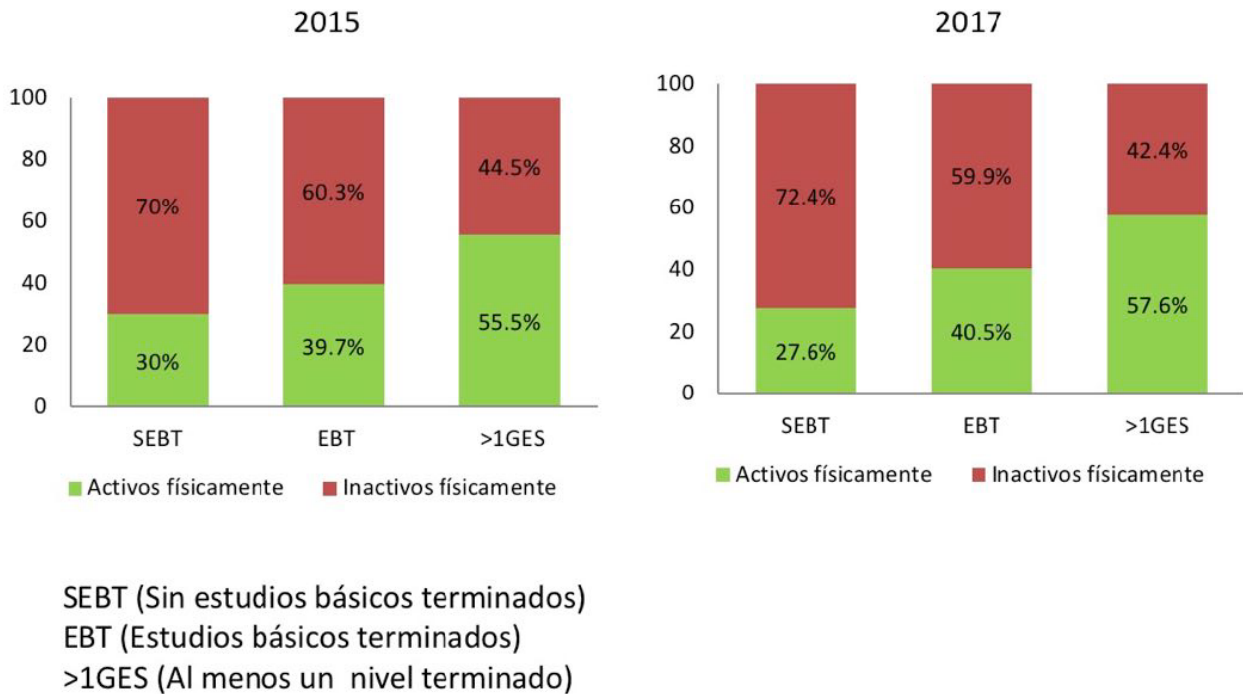


Figura 2. Distribución porcentual de la población de 18 y más años por nivel de escolaridad según condición de práctica físico deportiva en tiempo libre (MOPRADEF, 2016; http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/mopradef/mopradef2018_01.pdf)

se dieron a conocer los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición realizada en el 2012 (8), en la que se estudió una muestra de 5,046 adultos mayores de 60 años y más, representando a 7,439,686 adultos mayores a nivel nacional. Dentro de la muestra 53.9% fueron mujeres (con una edad de 69.92 ± 7.56 años) y 46.1% hombres (cuya edad promedio era de 70.43 ± 7.73 años). Los resultados mostraron que la prevalencia de pre-sarcopenia fue del 8.70% y la de sarcopenia del 13.30%. De manera interesante se encontró una mayor prevalencia en las mujeres, la cual se incrementa conforme aumenta la edad, y se asocia a caídas, deterioro cognitivo, obesidad abdominal y alta marginación (8). Por lo que el problema de la discapacidad asociada a la pérdida de la movilidad, y por lo tanto de la independencia, en lugar de disminuir va en aumento. Lo cual es un reto para el sistema de salud de nuestro país y hace imperativo el entender el problema y buscar terapias de prevención para tratar de disminuir la sarcopenia.

Sarcopenia y ejercicio

La sarcopenia es un síndrome caracterizado por una progresiva y generalizada pérdida de masa

muscular y de potencia muscular esquelética, así como bajo rendimiento físico; fuertemente asociada con el envejecimiento (9, 10). Esta condición puede conducir a discapacidad física, alteraciones en la marcha y caídas; que provocan la pérdida de la independencia funcional, incrementando el costo sanitario y eventualmente favoreciendo el riesgo de mortalidad (11, 12) (Fig. 3).

Existen múltiples factores asociados a la sarcopenia, dentro de los que se encuentran desde el estilo de vida y la alimentación, hasta la pérdida de unidades motoras alfa de la médula espinal, factores humorales y hormonales, y la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (9) (Fig. 3).

La pérdida progresiva del músculo esquelético y de la fuerza se han asociado a la disfunción mitocondrial durante el envejecimiento (13). El daño acumulativo en las mitocondrias, inducido por las ERO generadas en la cadena respiratoria, afecta la replicación y la transcripción del ADN mitocondrial (ADNmt) lo que resulta en una disminución de su función; que a su vez conduce a una mayor producción de ERO y más daño al ADNmt (13, 14). La disfunción mitocondrial puede conllevar a una desregulación celular incrementando la muerte por apoptosis, induciendo estrés oxidante y lesión del

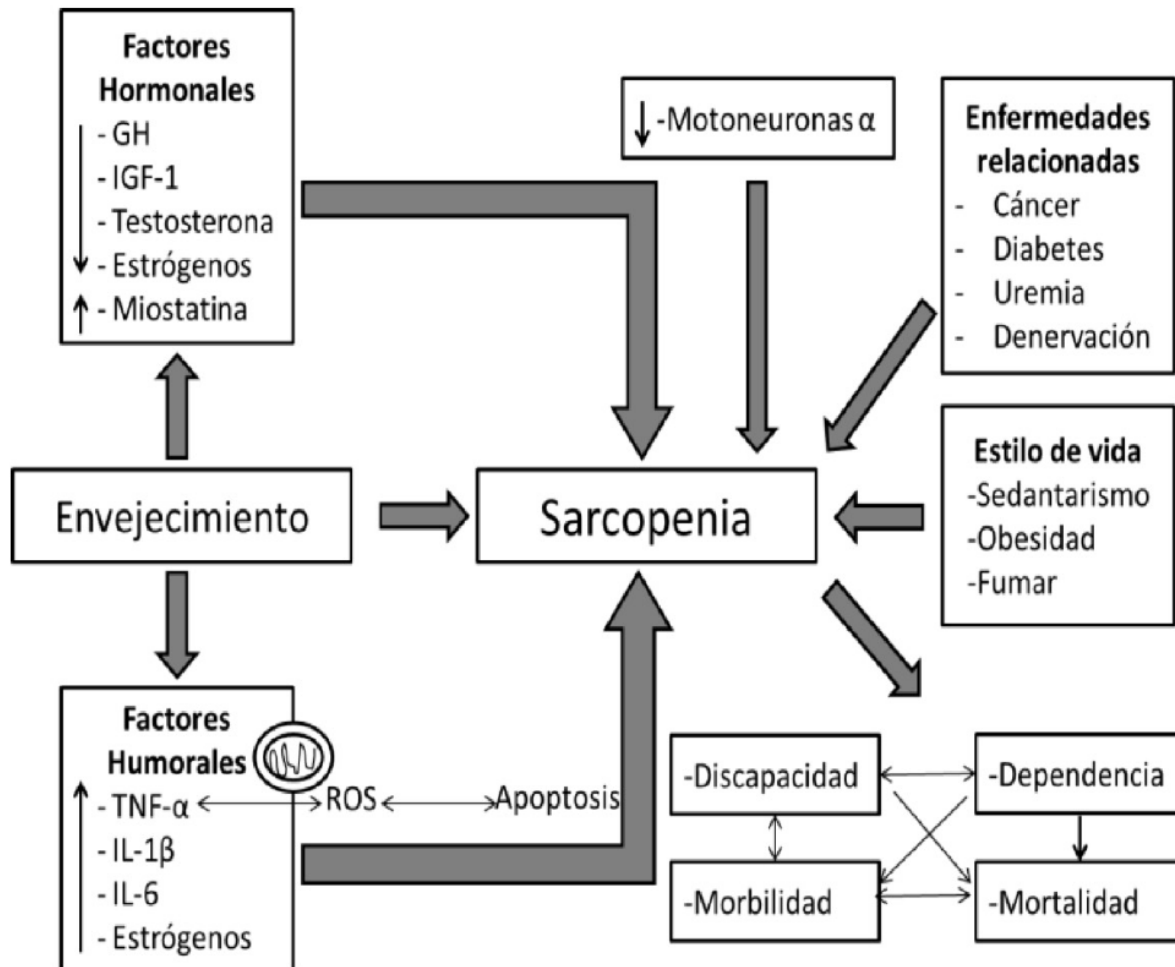


Figura 3. Esquema de los factores asociados a la sarcopenia y sus consecuencias.

tejido (15). Por ello, los marcadores circulantes de estrés oxidante como proteínas oxidadas y un cociente GSH/GSSG alterado durante la sarcopenia se han asociado con un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares (16).

Asimismo, la movilidad reducida y las limitaciones funcionales que caracterizan al envejecimiento, pueden promover un estilo de vida más sedentario para las personas mayores, lo que lleva a un círculo vicioso, empeorando aún más el rendimiento muscular y la calidad de vida de los pacientes, lo que predispone a un mayor riesgo de discapacidad y mortalidad. Puesto que la inactividad física está claramente relacionada con la pérdida de masa muscular y de la fuerza, se ha sugerido que el aumento en los niveles de actividad física puede tener efectos protectores (17). Lo anterior ha sido demostrado en varios estudios longitudinales en donde se ha confirmado que el ejercicio regular

puede extender la esperanza y calidad de vida y reducir la morbilidad de adultos mayores (18).

Metformina

A la fecha aún no existe un tratamiento basado en fármacos que logre prevenir o revertir los efectos de la sarcopenia de manera eficiente. Se han utilizado distintas intervenciones farmacológicas para retrasar su aparición, como tratamientos hormonales con testosterona, dehidroepiandrosterona y hormona de crecimiento, pero los resultados son controversiales. Estudios recientes realizados en modelos animales han sugerido que la metformina puede prevenir los daños ocasionados por el sedentarismo incrementando la capacidad de rendimiento muscular (19).

La metformina (MTF) es un medicamento perteneciente a la familia de las biguadinas, las cuales disminuyen la glucosa en sangre. Este medicamento

es comúnmente prescrito para el tratamiento de la diabetes tipo II (20). Los pacientes con este padecimiento presentan elevadas concentraciones de glucosa en plasma en ayunas, lo que se atribuye, en parte, al aumento en la tasa de gluconeogénesis. La MTF por su parte actúa inhibiendo dicha vía (21). Asimismo, se ha reportado que la MTF inhibe el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que ocasiona una reducción en la producción de ATP y conlleva a un aumento del cociente AMP/ATP; el cuál activa a la adenosina monofosfato cinasa (AMPK) (22, 23), que en músculo estimula el transporte de glucosa y en hígado bloquea la gluconeogénesis (22).

Diversos estudios muestran que la MTF tiene propiedades antioxidantes en pacientes diabéticos tipo II y en modelos experimentales de ratas diabéticas (24, 25), con un aumento en la actividad de la enzima catalasa (CAT), que elimina el exceso de peróxido de hidrógeno.

Por otro lado, se ha propuesto que la MTF conserva la homeostasis redox manteniendo los niveles de glutatión, CAT y superóxido dismutasa (SOD) (26). Por lo que este fármaco también ha sido propuesto como molécula que previene los daños ocasionados por el sedentarismo. Recientemente se demostró que el tratamiento con MTF incrementó la capacidad de rendimiento muscular de ratones sedentarios C57BL (19). Además que aumenta la activación de proteína cinasa Akt en el músculo gastrocnemio y el cuádriceps femoral; la inactivación de Akt está asociada con daños musculares asociados al envejecimiento (19), y junto con mTOR (de la que se hablará más adelante) regulan la masa muscular esquelética (27).

Mecanismos propuestos para la prevención y reversión de la sarcopenia, basados en el ejercicio y tratamiento farmacológico con MTF

Uno de los reguladores centrales del metabolismo celular en eucariotas es la cinasa AMPK, la cual, como ya se había mencionado antes, es activada por MTF. La AMPK es un complejo heterotrimérico que consta de una subunidad catalítica α y dos subunidades reguladoras β y γ , el cual puede ser activado cuando los niveles intracelulares de ATP son bajos. La AMPK desempeña papeles críticos en la regulación del crecimiento y la reprogramación del metabolismo celular (28). Puesto que el ejercicio puede estimular las vías de señalización que conducen al transporte de la glucosa en la célula (29), se piensa que durante el ejercicio, la cinasa AMPK se activa en el músculo esquelético y estimula los procesos de generación de energía, la absorción de glucosa y la oxidación de ácidos grasos, además

disminuye los procesos que consumen energía, como la síntesis de proteínas y lípidos; por lo que el ejercicio es quizás el activador fisiológico más potente de la AMPK (Fig. 4)(30). Se ha reportado que en humanos, el ejercicio de resistencia inhibe la síntesis de proteínas musculares, sin embargo, dicha síntesis se activa nuevamente 2-3 horas después del ejercicio, manteniéndose por 48 horas. Por lo que se ha sugerido que el mecanismo para la disminución de la síntesis de proteínas que sucede en esas primeras 2 -3 horas se debe a la activación de AMPK y la inhibición de los componentes de la vía de señalización de mTOR, como 4E-BP1 (Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1, por sus siglas en inglés) (31). Mecanismo que se apaga después de ese lapso de tiempo.

Aunque los mecanismos moleculares por los cuales podría actuar la MTF para prevenir la sarcopenia todavía no son del todo claros, se sabe que la AMPK también induce la captación de glucosa (32) (Fig. 4). Aparentemente la activación de AMPK en músculo regula la captación de glucosa a través de dos proteínas Rab: guanosine triphosphatases-activating protein (por sus siglas en inglés GAP) y TBC1D1 (dominio en Tre-2, BUB2p y Cdc16p) las cuales son fosforiladas por Akt y AMPK (33). La fosforilación de Rab (GAP) y TBC1D1 regula la actividad y translocación de GLUT4, principal proteína transportadora de glucosa (34).

Asimismo, la activación de la AMPK puede a su vez activar a los factores de transcripción Forkhead-O1 (FoxO) que, en el músculo esquelético de los mamíferos, promueven el catabolismo mediante la activación de proteínas ubiquitina ligasas (35). La activación de la AMPK juega un papel clave en el aumento del nivel de FoxO1, FoxO3a y miostatina en el músculo gastrocnemio después de inducir daño muscular a través del ejercicio excesivo (36). Se ha observado que FoxO1 regula la expresión de 4E-BP1 e inhibe la señalización de mTOR (mammalian target of rapamycin) que es un regulador crítico en la síntesis de proteínas, lípidos, crecimiento celular, autofagia y crecimiento muscular de los mamíferos.

Como se ha mencionado, el desequilibrio redox convertido en estrés oxidante, se reconoce como una causa importante de muchas condiciones patológicas y se ha asociado también al envejecimiento. Por ello, se ha asociado a la AMPK con estos procesos, ya que se activa en respuesta a las condiciones celulares que acompañan a la depleción de energía y juega un papel central en la regulación de homeostasis energética, la tumorigénesis y la longevidad. Así mismo, la cinasa AMPK desempeña un papel indispensable en el funcionamiento del sistema de defensa antioxidante al inducir la ex-

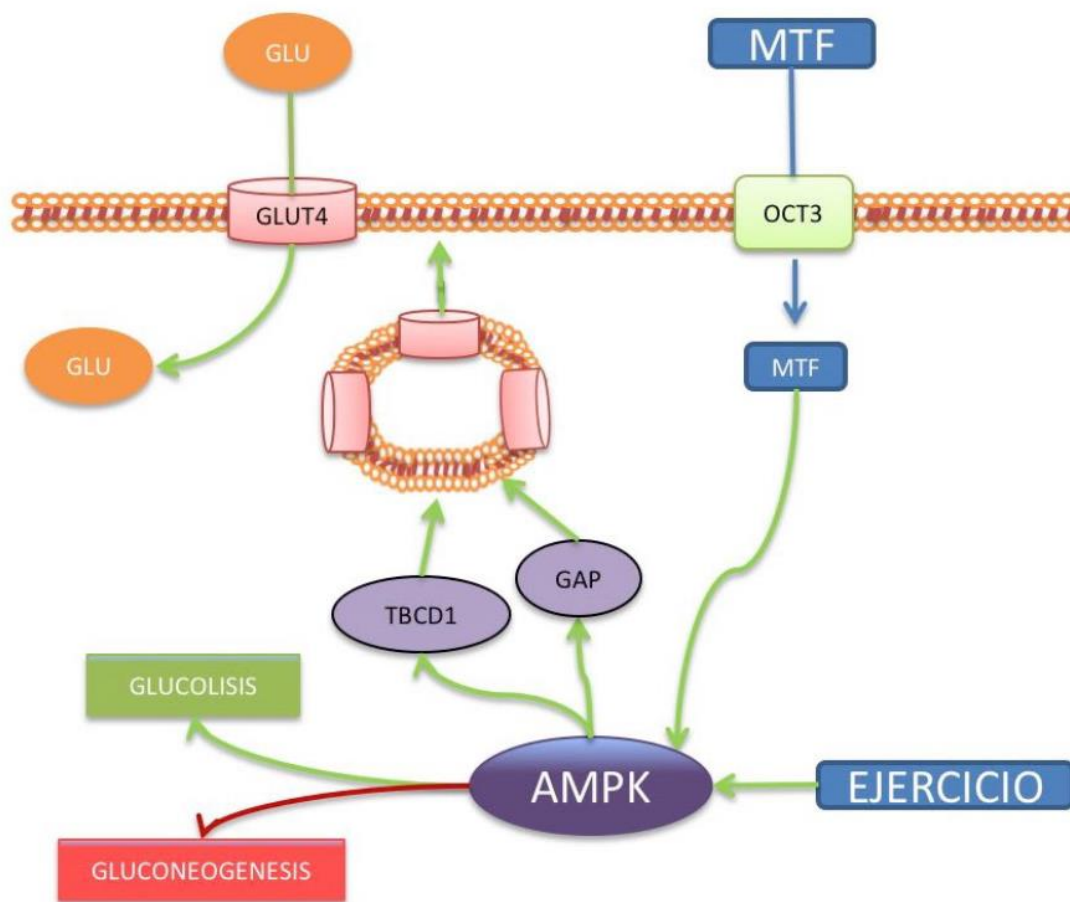


Figura 4. Representación del efecto en la captación de glucosa por el Ejercicio y la MTF. El Ejercicio y la MTF pueden estimular la activación de AMPK para el transporte de la glucosa en células y estimular los procesos de generación de energía, como la absorción de glucosa y la oxidación de ácidos grasos.

presión de las enzimas como la SODMn y CAT (Fig. 5). La AMPK también fosforila directamente FoxO1 humano en la Thr (649) *in vitro* e incrementa la transcripción de SODMn y CAT.

Estudios de mutagénesis dirigida mostraron que la fosforilación de FoxO1 por la AMPK es un paso crítico para la estabilidad y la localización nuclear de FoxO1, lo que revela que esta cinasa controla la expresión de las enzimas antioxidantes y confirma que la AMPK tiene un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis redox (37). En el músculo esquelético de los mamíferos, el factor de transcripción FoxO1 promueve el catabolismo mediante la activación de ubiquitina ligasas, mientras que la MTF disminuye la entrada nuclear de dos factores de transcripción, la proteína de unión a elementos de respuesta de carbohidratos (ChREBP) y FoxO1 en células endoteliales (38). De manera que la relación entre MTF y FoxO1 aún queda por aclararse.

Como se mencionó, la AMPK inhibe la síntesis de proteínas a través de la supresión de mTOR (39). mTOR es miembro de una familia de proteínas cinasas, la cual existe como parte de dos complejos mTORC1 y mTORC2; mTORC1 contiene una proteína asociada a la regulación de mTOR (raptor), mientras que mTORC2 contiene una proteína asociada insensible a la rapamicina de mTOR (rictor). Así, mTORC1 controla el tamaño de los miofibrilos y fibras musculares basado en un equilibrio dinámico entre los procesos anabólicos, como la síntesis de proteínas y el almacenamiento de nutrientes, además de procesos catabólicos como la utilización de energía almacenada (40). A diferencia de mTORC1, la AMPK se activa durante el proceso de inanición y resistencia para incrementar la regulación de los procesos de conservación de energía; por lo cual representan dos fuerzas antagónicas que rigen la adaptación muscular a la nutrición, la inanición y la estimulación del crecimiento.

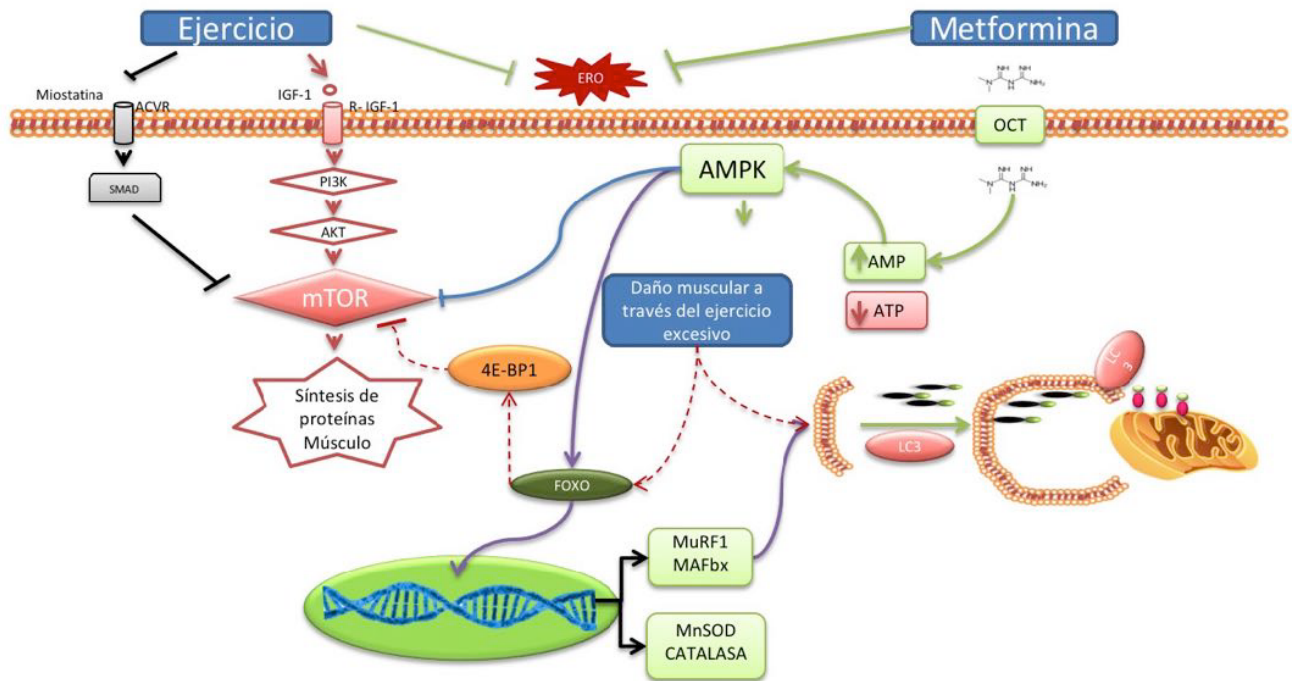


Figura 5. Representación esquemática de los efectos de AMPK y Akt sobre FoxO y mTOR. AMPK promueve la actividad de FoxO para mantener el equilibrio redox a través de la producción de antioxidantes y metabolismo de la glucosa. Akt estimula la señalización de mTOR para promover el metabolismo de la glucosa y la síntesis de proteínas.

Estudios con modelos animales han mostrado que la supresión de mTORC1 genera una disminución de la masa muscular correlacionada con el aumento de la activación de la AMPK. La inhibición de la AMPK en células musculares deficientes de proteína cinasa ribosómica S6 (p70S6K) (proteína importante para el control de la masa del músculo esquelético particularmente bajo estimulación mecánica)(41), restaura el crecimiento celular y la sensibilidad a los nutrientes. Por el contrario, se reportó que las células musculares que carecen de AMPK incrementan la activación mTORC1 aumentando la tasa de síntesis de proteínas así como el tamaño de las células musculares en miotubos primarios y fibras musculares.

Igualmente, la cinasa Akt puede estimular la captación de glucosa y su actividad se incrementa en respuesta a la actividad contráctil en el músculo esquelético de la rata. Se ha observado que el ejercicio de marcha intermedio-alto y de alta intensidad aumenta significativamente la actividad de Akt (42) y con ello la captación de glucosa. Estudios realizados para evaluar la acción hipertrofica de la mutante Akt (MyrAkt), mostraron que es mayor en músculos deficientes de AMPK, lo que indica que la AMPK actúa como un control de retroalimentación negativa para restringir la hipertrofia muscular.

Metformina e inflamación

La inmunidad innata y adaptativa son los principales mecanismos de defensa del organismo, que no sólo pueden provocar inflamación con el fin de proteger a los tejidos y células contra patógenos invasores, sino también reparar las lesiones en los tejidos y alertar al sistema inmunológico contra el peligro. La inflamación es un mecanismo de supervivencia crucial, pero puede ser peligroso si se convierte en un estado crónico (43). En el caso de la sarcopenia, el mecanismo directo por el cual se relaciona con la inflamación aún no se conoce, sin embargo se ha reportado que existe un aumento en el contenido de citocinas pro inflamatorias en el suero de pacientes con este padecimiento (44). Las citocinas estimulan el catabolismo de las proteínas y suprimen la síntesis muscular favoreciendo el deterioro muscular. El origen de la citocinas es aún incierto, pero se ha relacionado con la obesidad que frecuentemente acompaña a la sarcopenia en lo que ahora se conoce como obesidad sarcopénica (45) o bien por la inflamación crónica asociada a la edad, que se menciona a continuación.

Se ha reportado que el envejecimiento es un estado de inflamación crónica de bajo grado, que incluso se le ha denominado "inflammaging", en

inglés (46, 47); aunque la causa y el efecto de ello no son claros. Existen diferentes factores que contribuyen a la generación de la inflamación crónica durante el envejecimiento como el estado redox, el daño mitocondrial, las modificaciones epigenéticas, el medio ambiente entre otros (46, 47). Sin embargo, un factor novedoso que se ha asociado con la generación crónica de citocinas pro-inflamatorias durante el envejecimiento, es la presencia de células senescentes (48). Se ha reportado que las células senescentes se acumulan con la edad avanzada y secretan una serie de citocinas y quimocinas, factores de crecimiento y metaloproteasas, conocidas como fenotipo secretor asociado a la senescencia o SASP por sus siglas en inglés (49). Hay que mencionar que aún no existe una teoría unificadora que explique todos los aspectos del envejecimiento y su relación con la inflamación; en cambio, es probable que múltiples procesos contribuyan y que todos estén asociados con respuestas inflamatorias.

Existen varios marcadores inflamatorios, como las interleucinas 1 y 6 (IL-1, IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la proteína C reactiva (CRP), que se han asociado con enfermedades crónicas relacionadas con la edad y la discapacidad. Se ha observado que la IL-1, IL-6 y el TNF- α aceleran el catabolismo proteico, disminuyen la sensibilidad a la insulina y pueden influir en la remodelación ósea y muscular (50, 51).

La activación de la AMPK mediada por la MTF puede inhibir la respuesta inflamatoria inducida por diferentes estímulos; por lo que una disminución de la actividad de la AMPK se asocia con un aumento de la inflamación (43) (Fig. 6). Asimismo, se ha reportado que la MTF puede reducir la inflamación sistémica al disminuir el nivel de CRP y la IL-6 en el síndrome metabólico leve (52).

Conclusiones y perspectivas

A la fecha ya se han realizado algunos estudios sobre cohortes de humanos que toman metformina y hacen ejercicio, sin embargo, casi todos ellos se han realizado en pacientes diabéticos y la mayoría de ellos en jóvenes. Dichos estudios reportan que la MTF mejora la homeostasis de la glucosa durante el ejercicio (53), pero en otros no se ven cambios (54). Recientemente Long y colaboradores (55) realizaron un estudio muy interesante con pacientes de 65 años y más, que tomaron MTF, dos semanas antes de iniciar un régimen de ejercicio de 14 semanas, durante el cual seguían consumiendo el fármaco. Aunque aparentemente si aumentaba su fuerza física, la mayoría de los marcadores no fueron concluyentes. Sin embargo, es importante destacar que no existen experimen-

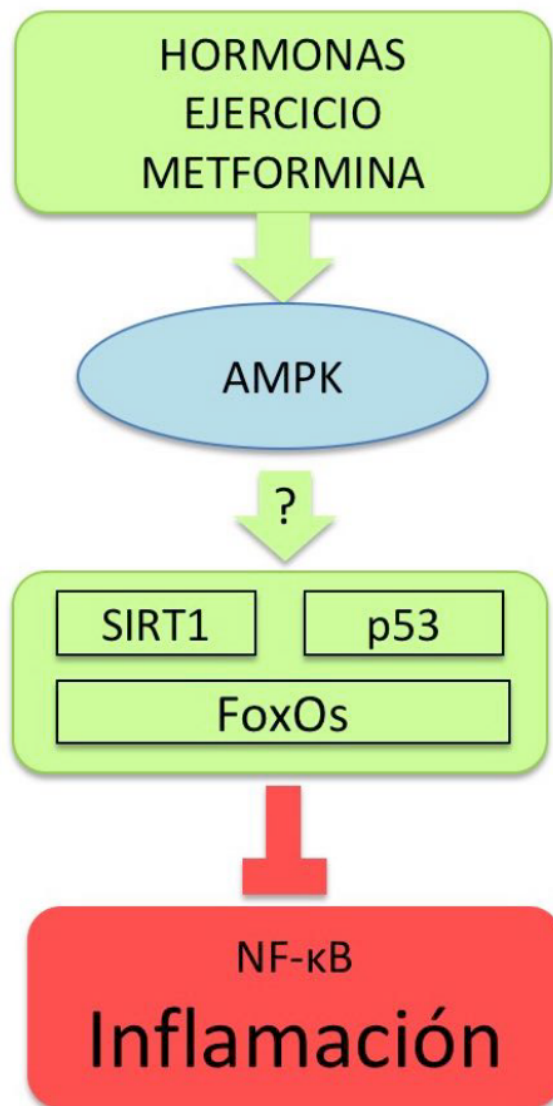


Figura 6. Representación esquemática de las conexiones funcionales de AMPK vinculado a la inhibición de NF- κ B. AMPK puede ser activado por distintos estímulos tales como el ejercicio y la MTF y éste inhibir la respuesta inflamatoria.

tos que usen esta combinación como prevención de la sarcopenia, antes del envejecimiento, lo que pudiera ayudar a una vejez con mejores músculos y sensibilidad a la insulina que permitan tener una mejor calidad de vida.


Puesto que la MTF ha demostrado inducir mecanismos de señalización que protegen a las células musculares, al mismo tiempo que regulan el estado redox y disminuyen la inflamación, y por otro lado el ejercicio previene el deterioro muscular y la pérdida de fuerza del músculo, sería interesante probar una terapia combinada donde se evalúe si existe un

efecto aditivo o sinérgico de estas intervenciones para prevenir la sarcopenia. Puesto que es más difícil regenerar al músculo una vez que gran cantidad de fibras musculares han muerto o están muy dañadas, lo conveniente sería tratar de prevenir dicho daño.

Es por todos conocida la importancia de hacer ejercicio, y habría que hacerlo durante toda la vida, sin embargo, queda la duda de en que momento combinar la actividad física con el tratamiento de MTF para evitar el deterioro muscular. Actualmente es difícil pensar en la posibilidad de administrar un fármaco como la MTF, de manera preventiva a per-

sonas sanas, por lo que habrá que hacer una gran cantidad de estudios para contestar estas preguntas antes de poder pasar directamente al tratamiento. Por lo que por ahora habrá que empezar con el ejercicio si queremos alcanzar un envejecimiento exitoso con una buena calidad de vida.

Agradecimientos

Este trabajo es financiado por el CONACYT FOSSIS 272256. David Hernández Álvarez es becario del CONACYT para estudios de posgrado. 

REFERENCIAS

- Guerrero M L, León SA (2010) Estilo de vida y salud. *Educere* 14:13-19.
- Barragán LL, González PM, Estrada MS, Hernández CY, Hernández CE, Ríos VJ, Flores SM (2015) Estilo de vida y dimensiones. En: *Estudiantes universitarios de área de la salud. Ciencia y Humanismo en la Salud*. México, pp 53-63.
- INEGI, 2016: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/poblacion2016_0.pdf
- INEGI, 2014: <http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2014/adultos0.pdf>
- ENIGH2012: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/9640/inegi_2012.pdf
- MOPRADEF, 2016: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/boletines/2016/especiales/especiales2016_01_08.pdf
- Hodes RJ, Sierra F, Austad SN, Epel E, Neigh GN, Erlandson KM, Schafer MJ, LeBrasseur NK, Wiley C, Campisi J, Sehl ME, Scalia R, Eguchi S, Kasinath BS, Halter JB, Cohen HJ, Demark-Wahnefried W, Ahles TA, Barzilai N, Hurria A, Hunt PW (2016) Disease drivers of aging. *Ann N Y Acad Sci* 1386:45-68.
- Espinel-Bermúdez MC, Sánchez-García S, García-Peña C, Trujillo X, Huerta-Viera M, Granados-García V, Hernández-González S, Arias-Merino ED (2018) Associated factors with sarcopenia among Mexican elderly: 2012 National Health and Nutrition Survey. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 56:S46-S53.
- Serra RJ. Consecuencias Clínicas de la sarcopenia. 2006. *Nutr. Hosp.* 21: 46-50.
- Montero FN, Serra RJ. Role of exercise on sarcopenia in the elderly (2013) *Eur J Phys Rehabil Med* 49:131-143.
- Cruz JA, Landi F, Topinkova E, Michel JP (2010) Understanding sarcopenia as a geriatric syndrome. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13:1-7
- Kim TN, Choi KM (2013) Sarcopenia: definition, epidemiology, and pathophysiology. *J BoneMetab* 20:1-10.
- Gonzalez-Freire M, Adelnia F, Moaddel R, Ferrucci L (2018) Searching for a mitochondrial root to the decline in muscle function with ageing. *J Cach Sarc Musc* 9:435-440.
- Hang C, Yahui K, Hong Z (2012) Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *J Signal Transduct* 2012: 646354.
- Green DR, Galluzzi L, Kroemer G (2011) Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* 333:1109-1112.
- Bellanti F, Romano AD, Lo Buglio A, Castriotta V, Guglielmi G, Greco A, Serviddio G, Vendemiale G (2018) Oxidative stress is increased in sarcopenia and associated with cardiovascular disease risk in sarcopenic obesity. *Maturitas* 109:6-12.
- Denison HJ, Cooper C, Sayer AA, Robinson SM (2015) Prevention and optimal management of sarcopenia: a review of combined exercise and nutrition interventions to improve muscle outcomes in older people. *Clin Interv Aging* 10:859-869.
- Zampieri S, Mosole S, Löfler S, Fruhmann H, Burggraf S, Cvečka J, Hamar D, Sedliak M, Tirptakova V, Šarabon N, Mayr W, Kern H (2015) Physical Exercise in Aging: Nine Weeks of Leg Press or Electrical Stimulation Training in 70 Years Old Sedentary Elderly People. *Eur J Transl Myol* 25:237-242.

19. Senesi P, Montesano A, Luzi L, Codella R, Benedini S, Terruzzi I (2016) Metformin Treatment Prevents Sedentariness Related Damages in Mice. *J Diabetes Res* 2016:1-11.
20. Wessels B, Ciapaite J, van den Broek NM, Nicolay K, Prompers JJ (2014) Metformin impairs mitochondrial function in skeletal muscle of both lean and diabetic rats in a dose-dependent manner. *PLoS One* 9:e100525.
21. Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, Inzucchi SE, Schumann WC, Petersen KF, Landau BR, Shulman GI (2000) Mechanism by which Metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes* 49:2063-2069.
22. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 108:1167-1174.
23. Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, Palacios HH, Mote PL, Scheibye-Knudsen M, Gomes AP, Ward TM, Minor RK, Blouin MJ, Schwab M, Pollak M, Zhang Y, Yu Y, Becker KG, Bohr VA, Ingram DK, Sinclair DA, Wolf NS, Spindler SR, Bernier M, de Cabo R (2013) Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun* 4:2192.
24. Chakraborty A, Chowdhury S, Bhattacharyya M (2011) Effect of metformin on oxidative stress, nitrosative stress and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract* 93:56-62.
25. Zayyanu U U, Abu A B and Mohamed M (2016) Metformin Reduces Oxidative Stress Status and Improves Plasma. *J Pharm Nut Sci* 6:120-125.
26. Pandey A, Kumar VL (2016) Protective Effect of Metformin against Acute Inflammation and Oxidative Stress in Rat. *Drug Dev Res* 77:278-284.
27. Kim YC, Guan KL (2015) mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest* 125:25-32.
28. Mihaylova MM, Shaw RJ (2011) The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol* 13:1016-1023.
29. Röhling M, Herder C, Stemper T, Müssig K (2016) Influence of Acute and Chronic Exercise on Glucose Uptake. *J Diabetes Res* 2016:2868652.
30. Richter EA, Ruderman NB (2009) AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. *Biochem J* Mar 418:261-275.
31. Dreyer HC, Fujita S, Cadenas JG, Chinkes DL, Volpi E, Rasmussen BB (2006) Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. *J Physiol* 576:613-624.
32. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE (2012) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108:1167-1174.
33. Jessen N, An D, Lihn AS, Nygren J, Hirshman MF, Thorell A, Goodyear LJ (2011) Exercise increases TBC1D1 phosphorylation in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301:E164-71
34. Huang S, Czech MP (2007) The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab* 5:237-252.
35. Southgate RJ, Neill B, Prelovsek O, El-Osta A, Kamei Y, Miura S, Ezaki O, McLoughlin TJ, Zhang W, Unterman TG, Febbraio MA (2007) FOXO1 regulates the expression of 4E-BP1 and inhibits mTOR signaling in mammalian skeletal muscle. *J Biol Chem* 282:21176-21186.
36. Lee K, Ochi E, Song H, Nakazato K (2015) Activation of AMP-activated protein kinase induce expression of FoxO1, FoxO3a, and myostatin after exercise-induced muscle damage. *Biochem Biophys Res Commun* 466:289-294.
37. Yun H, Park S, Kim MJ, Yang WK, Im DU, Yang KR, Hong J, Choe W, Kang I, Kim SS, Ha J (2014) AMP-activated protein kinase mediates the antioxidant effects of resveratrol through regulation of the transcription factor FoxO1. *FEBS J* 281:4421-4438.
38. Xiaoyu L, Kover KL, Heruth DP, Watkins DJ, Moore WV, Jackson K, Zang M, Clements MA, Yan Y (2015) New Insight Into Metformin Action: Regulation of ChREBP and FOXO1 Activities in Endothelial Cells. *Mol Endocrinol* 29:1184-1194.
39. Mounier R, Lantier L, Leclerc J, Sotiropoulos A, Pende M, Daegelen D, Sakamoto K, Foretz M, Viollet B (2009) Important role for AMPK α 1 in limiting skeletal muscle cell hypertrophy. *FASEB J* 23:2264-2273.
40. Mounier R, Lantier L, Leclerc J, Sotiropoulos A, Foretz M, Viollet B (2011) Antagonistic control of muscle cell size by AMPK and mTORC1. *Cell Cycle* 10:2640-2646.
41. Zanchi NE, Lancha AH Jr (2008) Mechanical stimuli of skeletal muscle: implications on

- mTOR/p70s6k and protein synthesis. *Eur J Appl Physiol* 102:253-263.
42. Sakamoto K, Aschenbach WG, Hirshman MF, Goodyear LJ (2003) Akt signaling in skeletal muscle: regulation by exercise and passive stretch. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E1081-1088.
 43. Salminen A, Hyttinen JM, Kaarniranta K (2011) AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *J Mol Med (Berl)* 89:667-676.
 44. Bano G, Trevisan C, Carraro S, Solmi M, Luchini C, Stubbs B, Manzato E, Sergi G, Veronese N (2017) Inflammation and sarcopenia: A systematic review and meta-analysis. *Maturitas* 96:10-15.
 45. Kalinkovich A, Livshits G (2017) Sarcopenic obesity or obese sarcopenia: A cross talk between age-associated adipose tissue and skeletal muscle inflammation as a main mechanism of the pathogenesis. *Ageing Res Rev* 35:200-221.
 46. Sanada F, Taniyama Y, Muratsu J, Otsu R, Shimizu H, Rakugi H, Morishita R (2018) Source of Chronic Inflammation in Aging. *Front Cardiovasc Med.* 22:12. eCollection 2018.
 47. Bektas A, Schurman SH, Sen R, Ferrucci L (2018) Aging, inflammation and the environment. *Exp Gerontol* 105:10-18.
 48. Olivieri F, Prattichizzo F, Grillari J, Balistreri CR (2018) Cellular Senescence and Inflammaging in Age-Related Diseases. *Mediators Inflamm.* 17;2018:9076485.
 49. González-Puertos VY, Maciel-Barón LÁ, Barajas-Gómez BA, López-Diazguerrero, NE, Königsberg M (2015) Participación del fenotipo secretor de las células senescentes en el desarrollo del cáncer, el envejecimiento y las enfermedades asociadas a la edad. *Gac Méd Mex* 151:491-500.
 50. Warne JP (2003) Tumour necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass. *J Endocrinol* 177:351-355.
 51. Ferrucci L, Corsi A, Lauretani F, Bandinelli S, Bartali B, Taub DD, Guralnik JM, Longo DL (2005) The origins of age-related proinflammatory state. *Blood* 105:2294-2299.
 52. Akbar DH(2003) Effect of metformin and sulfonylurea on C-reactive protein level in well-controlled type 2 diabetics with metabolic síndrome. *Endocrine* 20:215-218.
 53. Boulé NG, Kenny GP, Larose J, Khandwala F, Kuzik N, Sigal RJ (2013) Does metformin modify the effect on glycaemic control of aerobic exercise, resistance exercise or both? *Diabetologia* 56:2378-2382.
 54. Hansen M, Palsøe MK, Helge JW, Dela F (2015) The effect of metformin on glucose homeostasis during moderate exercise. *Diabetes Care* 38:293-301.
 55. Long DE, Peck BD, Martz JL, Tuggle SC, Bush HM, McGwin G, Kern PA, Bamman MM, Peterson CA (2017) Metformin to Augment Strength Training Effective Response in Seniors (MASTERS): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 18:192.

