



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

“Participación del GDF11 como factor de regeneración muscular en ratas con obesidad sarcopénica asociada al envejecimiento bajo un régimen de ejercicio.”

**TESIS**

Para obtener el grado de Doctora en Biología Experimental presenta:

*M. en C. Beatriz Mena Montes*

Matricula: 2161801129

**Codirectores:**

Dr. Armando Luna López  
Dra. Norma Edith López DíazGuerrero

**Asesora:**

Dra. Mina Königsberg Fainstein

Iztapalapa, Ciudad de México a 07 de diciembre de 2021



Participación del GDF11 como factor de regeneración muscular en ratas con obesidad sarcopénica asociada al envejecimiento bajo un régimen de ejercicio.



BEATRIZ MENA MONTES  
ALUMNA

REVISO

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARAJÉ CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

VOCAL

DRA. MARIA CRISTINA GONZALEZ TORRES

VOCAL

DR. ALEJANDRO SILVA PALACIOS

SECRETARIO

DR. OSCAR ROSAS CARRASCO

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 9:00 horas del día 7 del mes de diciembre del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

- DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN
- DRA. MARIA CRISTINA GONZALEZ TORRES
- DR. ALEJANDRO SILVA PALACIOS
- DR. OSCAR ROSAS CARRASCO

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

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: BEATRIZ MENA MONTES

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

Aprobar

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

El presente documento cuenta con la firma -autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta - Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

La que suscribe: **Beatriz Mena Montes**, alumna del posgrado en Biología Experimental con matrícula 2161801129, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autora de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **“Participación del GDF11 como factor de regeneración muscular en ratas con obesidad sarcopénica asociada al envejecimiento bajo un régimen de ejercicio”**,

Declaro que:

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

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 07 de diciembre del 2021.

Atentamente

A handwritten signature in black ink, enclosed within a hand-drawn circle. The signature appears to be 'BMM' with some additional scribbles below it.

Beatriz Mena Montes

# INFORME DE ORIGINALIDAD

UAM

INFORME DE ORIGINALIDAD

<b>17%</b>	<b>15%</b>	<b>4%</b>	<b>7%</b>
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>Submitted to CONACYT</b> Trabajo del estudiante	<b>2%</b>
<b>2</b>	<b>hdl.handle.net</b> Fuente de Internet	<b>2%</b>
<b>3</b>	<b>docplayer.es</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>4</b>	<b>idoc.pub</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>5</b>	<b>downloads.hindawi.com</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>6</b>	<b>diposit.ub.edu</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>7</b>	<b>www.geriatria.salud.gob.mx</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>8</b>	<b>Submitted to Universidad de Jaén</b> Trabajo del estudiante	<b>&lt;1%</b>
<b>9</b>	<b>Submitted to Instituto Politecnico Nacional</b> Trabajo del estudiante	<b>&lt;1%</b>

## CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 07 de diciembre de 2021

Comisión Académica del Posgrado en  
Biología Experimental

Presente

La que suscribe Beatriz Mena Montes alumna con número de matrícula 2161801129, del *Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I)*, manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación: **“Participación del GDF11 como factor de regeneración muscular en ratas con obesidad sarcopénica asociada al envejecimiento bajo un régimen de ejercicio”** en el departamento de ciencias de la salud, lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

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

Atentamente

A handwritten signature in black ink, enclosed within a hand-drawn circle. The signature appears to be 'BMM' with some additional scribbles below it.

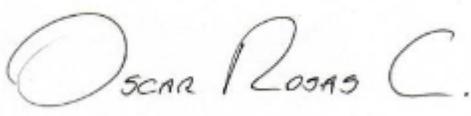
Beatriz Mena Montes

El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020. Todo el proceso de doctorado estuvo apoyado por el Instituto Nacional de Geriátrica de la Secretaría de Salud.

## Miembros de jurado

El jurado designado por la Comisión Académica del posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la Tesis titulada: *“Participación del GDF11 como factor de regeneración muscular en ratas con obesidad sarcopénica asociada al envejecimiento bajo un régimen de ejercicio.”*

Presento:  
Beatriz Mena Montes  
El día 07 de diciembre de 2021

 <p>PRESIDENTA <b>Dra. Mina Königsberg Fainstein</b> Profesor Titular C Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa</p>	 <p>SECRETARIO <b>Dr. Oscar Rosas Carrasco</b> Profesor e Investigador Departamento de Salud Universidad Iberoamericana</p>
 <p>VOCAL <b>Dra. María Cristina González Torres</b> Lab. Biología Celular. Dpto. Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa</p>	 <p>VOCAL <b>Dr. Alejandro Silva Palacios</b> Investigador en Ciencias Médicas Departamento de Biomedicina Cardiovascular Instituto Nacional de Cardiología. “Ignacio Chávez”</p>

## **COMITÉ TUTORAL:**

### **CO-DIRECTOR:**

**Dr. Armando Luna López**

Investigador en Ciencias Médicas "D"  
Laboratorio de Biología del Envejecimiento  
Instituto Nacional de Geriátria

### **CO- DIRECTORA:**

**Dra. Norma Edith López DiazGuerrero**

Profesor Titular C  
Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

### **ASESORA:**

**Dra. Mina Königsberg Fainstein**

Profesor Titular C  
Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

# **Agradecimientos**

**INSTITUTO  
NACIONAL DE  
GERIATRÍA**



**INGER**

Dedicada a quien me da fuerzas y son mi felicidad día a día:

# *Mi familia*

En especial a mi hijo

*Antonio Noyolotzin Villanueva Mena*

A mi madre hermosa Beatriz Montes Cárdenas y a mi hermano Marcelo Mena Montes, gracias por su apoyo, consejos y paciencia en esta etapa de mi vida.

A mi Tony por su paciencia y perseverancia.

*“No te ahogaras por caerte al mar, si no por no salir de él”. Paulo Coelho*

“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas” “Marie Curie”

Gracias por todo su apoyo durante mi formación científica:

Dr. Armando Luna López

Dra. Norma Edith López  
DíazGuerrero

Dra. Mina Königsberg Fainstein

Gracias al **Dr Armando Luna López** por brindarme la confianza y por permitirme participar en este maravilloso proyecto, estuve presente desde la concepción de la idea, la escritura, 1a obtención del financiamiento y visualice la llegada de cada uno de los equipos, reactivos y materiales, particularmente recordare con cariño la llegada y puesta en marcha de la caminadora de entrenamiento de las ratas. He presenciado los frutos de este proyecto convertidos en artículos científicos y en esta muy apreciada tesis. Su confianza, sus consejos y su dirección durante estos 4 años de doctorado han sido la base para la realización de este proyecto y pero sobre todo la de mi formación en el camino de la ciencia. Gracias por haberme sostenido en mis errores y equivocaciones y por enseñarme que la vida sigue y el proyecto sigue hasta donde queramos llegar.

Gracias a la **Dra. Norma Edith López DiazGuerrero** por su apoyo y dirección como mi tutora, aprendí mucho con sus consejos, paciencia y enseñanzas. Todo el tiempo demostró interés en mi formación profesional y también en la parte personal. Gracias por dirigirme en los pequeños detalles que para mi fueron muy significativos.

Gracias a la **Dra. Mina Königsberg Fainstein** por compartir su experiencia en mi formación como científica de ella aprendí liderazgo, motivación y superación ante cualquier adversidad.

Gracias al Dr. Oscar Rosas Carrasco por la confianza y por las enseñanzas sobre el tema de la obesidad osteo-sarcopenica. Gracias por el apoyo a este proyecto.

Gracias a todos mis compañeros y amigos del Instituto Nacional de Geriatria, por brindarme la oportunidad de estudiar el doctorado y continuar en el camino de la ciencia en envejecimiento, en especial Dr. Luis Miguel Gutiérrez Robledo, Dra. Carmen García Peña, Mtra. María de Lourdes Ávila Alva. Y también gracias por su acompañamiento y amistad a Mtra. Sara Torres Castro y Dra Isabel Arrieta Cruz. Gracias por compartir el día a día en el Laboratorio de Biología del envejecimiento a Raul Librado Osorio y Luis A. Erosa de Haro.

Gracias a la hermosa familia del laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular de la UAMI, la manera de coordinar y dirigir a los estudiantes es fantástica, aprendí mucho acerca de la logística y conducción de los estudiantes. Además a todos los compañeros siempre estuvieron dispuestos a ayudar y enseñar a los que menos saben gracias a Gibrán, David, Alfredo, Silvia, Royer, Pedro, Rafael, Luis, Sandra, Elisa, Edith y Ulalume.

## ÍNDICE GENERAL

i.	Resumen	17
ii.	Abstrac	18
iii.	Lista de abreviaturas	19
1.	INTRODUCCIÓN	21
1.1	Envejecimiento	21
1.2	Estrés oxidante y sistema antioxidante	22
1.3	Glutación	24
1.4	Nrf2 y su respuesta al estrés oxidante	25
1.5	Hormésis como respuesta adaptativa	26
1.6	Sarcopenia	29
1.6.1	Definición de la sarcopenia	29
1.6.2	Fisiopatología de la sarcopenia	31
1.7	Obesidad	33
1.7.1	Cambios moleculares durante la obesidad	34
1.8	Osteoporosis	36
1.8.1	Cambios moleculares en la osteoporosis	36
1.9	Obesidad sarcopénica (OS)	37
1.9.1	Fisiopatología de OS	38
1.10	Obesidad Osteo-sarcopénica (OSO)	39
1.10.1	Fisiopatología de la OSO	40
1.10.1.1	Estrógenos	40
1.10.1.2	Adipocinas	41
1.10.1.3	Interleucina 6 (IL-6)	44
1.10.1.4	Factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ )	45
1.10.1.5	Interleucina 10 (IL-10)	45
1.10.1.6	Células troncales mesenquimales (MSC)	46
1.11	Ejercicio y envejecimiento	48
1.11.1	Tipo de ejercicio	49
1.11.2	Intensidad del ejercicio	50
1.11.3	Duración y frecuencia del ejercicio	50
1.12	Factor de crecimiento y diferenciación 11 (GDF11)	52
1.12.1	Historia del GDF11	52
1.12.2	Ratones deficientes de GDF11 y GDF8	53
1.12.3	Biología del GDF11	54
1.12.4	GDF11 y el metabolismo	56
1.12.5	GDF11 y ejercicio	57
2.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	58
3.	JUSTIFICACIÓN	59
4.	HIPÓTESIS	61
5.	OBJETIVOS	62

5.1 General	62
5.2 Particulares	62
6. METODOLOGÍA	63
6.1 Animales	63
6.2 Grupo sedentario (SED)	63
6.3 Rutina de ejercicio de baja intensidad por un periodo largo de tiempo (LIERLT)	64
6.4 Índice de masa corporal (IMC)	65
6.5 Absorciometría de energía dual de rayos x (DEXA)	65
6.6 Fuerza de agarre	66
6.7 Determinación de parámetros bioquímicos	66
6.8 Concentración de GDF11 en suero	67
6.9 Estado redox (coeficiente GSH/GSSG)	67
6.10 Daño oxidante a proteínas	68
6.11 Perfil de citocinas inflamatorias	68
6.12 Análisis estadístico	69
7. RESULTADOS	70
7.1 Análisis morfométrico	70
7.2 Composición corporal (DEXA o DXA)	71
7.3 Fuerza de agarre	74
7.4 Funcionalidad muscular	75
7.5 Parámetros bioquímicos	77
7.6 Perfil de citocinas	79
7.7 Concentración en suero de GDF-11	82
7.8 Análisis de poblaciones	83
7.9 Estado redox y daño oxidante de las proteínas	84
7.10 Curva de Kaplan-meier	85
8. DISCUSIÓN	87
9. CONCLUSIONES	93
10. PERSPECTIVAS	95
11. REFERENCIAS	96

## ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
Figura 1. Formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y enzimas antioxidantes.	23
Figura 2. Extensión de la curva hormética por la exposición a los niveles de ERO durante el ejercicio	28
Figura 3. Estadíos conceptuales de la sarcopenia debida al envejecimiento	29
Figura 4. Caso clínico obesidad sarcopénica	37
Figura 5. Fisiopatología de la OSO	47
Figura 6. Señalización de GDF11	56
Figura 7. Diseño experimental	64
Figura 8. Índice de masa corporal (IMC) en las diferentes etapas del desarrollo	70
Figura 9. Imágenes de la composición corporal	71
Figura 10. Porcentaje de grasa total	72
Figura 11. Densidad mineral ósea (BMD)	73
Figura 12. Porcentaje de masa magra libre de hueso (LMWB)	74
Figura 13. Fuerza de agarre	75
Figura 14. Índice muscular esquelético (SMI)	76
Figura 15. Funcionalidad muscular	77
Figura 16. Mapa de calor de 23 citocinas	79
Figura 17. Relación de las citocinas TNF $\alpha$ /IL-10	81
Figura 18. Relación de las citocinas IL-6/IL-10	81
Figura 19. Niveles en suero de GDF11	82
Figura 20. Niveles de GSH/GSSG	84
Figura 21. Niveles de carbonilación de proteínas	85
Figura 22. Supervivencia	86

## ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Página
Tabla 1. Comparación de los fenotipos de los ratones deficientes de GDF11 y Miostatina	54
Tabla 2. Parámetros Bioquímicos	78
Tabla 3. Comparación entre poblaciones	83
Tabla 4. Resumen de los resultados del proyecto	94

## **i. RESUMEN**

En el envejecimiento ocurren cambios en la composición corporal incluyendo los de menor grado como el índice de masa corporal (IMC), los que generan en el adulto mayor una disminución de la fuerza y de la movilidad, condicionándolo al sedentarismo. El aumento en la grasa corporal, la disminución de la masa muscular y la densidad mineral ósea conducen al establecimiento de la obesidad sarcopénica (OS) y a la obesidad osteo-sarcopénica (OSO), los cuales son síndromes descritos en el adulto mayor, con mayor incidencia en las mujeres. Por otro lado, el ejercicio es considerado un factor anti-envejecimiento ya que tiene la capacidad de atenuar la pérdida de la masa muscular y de la densidad mineral ósea, lo que a su vez favorece el incremento de la sobrevivencia. Particularmente, el factor de crecimiento y diferenciación 11 (GDF11) ha sido descrita, en un modelo de parabiosis heterocrónica, como el principal componente anti-envejecimiento del suero de organismos jóvenes.

Por lo tanto, el objetivo de esta tesis se centró en el establecimiento de un modelo de obesidad sarcopénica en ratas Wistar hembras bajo un régimen de ejercicio, en el cual estudiamos la participación de GDF11. Para ello, evaluamos la composición corporal y los niveles séricos de GDF11 a los 4, 8, 12, 18, 22 y 24 meses de edad de las ratas. El entrenamiento de ejercicio empleado fue de baja intensidad (similar a una caminata leve) a lo largo de toda la vida (largo plazo) de las ratas y, posteriormente, comparamos los grupos experimentales: ratas sedentarias *versus* ratas con ejercicio. Nuestros resultados indican que el ejercicio leve previene la OS y la OSO mediante el mantenimiento de los niveles de GDF11 por un mayor periodo de tiempo (4 meses más) en comparación al grupo de ratas sedentarias. Además, estos hallazgos se relacionan con una disminución del estrés oxidante y de la inflamación.

## ii. ABSTRACT

In aging, changes in body composition occur even without significant changes in the body mass index (BMI), which generate a decrease in strength and mobility in the elderly, conditioning them to sedentary lifestyle.

The increase in body fat, the decrease in muscle mass and bone mineral density lead to the establishment of sarcopenic obesity (OS) and osteo-sarcopenic obesity (OSO), which are syndromes described in the elderly and, particularly, in women.

Exercise is considered an anti-aging factor since it attenuates the loss of muscle mass and the loss of bone mineral density, which in turn favors increased survival. On the other hand, the growth and differentiation factor 11 (GDF11) has been described, in a heterochronic parabiosis model, as the main anti-aging component of the serum of young organisms.

Therefore, the objective of this thesis focused on the establishment of a sarcopenic obesity model in female Wistar rats under an exercise regimen in which we studied the participation of GDF11. To do this, we evaluated the body composition and serum levels of GDF11 at 4, 8, 12, 18, 22 and 24 months of age of the rats. The exercise training used was of low intensity (similar to a light walk) throughout the life (long term) of the rats and, subsequently, we compared the experimental groups: sedentary rats versus rats with exercise. Our results indicate that mild exercise prevents OS and in our model OSO by maintaining GDF11 levels for a longer period of time (4 months) compared to the group of sedentary rats. In addition, these findings are related to a decrease in oxidative stress and inflammation.

### iii . ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
IMC	Índice de masa corporal
OS	Obesidad Sarcopénica
OSO	Obesidad Osteo-sarcopénica
GDF11	Factor de Crecimiento y Diferenciación número once
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogeno
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
SOD	Superóxido Dismutasa
CAT	Catalasa
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
SPPB	Batería corta del rendimiento físico
EWGSOP	Grupo Europeo de Trabajo sobre la Sarcopenia en Personas de Edad Avanzada
MyoD	proteína 1 de diferenciación miogénica
GH	Hormona del crecimiento
IGF-1	Factor de crecimiento semejante a la insulina 1
myf5	Factor miogénico 5
AT	Tejido adiposo
PCR	Proteína C reactiva
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10

TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
HDF	Dieta Alta en Grasa
MSC	Células Madre Mesenquimales ( <i>mesenchymal stem cells</i> )
AGE	productos finales de glicación ( <i>advanced glycation end products</i> )
DEXA (DXA)	Absorciometría de rayos X de energía dual
SED	Grupo sedentario
LIERLT	Rutina de ejercicio de baja intensidad por un periodo largo de tiempo ( <i>low-intensity exercise routine for a long period of time</i> )
BMD	Densidad mineral ósea
SMI	Índice muscular esquelético
LMWB	Masa magra sin hueso ( <i>Lean Mass without bone</i> )
TGO	transaminasa oxalacética
AST	aspartato aminotransferasa
TGP	Transaminasa glutámico-pirúvica
GGT	gamma glutamil transpeptidasa
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
Cre	Creatinina
TG	Triglicéridos
T-chol	Colesterol total
ELISA	acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Envejecimiento

En algunas tribus antiguas, el envejecimiento era considerado un privilegio de los dioses pues la vejez representaba sabiduría. De hecho, se tienen indicios de la primera descripción de la vejez realizada por el escriba egipcio Ptah-Hotep, visir del faraón Tzezi de la dinastía V del año 2450 A.C, que enuncia: "*¡Qué penoso es el fin de un viejo! Se va debilitando cada día; su vista disminuye, sus oídos se vuelven sordos; su fuerza declina, su corazón ya no descansa; su boca se vuelve silenciosa y no habla. La vejez es la peor de las desgracias que puede afligir a un hombre*" (Trejo, 2001). Esta descripción nos habla de las observaciones que hasta hoy perduran sobre el declive de la fisiología de los individuos a lo largo de la vida hasta llegar a la vejez.

Desde el punto de vista biológico, el envejecimiento es un fenómeno multifactorial y multisistémico que se caracteriza por la pérdida progresiva de la capacidad del organismo para resistir perturbaciones homeostáticas, debido a la reducción en su capacidad adaptativa ante diversos estímulos intrínsecos y extrínsecos (Flatt, 2012). También se caracteriza por la pérdida progresiva de las funciones fisiológicas, celulares y bioquímicas de los individuos, conduciendo a una mayor susceptibilidad a padecer enfermedades crónicas degenerativas como la fragilidad, diabetes, obesidad, osteoporosis, demencia, cáncer, sarcopenia, entre otras (Johnson et al., 1999). A este panel se suman las nueve características biológicas del envejecimiento, recientemente descritas por López Otín y colegas, que incluyen la inestabilidad genómica, el acortamiento de los telómeros, las alteraciones epigenéticas, la pérdida de la proteostasis, la desregulación en la detección de nutrientes, la disfunción mitocondrial, la senescencia celular, el agotamiento de las células madre y la comunicación intercelular alterada (López et al., 2013).

Además, se han postulado diversas teorías para explicar el envejecimiento; entre ellas, destaca la introducida por Harman en 1956 denominada *la Teoría de los*

*Radicales Libres*, en donde se postula que el envejecimiento resulta de los efectos perjudiciales por acción de los radicales libres a los tejidos a lo largo de la vida de un organismo. Sin embargo, esta teoría resulta controversial y ha sido rebatida a partir de estudios con modelos de animales transgénicos y cuyos resultados no presentan una asociación directa entre la acumulación del daño oxidante con la longevidad (Pérez y Sierra, 2009; Pérez et al., 2009). A pesar de sus controversias, el daño oxidante está estrechamente relacionado con ciertas patologías como la sarcopenia y la osteoporosis (Can et al., 2017; Zhou et al., 2016).

## **1.2 Estrés oxidante y sistema antioxidante**

El estrés oxidante es el desbalance entre la producción y eliminación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) producidas por las células. Estas especies incluyen una variedad de moléculas y radicales derivadas del oxígeno molecular ( $O_2$ ), los cuales son considerados productos finales fisiológicos del metabolismo oxidativo. El  $O_2$  puede ser reducido por un electrón a la vez, produciendo intermediarios relativamente estables, tal como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) que puede, espontáneamente o enzimáticamente, ser dismutado a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). A su vez, el  $H_2O_2$  puede ser totalmente reducido a agua o parcialmente reducido a radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), en una reacción catalizada por metales de transición (Buelna-Chontal et al., 2021).

En la teoría del Envejecimiento, se enuncia a la mitocondria como el principal agente causal de este fenómeno, ya que la producción descontrolada de ERO inducen cambios negativos a diferentes biomoléculas del organismo. Entre las principales fuentes endógenas de ERO encontramos a la xantina oxidoreductasa, la NADPH (nicotinamida adenín dinucleótido fosfato) oxidoreductasa, la cadena de transporte de electrones mitocondrial, la mieloperoxidasa (MPO), la lipoxigenasa y la ciclooxigenasa. Pero como todo balance, los organismos cuentan con un *sistema de defensa antioxidante* que tiene como propósito evitar el exceso de oxidación a nivel celular.

El sistema antioxidante involucra tanto agentes antioxidantes exógenos como la vitamina C y vitamina E, así como los endógenos como el glutatión (GSH), sin olvidar a las enzimas tal como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa y la catalasa (CAT) (Figura 1) (San y Martin, 2009). En breve, el  $O_2^{\cdot-}$  es, espontáneamente o enzimáticamente, dismutado a  $H_2O_2$  a través de la enzima SOD la cual existen en tres isoformas: SOD1 que se localiza en el citoplasma, la SOD2 en las mitocondrias y la SOD3 en el líquido extracelular. Las SOD1 y SOD3 emplean al cobre y zinc como cofactores, mientras que SOD2 utiliza manganeso (Dosunmu et al., 2019). La CAT se encuentra en los peroxisomas y degrada el  $H_2O_2$  en agua y oxígeno, evitando la producción del radical hidroxilo. Además, la GPx convierte el peróxido en formas no tóxicas mediante la oxidación del glutatión reducido (GSH) en disulfuro de glutatión (GSSG), que después se reduce a GSH por la enzima glutatión reductasa quien emplea NADPH. La GPx se distribuye en el citosol y en las mitocondrias, cuya actividad esta modulada principalmente por la relación GSH /GSSG que responde al estado *redox* celular (Figura 1) (Aoyama y Nakaki, 2015).

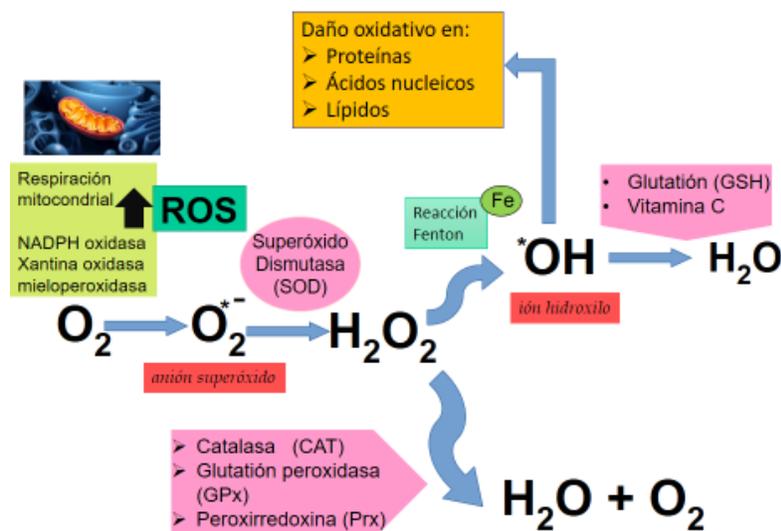


Figura 1. Formación de especies reactivas de oxígeno y enzimas antioxidantes (Merksamer et al., 2013).

### 1.3 Glutación

El tripéptido  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cisteína-glicina, conocido como GSH, es el antioxidante de bajo peso molecular (307.32 g/mol) más importante en las células. Se sintetiza por la adición secuencial de cisteína a glutamato seguido de la adición de glicina. El grupo sulfhidrilo (SH) de la cisteína participa en reacciones de reducción y conjugación que generalmente se consideran como las funciones más importantes del GSH (Forman et al., 2009). El GSH es considerado el tiol de mayor abundancia en las células de los mamíferos (1–10 mM concentración citosólica). Pero, además del citosol (80-85%) también se concentra en las mitocondrias (10 a 15%) y en un pequeño porcentaje (<0,1%) en estado estacionario en forma de proteínas glutationiladas (PSSG) en el retículo endoplásmico (Appenzeller, 2011; Hansen et al. 2009)). La estructura del GSH es única porque el enlace peptídico que une al glutamato y a la cisteína, es a través del grupo  $\gamma$ -carboxilo del glutamato en lugar del grupo  $\alpha$ -carboxilo convencional. La única enzima que puede hidrolizar este enlace inusual es la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa (GGT) y, consecuentemente, el GSH es resistente a la degradación intracelular y solo es metabolizado extracelularmente por células, como las hepáticas, que expresan GGT. Esto permite que el GSH liberado sea degradado y sus aminoácidos constituyentes sean absorbidos por las células y reincorporados al GSH (el llamado ciclo  $\gamma$ -glutamilo) (Lu, 2013). El GSH participa en funciones vitales que incluyen defensa antioxidante, desintoxicación de xenobióticos y/o sus metabolitos, regulación de la progresión del ciclo celular y apoptosis, almacenamiento de cisteína, mantenimiento del potencial redox, modulación de la función inmunológica y fibrogénesis (Lu, 2009).

El glutación mantiene el potencial de óxido-reducción de la célula, pues preserva en estado reducido a los grupos tiol de las proteínas, permitiendo la inducción de diversas cascadas de señalización intracelular (Gaucher et al., 2018). La síntesis del GSH se produce por la acción consecutiva de dos enzimas: la glutamato cisteína ligasa (GCL, EC 6.3.2.2) y glutación sintetasa (GS, EC 6.3.2.3). En una primera reacción (I), la enzima GCL usa como sustratos a los aminoácidos glutamato y

cisteína, formando el dipéptido  $\gamma$ -L-glutamilcisteína que se combina con glicina y forma GSH, en una segunda reacción (II) que es dependiente de la enzima glutatión sintetasa. La GCL es considerada la enzima limitante de la velocidad de síntesis ya que la sobreexpresión de GCL incrementa la síntesis de GSH (Denzoin et al., 2013). Agentes oxidantes y electrófilos pueden aumentar la transcripción de las subunidades de la GCL, tanto moduladoras (M) como catalíticas (C), que ocurren por la activación de las vías de transducción de señales implicadas en el control transcripcional de los genes *GCLC* y *GCLM*, en cuyas regiones promotoras contienen elementos de respuesta en *cis* que responden a agentes oxidantes y electrófilos. Particularmente, el elemento de respuesta a electrófilos o EpRE (*Electrophiles Response Element*, por sus siglas en inglés), se unen a proteínas de los miembros de la familia Nrf, la familia Jun y la pequeña familia Maf. Uno de los factores de transcripción con capacidad de unirse a EpRE es el Nrf2 (*Nuclear factor-erythroid 2-p45 derived factor 2*, por sus siglas en inglés) (Forman et al., 2009), quien además es un regulador positivo de la expresión de GGT (Zhang et al., 2006).

#### **1.4 Nrf2 y su respuesta al estrés oxidante**

El factor de transcripción Nrf2 pertenece a la familia de proteínas básicas con un característico “zipper” o cierre de leucinas (bZip) en la región C-terminal. La región básica corriente arriba de bZip es la responsable de la unión al ADN, mientras que la región ácida se requiere para su activación transcripcional. En ausencia de estrés, el Nrf2 queda secuestrado en el citosol por su represor Keap1 (*Kelch-like-ECH-associated protein 1*) a través de su unión a Cullin-3 (Cul3) y a *RING-box protein 1* (Rbx1) para formar un complejo Keap1-Cul3-Rbx1 E3 ligasa de ubiquitina dirigiendo al Nrf2 a su degradación proteosomal. La exposición a ERO o electrófilos conducen a la oxidación de residuos de cisteínas críticos en Keap1 (Cys<sup>23</sup>, Cys<sup>151</sup>, Cys<sup>273</sup> y Cys<sup>288</sup>) evitando, de esta manera, su ubiquitinación (Cuamani y García, 2016). Una vez que Nrf2 escapa de Keap1, se transloca al núcleo e interactúa con las

secuencias del elemento de respuesta antioxidante (ARE, *antioxidant response element*) para actuar como un activador transcripcional de genes como hemo-oxigenasa-1 (HO-1), glutatión-S-transferasa (GST), GPx, NADPH quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), SOD, CAT, glutatión reductasa (GR), entre otras (Galicia et al., 2020). Nrf2 es un factor de transcripción considerado como el regulador maestro de la homeostasis redox celular, sin embargo, en el envejecimiento su actividad se compromete (Silva-Palacios, et al. 2018) . En este sentido, el Nrf2 controla la síntesis de las subunidades de la glutamato-cisteína ligasa induciendo una disminución significativa de la reserva de glutatión (Schmidlin et al., 2019). En términos generales, el Nrf2 es considerado uno de los principales factores de transcripción que han contribuido a la evolución de los animales ante cambios ambientales. A nivel intracelular, señales como el estrés del retículo endoplásmico o una autofagia alterada, son respuestas capaces de activar al Nrf2 activando una defensa celular inicial (Bellezza et al., 2018).

### **1.5 Hormesis como respuesta adaptativa**

El sistema oxidante y antioxidante se mantienen en una fluctuación dinámica dada la constante exposición a las ERO generados por metabolismo celular endógeno, así como a la exposición de agentes ambientales que producen estrés (Zhang et al., 2015). En particular, el concepto de dosis-respuesta representa una integración biológica de cómo los sistemas vivos (en todos los niveles de organización) responden, se adaptan (o no) a agentes endógenos, procesos metabólicos y factores de estrés impuestos externamente (medio ambiente) (Calabrese, 2001).

En la actualidad, la exposición constante a las ERO ha despertado el interés de estudiar a la *hormesis*, que se define como el *proceso por el cual la exposición a una dosis baja de un agente químico o bien un factor ambiental, que es dañino a dosis altas, induce una respuesta adaptativa y/o un efecto benéfico en la célula o el organismo*. Hasta la fecha, los agentes horméticos más importantes son la radiación,

el calor, los metales pesados, los antibióticos, el etanol, los agentes pro-oxidantes, el ejercicio y la restricción alimentaria (López et al., 2013).

El ejercicio, por ejemplo, se ha asociado con un incremento en los marcadores de estrés oxidante, en tanto las ERO tienen una influencia bifásica en la producción de la fuerza del músculo esquelético (Reid, 2001). Actualmente, se tiene la interrogante de si el estrés oxidante producido por el ejercicio es una cuestión benéfica o dañina (Powers et al., 2020). Interesantemente, son cada vez más los estudios de los mecanismos benéficos del ejercicio en el músculo esquelético, incluso aquellos relacionados con el estrés oxidante y el envejecimiento (Le et al., 2017).

Es importante señalar que los efectos del ejercicio son sistémicos y complejos, por ejemplo, el ejercicio regular disminuye el riesgo de enfermedades relacionadas con la edad y aumenta significativamente la calidad de vida, especialmente en los ancianos. Además, tiene efectos positivos en la función cerebral (Ma et al., 2017) y previene varios tipos de cáncer como el de mama, colon, endometrio, riñón, vejiga, esófago y estómago (Patel et al., 2019; Hojman, 2017; Idorn y Hojman, 2016). Se han propuesto algunos mecanismos acerca de los beneficios del ejercicio en la prevención del cáncer, entre ellos la mejoría en la composición corporal, la disminución de la inflamación sistémica y el mantenimiento óptimo de las hormonas sexuales, entre otros (Idorn et al., 2017). En el músculo esquelético, mejora la sensibilidad a la insulina, aumenta la traslocación del transportador de glucosa GLUT4 al sarcolema y reduce el riesgo a síndrome metabólico (Flores et al., 2020). En tanto, el ejercicio aeróbico regular mantiene la función del riñón, el hígado, el cerebro y el corazón (Luan et al., 2019).

Se ha propuesto que los organismos se adaptan a la exposición de las ERO generadas en el ejercicio, lo que resulta benéfico en parte a la extensión de la cumbre de curvas de dosis-respuesta en forma de campana, lo que representa una mayor tolerancia a las ERO (Figura 2) sin llegar a la pérdida de la función, incluida la hipertrofia muscular y el cansancio extremo (Radak et al., 2013; Radak et al., 2017).

En otras palabras, los individuos no entrenados presentan una curva dosis-respuesta en forma de campana, la cual incrementa al someterse a niveles de ejercicio con intensidad y duración moderados, obteniendo una mejor respuesta fisiológica. Por el contrario, el ejercicio de alta intensidad por larga duración causa fatiga y disminución del rendimiento ocasionando pérdida de la función. En los individuos bien entrenados, debido a la respuesta adaptativa, soportan niveles más altos de ERO sin daño significativo en las macromoléculas, tolerando niveles superiores de daño oxidante y sin pérdida significativa de la función. Éste escenario representa el efecto del pre-acondicionamiento mediado por el ejercicio a través de las ERO y, a su vez, es el fenómeno de "dosis-respuesta" por el cual el ejercicio atenúa la incidencia de las enfermedades asociadas a las ERO (Radak et al., 2013; Radak et al., 2017) tal como la sarcopenia (Muller et al., 2007).

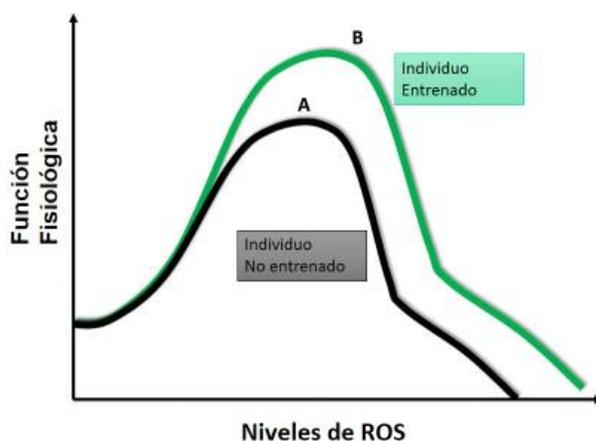


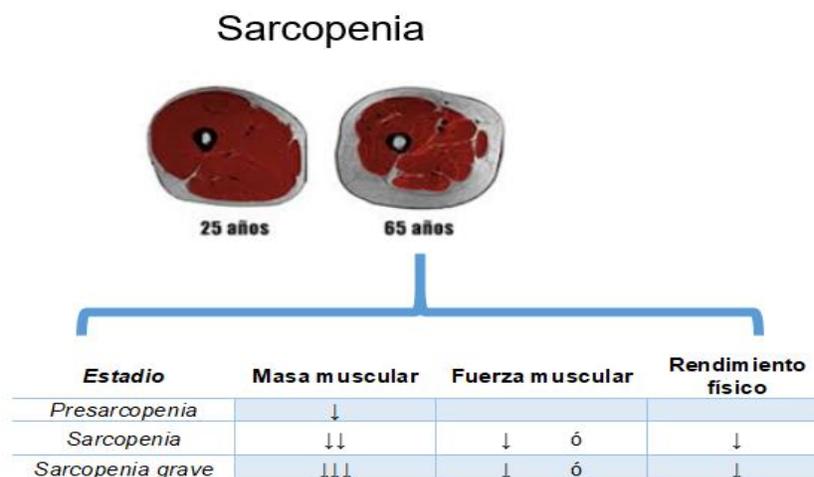
Figura 2. Extensión de la curva hormética por la exposición a los niveles de ERO durante el ejercicio (Radak et al., 2013).

## 1.6 Sarcopenia

El envejecimiento se caracteriza por la pérdida de las funciones que conllevan a un deterioro progresivo del individuo haciéndolo susceptible de presentar enfermedades degenerativas y discapacitantes tal como la sarcopenia, en cuya patología las ERO están implicadas (López et al., 2013). Se sabe que la generación de ERO es casi tres veces mayor en ratones viejos (28 a 32 meses) en comparación con ratones jóvenes (10 meses) y esto se ha asociado a una pérdida del 30% de la masa del músculo gastrocnemio (Muller et al., 2007).

### 1.6.1 Definición de la sarcopenia

En 2010, el grupo Europeo de Trabajo sobre la Sarcopenia en Personas de Edad Avanzada (EWGSOP, *European Working Group on Sarcopenia in Older People*) definió a la sarcopenia como la pérdida de la composición y función de la masa del músculo esquelético relacionada al envejecimiento (Figura 3), afectando la fuerza, la capacidad funcional y el rendimiento físico de los individuos (Cruz et al., 2010). En general, la sarcopenia presenta 3 estadios conceptuales: la pre-sarcopenia, la sarcopenia y la sarcopenia grave.



**Figura 3.** Estadios conceptuales de la sarcopenia según el EWGSOP (Cruz et al., 2010).

Para el 2019, la EWGSOP actualizó la definición de la sarcopenia como “*Un trastorno muscular esquelético progresivo y generalizado que se asocia con una mayor probabilidad de resultados adversos que incluyen caídas, fracturas, discapacidad física y mortalidad*”. En esta nueva definición, la fuerza muscular llega a la vanguardia, pues se reconoce que este parámetro es mejor que sólo la masa en la predicción de resultados adversos. Por ello, se utiliza la baja fuerza muscular como el parámetro principal para el diagnóstico de la sarcopenia (Cruz et al., 2019). Por su parte, la fuerza de agarre débil (medida por dinamometría) sirve como un indicador del estado muscular en adultos mayores (Bohannon y Magasi, 2015) y es un componente clave de la sarcopenia que se asocia con discapacidad y mortalidad (Dodds et al., 2016). El diagnóstico de la sarcopenia se realiza mediante (1) la medición de la fuerza de agarre que se realiza mediante un dinamómetro y se ha puntualizado como puntos de corte para la sarcopenia con un valor de <16kg en mujeres y <27kg en hombres. Posteriormente, (2) se mide la masa muscular mediante absorciometría de emisión dual de rayos X (DEXA, por sus siglas en inglés *Dual-energy X-ray absorptiometry*), la cual consiste en la emisión de dos diferentes energías ionizantes para visualizar las partes blandas del cuerpo y diferencia tres componentes: grasa, hueso y músculo. Se emplea el índice muscular esquelético el cual consiste en la sumatoria de la masa muscular de brazos y pierna (masa muscular apendicular esquelética) ajustada entre la altura al cuadrado del sujeto. Aquellos valores, inferiores a <7.26 kg/m<sup>2</sup> en hombres y <5.5 kg/m<sup>2</sup> en mujeres se considera como sarcopenia, estos valores se obtuvieron a partir de ajustarse a la población de estudio considerando dos desviaciones estándar (DE) por debajo de la media de los adultos jóvenes (cuyo valor en hombres es de 8.3 y en mujeres 7.3) (Baumgartner et al., 1998; Cruz et al., 2010).

Para la evaluación (3) del rendimiento físico en el adulto mayor, se emplea la medición de la velocidad de la marcha y la batería corta del rendimiento físico (SPPB, por sus siglas en inglés *Short Physical Performance Battery*). La prueba de velocidad de marcha habitual es la de 4 m, el indicador de sarcopenia grave es  $\leq 0,8$

m/s (Maggio et al., 2016). Las consecuencias físicas de la sarcopenia varían desde un incremento de caídas y fracturas, incapacidad para realizar actividades de la vida diaria hasta los altos costos de hospitalización. Sumado a lo anterior, se han propuesto ciertos factores de riesgo como:

- Estilo de vida (dieta y ejercicio).
- Desbalance de ciertas hormonas y citocinas.
- Disminución en la síntesis de proteínas y en la capacidad de regeneración.
- Remodelamiento en la unidad motora.
- Bases evolutivas.
- Influencias en el desarrollo temprano.

La sarcopenia temprana se caracteriza por una disminución en el tamaño del músculo y, eventualmente, una reducción en la calidad del mismo. El reemplazo de fibras musculares con grasa, el aumento de la fibrosis, los cambios en el metabolismo muscular, el estrés oxidante y la degeneración de la unión neuromuscular, son algunas de las características de la sarcopenia que, en última instancia, llevan a la pérdida progresiva de la función muscular y a la fragilidad (Dhillon y Hasni, 2017).

### **1.6.2 Fisiopatología de la sarcopenia**

En la sarcopenia, mediante análisis histológico, se ha observado que se afectan predominantemente las fibras musculares de tipo II (contracción rápida), cuyo tamaño se reduce hasta en un 50% (Nilwik et al., 2013). Además, la masa muscular disminuye con la edad y se atribuye a un menor tamaño de este tipo de fibras musculares. También, la sarcopenia ha sido explicada por una generación excesiva de ERO que hemos explicado previamente. La mitocondria es el centro del metabolismo aeróbico y, por consecuencia, el principal generador de ERO. El resultado final del estrés oxidante es un mayor daño y alteraciones funcionales. Por

ejemplo, en tejidos que tienen una alta tasa de fosforilación oxidativa como el músculo esquelético, la acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt) a lo largo de la vida generan más ERO, provocando la degradación del tejido, la atrofia del músculo esquelético, disminución de la función muscular y un aumento de la presencia de tejido fibrótico (Arthur y Cooley, 2012). Por su parte, la actividad antioxidante de la catalasa y la GST, por ejemplo, están reducidas en las células satélite provenientes de sujetos viejos comparado a los sujetos jóvenes (Fulle et al., 2005). Mientras tanto, la delección de la SOD genera un fenotipo acelerado de sarcopenia y niveles altos de daño oxidante así como la activación del sistema proteolítico (Ahn et al., 2019; Jang et al., 2020).

Durante el envejecimiento muscular, la expresión de factores miogénicos regulatorios como la proteína de diferenciación miogénica (MyoD) y miogenina disminuyen. También aumentan hasta dos veces la expresión de la miostatina en el músculo esquelético envejecido en relación con los sujetos jóvenes. Mecanicamente, la hormona del crecimiento (GH) y el factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF-1) tienen un efecto inhibitorio sobre la miostatina, por lo tanto, una causa potencial del aumento de la miostatina en el músculo esquelético envejecido es la disminución en la expresión de GH y IGF-1 (Lozier et al., 2018). Así mismo, se ha correlacionado el decremento en los niveles de hormonas sexuales como la testosterona (Marcell et al., 2001) y estrógenos (Tsai et al., 2007) con la disminución de GH y el IGF1 en la edad avanzada, lo cual podría contribuir con la sarcopenia. Se ha comprobado que IGF-1 disminuye en circulación y en el músculo de los ancianos en comparación con jóvenes (Arthur y Cooley, 2012). Además, los niveles de IGF-1 y de la proteína 3 de unión al factor de crecimiento semejante a la insulina (IGFBP3) declinan con la edad y su disminución correlacionan con la disminución de la fuerza del agarre en mujeres de adultas y ancianas pero no en hombres (Taekema et al., 2011). También se han asociado los niveles altos en circulación de moléculas inflamatorias como interleucina-6 (IL-6), la proteína C reactiva y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) con la sarcopenia (Bian et al., 2017; Bano et al., 2017).

En animales viejos se produce un retraso en la reparación de tejido muscular de hasta un 40% comparado con las ratas jóvenes, que se debe tanto a una desregulación (Marsh et al., 1997) como a un menor número de células satélite (Carlson et al., 2009), las cuales presentan una capacidad de proliferación disminuida (Shefer et al., 2006). La expresión alterada de factores regulatorios miogénicos (MRFs) y de miostatina juegan un papel en la inhibición de la proliferación y la diferenciación en la regeneración del músculo envejecido. Por ejemplo, la expresión de MyoD, el factor miogénico conocido como myf5, miogenina y la cadena pesada de miosina (MHC) disminuyen en el músculo envejecido, afectando el recambio de proteínas y el reemplazamiento de la miosina (Degens, 2007). Aunado a ello, la presencia de ERO hace a la molécula de miosina susceptible a la oxidación, debilitando la formación de los puentes cruzados que se unen a los filamentos de actina durante la contracción. Mediante la eliminación del receptor activado de proliferación de peroxisomas delta (PPAR $\delta$ ) en el músculo, se reportó un decremento del 40% en el número de células satélites que impactan en sus capacidades proliferativas y regenerativas después del daño (Angione et al., 2011). La actividad de PPAR $\beta$  y PPAR $\delta$  esta regulada por la molécula coactivadora PGC-1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha*) que es el regulador clave de la biogénesis mitocondrial. Además, su sobre-expresión protege de la sarcopenia y su incremento de peso esta asociado a la edad así como a la resistencia de la insulina durante el envejecimiento (Wenz et al., 2009).

### **1.7 Obesidad**

La obesidad se asocia con un estado funcional pobre, morbilidad y mortalidad en todas las edades, además esta catalogada como una enfermedad que impacta en el estado de salud y calidad de vida de los adultos mayores (Rosas et al., 2012). La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la obesidad cuando el índice de masa corporal (IMC) es igual o superior a 30 kg/m<sup>2</sup>. El IMC es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla, se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros (kg/m<sup>2</sup>) (OMS, 2021).

Generalmente, las mujeres tienen un porcentaje de grasa más alto que los hombres. Sin embargo, se sabe que la masa de grasa aumenta de 20% a 40% entre los 20 y 80 años en ambos sexos (Kyle et al., 2001) indicando que en el envejecimiento ocurren cambios en la composición corporal. El principal depósito de lípidos se ubica en la zona visceral induciendo un incremento de la infiltración de grasa al hígado y al músculo esquelético (Arroyo et al., 2007).

En la literatura, existen variaciones en los puntos de corte para clasificar el sobrepeso/obesidad mediante el empleo del porcentaje de grasa corporal total. La OMS considera que un 40% ya se considera obesidad mientras que otros autores recomiendan considerar el 33% (Liu et al., 2014) y, específicamente, en mujeres se recomienda el empleo del 32-35% (JafariNasabian et al., 2017) de grasa corporal. El criterio para el diagnóstico de obesidad recae en un porcentaje de masa grasa  $\geq 32\%$ , un estimado obtenido por DEXA, según las recomendaciones para mujeres de la Sociedad Americana de Médicos Bariátricos (ASBP, 2015; Illich et al., 2016).

### **1.7.1 Cambios moleculares en la obesidad**

El tejido adiposo (AT, *adipose tissue*) es un tejido endocrino y metabólicamente activo implicado en: I) el mantenimiento del balance energético, II) la termorregulación, III) el metabolismo de lípidos y glucosa, IV) la modulación de la función hormonal y reproductiva, V) la regulación de la presión arterial y VI) la coagulación sanguínea (Frigolet y Gutiérrez, 2020).

Cuando hay un balance positivo de energía, el excedente energético se acumula en el tejido adiposo subcutáneo el cual aumenta por *hiperplasia*, es decir, a partir de la proliferación y diferenciación de los pre-adipocitos. En contraste, cuando el tejido adiposo subcutáneo no se almacena apropiadamente, aumentan los depósitos de grasa visceral que, al tener menor capacidad adipogénica, crecen por *hipertrofia* y, por tanto, aumentan el tamaño de los adipocitos (Izaola et al., 2015).

En la obesidad, el exceso de adipocitos incrementa la distancia entre las células del AT y la vasculatura, favoreciendo una condición de hipoxia. La hipoxia, al igual que la insulina, activan la expresión del factor 1 inducible a la hipoxia (HIF-1) en los adipocitos contrarrestando las consecuencias negativas de la adiposidad. Sin embargo, la hipoxia crónica conduce a muerte celular, manteniendo y amplificando las señales inflamatorias que regulan concomitantemente la diferenciación de la población celular inmune como los macrófagos y monocitos. En este sentido, los macrófagos se infiltran para recoger adipocitos muertos y necróticos de los depósitos de grasa, posteriormente, amplifican una respuesta inflamatoria local a través de la producción de IL-6 y TNF $\alpha$  (Bastarrachea et al., 2007), sumado al establecimiento de la fibrosis (Liu y Nikolajczyk, 2019).

El fenómeno de “cambio fenotípico”, descrito en la obesidad, es una transformación en el estado de polarización de los macrófagos; es decir, la transformación de un estado anti-inflamatorio M2 (predominante durante el balance negativo de energía) a una forma más pro-inflamatoria M1. Una infiltración masiva de macrófagos M1 secundaria al incremento de la secreción de la proteína quimioatrayente de macrófagos (MCP-1) juega un papel crucial en el tejido adiposo en la obesidad, que se debe a la activación del factor nuclear kappa B (NF-kB), principal regulador de la transcripción de citocinas (Izaola et al., 2015; Mau y Yung, 2018).

Además de los macrófagos se han descrito otras células del sistema inmune residentes en el AT, por ejemplo, en biopsias de tejido adiposo visceral y subcutáneo perteneciente a personas con sobrepeso y obesidad; se encontró que la población de células T-cooperadoras 1 y 17 (Th1 y Th2) y las células T CD8 son más frecuentes en el tejido adiposo visceral en comparación con el subcutáneo, además las células Th1 viscerales correlacionan con niveles altos de la proteína C reactiva (PCR) en suero y las células Th2 subcutaneas correlacionan con los niveles de IL-6 en suero (McLaughlin, et al., 2014).

## **1.8 Osteoporosis**

La OMS define a la osteoporosis como una enfermedad esquelética sistémica progresiva caracterizada por una baja masa ósea y deterioro microarquitectural del tejido óseo, con un consiguiente aumento de la fragilidad ósea y la susceptibilidad a la fractura.-La técnica estándar para su diagnóstico es mediante DEXA, empleando puntuaciones estándar T de densidad mineral ósea (DMO), las cuales se establecieron utilizando puntuaciones de desviación estándar (DE) relacionadas con la masa ósea de personas jóvenes sanas. Así, un valor de T-score  $>-1$  DE indica un rango normal, un valor de T-score entre  $-1$  y  $-2.5$  DE indica osteopenia y un valor de T-score  $\leq -2.5$  DE indica osteoporosis (Siris, et al., 2014).

### **1.8.1 Cambios moleculares en la osteoporosis.**

El equilibrio entre la resorción (eliminación) y la formación ósea es fundamental para mantener la densidad ósea y la homeostasis mineral en condiciones saludables. La resorción ósea ocurre de forma continúa en el cuerpo humano manteniéndose en equilibrio con la formación de hueso nuevo. Con el envejecimiento y/o la menopausia, la tasa de resorción tiende a superar la tasa de formación, lo que conduce a la descalcificación, pérdida de la densidad y, por ende, a un hueso más frágil (Noh, et al., 2020). Los osteoclastos son los responsables de la resorción ósea, en contraparte el tejido óseo nuevo que se forma por los osteoblastos (Xiao et al., 2016).

Con la edad, la acumulación de citocinas como la IL-6, el TNF- $\alpha$  y la interleucina-1 (IL-1) hacen que la médula ósea adquiera un fenotipo proinflamatorio. Así, por ejemplo, se sabe que la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (además de promover la respuesta inflamatoria) es un paso clave requerido en la diferenciación de osteoclastos y puede inhibir potencialmente la formación ósea osteoblástica (Yu y Wang, 2016). En este sentido, estudios epidemiológicos en mujeres adultas mayores confirman un aumento en el riesgo de fractura de cadera osteoporótica con niveles incrementados de TNF- $\alpha$  e IL-6 como marcadores inflamatorios (Barbour et al., 2014). Así mismo, existe evidencia de que el estrés oxidante conduce a la activación

de NF-κB en varios tejidos envejecidos y, en el caso del hueso, el estrés oxidante se relaciona con la osteoporosis (Sheweita y Khoshhal, 2007).

### 1.9 Obesidad sarcopénica (OS)

La obesidad sarcopénica es la combinación del exceso de peso corporal (masa grasa) y la reducida masa y/o fuerza muscular (Figura 4). Evidencias indican que la obesidad sarcopénica conduce a un mayor deterioro funcional que sólo la sarcopenia o la obesidad (Rolland et al., 2009). En este sentido, se ha reportado que los hombres y mujeres mayores de 60 años con obesidad sarcopénica tienen mayor riesgo de tener tres o más discapacidades (Zamboni et al., 2008). En una población coreana, Kim y colaboradores (2014) durante un seguimiento de 27 meses, encontraron que la masa de tejido blando magro apendicular disminuye significativamente, mientras que la masa grasa total y del tronco aumenta tanto en hombres como en mujeres, pero sin cambios en el peso ni en el IMC (Kim et al., 2014).

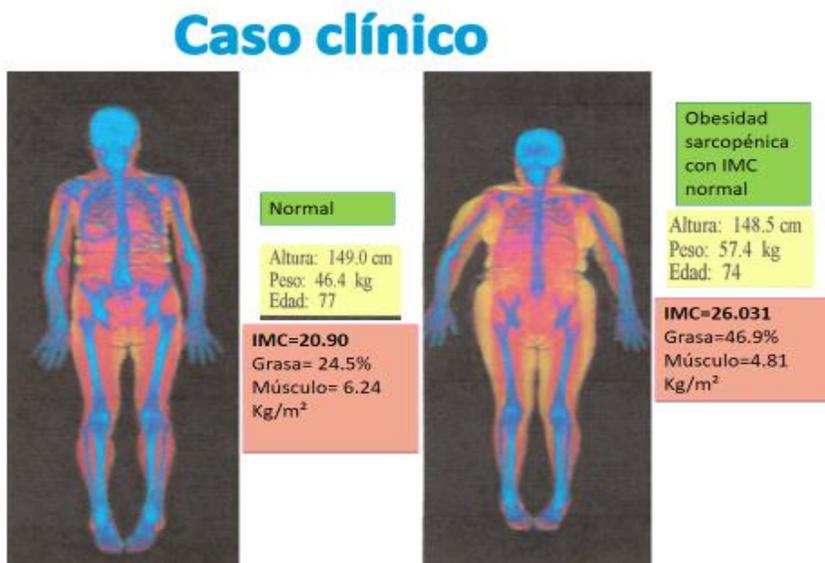


Figura 4.-Caso clínico obesidad sarcopénica. Este caso deriva de un estudio de investigación llamado FraDySMex en la Ciudad de México (Szlej et al.,2017). En la imagen podemos identificar en color amarillo la grasa corporal, en color rojo el músculo y en azul el hueso.

### 1.9.1 Fisiopatología de la OS

La resistencia a la insulina y los niveles altos de proteína C reactiva (PCR) están asociados con la OS en mujeres (Kim et al., 2013). Por su parte, Kob y colegas (2015) propusieron una serie de posibles mecanismos biológicos que explican la OS:

- Lipotoxicidad intracelular derivada de la obesidad (es decir, niveles elevados de lípidos intramusculares y sus derivados) que induce apoptosis a través de un elevado estrés oxidante.
- Mecanismos paracrinos y citocinas inflamatorias, tal como la PCR y la IL- que se suman al bajo grado de inflamación presente en la obesidad.
- Estado nutricional, es decir, los sujetos obesos se encuentran en un estado metabólico catabólico, con una mayor susceptibilidad al desgaste muscular bajo restricción energética.
- Resistencia a la insulina en el músculo esquelético inducida por la obesidad y la consecuente desregulación metabólica y de la señalización en las células musculares.
- La diferenciación de las células progenitoras del músculo hacia un fenotipo de adipocito, como resultado del microambiente producido por las adipocitocinas que conlleva a una reducida capacidad de renovación muscular.

Particularmente, la teoría de la lipotoxicidad postula una acumulación intracelular de grasa y/o sus derivados en la OS. En el corazón, el hígado y el páncreas se han descrito mecanismos de apoptosis debido al exceso intracelular de ácidos grasos (Yu et al., 2019)). En la obesidad, niveles altos de lípidos circulantes se acumulan en el músculo esquelético por ejemplo, el triacilglicerol y sus derivados tal como diacilglicerol (DAG), el acil-CoA de cadena larga y la ceramida los cuales alteran la morfología, el tamaño y la función del músculo. Además, fungen como un vínculo bioquímico entre el aumento en los lípidos intramiocelulares y la disminución de la sensibilidad a la insulina. Por otro lado, los niveles elevados de ácido palmítico correlacionan con la síntesis *de novo* de ceramidas y causan la activación de la

apoptosis en varios tipos celulares como las células  $\beta$ , disminuyendo así la secreción de la insulina (Van Herpen et al., 2008).

En este sentido, en modelos animales con OS, otros mecanismos se han descrito. Por ejemplo, PGC-1 $\alpha$  disminuye en ratas viejas (22 meses) con OS tras la ingesta alta en grasas. Además, proteínas relacionadas con la biosíntesis de proteínas musculares (mTOR, 4E-BP1 y S6K1) también disminuyen (Bollheimer et al., 2012). En otro modelo de OS en ratas viejas (25 meses) alimentadas con una dieta alta en grasas por 10 semanas, desarrollaron resistencia a la insulina en correlación con un fuerte incremento de ceramida y una disminución en la síntesis de proteínas musculares que fueron asociados con el aumento de la fosforilación del factor de inicio de la traducción eIF2 $\alpha$  (factor de iniciación eucariota 2) cuyos resultados se asociaron al envejecimiento y a la dieta., (Tardif et al., 2014). Recientemente, en un modelo en ratón de obesidad sarcopénica se describió que el músculo envejecido de ratones alimentados con dieta alta en grasa (HDF) se reduce en un 29% e, interesantemente, el factor miogénico MyoD fue más alto en los viejos en comparación con los jóvenes. (Brown et al., 2021).

### **1.10 Obesidad osteo-sarcopénica (OSO)**

En los adultos mayores, recientemente se ha descrito el síndrome de la obesidad osteosarcopénica (OSO) como una condición multifactorial que se debe a cambios en la composición corporal dependientes del envejecimiento (Ilich et al., 2016). Los criterios para su identificación y diagnóstico incluyen la combinación de sus componentes individuales: osteoporosis/osteopenia y/u obesidad osteopénica, sarcopenia y/u obesidad sarcopénica y aumento de la adiposidad (obesidad) (Ilich et al., 2016). En México, particularmente, la prevalencia de la OSO en mujeres mayores de 50 años es del 19% (Szlejf et al., 2017). En tanto, un estudio en Grecia reporta una prevalencia de OSO del 20% en mujeres y el 18% en hombres (Keramidaki et al., 2019).

El envejecimiento esta acompañado de una disminución progresiva y lenta de la masa muscular y ósea; pero también se asocia con un aumento de la masa grasa que resulta de una baja actividad física o sedentarismo. La distribución de la grasa cambia con la edad, es decir, no sólo aumenta la grasa visceral abdominal y disminuye la grasa abdominal subcutánea, también ocurre infiltración de grasa en el músculo esquelético, el hueso, el hígado, el corazón y el páncreas; cuyos cambios ocurren incluso sin cambios significativos en el IMC (Zamboni et al., 2019; Lee et al., 2020). Consecuentemente, este escenario se suma al perfil de factores de riesgo metabólico como la resistencia a la insulina y el riesgo cardiovascular, sin mencionar las consecuencias clínicas. La OSO esta asociado a un mayor riesgo de fracturas, caídas, estado funcional deteriorado (incluido la afectación de las actividades de la vida diaria), discapacidad física, mayor riesgo de infecciones, mayor duración de la estancia hospitalaria y menor supervivencia (Ormsbee et al., 2014). Indudablemente, los cambios en la composición corporal asociados al envejecimiento repercuten en la calidad de vida de los pacientes con OSO condicionándolos a una baja actividad física y generando un círculo vicioso (Kob et al., 2015). Por otro lado, el diagnostico clínico de la OSO consiste en la identificación de tres condiciones: obesidad, sarcopenia y osteoporosis y, metodológicamente, se determina a través del análisis DEXA) (Ilich et al., 2016).

### **1.10.1 Fisiopatología de la OSO**

Desde el punto de vista endocrino, el músculo, la grasa y el hueso están interrelacionados a nivel celular, ya que los tres órganos responden a estrógenos y sus células precursoras parten de un precursor común, las células madre mesenquimales (MSC, *mesenchymal stem cells*) (Figura 5) (Kirk et al., 2020).

#### **1.10.1.1 Estrógenos**

El tejido adiposo es la única fuente de estrógenos en las mujeres post-menopausicas y en los hombres adultos mayores, la disminución en sus niveles conducen a la pérdida de masa ósea y fuerza, lo que contribuye al desarrollo de la osteoporosis

(Almeida et al., 2017). Los efectos de los estrógenos y andrógenos sobre el hueso se ejercen sobre la unión con alta afinidad al receptor de estrógeno  $\alpha$  y  $\beta$  y al receptor de andrógenos (Imai et al., 2010). Asimismo, los estrógenos incrementan la apoptosis de los osteoclastos y la disminuyen en los osteoblastos (Bradford et al., 2010). Los estrógenos, además de ser considerados como anti-inflamatorios en el músculo, están relacionados con la regeneración y reparación del músculo. Por el contrario, su disminución, se asocia con merma de la fuerza debido a proteínas contráctiles como miosina y la troponina C. De igual manera, los estrógenos protegen contra la apoptosis del tejido muscular mediante miRNAs y proteínas de choque termico (Collins et al., 2019).

Los estrógenos no sólo regulan la cantidad de grasa corporal acumulada, sino también su distribución entre los diferentes depósitos. En general, los hombres tienen una menor cantidad de grasa corporal total que las mujeres (Blaak, 2001). Sin embargo, en el período pre-menopáusico, las mujeres poseen una mayor proporción de grasa corporal acumulada en la zona subcutánea que los hombres; por tanto, acumulan más grasa en el compartimiento visceral. Posterior a la menopausia, la grasa corporal se redistribuye y las mujeres tienden a adquirir un patrón de acumulación de grasa corporal similar al de los hombres, dicha redistribución puede estar relacionada con la disminución en los niveles de estrógeno con la edad. La determinación del tamaño de los adipocitos depende del equilibrio entre las vías lipogénica y lipolítica, pero también de la tasa de proliferación y diferenciación de adipocitos y, en todos estos procesos, la influencia de los estrógenos es relevante. Sumado a lo anterior, se sabe que los estrógenos reducen la acumulación del tejido graso mediante la disminución de la lipogénesis (Monteiro et al., 2014; Carson y Manolagas, 2015).

#### **1.10.1.2 Adipocinas**

Los osteoblastos y los miocitos expresan receptores para dos hormonas producidas en tejido adiposo que son la leptina y la adiponectina. A este respecto, en suero de

individuos obesos se han detectado niveles altos de leptina y niveles bajos de adiponectina (Katsiki et al., 2017). Además de sus funciones anti-inflamatoria y anti-aterogénicas, la adiponectina promueve la osteoblastogénesis y afecta la osteoclastogénesis de forma dual ya que los osteoblastos y los osteoclastos expresan receptores de adiponectina. La actuación dual de esta hormona se ha observado en médula ósea, en donde también promueve la migración de los osteoblastos y osteoclastos (Lewis et al., 2021). Adicionalmente, potencia la biosíntesis de ácidos grasos e inhibe la gluconeogénesis en el hígado, mejora la resistencia a la insulina reduciendo la cantidad de grasa intracelular tras el aumento de la oxidación de ácidos grasos vía la activación PPAR $\alpha$ , mejorando la señalización del sustrato del receptor de insulina (IRS) en el músculo esquelético y el hígado (Choi et al., 2020).

Ratones *knockout* (KO) de adiponectina presentan una reducción en la fuerza, en tanto los ratones KO del receptor de adiponectina 1 (AdipoR1) exhiben una pobre capacidad para realizar ejercicio y una disminución del porcentaje de fibra de tipo I o fibras de contracción lenta. Además, la adición de adiponectina a células C2C12 (miotubos diferenciados) aumento rápidamente el calcio intracelular, un efecto que se abate por la adición del siRNA de AdipoR1. La adiponectina se presenta en 8 isoformas distintas y en plasma es posible encontrarla en trimeros, hexámeros y multímeros; y mediante un corte proteolítico se forma la adiponectina globular. Específicamente, la adiponectina globular activa la motilidad y los rasgos regenerativos de las células satélite musculares, también induce la diferenciación y la fusión de las células del músculo esquelético (Krause et al., 2019).

En distintas enfermedades inflamatorias como la obesidad, aterosclerosis, diabetes y disfunción endotelial, la adiponectina tiene una actividad protectora. En estudios *in vitro*, esta hormona atenúa la inflamación del endotelio, del músculo, de células epiteliales y de macrófagos mediante la activación de AMPK (proteína quinasa activada por AMP) y AMP cíclico-Proteína cinasa A (cAMP-PKA). La adiponectina actúa directamente en células inflamatorias (macrófagos), suprimiendo las ERO y

estimulando la expresión de la citocina anti-inflamatoria interleucina-10 (IL-10) y la supresión de la señalización inflamatoria mediada por NF- $\kappa$ B (Nigro et al., 2014). En adipocitos 3T3L1, tratados con IL-6 y TNF- $\alpha$  exógenas, se disminuye la secreción de la adiponectina en los adipocitos, un evento que también ha sido observado en personas obesas (Choi et al., 2020).

En los macrófagos, la adiponectina promueve la diferenciación celular de monocitos a macrófagos M2 y suprime su diferenciación a los macrófagos M1, lo que muestra efectos pro- y anti-inflamatorios, respectivamente. El tejido adiposo libera varias adipocinas, siendo la adiponectina quien participa principalmente en el control del sistema endocrino del tejido adiposo. Incluso, reduce la expresión de genes de citocinas pro-inflamatorias (como IL-6, TNF- $\alpha$  y VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)) e inhibe la activación de la vía NF- $\kappa$ B. Por su parte, la leptina transmite información sobre las reservas de energía en el cuerpo al cerebro. En el sentido de la composición corporal, tiene efectos pro-inflamatorios ya que induce la secreción de IL-6 e IL-12 a la par de suprimir los niveles de interferón alfa (Kaser et al., 2002). En el contexto de la resistencia a la insulina y el alcohol, incrementan los niveles de leptina en sangre (Ju et al., 2011).

En el hueso, el receptor de leptina se encuentra en osteoblastos y condrocitos, sugiriendo un efecto de la leptina en el crecimiento y el metabolismo óseo (Coen, 2004). La leptina también regula a la osteocalcina, que a su vez regula no sólo el metabolismo óseo sino también la sensibilidad a la insulina y el gasto energético. La leptina tiene una función neuroendocrina, lo que hace difícil separar los efectos de la leptina *per se* frente a sus efectores hipotalámicos como el estrógeno, el cortisol, IGF-1 y la hormona paratiroidea en la masa ósea. Interesantemente, la terapia con leptina aumenta los niveles de todas estas hormonas que se refleja en una mejora de la masa ósea, por lo tanto, sería relevante discernir si los efectos sobre la masa ósea ocurren directa o indirectamente a través de otras hormonas (Upadhyay et al., 2015).

Los ratones ob/ob (deficientes de leptina) son roedores obesos, con una reducida masa ósea y masa muscular pero, que al suministrarles leptina, se induce un aumento del tamaño de sus fibras musculares lo que mejora la proliferación de las células musculares y reduce la degradación de las proteínas del músculo a la vez que disminuyen los marcadores de atrofia como miostatina y las ubiquitin ligasas E3 (MAFbx y MuRF1). También se demostró que la inyección intracerebroventricular de leptina en ratones ob/ob aumenta la formación del hueso, la densidad mineral ósea, la masa del músculo, los niveles de IGF-1 y la expresión de genes osteogénicos (Bartell et al., 2011). Sin embargo, en el músculo esquelético de ratas viejas, los niveles elevados de leptina inducen inflamación (Tazawa et al., 2019).

#### **1.10.1.3 Interleucina 6 (IL-6)**

La IL-6 es una citocina secretada por diversos tipos celulares como monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, fibroblastos, células endoteliales, células de la glía, adipocitos y osteoblastos. Actúa como una citocina pleiotrópica, es decir, que tiene efectos pro- y anti-inflamatorios pero, también, es una mioquina (citocinas secretadas por los miocitos). La familia de citocinas de la IL-6, se definen así por que utilizan a la glicoproteína de la subunidad receptora común 130 kDa (gp130) para señalizar (Rossi et al., 2015).

Después de un daño tisular o una infección, la respuesta inflamatoria de fase aguda esta gravemente comprometida en ratones KO de IL-6 e, incluso, se reducen las células Tfh (*T follicular helper (Tfh) cells*) y la IL-21 (Kang et al., 2019). Adicionalmente, estos ratones presentan osteopenia junto con un decremento en los osteoblastos y un aumento en número y actividad de osteoclastos, lo que conduce a una osificación defectuosa con graves alteraciones en la microarquitectura ósea cortical y trabecular (De Benedetti et al., 2006). En línea con ello, alteraciones en el metabolismo de glucosa y lípidos también han sido reportados en ratones deficientes de IL-6 con obesidad. En particular, la abundante expresión de IL-6 en el sistema nervioso central (CNS) correlaciona negativamente con la obesidad al reducir el

volumen de grasa corporal en ratas infundidas intracerebroventricularmente con IL-6 (Kang et al., 2019). Por el contrario, el aumento en los niveles de IL-6 plasmáticos lleva a la lipólisis en el músculo y a la oxidación de ácidos grasos a nivel sistémico, en correlación con una disminución en la fuerza de agarre y la sarcopenia (Bian et al., 2017).

#### **1.10.1.4 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ )**

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) es una citocina inflamatoria secretada por macrófagos/monocitos durante la inflamación aguda y es responsable de una amplia gama de eventos de señalización que conducen a muerte celular (Idriss y Naismith, 2000). TNF- $\alpha$  participa en diversas funciones como citotoxicidad y muerte celular, en la producción de IL-10 monocitaria, en la proliferación de células B, en la inhibición de la diferenciación de adipocitos y en la resistencia a la insulina (Horiuchi et al., 2010).

El TNF- $\alpha$  se expresa y secreta en el tejido adiposo e, importantemente, sus niveles correlacionan con el grado de adiposidad. La exposición con TNF $\alpha$  en roedores provoca resistencia a la insulina a través de la inhibición del sustrato al receptor de la insulina (IRS)-1 y al aumento de ácidos grasos libres en plasma mediante la estimulación de la lipólisis en el tejido adiposo (Bruce et al., 2004). En la obesidad, se ha sugerido que los macrófagos de tejido adiposo son los responsables de la producción elevada de TNF- $\alpha$  (Cawthorn y Sethi, 2007).

La administración subcutánea de Etanercept (un bloqueador de TNF- $\alpha$ ) previene de la atrofia y la pérdida de fibras musculares rápidas o fibras tipo II mejorando la función muscular, asociado a la prevención de la sarcopenia y una mejor sobrevivencia (Sciorati et al., 2020). En línea con ello, altos niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 correlacionan positivamente con la sarcopenia en el adulto mayor (Bian et al., 2017). Cabe mencionar que el TNF- $\alpha$  es un inhibidor de la diferenciación osteoblástica y un activador de la osteoclastogénesis y, se ha sugerido, que esta citocina induce

apoptosis en los osteoblastos a través de la inhibición de la autofagia (Zheng et al., 2017).

#### **1.10.1.5 Interleucina 10 (IL-10)**

La IL-10, también conocida como factor de inhibición de la síntesis de citocinas (CSIF, *cytokine synthesis inhibition factor*), posee propiedades anti-inflamatorias ya que es capaz de inhibir la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-3, IL-6, TNF- $\alpha$  y CSF-1 por los linfocitos T y los macrófagos, además suprime la capacidad de presentación de antígenos de los monocitos (Saraiva et al., 2020).

La IL-10 regula al tejido adiposo; por ejemplo, estudios epidemiológicos vinculan los niveles bajos de IL-10 con el síndrome metabólico y la DM2 (Silawal et al., 2019). Se ha propuesto que esta interleucina, promueve la actividad de los macrófagos M2 en el tejido adiposo, inclusive actúa directamente sobre los adipocitos para disminuir su respuesta inflamatoria. Además, se ha demostrado que la señalización directa de IL-10 derivada de médula ósea impacta en los adipocitos, limitando la termogénesis y el gasto energético a través de la remodelación de la cromatina del adipocito (Rajbhandari et al., 2018; Saraiva et al., 2020). Trabajos recientes demuestran un papel pro-osteogénico de la IL-10 (Mahon et al., 2020) que se ha asociado a polimorfismos en el gen *IL-10* con la osteoporosis en mujeres (Kotrych et al., 2016). Asimismo, la relación IL-6/IL-10 es más alto en sujetos con sarcopenia (Rong et al., 2018).

#### **1.10.1.6 Células troncales mesenquimales (MSC)**

Las MSC son células multipotenciales que tienen una alta capacidad proliferativa y pueden diferenciarse a diversos linajes celulares como miocitos, adipocitos, osteoblastos, condrocitos, entre otros, aunque esto depende de los factores de crecimiento y de las condiciones microambientales (Ding et al., 2011). Respecto a los factores que dirigen la diferenciación de las MSC hacia osteoblasto se han descrito a Cbfa-1 (core-binding factor alpha-1) y RUNX2 (runt-related transcription factor 2).

Mientras tanto, el factor que dirige la diferenciación de MSC hacia adipocito es PPAR $\gamma$  y, en cambio, MyoD y miogenina son moléculas clave para la diferenciación en miocitos (Illich et al., 2014). A pesar de que aquellos factores de crecimiento que inducen la diferenciación desde MSC hacia adipocitos inhiben (a la vez) la osteogénesis e, inversamente, aquellos factores de crecimiento que inducen la diferenciación desde MSC hacia osteoblastos, obstaculizan la adipogénesis. Una variedad de señales externas también contribuyen al delicado equilibrio de la diferenciación adipo-osteogénica de las MSC pero, el envejecimiento, la obesidad y la osteoporosis son factores que inducen una desregulación en este equilibrio (Chen et al., 2016). En el músculo residen un tipo de MSC denominadas células satélite, las cuales proliferan y se diferencian para la regeneración y reparación muscular. Igualmente, se sugiere un rol adipogénico ya que tienen la capacidad de generar grasa ectópica que esta relacionada con la obesidad sarcopénica (Uezumi et al., 2010).

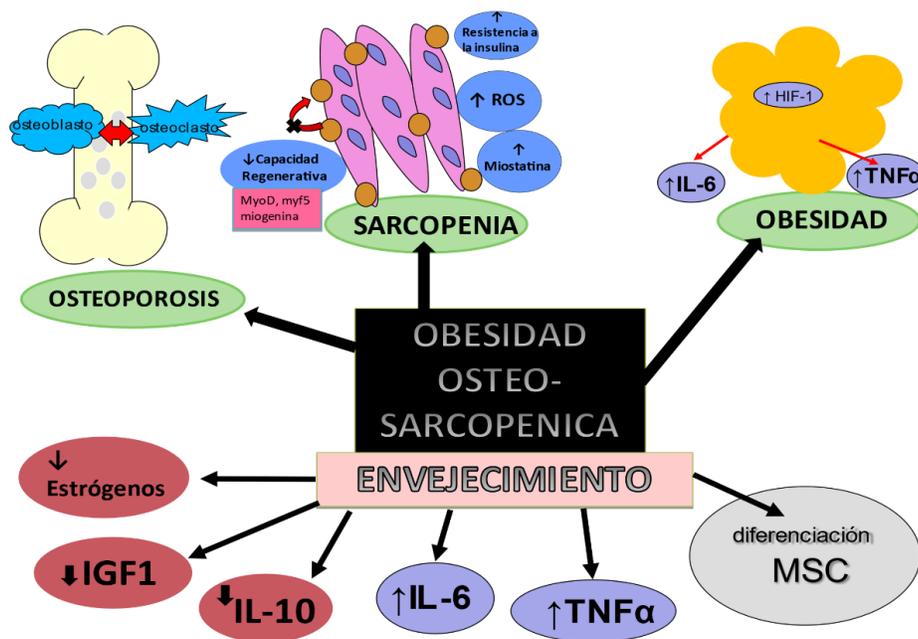


Figura 5. Fisiopatología de la OSO. La obesidad osteosarcopénica (OSO) es una alteración clínica en la composición corporal debida al envejecimiento. Es debida a la coexistencia de la obesidad, la sarcopenia y la osteoporosis, en cada condición ocurren alteraciones moleculares entre las que destacan el estrés oxidante, la inflamación, la disminución de estrógenos, la diferenciación de la células madre mesenquimales (MSC). HIF-1 (factor inductor de hipoxia 1), ROS (especies reactivas de oxígeno), Factores miogénicos (MyoD, myf5 y miogenina), IGF1 (Factor de crecimiento semejante a la insulina 1).

## 1.11 Ejercicio y envejecimiento

El ejercicio físico es considerado un factor anti-envejecimiento ya que ejerce su acción en ciertas características moleculares del envejecimiento e impacta en múltiples beneficios a nivel sistémico, como mejora del tono muscular, una mejor función cognitiva, activación del metabolismo y prevención de la pérdida de la masa muscular, entre otros (Garatachea et al., 2015; Rebelo et al., 2018). La OMS recomienda que el adulto mayor realice actividad física moderada aeróbica durante 150 min semanales. A este respecto, el Colegio Americano de Medicina del Deporte (*ACSM, The American College of Sports Medicine*) ha dado la iniciativa para que el ejercicio sea pre-escrito, ya que podría ser un “medicamento” para los pacientes, alentando a los adultos mayores a realizar 30 min por día o más de ejercicio aeróbico de intensidad moderada de 3 a 5 días por semana hasta un total de 150 min por semana, complementado con entrenamiento de resistencia, flexibilidad y equilibrio  $\geq 2$  días por semana (Zaleski et al., 2016).

Con el ejercicio físico habitual, el riesgo a desarrollar enfermedades asociadas a la edad tal como las cardiovasculares, la DM2, la osteoporosis, la fragilidad, la obesidad, y la sarcopenia disminuye (Gremeaux et al., 2012). Interesantemente, el ejercicio ofrece una respuesta diferencial entre jóvenes y ancianos. Por ejemplo, en el músculo de los jóvenes se presenta una disminución del daño oxidante a través del incremento en la degradación de proteínas, mientras que en el músculo de los viejos se activa la capacidad antioxidante en respuesta a las ERO generadas durante el ejercicio (Johnson et al., 2014). Hasta ahora, son pocos los estudios comparativos de los beneficios ofrecidos por el ejercicio en los adultos mayores pero sin evidencia directa de los efectos del ejercicio a largo plazo tanto en modelos animales como en humanos.

Aunque muchos adultos mayores son funcionalmente independientes y capaces de participar en la mayoría de los programas de ejercicio, otros pueden tener múltiples enfermedades crónicas y condiciones geriátricas, tal como deterioro cognitivo y

caídas recurrentes, limitando su capacidad para participar en ciertos tipos de ejercicio (Lee et al., 2017). Por ello, antes de que el adulto mayor realice actividad física o ejercicio debería acudir con un profesional de la salud con el fin de conocer su estado de salud actual y con ello ofrecerle el mejor programa de ejercicio a realizar dependiendo de las características individuales de cada paciente. En general, los beneficios del ejercicio en el adulto mayor dependen del tipo (aeróbico, de resistencia, de fuerza, de equilibrio, de flexibilidad y balance), la intensidad, la frecuencia y la duración (Galloza et al. 2017).

### **1.11.1 Tipo de ejercicio**

Dependiendo del tipo de ejercicio se obtienen ciertos resultados, por lo que se recomienda un programa de entrenamiento combinando varios tipos de ejercicios. Las categorías principales de actividades físicas son el ejercicio aeróbico/de resistencia, de resistencia/fuerza, de equilibrio y de flexibilidad. En las personas de edad avanzada, el ejercicio aeróbico posee beneficios cardiovasculares y músculoesqueléticos, en tanto, el ejercicio de resistencia es la única terapia que mejora la masa, la fuerza y la calidad muscular además de reducir el peso corporal y mejorar la densidad mineral ósea (Zaleski et al., 2016).

Una sesión de ejercicio aeróbico restaura la respuesta anabólica de proteínas del músculo a la insulina mejorando la función endotelial y la señalización Akt/mTOR en sujetos de edad avanzada (Fujita et al., 2007). Igualmente, tiene un potencial anti-inflamatorio mediante la reducción de citocinas asociadas a la obesidad en adultos mayores como la IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$  y PCR (Kohut et al., 2006). Por su parte, el ejercicio de resistencia atenúa los cambios en el número de células satélite y su capacidad miogénica en el envejecimiento (Shefer et al., 2010). También atenúa la pérdida de masa muscular en los adultos mayores frágiles obesos en el tratamiento para bajar de peso (Frimel et al., 2008). De igual manera, disminuye la progresión patológica en los ancianos obesos frágiles mediante la reducción de PCR pero no de IL-6 (Donges et al., 2010). En particular, en un modelo de obesidad sarcopénica, se

ha demostrado que el ejercicio de resistencia regula la producción de proteínas musculares a través de la disminución en la expresión de DEPTOR, una molécula inhibidora de la vía mTOR (Nilsson et al., 2013).

### **1.11.2 Intensidad del ejercicio**

Son pocos los estudios realizados en relación al ejercicio de intensidad baja, moderada o alta. Pero, curiosamente, estos estudios se pierden en ancianos debido a lo delicado de su estado de salud. Para el adulto mayor se recomienda una rutina de ejercicio de moderada intensidad; en tanto, para aquellas personas con movilidad reducida la actividad física ( $\geq 3$  días a la semana) será para mejorar su equilibrio e impedir las caídas. Finalmente, cuando los adultos mayores no puedan realizar la actividad física recomendada (dado su estado de salud), lo ideal es que se mantengan físicamente activos en la medida en que se lo permita su estado de salud (OMS, 2020).

### **1.11.3 Duración y frecuencia del ejercicio**

Los beneficios de realizar ejercicio a largo plazo son mejores, pues se considera como un seguro de vida para prevenir enfermedades crónicas relacionadas a la edad. En el adulto mayor, el ejercicio de largo plazo es una manera de mantener la movilidad y la independencia de los ancianos y, por tanto, experimentan una mejor condición de salud y viven más (Sansano et al., 2019).

En los adultos mayores, el termino “entrenamiento físico de largo plazo” se refiere a un periodo  $\geq 12$  meses. Pero, realizar el seguimiento de rutinas de ejercicio en el adulto mayor son difíciles y costosas. Por un lado, el entrenamiento de balance y fuerza de largo plazo previene la disminución de la movilidad y la disminución de la fuerza (Aartolahti et al., 2020). Y, por el otro, el entrenamiento con ejercicios a largo plazo reduce el número de caídas (y sus consecuentes lesiones), mejorando la función física y de cognición en el adulto mayor (García et al., 2020). En sujetos de 50 a 60 años que practicaron ejercicio de largo plazo, se observó una reducción del

daño oxidante en células sanguíneas (Hofer et al., 2008). También, incrementaron los niveles de las células T CD3+, CD4+ y CD8+ y de IL-10 a la par de la disminución de los niveles de IL-6, TNF- $\alpha$  y la relación CD4/CD8 (lo que sugeriría un sistema inmunitario deteriorado) (Abd El y Al, 2018).

En los modelos animales, el ejercicio a largo plazo sirve como una medida preventiva contra el aumento de peso relacionado con la edad y los cambios en la composición corporal (McMullan et al., 2016). Este tipo de ejercicio previene la pérdida mineral ósea en ratonas envejecidas (Silbermann et al., 1990); además mejora el estado redox, una mejor adaptación al estrés del retículo endoplásmico (RE) y atenúa la señalización de la apoptosis relacionada con este tipo de estrés. Estos datos, indican que el ejercicio de por vida puede proteger contra el estrés celular relacionado con la edad (Belaya et al., 2018). En ratones viejos, el ejercicio disminuye la expresión de p16 (marcador de senescencia) en el tejido adiposo blanco (WAT, *white adipose tissue*). Adicionalmente, indujo cambios en el perfil inmune en la fracción vascular estromal de WAT (Yoon et al., 2021) y atenúa la expresión de los receptores tipo Toll 4 (TLR4) y regula río abajo la señalización de p38 y PI3K/Akt (Chen et al., 2020).

Se ha demostrado que el ejercicio es una terapia anti-envejecimiento efectiva, sin embargo, no revierte el proceso de envejecimiento, ya que solo se disminuyen y retrasan los efectos deletereos, contribuyendo a la promoción de un envejecimiento saludable (Garatachea et al., 2017). El objetivo de la medicina anti-envejecimiento consiste en enlentecer, detener o (incluso) revertir los procesos biológicos relacionados con el envejecimiento y con ello aumentar la esperanza de vida. Algunos compuestos anti-envejecimiento que mimetizan la restricción calórica se encuentran la metformina, el pegvisomant, la rapamicina y el resveratrol (Son et al., 2019). Recientemente, se ha descrito al factor de crecimiento y diferenciación 11 (GDF11, *growth differentiation factor 11*) como un factor anti-envejecimiento, aunque dicha premisa aún es un tema de debate.

## 1.12 Factor de crecimiento y diferenciación 11 (GDF11)

### 1.12.1 Historia del GDF11

En un hecho sin precedentes, se descubrió el modelo de *parabiosis heterocrónica* que consistía en la unión sistémica de un organismo joven con uno viejo, este hallazgo demostró que la sangre proveniente del joven impacta significativamente en la restauración y mejora de la función de los tejidos envejecidos. Al respecto Conboy y colegas (2005) indicaron que tras la exposición a un ambiente sistémico joven, las células progenitoras envejecidas, como las células satélite del músculo y células progenitoras del hígado, rejuvenecen a través de la restauración de su capacidad proliferativa y regenerativa. Por el contrario, la exposición de un ratón joven a un entorno sistémico viejo, inhibe los procesos de miogénesis (Brack et al., 2007) y de neurogénesis (Villeda et al., 2011) en el ratón joven.

En 2013, se descubrió que el GDF11 es el factor circulante responsable del efecto rejuvenecedor en el modelo de parabiosis heterocrónica. Los autores, también, determinaron que la expresión de GDF11 disminuye en función de la edad y revierte la hipertrofia cardíaca *in vitro* (Loffredo et al., 2013). Más tarde, Sinha y colaboradores demostraron que el GDF11 rejuvenece a las células satélites del músculo envejecido, a través de la restauración de la integridad del ADN y el calibre de miofibras, sugiriendo que el GDF11 potencializa la biogénesis mitocondrial y promueve la autofagia (Sinha et al., 2014). Con ambas publicaciones, el GDF11 se posicionó como una molécula anti-envejecimiento. Sin embargo, surgieron publicaciones que contradijeron a estos autores al señalar que el GDF11 no disminuía con la edad si no que incrementaba (Egerman et al., 2015) y que la administración de GDF11 no mejora la hipertrofia cardíaca en animales viejos (Smith et al., 2015).

Posteriormente, se demostró que el anticuerpo contra GDF11 (Abcam, ab124721) detectaba tanto a GDF11 como a GDF8 (miostatina) y, por si fuera poco, daba una reacción cruzada entre GDF11 y las inmunoglobulinas cuando se cuantificaba al

GDF11 (Poggioli et al. 2016; Smith et al., 2015; Egerman et al., 2015). Para sobreponer estos inconvenientes, anticuerpos específicos y otras metodologías para la medición exacta de GDF11 han surgido (Semba, et al., 2019). Sin embargo, si el GDF11 incrementa o disminuye con la edad así como su posible papel anti-envejecimiento del músculo cardíaco y esquelético, aún son interrogantes por resolver (Hammers et al., 2017; Zimmers et al., 2017; Hinken et al., 2016). A pesar de las sus contradicciones, el GDF11 ha sido relacionado con la sobrevivencia de las células  $\beta$  pancreáticas (Li et al., 2017), la neurogénesis (Lu et al., 2018), la función angiogénica (Zhang et al., 2018), inclusive, aún se propone como un factor anti-envejecimiento (Rochette et al., 2020).

### **1.12.2 Ratones deficientes en GDF11 y GDF8**

El GDF11 es un miembro de la familia de las citocinas de factor de crecimiento transformante beta ( $TGF\beta$ ) que se divide en tres subclases:  $TGF\beta$ s, las proteínas morfogenicas de hueso (BMPs) y activinas/inhibinas. El GDF11 es un homólogo de GDF8 o miostatina (MSTN) y ambas comparten una identidad en su secuencia del 89% en su dominio maduro (Suh et al., 2020). A pesar de su similitud, el GDF11 y la miostatina tienen funciones diferentes. Por ejemplo, la MSTN se expresa en músculo esquelético y cardíaco, mientras que GDF11 se expresa en varios tejidos incluidos hueso, riñón, páncreas, retina, bazo y músculo esquelético. La MSTN regula el crecimiento muscular y participa en el metabolismo de la glucosa y la adipogénesis. En contraste, el GDF11 participa en el desarrollo embrionario, en particular en los huesos del eje esquelético anterior/posterior de las vértebras torácicas y lumbares y la cola así como en la formación del riñón, el estómago, el bazo, el páncreas y la neurogenesis olfatoria. Las funciones postnatales de GDF11 han sido menos exploradas por la letalidad de los ratones KO para GDF11. En la Tabla 1, se resume la comparación de los diferentes fenotipos de los ratones KO para GDF11 y MSTN así como el doble KO de MSTN/GDF11 (Walker et al., 2016).

Tejido	MSTN KO	GDF11 KO	MSTN/GDF11 DKO
	McPherron et al., 1997 Heineke et al., 2010	McPherron et al., 1999 Nakashima et al. 1999	McPherron et al., 2009
Letalidad	No	Si, perinatal.	Si, ratones nacidos en la proporción esperada pero ninguno nacido vivo.
Hueso	No reportado	Transformación homeótica anterior del eje esquelético (transformación de vértebras posteriores a identidad anterior) a través de la expresión génica alterada HOX en el eje Anterior/Posterior; Aumento de la frecuencia del paladar hendido	Transformaciones homeóticas más severas que GDF11KO Todos tienen paladar hendido; Defectos esqueléticos adicionales, incluyendo defectos de extremidades (extremidades anteriores extras o adicionales, extremidades acortadas), defectos de patrón de dígitos (sexto dígito).
Músculo esquelético	Hiperplasia e hipertrofia de las miofibras.	Ninguno reportado (letalidad perinatal)	No reportado (letalidad perinatal)
Grasa	Incremento del peso corporal con decremento en el contenido de lípidos y decremento de los niveles de triacilglicéridos.	Ninguno reportado, pero el análisis es limitado debido a la letalidad perinatal.	No reportado (letalidad perinatal)
Corazón	Incremento en el peso del corazón y el peso corporal.	No reportado (letalidad perinatal)	No reportado (letalidad perinatal)

**Tabla 1.** Comparación de los fenotipos de los ratones deficientes de GDF11 y Miostatina. HOX, genes homeobox son un subgrupo de genes que se encargan del desarrollo anatómico.

En miofibras esqueléticas de adultos jóvenes, los KO condicionales para GDF11 no incrementan la masa muscular y no se observan cambios en el tipo de fibra, en contraparte los KO condicionales para MSTN incrementan 2 veces su masa muscular presentando hiperplasia e hipertrofia así como un aumento en las fibras de tipo glicolíticas IIB (McPherron et al., 2009).

### 1.12.3 Biología del GDF11

Identificado por McPherron y colegas (1999), el gen GDF11 se localiza en el cromosoma 12q13.2 y tres variantes de splicing se han identificado, siendo la más interesante GDF-11 $\Delta$ Ex11, caracterizada por la ausencia de exón 1 y compuesta por

el exón 2 y 3 con iniciación transcripcional en el intrón 1. Se predice que esta variante podría ser regulada por factores de transcripción como algunos factores miogénicos (MRF, Myf5, MyoD Miogenina y MRF4) sugiriendo que esta variante podría estar involucrada en el desarrollo y la reparación muscular (Jeanplong et al., 2014).

El mensajero de GDF11 se traduce en una proteína precursora, que es procesada por una furin proteasa que genera la forma GDF11 madura (C-terminal, 12.5 kDa) y el pro-dominio (N-terminal, 30.1 kDa). Aunque hay una alta homología entre miostatina madura y el GDF11, los pro-dominios de ambas proteínas comparten sólo el 54% de la homología. El pro-dominio es fundamental para el plegamiento adecuado de proteínas, la formación de enlaces disulfuro y la exportación de los homodímeros, sugiriendo posibles diferencias en el proceso post-traduccional entre miostatina y GDF11. El dímero GDF11 se puede unir a los receptores TGF- $\beta$  de la superfamilia de tipo I, a los 2 receptores de activina tipo II A o B (ActRIIA, ActRIIB), ó a los 3 receptores ALK (*Activin receptor-like kinase 4, 5 y/o 7*) (Figura 6) (Walker et al., 2016; Walker et al., 2017). Los receptores de tipo II fosforilan el dominio de la cinasa intracelular de los receptores de tipo I. A continuación, las proteínas SMAD2 y SMAD3 (por su siglas en inglés *Mothers Against Decantaplegic*) se fosforilan. El complejo SMAD 2/3 recluta SMAD 4 quien es traslocado a el núcleo en donde activará la transcripción de genes diana como los genes homeobox, que son importantes en el desarrollo anatómico embrionario, así como en los procesos de proliferación y diferenciación celular. Sin embargo, esta no es la única vía de señalización a través de la cual actúa GDF 11. También puede mediar la señal activando Ras, ERK1/2, TAK1, JNK y p38 (Jamaiyar et al., 2017).

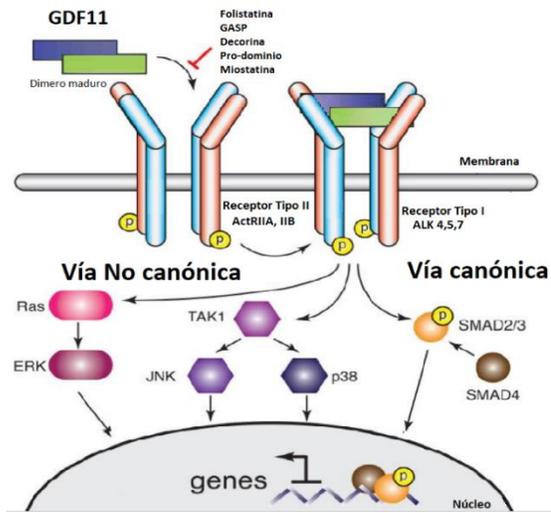


Figura 6. Señalización de GDF11 a través de sus vías canónica y no canónica.

#### 1.12.4 GDF11 y el metabolismo

Pese a las contradicciones del GDF11, su efecto anti-envejecimiento sobre la piel ha sido recientemente descrito (Rochette et al., 2020) aunque diversos estudios también apoyan sus efectos a nivel biológico. El GDF11 restaura el metabolismo de la glucosa y mejora la resistencia a la insulina, aumenta el gasto energético de los ratones, regula el incremento de la expresión de genes responsables de la termorregulación en el tejido adiposo marrón y blanco (Pham et al., 2021), regula la expresión de genes inflamatorios en el tejido adiposo blanco así como aquellos genes involucrados en el metabolismo de la glucosa y los lípidos hepáticos (Lu et al., 2019), incluidos la reducción del peso y mejora la homeostasis de la glucosa (Walker et al., 2020). Por su parte, la sobreexpresión de GDF11 activa vías de señalización como de TGF- $\beta$ /Smad2, PI3K/AKT/FOXO1 y AMPK en el tejido adiposo blanco (Lu et al., 2019; Walker et al., 2020). Asimismo, esta estrechamente relacionado con el síndrome metabólico (Xu et al., 2021) y se ha demostrado que el eje GDF11-FTO (ARN desmetilasa, asociada a la obesidad y a la masa grasa)-PPAR $\gamma$  promueven el cambio de las MSC óseas hacia adipocitos e inhibe la formación de hueso en la

osteoporosis (Shen et al., 2018), también promueven la osteogénesis y la inhibición de GDF11 afecta la fuerza ósea (Suh et al., 2020). En otros contextos, el GDF11 previene de la isquemia al miocardio, mejorando la morfología de los miocitos a través del incremento de la actividad de SOD y la autofagia (Bin et al., 2020). Además, su efecto anti-envejecimiento se observa con la reducción de los niveles de productos finales de glicación avanzada (AGE, por sus siglas en inglés *advanced glycation end products*), la oxidación de proteínas y peroxidación de lípidos a través del incremento en la actividad de enzimas como CAT, GPX y SOD (Zhou et al., 2019). También, el GDF11 protege de la disfunción y fibrosis cardíaca al reducir los niveles de ERO mediante el incremento de la expresión y actividad de la sirtuina 1 (SIRT1) (Zhu et al., 2021). En pacientes, la miostatina y la follistatina (análogos de GDF11) circulantes se asocian negativamente con la función muscular en mujeres mayores. De hecho, el GDF11 tiene una mayor asociación con la masa y la composición corporal que con la función muscular en mujeres mayores (Fife et al., 2018).

#### **1.12.5 GDF11 y ejercicio**

En el sentido del ejercicio a largo plazo (pero no el de corto plazo) se ha demostrado que tanto los niveles séricos como la expresión de GDF11 incrementan en el músculo después del ejercicio (Elliot et al., 2017; De Domenico et al., 2017; Lee et al., 2019). Así mismo, la inactividad física está asociada con una disminución de GDF11 en la enfermedad pulmonar obstructiva (EPOC) (Tanaka et al., 2018). En este sentido, el incremento a nivel plasmático de GDF11 correlaciona positivamente con el cambio en la actividad física diaria de pacientes con EPOC, indicando que el GDF11 podría ser un factor humoral útil que refleje la actividad física en la EPOC (Tanaka et al., 2021).

## **2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La combinación del acondicionamiento físico y el tratamiento con un factor de regeneración del músculo, como el GDF-11, mejorarán las condiciones físicas y estructurales de ratas viejas con obesidad sarcopénica?

### 3. JUSTIFICACIÓN

Existe una verdadera preocupación sobre el costo en salud y la carga social respecto al cuidado de los pacientes geriátricos, dado su creciente aumento en México y en el mundo. Entre los principales síndromes geriátricos destacan la sarcopenia, la OS y la OSO, por lo tanto, hay una necesidad urgente de comprender los mecanismos subyacentes para estos síndromes con el objetivo de desarrollar medidas preventivas y/o terapéuticas para evitar los desenlaces adversos consecuentes a estas patologías. En particular, las investigaciones futuras apuntan cada vez más hacia el estudio molecular y genético. De hecho, la evidencia actual sugiere que el inicio de la pérdida muscular está vinculada a cambios asociados en la expresión génica de la sarcopenia. Por otro lado, la OS y la OSO son términos relativamente nuevos que están relacionados al estado combinatorio entre la obesidad, la sarcopenia y la osteoporosis. Estas tres afectaciones son inherentes a cambios en la composición corporal asociadas al envejecimiento que actúan sinérgicamente aumentando el riesgo a desenlaces negativos en el estado de salud de los adultos mayores. Así mismo, el aumento de la grasa corporal está estrechamente relacionado con la disminución de la masa muscular y, ambos procesos, están implicados en diversos mecanismos moleculares como la síntesis y degradación de las proteínas, la miogénesis, la adipogénesis, la biogénesis mitocondrial así como al incremento de citocinas pro-inflamatorias.

En el sentido de las enfermedades asociadas a la edad como la obesidad, la sarcopenia, la osteoporosis y la fragilidad, el ejercicio físico es un procedimiento barato y efectivo para combatir sus efectos deletéreos. Los programas integrales de 3-18 meses de duración que incluyen ejercicio y restricción calórica, mejoran el rendimiento funcional de los adultos mayores y reducen la inflamación, el estrés oxidante y la resistencia a la insulina, factores que contribuyen a la sarcopenia, en comparación con aquellos individuos que sólo realizan ejercicio o dieta. Ambos (ejercicio y dieta) parecieran ser procedimientos eficaces para contrarrestar la OS y

la discapacidad en la movilidad del adulto mayor obeso. No obstante, es un hecho que un gran número de adultos mayores no presenta las condiciones clínicas favorables (por ejemplo, sarcopenia) para realizar actividad física y dieta, por lo tanto, ya no sería una buena opción. Por lo que resulta interesante recurrir a otras estrategias para retardar la progresión de la sarcopenia, la OS y la OSO.

El GDF11 es una proteína que participa en la proliferación del músculo esquelético, sin embargo, su expresión disminuye a lo largo de la vida. En ratones viejos, por ejemplo, se ha reportado que al restablecer los niveles de GDF11 se mejora la estructura, la fuerza y la resistencia del músculo esquelético y la proliferación de células satélites musculares, sumado al incremento de la biogénesis y la dinámica mitocondrial en el músculo esquelético. Por otra parte, se ha reportado que el GDF-11 disminuye la adipogénesis, la resistencia a la insulina y el metabolismo de lípidos y carbohidratos. Sugiriendo que sí se disminuyen los factores que inducen la inflamación y el estrés oxidante vía el restablecimiento de los niveles de GDF11 sería una terapia alternativa para tratar la OS y OSO en una población envejecida sedentaria. Además, sería una importante oportunidad para conocer los mecanismos moleculares que participan en el proceso de regeneración del músculo esquelético y los posibles biomarcadores plasmáticos en ambas condiciones, que podrían ser utilizados en el diagnóstico clínico en los adultos mayores.

#### **4. HIPÓTESIS**

El re-establecimiento de los niveles plasmáticos de GDF-11 en animales envejecidos, inducirá la capacidad proliferativa y regenerativa del tejido muscular, esperando que estas capacidades incrementen mediante una terapia física aeróbica que restaurará las funciones anabólicas del músculo en un modelo de ratas envejecidas con obesidad-sarcopénica.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el nivel de obesidad sarcopénica a lo largo de la vida (4,8,12,18,22 y 24 meses de edad) en ratas hembras Wistar sedentarias, tratadas con el factor de crecimiento y diferenciación 11 (GDF11) (intraperitoneal a una dosis de 0.1mg/kg peso) y bajo un esquema de ejercicio leve por 20 meses. Así como determinar los mecanismos moleculares que participan en el proceso de regeneración del músculo esquelético e identificar posibles biomarcadores plasmáticos para la evaluación de la obesidad sarcopénica en adultos mayores.

### **5.2 OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Evaluar la sobrevivencia de las ratas Wistar con los tratamientos de GDF11, sedentarias y ejercicio, para determinar si correlacionan con el incremento de la esperanza de vida.
- Caracterizar la composición corporal a la edad de 4,8,12,18,22 y 24 meses de edad a través de las medidas antropométricas y del porcentaje de músculo, hueso y grasa corporal de las ratas Wistar para establecer un modelo de obesidad osteosarcopenica (OSO).
- Comparar el efecto del ejercicio leve por 20 meses a lo largo de la vida en la estructura y morfología del tejido muscular.
- Monitorear el perfil bioquímico y los niveles de citocinas en el suero de los grupos experimentales para determinar si se afectan, sea por la edad o por los tratamientos.
- Evaluar parametros de estrés oxidante en los grupos experimentales.
- Comparar el efecto de los tratamientos sobre la edad y la expresión de los diferentes marcadores de proliferación y supervivencia muscular en muestras de tejido y suero.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1 Animales**

Se usaron 115 ratas Wistar hembras (*Rattus norvegicus*,) de 3 meses de edad (220 gramos) que se obtuvieron de la colonia del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Se mantuvieron en este bioterio con un ciclo de luz-oscuridad 12/12 h con agua y comida (Abene BDL-7100) *ad libitum*. A los 4 meses de edad, las ratas fueron divididas en 2 grupos: sedentarias y con ejercicio. Posteriormente, se realizaron determinaciones en las diferentes etapas del desarrollo de las ratas hasta su envejecimiento: adultos jóvenes (4-8 meses), adultos (8-12 meses), mediana edad (12-18 meses) y viejos (18-24 meses). Todos los procedimientos en los animales se llevaron a cabo acorde a la NOM-062-ZOO-1999 y los desechos biológicos fueron dispuestos acorde a la NOM-087-ECOL-1995. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Geriátrica (SIRES-DI-003-2015) y cumple con la NOM-062-ZOO-1999.

### **6.2 Grupo sedentario (SED)**

El grupo sedentario estuvo compuesto de 60 ratas y separadas (5 ratas por caja) en cajas de acrílico transparentes de 6 mm de espesor con las siguientes medidas: 43 x 53 x 20 cm (ancho, largo, alto). Las ratas se consideraron sedentarias cuando crecieron en condiciones estándar a lo largo de su vida, con comida *ad libitum* y sin ningún enriquecimiento que pudiera modificar su movilidad, de acuerdo a reportes previos (Alessio et al., 2005; Mattson y Wan, 2005).

### 6.3 Rutina de ejercicio de baja intensidad por un periodo largo de tiempo (LIERLT: low-intensity exercise routine for a long period of time)

A la edad de 4 meses, 55 ratas comenzaron con el reconocimiento y adaptación al equipo de entrenamiento (Treadmill Control LE8710 Panlab Harvard Apparatus) durante por 5 días a la semana, de acuerdo al siguiente protocolo: primera semana a una velocidad de 6 metros (m)/minuto (min) por 10 min, a 9m/min por 15 min la segunda semana, a 12m/min por 20 min la tercera semana y, finalmente, a 15m/min por 30 min la cuarta semana. Cuando las ratas se adaptaron, la velocidad y el tiempo se ajustaron a una rutina física de baja intensidad (LIERLT) que consiste de una velocidad de 15 m/min durante 5 días a la semana hasta la edad de 24 meses (Abreu et al., 2016). Después de cada rutina, 5 animales de cada grupo fueron sacrificados mediante decapitación a la edad de 4, 8, 12, 18, 22 y 24 meses (Figura 7).

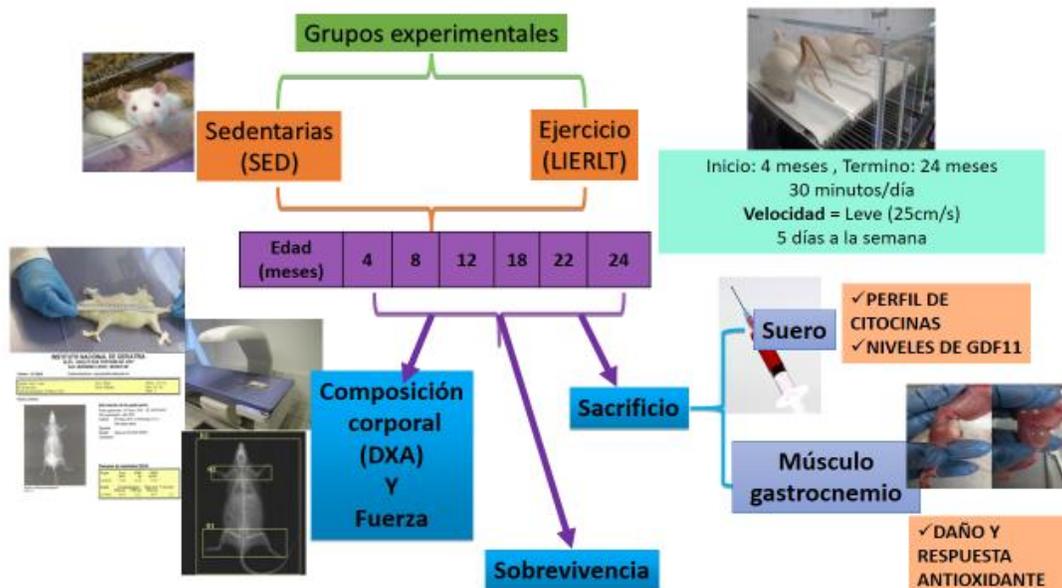


Figura 7. Diseño experimental. Se tienen 2 grupos experimentales a la edad de 4 meses comienza la rutina de ejercicio leve y a la edad de 4, 8, 12, 18, 22 y 24 meses se realizó la composición corporal, fuerza, sobrevivencia y sacrificio. En suero se determinó un perfil de citocinas y los niveles de GDF11.

#### **6.4 Índice de masa corporal (IMC)**

El IMC se determinó con la relación el peso corporal de cada rata y la longitud nasorectal ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) a los 4, 8, 12, 18, 22 y 24 meses de edad. Las curvas de crecimiento se establecieron mediante un ajuste polinomial. En breve, este tipo de curvas nos permiten establecer las diferentes etapas de desarrollo a lo largo de la vida. De 4-8 meses son adultos jóvenes; 8-12 meses son adultos; 12-18 meses son de mediana edad y de 18-24 meses son viejos. De igual manera, se calculó el índice de Lee que es un indicador de obesidad en ratas, calculado a través de la raíz cubica del peso entre la longitud naso-rectal. Posteriormente, realizamos un análisis de la composición corporal mediante un escaneo DEXA.

#### **6.5 Absorciometría de energía dual de rayos X (DEXA o DXA)**

Los grupos de animales SED y LIERLT fueron previamente anestesiados con un coctel compuesto de 2.5 mL ketamina (100mg/mL), 0.8 mL xilacina (20mg/mL) y 2.5 mL de solución salina. De esta mezcla se administraron 100 $\mu$ L (4.3mg ketamina + 0.28mg xilacina) /100g de peso del animal. Una vez anestesiadas, los animales se sometieron al estudio DEXA (Discovery QDR Series, Hologic® Discovery 87899) a las edades de 4, 8, 12, 18, 22 y 24 meses. El equipo fue previamente calibrado con el fantoma (Hologic Rat Step Phantom P/N 010-0758) para todas las mediciones. Para evitar sesgos debido a la relación de tamaño entre ratas jóvenes, adultas y viejas, la composición corporal se reporto como un porcentaje. La masa grasa total se relacionó con el peso total de la rata, que también se hizo con la densidad mineral ósea (BMD por sus siglas en ingles *bone mineral density*). El porcentaje de grasa y la masa magra sin hueso (LMWB por sus siglas en ingles *lean mass without bone*) se determinó cuantificando la masa libre de grasa restando el contenido de hueso, para realizar la relación con respecto al peso total de cada animal. El índice de músculo esquelético (SMI por sus siglas en ingles *skeletal muscle index* ) se calculó como sigue: la masa magra sin hueso de las cuatro extremidades se dividió

por la longitud naso-rectal al cuadrado para cada uno de los animales, para ello empleamos el software QDR del equipo DEXA y seleccionamos dos regiones, una en la parte superior (brazos) y otra en la región inferior (piernas), dibujando un rectángulo ubicando (similar a Gerbaix et al., 2010) la región del Acromion derecho-Acromion izquierdo:Fascia axilar derecha-Fascia axilar izquierda para la región superior (Extremidades superiores) y la región de la Vertebra sacra 1 (S1)-Raíz de la cola para la región inferior (Extremidades inferiores) (Figura 9). Consideramos un porcentaje de grasa corporal superior al 30%, como el punto de corte para determinar nuestro modelo OSO. En la osteoporosis, el punto de corte se estableció cuando los valores de BMD eran inferiores a 2.5 veces la DE con respecto al valor medio de las ratas adultas jóvenes (8 meses) (Kelly et al., 2019; Lin et al., 2018). La sarcopenia y la dinapenia se establecieron cuando el porcentaje de LMWB y la fuerza disminuyeron por debajo de dos veces la DE con respecto al valor medio de las ratas adultas jóvenes.

## **6.6 Fuerza de agarre**

La fuerza de agarre se evaluó utilizando un dinamómetro digital Rhino BAC-20 (PKCh) con un rango de medición entre 0.1 N y 200 N (Newton) (Hernández et al., 2019). El dinamómetro se fijó verticalmente a una rejilla de acero inoxidable y se registró la fuerza máxima de agarre en el momento en que la rata se soltó de la rejilla; los resultados se expresaron como N/kg de peso de la rata en todos nuestros grupos.

## **6.7 Determinación de parámetros bioquímicos**

Después de un ayuno de 8 horas, los grupos de ratas SED y LIERLT a la edad de 4, 8, 12, 18, 22 y 24 meses fueron eutanizados por decapitación. El músculo gastrocnemio fue extraído y almacenado a -80°C. La sangre fue colectada y el suero

fue separado por centrifugación a 3,500 rpm por 10 min. La glucosa, creatinina, triglicéridos, colesterol, TGO (transaminasa oxalacética), TGP (transaminasa glutámico-pirúvica), GGT (gamma glutamil transpeptidasa) y HDL (lipoproteínas de alta densidad) fueron determinados en suero usando el analizador químico de la marca Arkray (SPOTCHEM EZ SP-4430).

### **6.8 Concentración de GDF11 en suero**

Los niveles de GDF11 fueron determinados en suero mediante ELISA (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) empleando el kit comercial de la marca Cloud Clone Corp ELISA kit (# cat. SEC113Ra) en todos los grupos experimentales.

### **6.9 Estado redox (coeficiente GSH/GSSG)**

Los niveles de glutatión reducido y glutatión oxidado fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se homogenizaron 100 mg del músculo gastrocnemio con 800  $\mu$ L de ácido clorhídrico/BPDS (HCL 10%/BPDS 1mM), posteriormente la suspensión fue centrifugada a 10,000 rpm por 5 min a 4°C y el sobrenadante se recuperó. Se tomaron 30  $\mu$ L de cada muestra y se inyectaron al sistema de HPLC. Se utilizó una bomba binaria 1525 Waters, acoplada a un detector UV/visible 2489 calibrado a 210 nm, la fase estacionaria consistió en una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 de 4.6 x 250 mm y 5  $\mu$ M de partícula. Como fase móvil se usó 1% de acetonitrilo y 99% de buffer de fosfato de potasio monobásico (20 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a pH 2.7. Se utilizó un flujo isocrático de 1 ml/min y las muestras fueron analizadas por detección ultravioleta a 210 nm. El área bajo la curva se determinó mediante el uso de estándares de GSH y GSSG.

### **6.10 Daño oxidante a proteínas**

La oxidación de proteínas fue determinada por espectrofotometría en placas de 96 pozos usando el reactivo 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). En breve, 20  $\mu\text{L}$  de DNPH (10 mM en 0.5 M de ácido fosfórico) se mezclaron con 20  $\mu\text{L}$  de muestra y se incubaron en oscuridad por 10 min. Posteriormente, 10  $\mu\text{L}$  de NaOH (6M) fueron adicionados e incubados 10 min en la oscuridad. La absorbancia fue medida a 450 nm y el contenido de carbonilos se calculo como  $\text{Abs}_{450}/\text{E}/\text{mg}$  de proteína total de cada muestra, donde E es el coeficiente de extinción molar =  $22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Hernández et al., 2018).

### **6.11 Perfil de citocinas inflamatorias**

Se analizaron 23 citocinas: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-18, MCP-1, MIP-1a, MIP3a, M-CSF, IFN- $\gamma$ , G-CSF, GM-CSF, GRO-KC, RANTES, VEGF y TNF- $\alpha$  en 50  $\mu\text{L}$  de suero de las ratas SED y LIERLT empleando el kit comercial Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 23-plex Assay (Biorad, Hercules, CA) acorde a las instrucciones del fabricante. La cuantificación se basó en la cantidad de proteínas que se adhieren a su anticuerpo específico. Para representar los valores obtenidos en el mapa de calor se normalizaron las concentraciones obtenidas de cada una de las citocinas con respecto a las concentraciones obtenidas de las ratas jóvenes (4 meses de edad). Posteriormente, se aplicó una función logarítmica a los valores obtenidos y se graficaron en una escala de -1 a 1. Finalmente, se calcularon las relaciones TNF $\alpha$ /IL-10 e IL-6/IL-10 a partir de la concentración de cada citoquina para evaluar la respuesta inflamatoria de cada grupo de estudio.

## **6.12 Análisis estadístico**

Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar (ES) de cada grupo de animales ( $n = 5$ ). Las curvas de crecimiento poblacional se establecieron mediante correlaciones polinomiales, para una mejor visualización del crecimiento de los individuos en sus diferentes etapas del desarrollo. Las diferencias entre los grupos se determinaron mediante análisis multivariado (MANOVA). Las diferencias en el estado redox y la carbonilación de proteínas se determinaron mediante una ANOVA seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. En todos los casos, el valor de significancia utilizado se menciona en cada figura.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Análisis morfométrico

Para determinar si una rutina de ejercicio de baja intensidad durante un largo período de tiempo (LIERLT) retrasa el fenotipo OSO, determinamos el IMC (para estimar el estado nutricional y de desarrollo del organismo) y la composición corporal en los grupos SED y LIERLT en un estudio longitudinal. Para realizar un mejor análisis comparativo de los grupos de estudio, los datos se transformaron como grupos poblacionales y las diferentes etapas del desarrollo de la rata se estimaron mediante correlaciones polinomiales, como se muestra en la Figura 8.

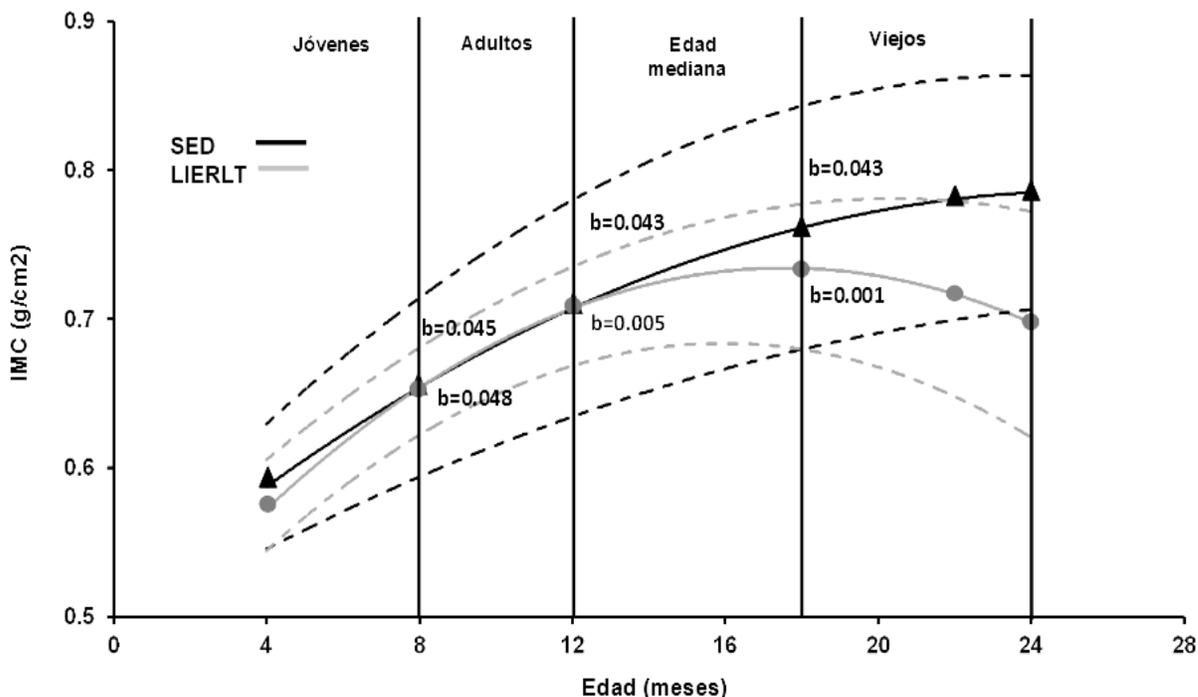


Figura 8. Índice de masa corporal (IMC) en las diferentes etapas del desarrollo desde los 4 hasta los 24 meses de edad de las ratas sedentarias (SED) (triángulos de línea negra) y ratas con ejercicio (LIERLT) (círculos de línea gris). MEDIA  $\pm$  Desviación estándar (DE). b= p de significancia estadística. A: con el mismo grupo de edad y B: comparación respecto al grupo de 4 meses.

Los resultados muestran un aumento significativo del 8% en el IMC en ambos grupos en la etapa adulta joven (4-8 meses de edad; SED,  $p=0.045$ ; LIERLT,  $p=0.048$ ). Los resultados correspondientes a la etapa adulta de las ratas (8-12 meses de edad), se observó un aumento del 11% para ambos grupos (SED,  $p=0.043$ ; LIERLT,  $p=0.005$ ). De 12 a 18 meses de edad (mediana edad) se observó un aumento del 8% en el IMC (SED,  $p=0.043$ ; LIERLT,  $p=0.001$ ). Finalmente, en la etapa de desarrollo donde las ratas Wistar se consideran viejas (18-24 meses de edad), no se observaron cambios significativos en el IMC (Figura 8). En general, los resultados de IMC no mostraron diferencias entre los grupos experimentales, por lo tanto, un análisis de la composición corporal mediante un estudio DEXA se realizó para evaluar el efecto de la rutina de ejercicio LIERLT durante el envejecimiento de las ratas. Por su parte, los resultados del índice de Lee no mostraron diferencias estadísticamente significativas (datos no mostrados).

## 7.2 Composición corporal (DEXA)

La evaluación de la composición corporal se realizó empleando el DEXA en las diferentes etapas del desarrollo como se describió anteriormente (Figura 9).

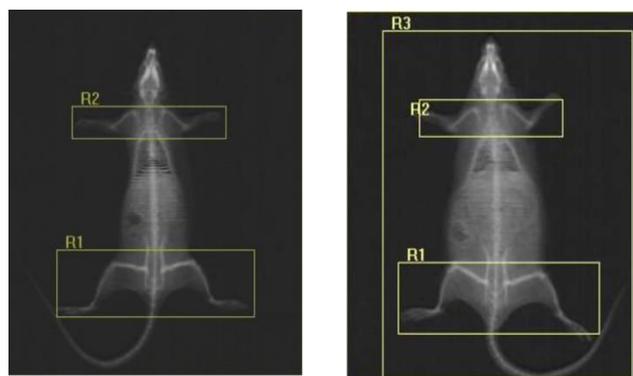


Figura 9. Imágenes de la composición corporal en las cuales se evalúa la composición total y de las extremidades superiores e inferiores de los grupos SED y LIERLT. En rectángulos se delimitan las extremidades superiores e inferiores para la obtención del índice muscular esquelético (SIM). La imagen de la izquierda corresponde al grupo SED y la de la derecha al grupo LIERLT, donde R indica la región evaluada.

Se evaluó la composición corporal total y la composición de las extremidades superiores e inferiores (Figura 9). Estos valores fueron relacionados a la longitud naso-rectal al cuadrado para calcular el índice muscular esquelético (SMI), además se obtuvieron los valores de porcentaje de grasa total (Figura 10).

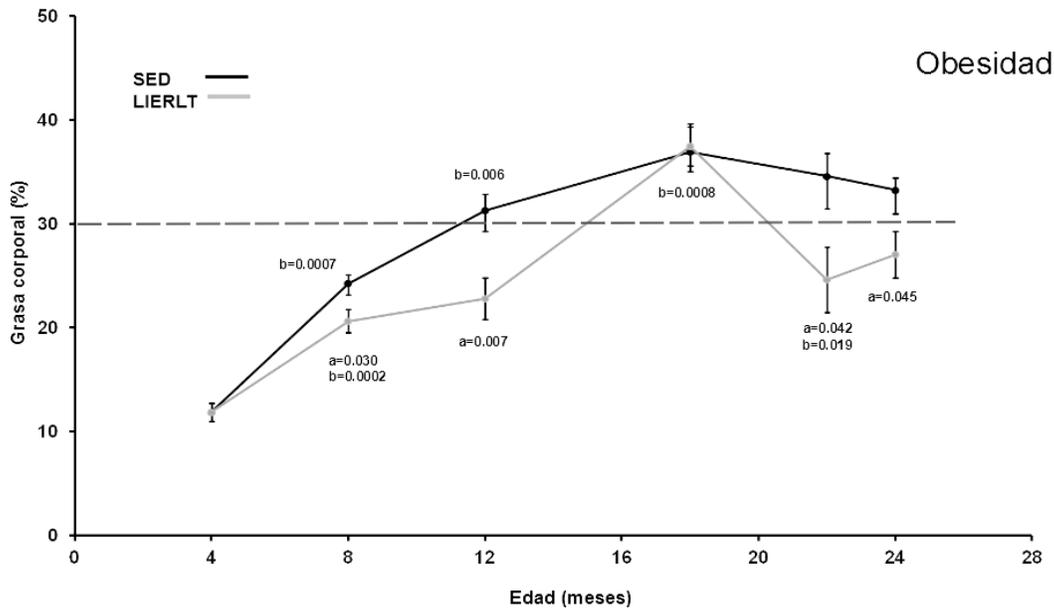


Figura 10. Porcentaje de grasa total en las diferentes etapas del desarrollo desde los 4 hasta los 24 meses de edad de las ratas sedentarias (SED) (línea negra) y ratas con ejercicio (LIERLT) (línea gris). Media  $\pm$  desviación estándar (DE). a y b = p de significancia estadística. A: con el mismo grupo de edad y B: comparación respecto al grupo de 4 meses

Los resultados en la Figura 10 muestran que los animales en el grupo SED incrementan su grasa corporal en un alto porcentaje comparado con los animales del grupo LIERLT, mientras tanto, el grupo SED muestra un incremento significativo a los 8 meses (14.99%,  $p=0.030$ ), a los 12 meses (27.12%,  $p=0.007$ ), un 28.84% a los 22 meses ( $p=0.042$ ) y 18.67% a los 24 meses ( $p=0.045$ ) con respecto al grupo LIERLT. Es importante mencionar, que la obesidad en ratas se establece cuando los animales tienen un porcentaje de grasa superior al 30%, por lo que las ratas del

grupo LIERLT solo presentaron obesidad a los 18 meses ( $p=0.0008$ ), mientras que en las ratas SED fueron obesas de 12 a 24 meses de edad.

En cuanto a la densidad mineral ósea (BMD), en la Figura 11 se observa que a los 8 y 18 meses no hay cambios significativos entre los grupos SED y LIERLT. Estos cambios solo se apreciaron a los 12, 22 y 24 meses, dado que las ratas LIERLT aumentaron significativamente su porcentaje de BMD con respecto a las ratas SED en 10.66% ( $p=0.002$ ), 11.87% ( $p=0.023$ ) y 11.04% ( $p=0.040$ ). Por otro lado, la osteoporosis se estableció cuando el BMD disminuyó 2.5 veces la desviación estándar con respecto a la media de ratas adultas jóvenes SED (8 meses de edad). En base a este criterio, se puede observar que las ratas SED presentaron osteoporosis desde los 18 y hasta los 24 meses; mientras que las ratas LIERLT sólo presentaron osteoporosis a los 18 meses.

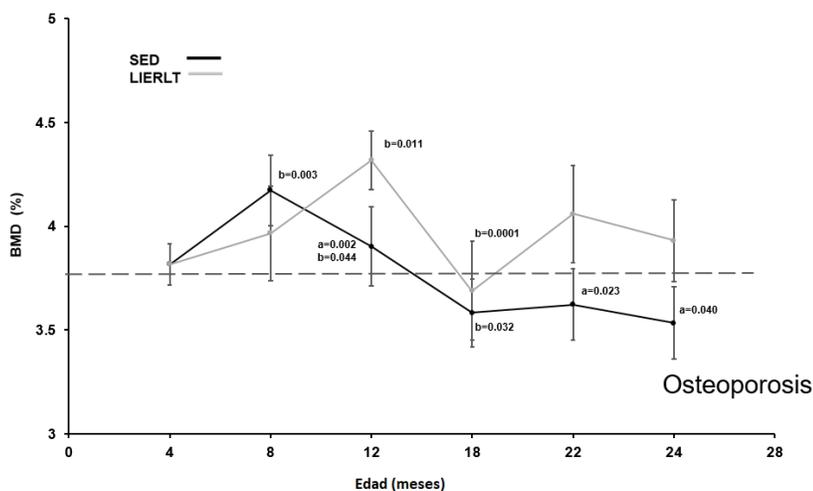


Figura 11. Densidad mineral ósea (BMD) en las diferentes etapas del desarrollo desde los 4 hasta los 24 meses de edad de las ratas sedentarias (SED) (línea negra) y ratas con ejercicio (LIERLT) (línea gris). Media  $\pm$  desviación estándar (DE). a y b= p de significancia estadística. A: con el mismo grupo de edad y B: comparación respecto al grupo de 4 meses

Por otro lado, los resultados de la evaluación de la masa magra libre de hueso (LMWB) (Figura 12) muestran que las ratas del grupo LIERLT tienen más alto LMWB que las ratas del grupo SED: 5.42% a los 8 meses ( $p=0.024$ ), 12.47% a los 12 meses

( $p=0.009$ ), 15.42% a los 22 meses ( $p=0.026$ ) y 9.27% a los 24 meses ( $p=0.049$ ). Sin embargo, a los 18 meses de edad, los grupos SED y LIERT no mostraron diferencias significativas. Tomando en cuenta los resultados anteriores, determinamos que la sarcopenia en nuestro modelo experimental se estableció cuando la disminución de LMWB fue más de 2 veces la desviación estándar con respecto a la media de las ratas adultas jóvenes SED (8 meses). De tal forma, que las ratas del grupo SED presentaron sarcopenia a partir de los 12 meses de edad, en tanto las ratas del grupo bajo el regimen de ejercicio retrasaron el inicio de la sarcopenia hasta los 18 meses de edad.

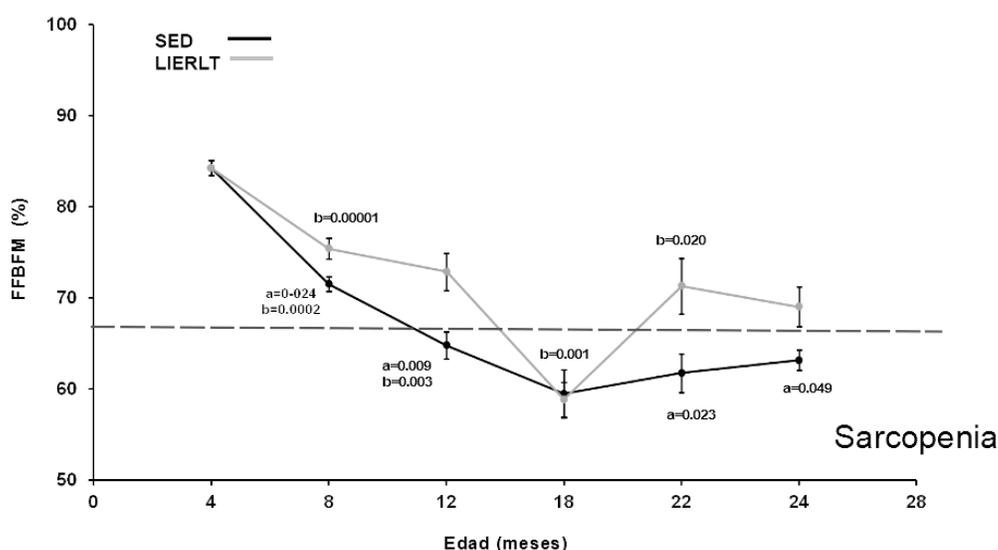


Figura 12. Porcentaje de masa magra libre de hueso (LMWB) en las diferentes etapas del desarrollo desde los 4 hasta los 24 meses de edad de las ratas sedentarias (SED) (línea negra) y ratas con ejercicio (LIERT) (línea gris). Media  $\pm$  desviación estándar (DE). a y b= p de significancia estadística. FFBFM: masa libre de grasa y hueso. A: con el mismo grupo de edad y B: comparación respecto al grupo de 4 meses

### 7.3 Fuerza de agarre

Nuestros resultados de la fuerza de agarre muestran que en ambos grupos experimentales la fuerza disminuye con la edad (Figura 13). Sin embargo, a partir de los 12 meses de edad el grupo LIERT mostró mayor fuerza (62.12%,  $p=0.0025$ ) que las ratas SED. En tanto, la pérdida de la fuerza en este grupo fue progresiva hasta

los 24 meses de edad (50.59%,  $p=0,038$ ) pero sin cambios respecto al grupo con ejercicio leve. Adicionalmente, ambos grupos experimentales no presentaron diferencias significativas a los 8 meses de edad (Figura 13).

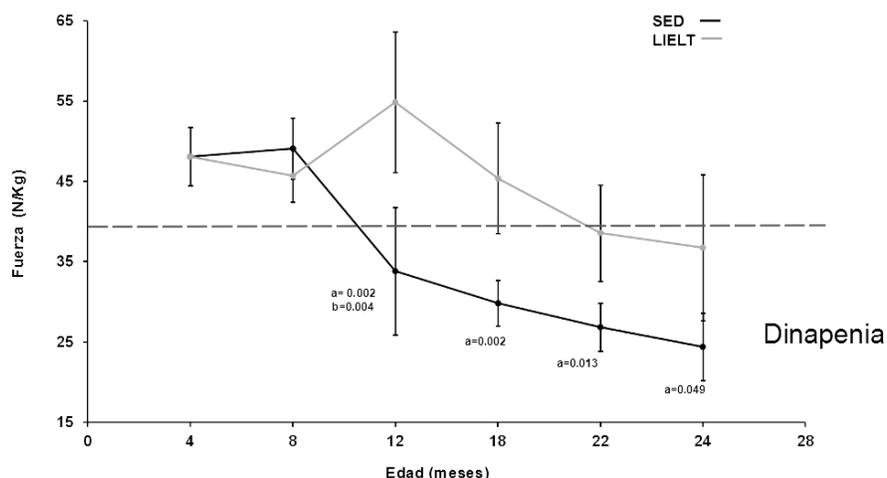


Figura 13. Fuerza de agarre en las diferentes etapas del desarrollo desde los 4 hasta los 24 meses de edad de las ratas sedentarias (SED) (línea negra) y ratas con ejercicio (LIERT) (línea gris). Media  $\pm$  desviación estándar (DE). a (respecto al grupo de la misma edad) y b (respecto al grupo de 4 meses) = p de significancia estadística. A: con el mismo grupo de edad y B: comparación respecto al grupo de 4 meses

## 7.4 Funcionalidad muscular

Para una mayor precisión de la composición muscular de los individuos, determinamos el índice muscular esquelético (SMI). Los resultados de esta evaluación se muestran en las Figuras 14 y 15, nuestros datos indican que las ratas de 22 y 24 meses de edad correspondiente al grupo LIERT mostraron una mayor cantidad de músculo (18%,  $p=0.028$ ) respecto a las ratas SED (15.25%,  $p=0.039$ ). Es importante mencionar que el SMI es el estándar de oro para el diagnóstico de la sarcopenia en humanos. Por otro lado, la funcionalidad muscular se determinó a través de la relación entre el SMI y la fuerza, cuyo parámetro funciona para comparar la funcionalidad entre los grupos SED y LIERT. Los resultados de la Figura 15 mostraron que este parámetro gradualmente disminuye en las ratas SED a partir de

los 12 meses. En cambio, la funcionalidad del musculo en el grupo LIERLT tiene un comportamiento diferente, es decir, a partir de los 12 meses se conserva la funcionalidad muscular. Incluso, el grupo de 24 meses con ejercicio asemeja una funcionalidad similar con un grupo más joven de sedentarias (12 meses).

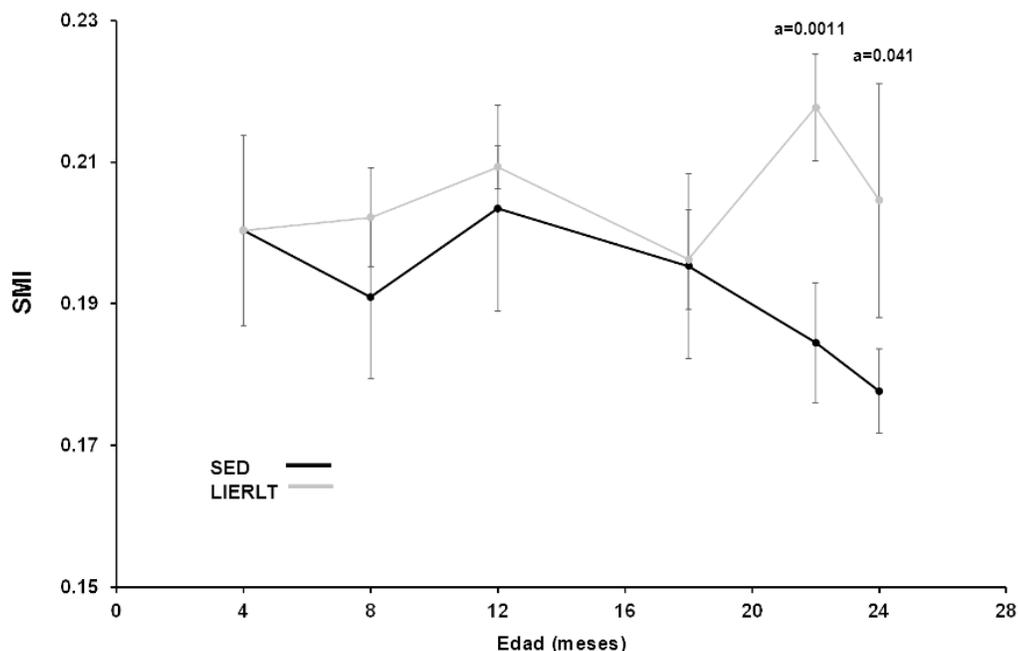


Figura 14. Índice muscular esquelético (SMI) en las diferentes etapas del desarrollo desde los 4 hasta los 24 meses de edad de las ratas sedentarias (SED) (línea negra) y ratas con ejercicio (LIERLT) (línea gris). Media  $\pm$  desviación estándar (DE). a = p de significancia estadística. A: con el mismo grupo de edad y B: comparación respecto al grupo de 4 meses

Sin embargo, esta funcionalidad disminuyó a los 18 meses de edad e, interesantemente, las ratas con 22 meses de edad y con LIERLT mostraron una mejor funcionalidad, aunque tenían menos músculo que las ratas LIERLT de 18 meses. Finalmente, las ratas de 24 meses del grupo LIERLT tenían la funcionalidad más baja, que estaba directamente relacionada con el envejecimiento. Un resultado interesante es que las ratas LIERLT de 24 meses mostraron una funcionalidad muscular similar a la de las ratas SED de 12 meses, lo que sugiere que la rutina de ejercicios LIERLT retrasa la aparición de la sarcopenia.

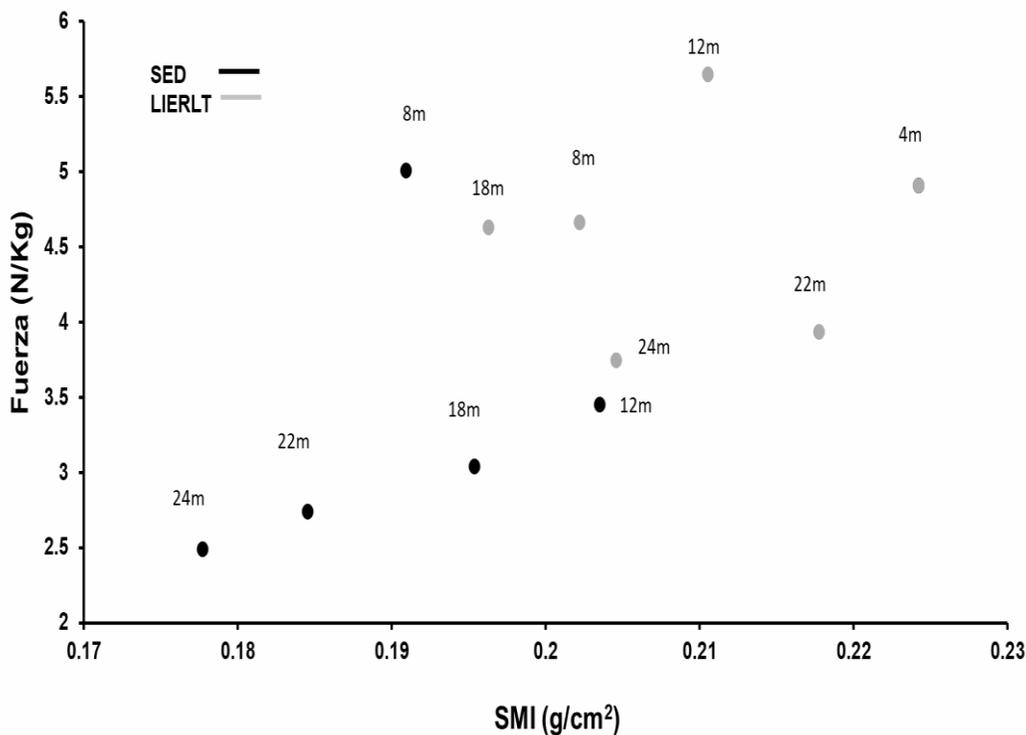


Figura 15. Funcionalidad muscular, relación del SIM y la fuerza en las diferentes edades de 4, 8, 12, 18, 22 y 24 meses (m) de las ratas sedentarias (SED) (negro) y ratas con ejercicio (LIERLT) (gris). Las líneas no se observan. Falta el punto de los animales SED a los 4 meses.

### 7.5 Parámetros bioquímicos

Las evaluaciones bioquímicas relacionadas con el perfil metabólico de los grupos experimentales se muestran en la Tabla 2. En general, todas las mediciones evaluadas se encuentran dentro de los valores normales (Giknis & Clifford, 2008), con respecto a la edad. Puntualmente, los niveles de creatinina (0.3-0.6 mg/dL) disminuyeron en ratas SED (0.2 mg/dL) en relación a la edad, por el contrario las ratas con ejercicio moderado no mostraron cambios. Es importante recalcar que una disminución en la creatinina sérica ha sido relacionado con la disminución en la masa del músculo esquelético (Bacallao & Badell, 2015). En suma, nuestros resultados relacionados a la disminución en LMWB y SMI encontrados en ratas SED podrían estar relacionados con la disminución de la creatinina sérica.

Edad (meses)	Glucosa	Creatinina	GPT	GOT	GGT	T-chol	HDL-c	TG
	(89-163 mg/dL)	(0.3-0.6 mg/dL)	(64-222 U/L)	(14-64 U/L)	(8.8-32 U/L)	(23-97 mg/dL)	(32.8 mg/dL)	(16-175 mg/dL)
<b>SEDENTARIAS</b>								
4	127.8± 2.6	0.8± 0.12	158 ±52.8	31.8± 5.07	13±3	59±8.6	18.6±6.8	71.2±26.6
8	114.2 ± 2.7	0.66 ± 0.05	336±51.5	35.6 ± 2.9	10.2±0.5	74.4 ± 14.4	21.2 ± 4	179.6 ± 46.7
12	139 ± 9.17	0.67 ± 0.06	147.67±24.03	20.67±2.08	10.67±1.2	90.67 ± 34.5	27 ± 14	88.67 ± 15.3
18	113.5 ± 9.7	0.75 ± 0.1	142.25 ± 30.3	20.25 ± 7.3	10±0	86.25± 19.2	27.25± 6.3	84.25± 26.3
22	74.33± 3.5	0.23±0.06***	38.33± 6.5	21.67±8.08	15.67±8.2	71.67±6.8	23.33±2.5	141.33±23.7
24	101.5±46	0.2±0***	82±48.5	18±11.3	10±0	74.5±29	32±15.7	80±38.2
<b>EJERCICIO</b>								
8	131±14.09	0.66±0.06	283.6±75.5	36.4±12.7	10.8±1.8	75.2±8	26.4±2.5	99.6±26.05
12	109.5± 9.5	0.75± 0.06	163.75±76.4	55.75±38.2	10± 0	100.25±8.4	29±5.5	126.75±57.3
18	107±13.4	0.8±0.08	149.75±24.4	27.5±11.39	12±1.4	84.5±51.1	23.5±12.5	190±212
22	109.25±9.3	0.78±0.095	164.75±36	20.75±9.6	11±1	67±13.6	20.75±4.1	211.75±128.5
24	92.8± 24.2	0.62±0.08	183.2±28.2	26.6±14.6	11.4±1.2	107.4±27	32±9	117.6±20.67

Tabla 2: Parámetros Bioquímicos. Glucosa, Creatinina (Cre), transaminasa glutámico oxalacética (GOT), transaminasa glutámica pirúvica (GPT), gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT), triglicéridos (TG), Colesterol total (T-chol) y lipoproteína de alta densidad (HDL) a los 4, 8, 12, 18, 22 y 24 meses de las ratas sedentarias (SED) y ratas con ejercicio (LIERLT). Media ± desviación estándar (DE). \*\*\* Diferencias significativas entre el grupo SED y LIERLT.

## 7.6 Perfil de citocinas

Evaluamos 23 citocinas tal que se describió en la sección de Materiales y Métodos y un mapa de calor se presenta en la Figura 16. Nuestros resultados indican que ambos grupos modificaron gradualmente la concentración de citocinas de manera dependiente de la edad. En particular, apreciamos un aumento de las citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ) en el grupo SED y una disminución de las anti-inflamatorias (IL-4 e IL-10) en el grupo LIERLT. Adicionalmente, algunas de las citocinas presentaron un comportamiento oscilatorio en los grupos SED y LIERLT, por ejemplo, MCP-1, RANTES, IL-7, GRO KC, M-CSF, MIP -3a, IL-13, IL-5 y VEGF.

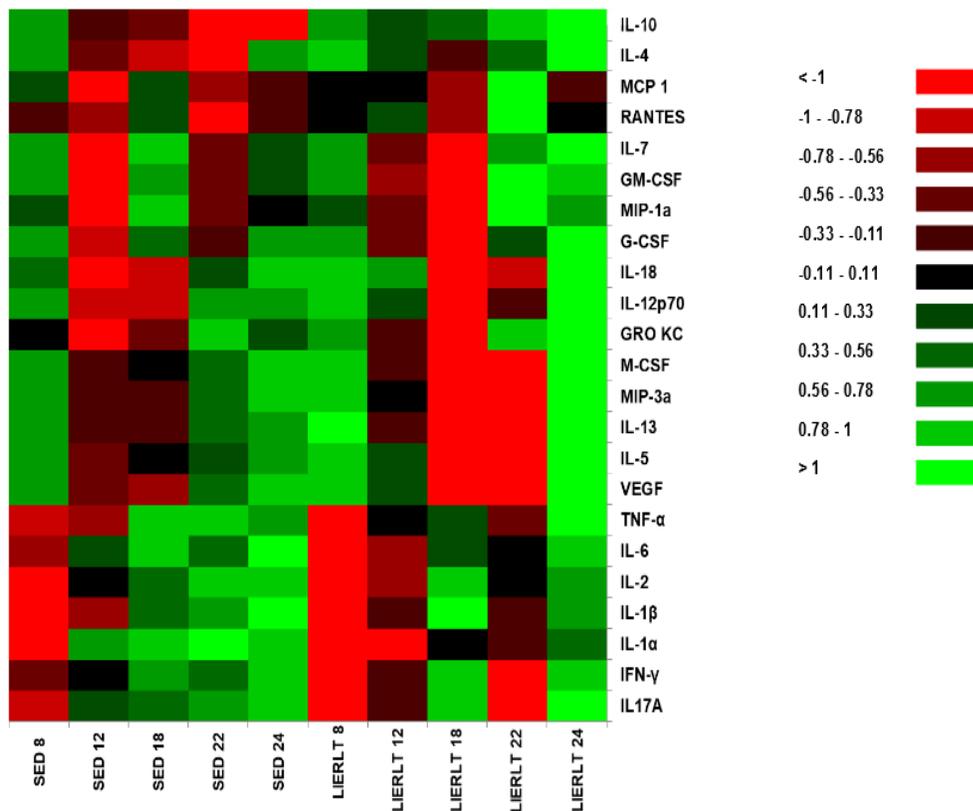


Figura 16. Mapa de calor de 23 citocinas detectadas en suero en ratas sedentarias (SED) y ratas con ejercicio (LIERLT) en las las diferentes edades de 4, 8, 12, 18, 22 y 24 meses de las.

Dado que este análisis no permite evaluar el perfil inflamatorio y, por tanto, discernir entre la respuesta pro- y anti-inflamatoria, realizamos dos cocientes en ambos grupos experimentales. Elegimos tres de las principales citocinas pro- y anti-inflamatorias que se han asociado con el perfil inflamatorio en la OSO: TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, cuyos cocientes se interpretan como: un valor mayor indicará un estado pro-inflamatorio superior. La primera relación evaluada fue TNF- $\alpha$ /IL-10 y los resultados muestran que las ratas SED aumentan gradualmente el estado inflamatorio de manera constante hasta los 24 meses. Mientras tanto, las ratas LIERLT mantuvieron a la baja su estado inflamatorio prácticamente hasta los 24 meses.

Al comparar los grupos experimentales, observamos que las ratas del grupo LIERLT disminuyeron el perfil pro-inflamatorio con respecto a las ratas SED (Figura 17). En particular, encontramos una disminución del 38% a los 18 meses ( $p=0.049$ ), del 72% a los 22 meses ( $p=0.00019$ ) y del 65% a los 24 meses ( $p=0.046$ ). Por otro lado, evaluamos la relación entre IL-6/IL-10 cuyos resultados fueron similares al cociente TNF $\alpha$ /IL-10. Es decir, un aumento gradual y constante de la relación IL-6/IL-10 en las ratas SED fueron observados. Sin embargo, al comparar la proporción pro-inflamatoria en las diferentes edades, se encontró que la rutina de ejercicio disminuyó el perfil inflamatorio en todas las edades de la siguiente manera: 34% a los 8 meses ( $p=0.038$ ), 48% a los 12 meses ( $p=0.039$ ), 33% a los 18 meses ( $p=0.049$ ), 75% a los 22 meses ( $p=0.033$ ) y 70% a los 24 meses ( $p=0.001$ ), estos resultados sugieren que el ejercicio disminuye el perfil pro-inflamatorio en el envejecimiento (Figura 18).

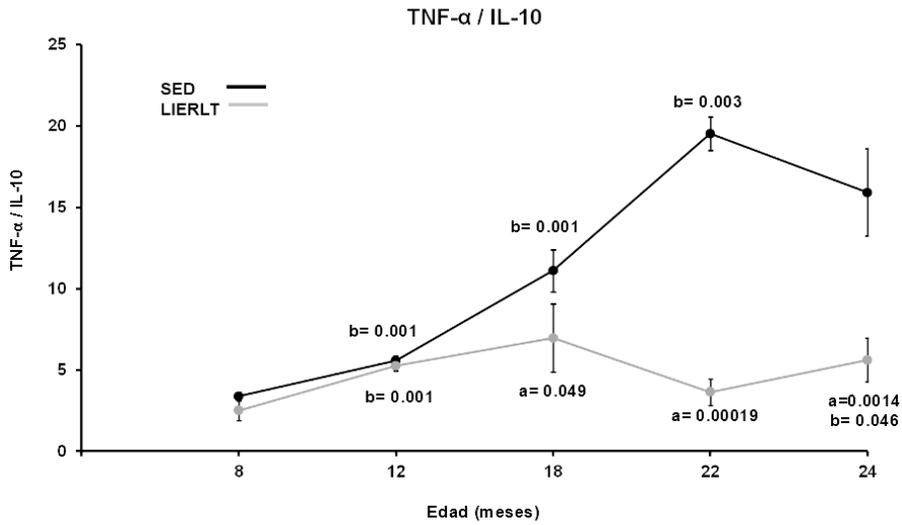


Figura 17. Relación de las citocinas TNF $\alpha$ /IL-10, en las diferentes edades de 4, 8, 12, 18, 22 y 24 meses de las ratas sedentarias (SED) y ratas con ejercicio (LIERLT). Media  $\pm$  desviación estándar (DE). a y b = p de significancia estadística.

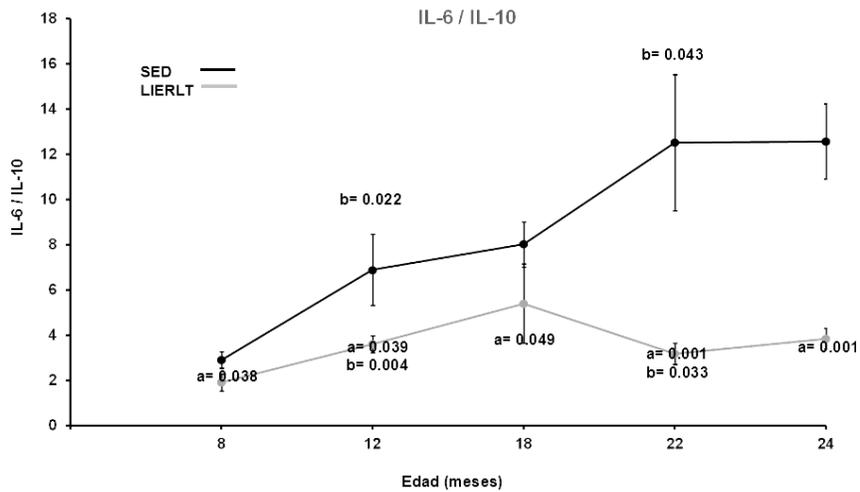


Figura 18. Relación de las citocinas IL-6/IL-10, en las diferentes edades de 4, 8, 12, 18, 22 y 24 meses de las ratas sedentarias (SED) y ratas con ejercicio (LIERLT). Media  $\pm$  desviación estándar (DE). a y b = p de significancia estadística.

## 7.7 Concentración de GDF-11 en suero

Se evaluó la concentración de GDF-11 en el suero de los animales y los resultados indican que, en ambos grupos, las concentraciones séricas de GDF-11 disminuyen con la edad (Figura 19). Sin embargo, entre los 12 y 18 meses de edad se aprecia una diferencia en las ratas LIERLT ya que presentan una mayor concentración de GDF-11 en comparación con las ratas SED. Estos datos indican, que la diferencia en la concentración sérica de GDF-11 (Figura 19) podría ser uno de los factores que inducen la mejora de la funcionalidad muscular (Figura 15) y la disminución de la grasa corporal (Figura 10) en ratas bajo un régimen de ejercicio leve.

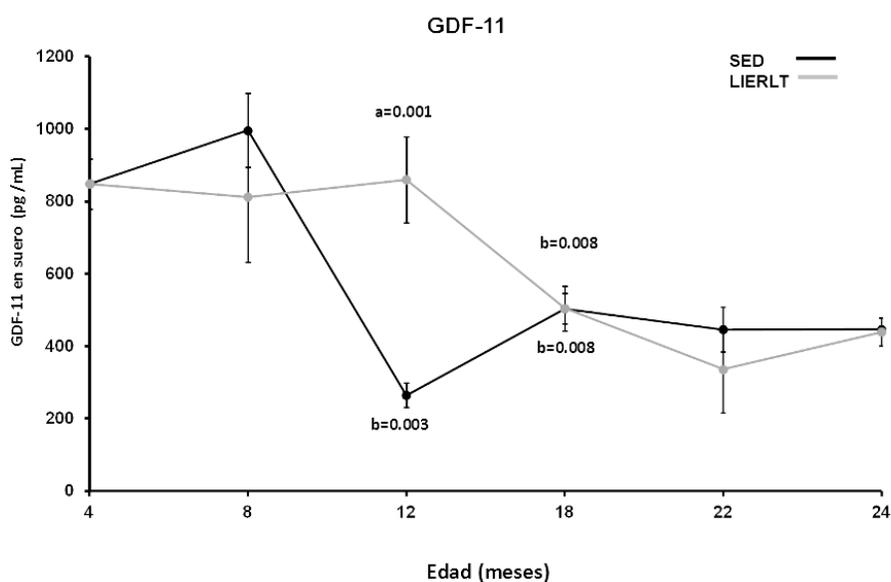


Figura 19. Niveles en suero de GDF11 en las diferentes edades de 4, 8, 12, 18, 22 y 24 meses de las ratas sedentarias (SED) y ratas con ejercicio (LIERLT). MEDIA  $\pm$  Desviación estándar (DE). a y b = p de significancia estadística.

### 7.8 Parámetros morfométricos y bioquímicos: Análisis de poblaciones.

Para establecer una relación entre los parámetros morfométricos y bioquímicos con los niveles de GDF-11, se realizó un análisis comparativo en nuestras poblaciones de ratas SED y LIERLT de 8 a 24 meses de edad. Los resultados muestran que las ratas LIERLT tienen un 7.32% más de LMWB ( $p=0.021$ ), 5.52% más BMD ( $p=0.014$ ) y 16.10% menos grasa ( $p=0.019$ ) que el grupo de ratas SED (Tabla 3). Con respecto a la funcionalidad muscular, las ratas LIERLT presentan un 33.68% más de fuerza que las ratas SED ( $p=0.0003$ ). En tanto, los parámetros bioquímicos relacionados con la pérdida, reparación y regeneración de la masa muscular (Tabla 2), se observó que los niveles de creatinina sérica fueron mayores en ratas LIERLT (33.33%,  $p=0.0007$ ) con un contenido de GDF-11 al 14.77% ( $p=0.031$ ) con respecto a las ratas SED.

<b>Variable</b>	<b>SED (8-24 meses)</b>	<b>LIERLT (8-24 meses)</b>	<b>Probabilidad</b>
<b>Fuerza</b>	33.84±10.03	45.24±9.41	<b>0.0003</b>
<b>Creatinina</b>	0.54±0.22	0.72±0.08	<b>0.0007</b>
<b>GDF11</b>	543.06±171.96	623.30±142.56	<b>0.031</b>
<b>IMC</b>	0.727±0.098	0.688±0.085	0.165
<b>% grasa</b>	30.92±6.53	25.94±7.21	<b>0.019</b>
<b>%FFBFM</b>	65.26±6.31	70.04±7.07	<b>0.021</b>
<b>%BMC</b>	3.80±0.28	4.01±0.28	<b>0.014</b>

Tabla 3. Comparación entre poblaciones, considerando la edad de 8 a 24 meses de las ratas sedentarias (SED) y ratas con ejercicio (LIERLT). Media ± desviación estándar (DE). p de significancia estadística. IMC: Índice de masa corporal, FFBFM: Masa libre de grasa y hueso, BMC: Contenido mineral óseo.

## 7.9 Estado redox y daño oxidante en las proteínas

El estrés oxidante se ha relacionado al envejecimiento y a las enfermedades asociadas a este tal como la OSO. Por ello, determinamos el estado redox a través del cociente GSH/GSSG y diferencias significativas a partir de los 8 meses de edad fueron observados en nuestros grupos experimentales. Específicamente, las ratas LIERLT presentaron un estado redox más reducido, es decir, la relación GSH/GSSG fue más alta (Figura 20) que las ratas SED en un 30.51% a los 8 meses ( $p=0.0012$ ), 28.91% a las 12 meses ( $p=0.0065$ ), 25.89% a los 18 meses ( $p=0.0078$ ), 26,53% a los 22 meses ( $p=0.0091$ ) y 250% a los 24 meses ( $p=0.00001$ ).

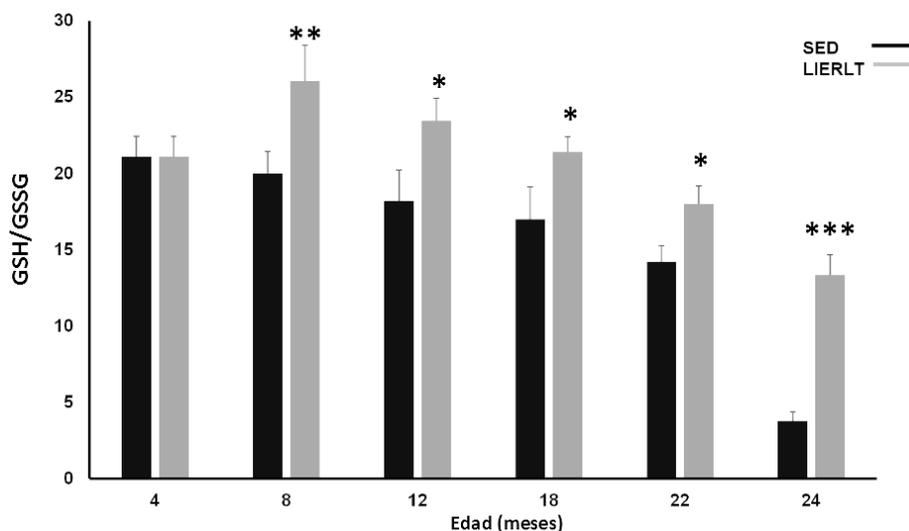


Figura 20. Niveles de GSH/GSSG en músculo, en las diferentes edades de 4, 8, 12, 18, 22 y 24 meses de las ratas sedentarias (SED) y ratas con ejercicio (LIERLT). Media  $\pm$  desviación estándar (DE). \* $p$  de significancia estadística en comparación con quien? Es muy evidente pero siempre es mejor aclararlo.

Los resultados del estado redox correlacionan con el daño oxidante evaluado por la oxidación de proteínas (Figura 21). A los 22 y 24 meses de edad, las ratas SED presentaron una carbonilación de proteínas mayor en comparación con las ratas LIERLT con un 31.10% para las ratas de 22 meses ( $p=0.0001$ ) y 44.11% en las ratas de 24 meses ( $p=0.0001$ ). Mientras que para el resto de las edades, no presentaron diferencias significativas.

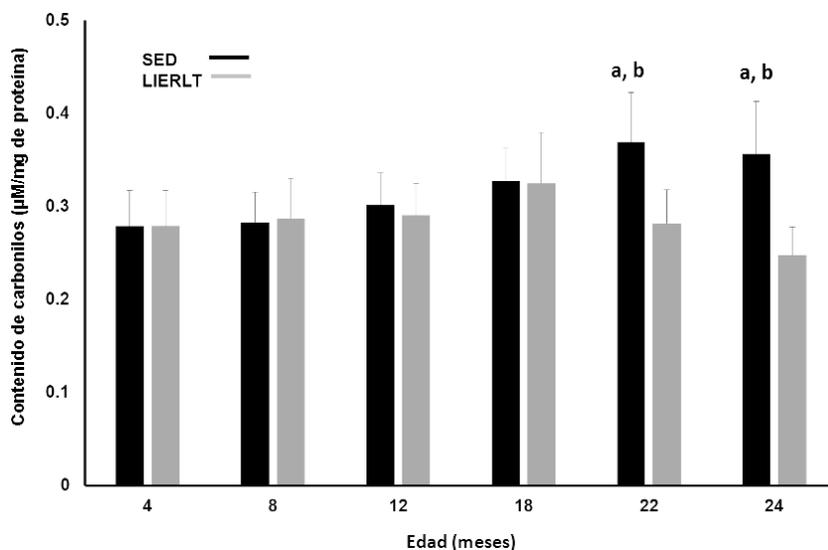


Figura 21. Niveles de carbonilación de proteínas en músculo, en las diferentes edades de 4, 8, 12, 18, 22 y 24 meses de las ratas sedentarias (SED) y ratas con ejercicio (LIERLT). Media  $\pm$  desviación estándar (DE). a y b= \*p de significancia estadística

### 7.10 Curva de Kaplan-Meier

Finalmente, para determinar el efecto benéfico del ejercicio de baja intensidad durante 24 meses, se determinó la supervivencia de las ratas mediante una curva de Kaplan-Meier en los grupos SED y LIELT. La curva de supervivencia indica que al reducir la grasa corporal y retrasar la pérdida de funcionalidad de la masa muscular afecta positivamente la tasa de supervivencia, posiblemente a través del aumento de la relación GSH/GSSG y la disminución del daño oxidante relacionado con el incremento de GDF-11. Los resultados de la Figura 22 muestran que el grupo SED tuvo solo una supervivencia del 30% a los 24 meses de edad, en tanto, las ratas LIERLT presentaron una supervivencia del 50%, lo que representa un aumento en la tasa de supervivencia del 66.66%.

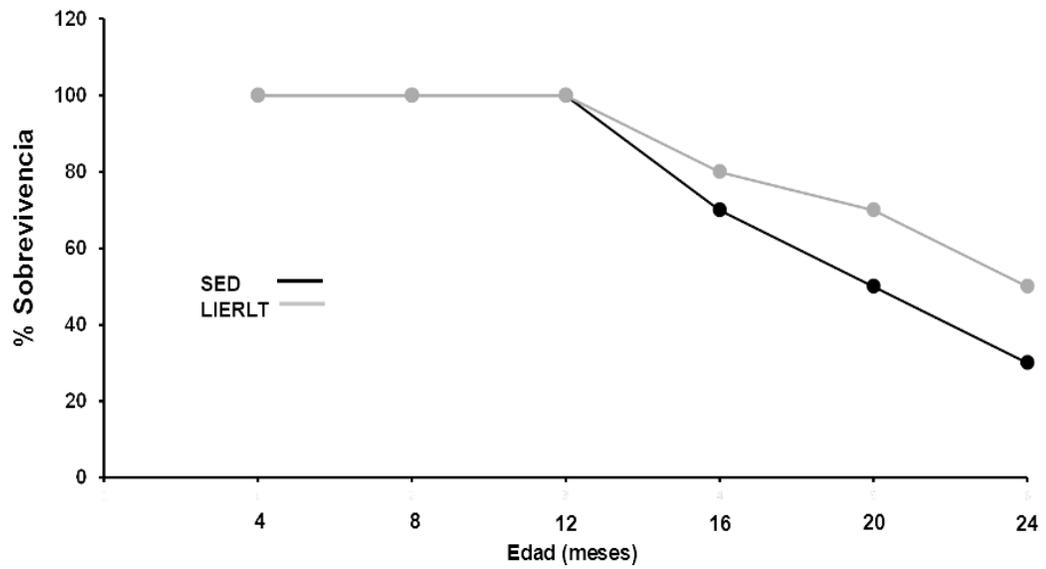


Figura 22. Supervivencia en las diferentes edades de 4, 8, 12, 18, 22 y 24 meses de las ratas sedentarias (SED) y ratas con ejercicio (LIERLT). Media  $\pm$  desviaci3n estandar (DE).

## 8. DISCUSIÓN

Numerosos estudios consideran al ejercicio como una intervención anti-envejecimiento dado sus efectos benéficos, entre los que destacan la mejora del tono muscular, la recuperación de la función cognitiva, la activación del metabolismo, la reducción del perfil inflamatorio y el retraso en la pérdida de masa muscular (Garatachea et al., 2015, Rebelo et al., 2018). Los programas de ejercicio mejor implementados incluyen diversas rutinas como entrenamiento de alta o moderada intensidad, técnicas aeróbicas de resistencia y técnicas de relajación muscular. Estas rutinas de ejercicio han demostrado sus efectos benéficos en programas de 3 a 12 meses, tanto en humanos como en roedores (Garatachea et al., 2015; Li et al., 2018); sin embargo, no existen estudios en roedores para rutinas de ejercicio a largo plazo durante toda la vida.

Por tanto, nuestro interés se centró en el establecimiento de un modelo OSO en rata sedentaria asociada al envejecimiento para identificar la participación del GDF11 como un factor involucrado en los efectos benéficos del ejercicio de baja intensidad (semejante a una caminata leve) a lo largo de toda la vida (largo plazo). En este estudio, por primera vez demostramos los beneficios de una rutina de ejercicio de baja intensidad y larga duración (LIERLT) que consiste de 30 min de ejercicio por 5 días a la semana durante 20 meses en ratas Wistar. Interesantemente, demostramos que esta rutina retrasa la aparición de la OSO en el envejecimiento. En línea con ello, un estudio prospectivo que dio seguimiento a adultos de 30 años por casi 8 años quienes realizaron actividad de baja intensidad durante 92 min a la semana (15 min por 6 días) incrementaron su esperanza de vida en casi 3 años más y su salud, que se reflejó en menor riesgo de mortalidad (14%). Además, cada 15 minutos adicionales de ejercicio diario, redujo aún más la mortalidad (hasta en un 4%) y la mortalidad por cáncer en un 1% (Wen et. al. 2011). En general, el practicar rutinas de ejercicio de alta intensidad, principalmente reduce el riesgo de caídas y lesiones (O'Keefe et al., 2018). Sugiriendo que la adaptación de la rutina LIERLT en humanos de mediana edad y ancianos podría tener grandes beneficios para la salud.

La OSO es un síndrome complejo que incluye el deterioro funcional óseo (osteopenia/osteoporosis), disminución de la masa y fuerza muscular (sarcopenia) y aumento de la grasa corporal (obesidad), las cuales están estrechamente relacionadas con los cambios corporales que ocurren durante el envejecimiento y, posiblemente, debido al efecto de otras enfermedades. La OSO se asocia con un bajo rendimiento físico, fragilidad, inmovilidad, caídas, fracturas y discapacidad (Kelly et al., 2019; JafariNasabian et al., 2017; Szlejf et al., 2017). Pese a su relevancia clínica, nos encontramos con pocos modelos en roedores y, en la mayoría, se induce obesidad a través de ovariectomía con la finalidad de observar los efectos en los músculos y los huesos durante el envejecimiento (Lin et al., 2018; Ezzat et al., 2017). Interesantemente, en condiciones estándar de laboratorio, cuando las ratas y ratones se crían con acceso *ad libitum* a los alimentos y poco entorno estimulante para el movimiento, tienden a desarrollar obesidad, hipertensión y resistencia a la insulina (Alessio et al., 2005; Mattson y Wan, 2005), lo cual apoya nuestro modelo de trabajo.

Los animales en condiciones sedentarias aumentan su grasa corporal entre un 30-50% pero sin desarrollar alteraciones metabólicas ni aumento en la concentración plasmática de glucosa, colesterol total y LDL; sugiriendo una adaptación metabólica a la obesidad. En humanos, se ha reportado un efecto similar en un estado particular de obesidad o sobrepeso que no presenta alteraciones metabólicas (Mayoral et al. 2020). Este estado se conoce como sobrepeso/obesidad metabólicamente saludable (MHO, por sus siglas en inglés *metabolically healthy obese*) y tiene una prevalencia del 36% en adultos jóvenes (Espinosa et al., 2018; Masih et al., 2021). Un estudio reciente, analizó una matriz genómica en individuos MHO, quienes mostraron una sobre-expresión de varias vías relacionadas con los procesos metabólicos lo que, parcialmente, podría explicar el proceso de adaptación de los individuos a la obesidad o al sobrepeso.

En contraparte con los datos metabólicos, los animales sedentarios presentan altas concentraciones de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$  (Oscari et al., 1969), cuyas características son consistentes con nuestro modelo de OSO asociado

a sedentarismo y envejecimiento. Es decir, las ratas del grupo SED aumentaron su grasa corporal por arriba del 30% a los 12 meses de edad (Figura 10), sin mostrar alteraciones en los parámetros bioquímicos relacionados con el metabolismo (Tabla 2) pero si un incremento de IL-6 y TNF- $\alpha$  (Figura 17 y 18).

En base a estudios previos en ratas y humanos (Collins et al., 2016; Rios et al., 2019) y, tomando en cuenta nuestros resultados, es posible proponer algunos puntos de corte con los que se caracterizó el modelo OSO en ratas hembras Wistar. Adicional a la obesidad, osteoporosis, sarcopenia y dinapenia, nuestro modelo presenta un aumento del perfil inflamatorio junto con un incremento del estrés oxidante. Por lo tanto, consideramos que nuestro modelo de OSO se asemeja a gran parte de las características clínicas observadas en pacientes.

En el caso de los animales sometidos a la rutina LIERLT, mostraron un bajo contenido de grasa corporal (Figure 10), un perfil anti-inflamatorio (Figuras 17 y 18) y un menor estrés oxidante (Figura 21); también presentaron un aumento del BMD (Figura 11) y retrasaron la aparición de sarcopenia (Figura 12 y 14), en comparación con las ratas SED durante el envejecimiento. Una de las principales ventajas de LIERLT es que puede ser realizado por todos los organismos que envejecen, incluidos aquellos con obesidad, falta de acondicionamiento físico y movilidad limitada. Diferentes autores han recomendado que las rutinas de ejercicio en ratas mayores de 18 meses no deben superar los 15 m/min, lo que equivale a una rutina de ejercicio de baja intensidad (Arnold et al., 2014; Arnold et al., 2017; Elsner et al., 2017). Puesto que, rutinas de ejercicio con velocidades superiores a 15 m/min pueden provocar un ejercicio exhaustivo, aumentando el estrés oxidante y dañando a tejidos como el músculo esquelético, el corazón, el hígado, los pulmones y los riñones en ratas viejas (Szlejf et al., 2017; Ezzat et al., 2017).

El aumento de grasa relacionado con la edad correlaciona con el deterioro muscular y óseo durante la OSO (Lin et al., 2018; Ezzat et al., 2017). Además, se ha observado que la grasa corporal aumenta en las ratas Wistar a lo largo de la vida, lo

que se ha relacionado con una disminución de la masa muscular, la BMD y la esperanza de vida (Fernández et al., 2019; Sertié et al., 2015; Ahima et al., 2019; Duque et al., 2009). Nuestros resultados, demuestran que la rutina LIERLT reduce la grasa corporal y aumenta la supervivencia de las ratas hasta en un 66% (Figura 22). En particular, la reducción de grasa corporal podría estar involucrada en mecanismos fisiológicos y moleculares relacionados con la disminución del estado inflamatorio, junto con el aumento de la respuesta antioxidante y la expresión de proteínas relacionadas con la regeneración muscular como el GDF-11.

El exceso de tejido adiposo también se ha relacionado con un aumento del estado inflamatorio y el estrés oxidante. De hecho, las ratas obesas tiene a la alza la concentración de IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , así como un incremento de ERO y malondialdehído en asociación con una disminución del ratio GSH/GSSG (Cavaliere et al., 2018; Kaya et al., 2014). Específicamente, las altas concentraciones de IL-6 y TNF- $\alpha$  están relacionadas directamente con la sarcopenia y la fragilidad tanto en humanos como en ratas (Li et al., 2018; Ferrucci et al., 2002; Visser et al., 2002; Tazawa et al., 2019). En nuestras condiciones, encontramos concentraciones bajas de citocinas pro-inflamatorias en el suero de ratas sometidas a LIERLT (Figura 16).

Para corroborar que la rutina LIERLT reduce el perfil inflamatorio, determinamos la relación (en términos de concentración) de citocinas pro-inflamatorias/anti-inflamatorias utilizando las relaciones TNF- $\alpha$ /IL-10 e IL-6/IL-10 (Figura 17 y 18) (Winger et al. 2011; Rong et al. 2018). Con esta estrategia evaluamos la inducción de un estado inflamatorio y la capacidad de los organismos para generar una respuesta compensatoria. Por tanto, uno de los mecanismos fisiológicos que se mejoran con LIERLT es la reducción del estado inflamatorio; esto correlaciona con diferentes reportes quienes indican que el ejercicio disminuye la expresión de marcadores inflamatorios relacionados con la obesidad tal como el NF- $\kappa$ B, IL-6, TNF- $\alpha$ , PCR, ciclooxigenasa 2 (COX2) en ratas Sprague Dawley obesas y envejecidas (Yu et al., 2019; Lee et al., 2014).

En un ambiente altamente pro-inflamatorio, como la obesidad, concurre con un mayor daño oxidante, cuyo escenario está determinado por la alza de enzimas como la NOX2 y la peroxiredoxina 2 (PRDX2). En contraparte, la SOD, la GPx y las concentraciones plasmáticas de GSH están disminuidas (Hussain et al., 2016; Manna y Jain, 2015; Singel y Segal, 2016, Vuolo et al., 2020). Esta misma relación de ambiente pro-inflamatorio y aumento del estrés oxidante ha sido ampliamente estudiada en el envejecimiento (Khansari et al., 2009). Por ejemplo, un estudio realizado por Annunziata y colaboradores en ratas viejas, determinaron una menor actividad de CAT, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa en el músculo gastrocnemio, junto con un aumento del estrés oxidante relacionado con un incremento en la expresión de IL-6 (Annunziata et al., 2020). En nuestro caso, determinamos que la rutina LIERLT redujo el estrés oxidante en aquellos animales sometidos al régimen de ejercicio moderado, en comparación a los animales sedentarios.

Bajo la premisa de que el ejercicio actúa como un factor anti-envejecimiento, evaluamos los niveles de GDF-11 que es una proteína relacionada con la regeneración y reparación del tejido muscular (Sinha et al., 2014). Los niveles de GDF-11 disminuyen y se relacionan con la disminución de las funciones fisiológicas, bioquímicas y estructurales a lo largo de la vida, principalmente en el sentido de la regeneración del músculo esquelético (Sinha et al., 2014; Poggioli et al., 2016). Las ratas del grupo LIERLT mostraron una elevada concentración en suero de GDF-11 en comparación con el grupo SED, de acuerdo a previos reportes en humanos y ratones (Loffredo et al., 2013; De Domenico et al., 2017; Poggioli et al., 2016; Elliott et al., 2017).

Curiosamente, en el estudio de Elliot y colaboradores, los individuos sedentarios tienen un mayor porcentaje de grasa corporal, sugiriendo una posible relación con los niveles de GDF-11. En este estudio observamos que, en ambos grupos, el porcentaje de grasa corporal aumentó con la edad. Sin embargo, las ratas LIERLT siempre presentaron un porcentaje de grasa menor que las SED, a excepción de los

18 meses de edad, donde no se observaron diferencias significativas por ser cambios dependientes de la edad. Curiosamente, entre los 12 y los 18 meses hay una disminución significativa de GDF-11 en ratas LIERLT; lo que refuerza la hipótesis que la expresión de GDF-11 estaría relacionada con el porcentaje de grasa corporal.

Adicionalmente, nuestros resultados muestran que, entre los 12 y 18 meses de edad, la supervivencia de la población de ratas SED disminuyó (Figura 22). Podríamos inferir que hay una relación entre los niveles de GDF-11 con la salud, la supervivencia y la longevidad. Esta idea se respalda a partir de un estudio en diferentes cepas de ratones donde los niveles más altos de GDF11 en la mediana edad están asociados con una mayor esperanza de vida (Zhou et al., 2016), en línea con ello, el GDF-11 aumenta con la edad en individuos sanos (Bueno et al., 2016). Es importante destacar que entre los 12 y los 18 meses de edad, las ratas hembras Wistar presentan una transición entre la edad adulta y la vejez, por lo que en este período se observa un cambio en el perfil hormonal y en los mecanismos de regulación epigenética (Guzmán et al., 2016). Sin embargo, se necesitan más estudios para dilucidar el papel del GDF-11 en la salud, la supervivencia y la longevidad.

Otra hipótesis para explicar los efectos benéficos de LIERLT podría estar relacionada con los mecanismos moleculares que relacionan los niveles de GDF-11 con el estrés oxidante. Recientemente, se ha reportado que la administración exógena de GDF-11 recombinante (rGDF-11) redujo el daño miocárdico después de un evento de isquemia-reperfusión, lo que refleja una mejor función cardíaca a través del aumento de la expresión de la HO-1 (Su et al., 2019). Otro trabajo informó que la administración de rGDF-11 durante 4 semanas a ratones viejos, disminuyó la oxidación de lípidos en correlación con el aumento de la respuesta antioxidante (Bueno et al., 2016).

Por tanto, es posible indicar que la función anti-envejecimiento del GDF-11 estaría relacionada con un papel antioxidante. En relación a ello, nuestros resultados

muestran una correlación entre las altas concentraciones de GDF-11 en el suero de ratas LIERLT y un menor daño oxidante junto con mejor estado redox en las ratas. La disminución del daño oxidante trae consigo un menor deterioro del tejido muscular y, consecuentemente, una mayor cantidad de tejido sano y funcional así como un aumento de la supervivencia de los animales. Sin embargo, es necesario corroborar esta premisa para demostrar el rol antioxidante del GDF-11 y dilucidar los mecanismos moleculares que se activan con la rutina de ejercicio LIERLT, principalmente aquellos que responden a modificaciones del estado redox, respuesta antioxidante y metabolismo del GSH.

En resumen, hemos reportado por primera vez los beneficios del entrenamiento bajo un régimen moderado de ejercicio durante 20 meses en ratas hembra Wistar con OSO. Los efectos favorables de la rutina LIERLT se observaron en cada una de las etapas de la vida de las ratas, pues se aprecia un aumento de la masa y fuerza muscular, así como de la BMD y la respuesta antioxidante. Molecularmente, los mecanismos de protección podrían relacionarse con el aumento de GDF-11, la disminución de la grasa corporal y de la inflamación. Clínicamente, podríamos proponer que la rutina de ejercicios LIERLT puede ser realizado por personas con bajo rendimiento físico y con sobrepeso u obesidad, promoviendo una mejor calidad de vida en la vejez.**9.**

## **9. CONCLUSIONES**

A través de nuestro modelo, logramos describir que el ejercicio leve a largo plazo: (1) disminuye el porcentaje de grasa, (2) evita la pérdida muscular (%FFBFM) y (3) evita la pérdida de hueso (BMD), (4) mejora el estado redox y el estado inflamatorio, (5) retrasa la disminución de los niveles de GDF11 en suero a lo largo del tiempo, así como (6) incrementar la sobrevivencia. Aunado a lo anterior, el modelo nos permitió postular dos hipótesis sobre los posibles mecanismos implicados en la relación del GDF11 con los depósitos de la grasa y el estrés oxidante. En general, un mejor

estado físico a lo largo de la vida evitaría el establecimiento de distintas enfermedades asociadas a la edad, tal como la OSO.

Condición Tejido	Sedentarias 	Ejercicio leve de largo plazo 
Músculo 	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Disminuye el estado <u>redox</u> (GSH/GSSG) con el envejecimiento.</li> <li>➤ Incrementa el daño oxidante a proteínas con el envejecimiento.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Conservan un mejor estado <u>redox</u> (GSH/GSSG) a lo largo de la vida.</li> <li>✓ Mantienen un nivel de daño sostenido con la edad.</li> </ul>
Suero 	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Incremento de la inflamación (cocientes IL-6/IL-10 y TNF<math>\alpha</math>/IL-10) con el envejecimiento.</li> <li>➤ Disminuyen los niveles de GDF11 desde los 12 meses</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Disminución de la inflamación (cocientes IL-6/IL-10 y TNF<math>\alpha</math>/IL-10) con el envejecimiento.</li> <li>✓ Los niveles de GDF11 se mantienen hasta una edad más tarde en comparación con las sedentarias.</li> </ul>
Sobrevivencia	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Disminuye a partir de la edad media.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Disminuye a partir de la edad media, atenuándose en comparación con las sedentarias al final de la vida.</li> </ul>

Tabla 4. Resumen de los resultados del proyecto de investigación.

## 10. PERSPECTIVAS

- Estudiar los mecanismos moleculares que ocurren en la pérdida del músculo y hueso así como el incremento de la grasa.
- Indagar la participación de moléculas como Pax7, MyoD, Myf5 y miogenina en el proceso de regeneración muscular y su papel en el ejercicio leve y el sedentarismo.
- Estudiar el proceso de dinámica mitocondrial en el modelo de OSO y el ejercicio.

## 11. REFERENCIAS

- Aartolahti E, Lönnroos E, Hartikainen S, Häkkinen A. (2020). Long-term strength and balance training in prevention of decline in muscle strength and mobility in older adults. *Aging Clin Exp Res.* 32(1):59-66.
- Abd El-Kader SM, Al-Shreef FM. (2018). Inflammatory cytokines and immune system modulation by aerobic versus resisted exercise training for elderly. *Afr Health Sci.*18(1):120-131.
- Abreu P, Vitzel KF, Monteiro IC, Lima TI, Queiroz AN, Leal-Cardoso JH, Hirabara SM, Ceccatto VM. (2016). Effects of endurance training on reduction of plasma glucose during high intensity constant and incremental speed tests in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res.* 49(11):e5226.
- Ahima RS. (2009). Connecting obesity, aging and diabetes. *Nat Med.* ;15(9):996-7.
- Ahn B, Smith N, Saunders D, Ranjit R, Kneis P, Towner RA, Van Remmen H. (2019). Using MRI to measure in vivo free radical production and perfusion dynamics in a mouse model of elevated oxidative stress and neurogenic atrophy. *Redox Biol.* 26:101308.
- Alessio HM, Hagerman AE, Nagy S, Philip B, Byrnes RN, Woodward JL, Callahan P, Wiley RL. (2005). Exercise improves biomarkers of health and stress in animals fed ad libitum. *Physiol Behav.* 84(1):65-72.
- Algoritmo de obesidad de la Sociedad Americana de Médicos Bariátricos (ASBP). 2015. <http://www.asbp.org/obesityalgorithm.html>.
- Almeida, M., Laurent, M. R., Dubois, V., Claessens, F., O'Brien, C. A., Bouillon, R., Vanderschueren, D., & Manolagas, S. C. (2017). Estrogens and Androgens in Skeletal Physiology and Pathophysiology. *Physiological reviews*, 97(1), 135–187.
- Angione AR, Jiang C, Pan D, Wang YX, Kuang S. (2011). PPAR $\delta$  regulates satellite cell proliferation and skeletal muscle regeneration. *Skelet Muscle.* Nov 1;1(1):33.
- Annunziata G, Jimenez-García M, Tejada S, Moranta D, Arnone A, Ciampaglia R, Tenore GC, Sureda A, Novellino E, Capó X. (2020) Grape Polyphenols Ameliorate Muscle Decline Reducing Oxidative Stress and Oxidative Damage in Aged Rats. *Nutrients.*12(5):1280.

- Aoyama, K., & Nakaki, T. (2015). Glutathione in Cellular Redox Homeostasis: Association with the Excitatory Amino Acid Carrier 1 (EAAC1). *Molecules* (Basel, Switzerland), 20(5), 8742–8758.
- Appenzeller-Herzog C. (2011). Glutathione- and non-glutathione-based oxidant control in the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci.*124(Pt 6):847-55.
- Arnold JC, Salvatore MF. (2014). Getting to compliance in forced exercise in rodents: a critical standard to evaluate exercise impact in aging-related disorders and disease. *J Vis Exp.* 22; (90):51827.
- Arnold JC, Cantu MA, Kasanga EA, Nejték VA, Papa EV, Bugnariu N, Salvatore MF. (2017). Aging-related Limit of Exercise Efficacy on Motor Decline. *PLoS One*; 12(11):e0188538.
- Arthur ST, Cooley ID. (2012). The effect of physiological stimuli on sarcopenia; impact of Notch and Wnt signaling on impaired aged skeletal muscle repair. *Int J Biol Sci.* 8(5):731-60.
- Arroyo P, Lera L, Sánchez H, Bunout D, Santos JL, Albala C. (2007). Indicadores antropométricos, composición corporal y limitaciones funcionales en ancianos [Anthropometry, body composition and functional limitations in the elderly]. *Rev Med Chil.* Jul;135(7):846-54.
- Bacallao Méndez Raymed, Badell Moore Aymara. (2015). La creatinina como indicador del tejido muscular esquelético y el estado nutricional. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición.* 1: S4-S2
- 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.* Feb;96:10-15.
- Barbour KE, Lui LY, Ensrud KE, Hillier TA, LeBlanc ES, Ing SW, Hochberg MC, Cauley JA; Study of Osteoporotic Fractures (SOF) Research Group. (2014). Inflammatory markers and risk of hip fracture in older white women: the study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res.* Sep;29(9):2057-64.
- Bartell SM, Rayalam S, Ambati S, Gaddam DR, Hartzell DL, Hamrick M, She JX, Della-Fera MA, Baile CA. (2011). Central (ICV) leptin injection increases bone formation, bone mineral density, muscle mass, serum IGF-1, and the expression of osteogenic genes in leptin-deficient ob/ob mice. *J Bone Miner Res.* 26(8):1710-20.
- Bastarrachea RA, López-Alvarenga JC, Bolado-García VE, Téllez-Mendoza J, Laviada-Molina H, Comuzzie AG. (2007). Macrófagos, inflamación, tejido adiposo, obesidad y resistencia a la insulina [Macrophages, inflammation,

adipose tissue, obesity and insulin resistance]. *Gac Med Mex*. Nov-Dec;143(6):505-12.

- Baumgartner RN, Koehler KM, Gallagher D, Romero L, Heymsfield SB, Ross RR, Garry PJ, Lindeman RD. (1998). Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am J Epidemiol*. 147(8):755-63.
- Belaya I, Suwa M, Chen T, Giniatullin R, Kanninen KM, Atalay M, Kumagai S. (2018). Long-Term Exercise Protects against Cellular Stresses in Aged Mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2018:2894247.
- Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R (2018). Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 1865(5):721-733.
- Bian AL, Hu HY, Rong YD, Wang J, Wang JX, Zhou XZ. (2017). A study on relationship between elderly sarcopenia and inflammatory factors IL-6 and TNF- $\alpha$ . *Eur J Med Res*. Jul 12;22(1):25.
- Bin Z, Yanli Y, Zhen Q, Qingtao M, Zhongyuan X. (2020). GDF11 ameliorated myocardial ischemia reperfusion injury by antioxidant stress and up-regulating autophagy in STZ-induced type 1 diabetic rats. *Acta Cir Bras*. 34(11):e201901106.
- Blaak E. (2001). Gender differences in fat metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 4(6):499-502.
- Bohannon, R. W., & Magasi, S. (2015). Identification of dynapenia in older adults through the use of grip strength t-scores. *Muscle & nerve* 51(1), 102–105.
- Bollheimer LC, Buettner R, Pongratz G, Brunner-Ploss R, Hechtel C, Banas M, Singler K, Hamer OW, Stroszczyński C, Sieber CC, Fellner C. (2012). Sarcopenia in the aging high-fat fed rat: a pilot study for modeling sarcopenic obesity in rodents. *Biogerontology*.13(6):609-20.
- Brack AS, Conboy MJ, Roy S, Lee M, Kuo CJ, Keller C, Rando TA. (2007). Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science*. 317(5839):807-10.
- Bradford, P. G., Gerace, K. V., Roland, R. L., & Chrzan, B. G. (2010). Estrogen regulation of apoptosis in osteoblasts. *Physiology & behavior*, 99(2), 181–185.
- Braune J, Weyer U, Hobusch C, Mauer J, Brüning JC, Bechmann I, Gericke M. (2017). IL-6 Regulates M2 Polarization and Local Proliferation of Adipose Tissue Macrophages in Obesity. *J Immunol*.198(7):2927-2934.

- Brown LA, Perry RA Jr, Haynie WS, Lee DE, Rosa-Caldwell ME, Brown JL, Greene NP, Wolchok JC, Washington TA. (2021). Moderators of skeletal muscle maintenance are compromised in sarcopenic obese mice. *Mech Ageing Dev.* 194:111404.
- Bruce CR, Dyck DJ. (2004). Cytokine regulation of skeletal muscle fatty acid metabolism: effect of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 287(4):E616-21.
- Buelna-Chontal M, García-Niño WR, Silva-Palacios A, Enríquez-Cortina C, Zazueta C. (2021). Implications of Oxidative and Nitrosative Post-Translational Modifications in Therapeutic Strategies against Reperfusion Damage. *Antioxidants (Basel)*. May 8;10(5):749.
- Bueno JL, Ynigo M, de Miguel C, Gonzalo-Daganzo RM, Richart A, Vilches C, Regidor C, García-Marco JA, Flores-Ballester E, Cabrera JR. (2016). Growth differentiation factor 11 (GDF11) - a promising anti-ageing factor - is highly concentrated in platelets. *Vox Sang.*; 111 (4):434-436.
- Calabrese E.J (2001). Overcompensation stimulation: A mechanism for hormetic effects. *Crit. Rev. Toxicol.* 31:425–470.
- Can B, Kara O, Kizilarlanoglu MC, Arik G, Aycicek GS, Sumer F, Civelek R, Demirtas C, Ulger Z. (2017). Serum markers of inflammation and oxidative stress in sarcopenia. *Aging Clin Exp Res.* 29(4):745-752.
- Carlson ME, Suetta C, Conboy MJ, Aagaard P, Mackey A, Kjaer M, Conboy I. (2009). Molecular aging and rejuvenation of human muscle stem cells. *EMBO Mol Med.* Nov;1(8-9):381-91.
- Carson, J. A., & Manolagas, S. C. (2015). Effects of sex steroids on bones and muscles: Similarities, parallels, and putative interactions in health and disease. *Bone*, 80, 67–78.
- Carvajal Carvajal, Carlos (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidante. *Med. leg. Costa Rica [online]*.36 (1): 91-100. ISSN 2215-5287.
- Cavaliere G, Viggiano E, Trinchese G, De Filippo C, Messina A, Monda V, Valenzano A, Cincione RI, Zammit C, Cimmino F, Catapano A, Sessa F, Messina G, Monda M, Crispino M, Mollica MP. (2018). Long Feeding High-Fat Diet Induces Hypothalamic Oxidative Stress and Inflammation, and Prolonged Hypothalamic AMPK Activation in Rat Animal Model. *Front Physiol.*; 9:818.
- Cawthorn WP, Sethi JK. (2007). TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett.* 2008 Jan 9;582(1):117-31.

- Chen CW, Kuo YC, How CK, Juan CC. (2020). Long-term aerobic exercise training-induced anti-inflammatory response and mechanisms: Focusing on the toll-like receptor 4 signaling pathway. *Chin J Physiol.*63(6):250-255.
- Chen Q, Shou P, Zheng C, Jiang M, Cao G, Yang Q, Cao J, Xie N, Velletri T, Zhang X, Xu C, Zhang L, Yang H, Hou J, Wang Y, Shi Y. (2016). Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death Differ.* 23(7):1128-39.
- Choi, H. M., Doss, H. M., & Kim, K. S. (2020). Multifaceted Physiological Roles of Adiponectin in Inflammation and Diseases. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1219.
- Coen G. (2004). Leptin and bone metabolism. *J Nephrol.*17(2):187-9.
- Collins, B. C., Laakkonen, E. K., & Lowe, D. A. (2019). Aging of the musculoskeletal system: How the loss of estrogen impacts muscle strength. *Bone*, 123, 137–144.
- Collins KH, Hart DA, Reimer RA, Seerattan RA, Waters-Banker C, Sibole SC, Herzog W. (2016). High-fat high-sucrose diet leads to dynamic structural and inflammatory alterations in the rat vastus lateralis muscle. *J Orthop Res.* 34(12):2069-2078.
- Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA. (2005). Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature.* 433(7027):760-4.
- Cruz-Jentoft, A. J., Baeyens, J. P., Bauer, J. M., Boirie, Y., Cederholm, T., Landi, F., Martin, F. C., Michel, J. P., Rolland, Y., Schneider, S. M., Topinková, E., Vandewoude, M., Zamboni, M., & European Working Group on Sarcopenia in Older People (2010). Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age and ageing*, 39(4), 412–423.
- Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, et al. (2019). Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis [published correction appears in *Age Ageing*. 48(4):601]. *Age Ageing*.;48(1):16-31.
- Cuamani Mitznahuatl G, García Arenas ON (2016). El papel emergente del factor nuclear eritroide 2 Nrf2 en la neuroprotección mediada por astrocitos. *Revista Mexicana de Neurociencia.* 17(5): 49-59.
- De Benedetti F, Rucci N, Del Fattore A, Peruzzi B, Paro R, Longo M, Vivarelli M, Muratori F, Berni S, Ballanti P, Ferrari S, Teti A. (2006). Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: a model for the

impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis Rheum.*54(11):3551-63.

- De Domenico E, D'Arcangelo G, Faraoni I, Palmieri M, Tancredi V, Graziani G, Grimaldi P, Tentori L. (2017). Modulation of GDF11 expression and synaptic plasticity by age and training. *Oncotarget.* 8(35):57991-58002.
- Degens H. (2007). Age-related skeletal muscle dysfunction: causes and mechanisms. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* Jul-Sep;7(3):246-52.
- Denzoin Vulcano, L A; Soraci, Alejandro L; Tapia, MO (2013). Homeostasis del glutati3n. *Acta Bioqu3mica Cl3nica Latinoamericana,* 47(3):529-539.
- Dhillon, R. J., & Hasni, S. (2017). Pathogenesis and Management of Sarcopenia. *Clinics in geriatric medicine,* 33(1), 17–26.
- Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. (2011). Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.*;20(1):5-14.
- Dodds, R. M., Syddall, H. E., Cooper, R., Kuh, D., Cooper, C., & Sayer, A. A. (2016). Global variation in grip strength: a systematic review and meta-analysis of normative data. *Age and ageing,* 45(2), 209–216.
- Donges CE, Duffield R, Drinkwater EJ. (2010). Effects of resistance or aerobic exercise training on interleukin-6, C-reactive protein, and body composition. *Med Sci Sports Exerc.* 42(2):304-13.
- Dosunmu-Ogunbi AM, Wood KC, Novelli EM, Straub AC (2019). Decoding the role of SOD2 in sickle cell disease. *Blood Adv.* 3(17):2679-2687.
- Duque G, Rivas D, Li W, Li A, Henderson JE, Ferland G, Gaudreau P. (2009). Age-related bone loss in the LOU/c rat model of healthy ageing. *Exp Gerontol.*; 44(3):183-9.
- Egerman MA, Cadena SM, Gilbert JA, Meyer A, Nelson HN, Swalley SE, Mallozzi C, Jacobi C, Jennings LL, Clay I, Laurent G, Ma S, Brachat S, Lach-Trifilieff E, Shavlakadze T, Trendelenburg AU, Brack AS, Glass DJ. (2015). GDF11 Increases with Age and Inhibits Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Metab.* 22(1):164-74.
- Elliott BT, Herbert P, Sculthorpe N, Grace FM, Stratton D, Hayes LD. (2017). Lifelong exercise, but not short-term high-intensity interval training, increases GDF11, a marker of successful aging: a preliminary investigation. *Physiol Rep.*; 5(13):e13343.
- Elsner VR, Basso C, Bertoldi K, de Meireles LC, Cechinel LR, Siqueira IR. (2017). Differential effect of treadmill exercise on histone deacetylase

activity in rat striatum at different stages of development. *J Physiol Sci.*; 67(3):387-394.

- Espinosa De Ycaza AE, Donegan D, Jensen MD. (2018). Long-term metabolic risk for the metabolically healthy overweight/obese phenotype. *Int J Obes (Lond)*. 42(3):302-309.
- Ezzat-Zadeh Z, Kim JS, Chase PB, Arjmandi BH. (2017). The Cooccurrence of Obesity, Osteoporosis, and Sarcopenia in the Ovariectomized Rat: A Study for Modeling Osteosarcopenic Obesity in Rodents. *J Aging Res*. 2017:1454103.
- Fernández A, Mazuecos L, Pintado C, Rubio B, López V, de Solís AJ, Rodríguez M, Andrés A, Gallardo N. (2019). Effects of Moderate Chronic Food Restriction on the Development of Postprandial Dyslipidemia with Ageing. *Nutrients.*; 11(8):1865.
- Ferrucci L, Penninx BW, Volpato S, Harris TB, Bandeen-Roche K, Balfour J, et al. (2002). Change in muscle strength explains accelerated decline of physical function in older women with high interleukin-6 serum levels. *J Am Geriatr Soc.*; 50:1947–54.
- Fife E, Kostka J, Kroc Ł, Guligowska A, Pigłowska M, Sołtysik B, Kaufman-Szymczyk A, Fabianowska-Majewska K, Kostka T. (2018). Relationship of muscle function to circulating myostatin, follistatin and GDF11 in older women and men. *BMC Geriatr*.18(1):200.
- Flatt T. (2012) A new definition of aging? *Front Genet*. 3:148. 65. Forman, H. J., Zhang, H., & Rinna, A. (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular aspects of medicine*, 30(1-2), 1–12.
- Flores-Opazo M, McGee SL, Hargreaves M. (2020). Exercise and GLUT4. *Exerc Sport Sci Rev*. 48(3):110-118.
- Frigolet ME, Gutiérrez-Aguilar R. (2020). The colors of adipose tissue. *Gac Med Mex.*;156(2):142-149.
- Frimel TN, Sinacore DR, Villareal DT. (2008). Exercise attenuates the weight-loss-induced reduction in muscle mass in frail obese older adults. *Med Sci Sports Exerc*. 40(7):1213-9.
- Fulle S, Belia S, Di Tano G. (2005). Sarcopenia is more than a muscular deficit. *Arch Ital Biol*. 143(3-4):229-34.
- Fujita S, Abe T, Drummond MJ, Cadenas JG, Dreyer HC, Sato Y, Volpi E, Rasmussen BB. (2007). Blood flow restriction during low-intensity resistance exercise increases S6K1 phosphorylation and muscle protein synthesis. *J Appl Physiol* (1985).103(3):903-10.

- Galicia-Moreno, M., Lucano-Landeros, S., Monroy-Ramirez, H. C., Silva-Gomez, J., Gutierrez-Cuevas, J., Santos, A., & Armendariz-Borunda, J. (2020). Roles of Nrf2 in Liver Diseases: Molecular, Pharmacological, and Epigenetic Aspects. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 9(10), 980.
- Galloza J, Castillo B, Micheo W. (2017). Benefits of Exercise in the Older Population. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 28(4):659-669.
- Garatachea N, Pareja-Galeano H, Sanchis-Gomar F, Santos-Lozano A, Fiuza-Luces C, Morán M, Emanuele E, Joyner MJ, Lucia A. (2015). Exercise attenuates the major hallmarks of aging. *Rejuvenation Res.* 18(1):57-89.
- Garatachea N, Santos-Lozano A, Hughes DC, Gómez-Cabello A, Ara I. (2017). Physical Exercise as an Effective Antiaging Intervention. *Biomed Res Int.* 7317609.
- García-Hermoso A, Ramirez-Vélez R, Sáez de Asteasu ML, Martínez-Velilla N, Zambom-Ferraresi F, Valenzuela PL, Lucia A, Izquierdo M. (2020). Safety and Effectiveness of Long-Term Exercise Interventions in Older Adults: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Sports Med.*50(6):1095-1106.
- Gaucher, C., Boudier, A., Bonetti, J., Clarot, I., Leroy, P., & Parent, M. (2018). Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 7(5), 62.
- Gerbaix M, Metz L, Ringot E, Courteix D. (2010). Visceral fat mass determination in rodent: validation of dual-energy X-ray absorptiometry and anthropometric techniques in fat and lean rats. *Lipids Health Dis.* 9:140.
- Giknis M. L. A., Clifford C. Clinical laboratory parameters for CrI: WI (Han) Charles River Laboratories. 2008;14. [https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference\\_id/1873773](https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference_id/1873773)
- Gremeaux V, Gayda M, Lepers R, Sosner P, Juneau M, Nigam A. (2012). Exercise and longevity. *Maturitas.* 73(4):312-7.
- Guzmán C, Cabrera R, Cárdenas M, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E. (2006). Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J Physiol.* 2006 Apr 1;572(Pt 1):97-108.
- Hammers DW, Merscham-Banda M, Hsiao JY, Engst S, Hartman JJ, Sweeney HL. (2017). Supraphysiological levels of GDF11 induce striated muscle atrophy. *EMBO Mol Med.*9(4):531-544.

- Hansen RE, Roth D, Winther JR. (2009). Cuantificación del estado global de tiol-disulfuro celular. *Proc Natl Acad Sci U S A*.106(2):422-7.
- Harman D (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 11(3):298-300.
- Heineke J, Auger-Messier M, Xu J, Sargent M, York A, Welle S, Molkentin JD. (2010). Genetic deletion of myostatin from the heart prevents skeletal muscle atrophy in heart failure. *Circulation*.121:419–425.
- Hernández-Arciga U, Herrera M LG, Ibáñez-Contreras A, Miranda-Labra RU, Flores-Martínez JJ, Königsberg M. (2018). Baseline and post-stress seasonal changes in immunocompetence and redox state maintenance in the fishing bat *Myotis vivesi*. *PLoS One*. 13(1):e0190047.
- Hernández-Álvarez D, Mena-Montes B, Toledo-Pérez R, Pedraza-Vázquez G, López-Cervantes SP, Morales-Salazar A, Hernández-Cruz E, Lazzarini-Lechuga R, Vázquez-Cárdenas RR, Vilchis-DeLaRosa S, Posadas-Rodríguez P, Santín-Márquez R, Rosas-Carrasco O, Ibañez-Contreras A, Alarcón-Aguilar A, López-Díazguerrero NE, Luna-López A, Königsberg M. (2019). Long-Term Moderate Exercise Combined with Metformin Treatment Induces an Hormetic Response That Prevents Strength and Muscle Mass Loss in Old Female Wistar Rats. *Oxid Med Cell Longev*.2019:3428543.
- Hinken AC, Powers JM, Luo G, Holt JA, Billin AN, Russell AJ. (2016). Lack of evidence for GDF11 as a rejuvenator of aged skeletal muscle satellite cells. *Aging Cell*.15(3):582-4.
- Hofer T, Fontana L, Anton SD, Weiss EP, Villareal D, Malayappan B, Leeuwenburgh C. (2008). Long-term effects of caloric restriction or exercise on ADN and RNA oxidation levels in white blood cells and urine in humans. *Rejuvenation Res*.11(4):793-9.
- Hojman P. (2017). Exercise protects from cancer through regulation of immune function and inflammation. *Biochem Soc Trans*. 45(4):905-11. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. (2010). Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)*. 49(7):1215-28.
- Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MC, Rahu N. (2016). Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev*.; 2016:7432797.
- Idorn M, Hojman P. (2016). Exercise-Dependent Regulation of NK Cells in Cancer Protection. *Trends Mol Med*. 22(7):565-577.

- Idorn M, Thor Straten P. (2017). Exercise and cancer: from "healthy" to "therapeutic"? *Cancer Immunol Immunother.* 66(5):667-671.
- Idriss HT, Naismith JH. (2000). TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech.* 50(3):184-95.
- Ilich JZ, Kelly OJ, Inglis JE, Panton LB, Duque G, Ormsbee MJ. (2014). Interrelationship among muscle, fat, and bone: connecting the dots on cellular, hormonal, and whole body levels. *Ageing Res Rev.* 15:51-60.
- Ilich, J. Z., Kelly, O. J., & Inglis, J. E. (2016). Osteosarcopenic Obesity Syndrome: What Is It and How Can It Be Identified and Diagnosed?. *Current gerontology and geriatrics research*, 7325973.
- Imai, Y., Kondoh, S., Kouzmenko, A., & Kato, S. (2010). Minireview: osteoprotective action of estrogens is mediated by osteoclastic estrogen receptor-alpha. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.), 24(5), 877–885.
- Izaola, Olatz, Luis, Daniel de, Sajoux, Ignacio, Domingo, Joan Carles, & Vidal, Montserrat. (2015). Inflamación y obesidad (lipoinflamación). *Nutrición Hospitalaria*, 31(6), 2352-2358.
- JafariNasabian, P., Inglis, J. E., Kelly, O. J., & Ilich, J. Z. (2017). Osteosarcopenic obesity in women: impact, prevalence, and management challenges. *International journal of women's health*, 9, 33–42.
- Jamaiyar A, Wan W, Janota DM, Enrick MK, Chilian WM, Yin L. (2017). The versatility and paradox of GDF 11. *Pharmacol Ther.* 175:28-34.
- Jang, Y. C., Rodriguez, K., Lustgarten, M. S., Muller, F. L., Bhattacharya, A., Pierce, A., Choi, J. J., Lee, N. H., Chaudhuri, A., Richardson, A. G., & Van Remmen, H. (2020). Superoxide-mediated oxidative stress accelerates skeletal muscle atrophy by synchronous activation of proteolytic systems. *GeroScience*, 42(6), 1579–1591.
- Jeanplong F, Falconer SJ, Oldham JM, Maqbool NJ, Thomas M, Hennebry A, McMahon CD. (2014). Identification and expression of a novel transcript of the growth and differentiation factor-11 gene. *Mol Cell Biochem.* 390(1-2):9-18.
- Johnson FB, D A Sinclair, L Guarente (1999) Molecular biology of aging. *Cell.* 22;96(2):291-302.
- Johnson ML, Irving BA, Lanza IR, Vendelbo MH, Konopka AR, Robinson MM, Henderson GC, Klaus KA, Morse DM, Heppelmann C, Bergen HR 3rd, Dasari S, Schimke JM, Jakaitis DR, Nair KS. (2015). Differential Effect of Endurance Training on Mitochondrial Protein Damage, Degradation, and

Acetylation in the Context of Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. Nov;70(11):1386-93.

- Ju A, Cheon YH, Lee KS, Lee SS, Lee WY, Won WY, Park SI, Kim WH, Kim DJ. (2011). The change of plasma ghrelin and leptin levels by the development of type 2 diabetes mellitus in patients with alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res*.35(5):905-11.
- Katsiki N, Mantzoros C, Mikhailidis DP. (2017). Adiponectin, lipids and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 28(4):347-354.
- Kang S, Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. (2019). Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. *Immunity*. 50(4):1007-1023.
- Kaser S, Kaser A, Vogel W, Patsch JR, Tilg H. (2002). Interferon-alpha suppresses leptin levels: studies in interferon-alpha treated patients with hepatitis C virus infection and murine adipocytes. *Eur Cytokine Netw*. 13(2):225-9.
- Kaya MS, Bayiroglu F, Mis L, Kilinc D, Comba B. (2014). In case of obesity, longevity-related mechanisms lead to anti-inflammation. *Age (Dordr)*.; 36(2):677-87.
- Keramidaki K, Tsagari A, Hiona M, Risvas G. (2019). Osteosarcopenic obesity, the coexistence of osteoporosis, sarcopenia and obesity and consequences in the quality of life in older adults  $\geq 65$  years-old in Greece. *J Frailty Sarcopenia Falls*. 4(4):91-101.
- Kelly OJ, Gilman JC, Boschiero D, Ilich JZ. (2019). Osteosarcopenic Obesity: Current Knowledge, Revised Identification Criteria and Treatment Principles. *Nutrients*.11(4):747.
- Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. (2009). Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 3(1):73-80.
- Kim TN, Park MS, Ryu JY, Choi HY, Hong HC, Yoo HJ, Kang HJ, Song W, Park SW, Baik SH, Newman AB, Choi KM. (2014). Impact of visceral fat on skeletal muscle mass and vice versa in a prospective cohort study: the Korean Sarcopenic Obesity Study (KSOS). *PLoS One*. 9(12):e115407.
- Kim TN, Park MS, Lim KI, et al. (2013). Relationships between sarcopenic obesity and insulin resistance, inflammation, and vitamin D status: the Korean Sarcopenic Obesity Study. *Clin Endocrinol (Oxf)*;78:525–532.
- Kimura A, Kishimoto T. (2010). IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*. 40(7):1830-5.

- Kirk B, Feehan J, Lombardi G, Duque G. (2020). Muscle, Bone, and Fat Crosstalk: the Biological Role of Myokines, Osteokines, and Adipokines. *Curr Osteoporos Rep.*18(4):388-400.
- Krause, M. P., Milne, K. J., & Hawke, T. J. (2019). Adiponectin-Consideration for its Role in Skeletal Muscle Health. *International journal of molecular sciences*, 20(7), 1528.
- Kohut ML, McCann DA, Russell DW, Konopka DN, Cunnick JE, Franke WD, Castillo MC, Reighard AE, Vanderah E. (2006). Aerobic exercise, but not flexibility/resistance exercise, reduces serum IL-18, CRP, and IL-6 independent of beta-blockers, BMI, and psychosocial factors in older adults. *Brain Behav Immun.* 20(3):201-9.
- Kotrych D, Dzieziejko V, Safranow K, Sroczynski T, Staniszewska M, Juzyszyn Z, Pawlik A. (2016). TNF- $\alpha$  and IL10 gene polymorphisms in women with postmenopausal osteoporosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*199:92-5.
- Kob R, Bollheimer LC, Bertsch T, Fellner C, Djukic M, Sieber CC, Fischer BE. (2015). Sarcopenic obesity: molecular clues to a better understanding of its pathogenesis? *Biogerontology.*16(1):15-29.
- Kyle UG, Genton L, Hans D, Karsegard L, Slosman DO, Pichard C. (2001). Age-related differences in fat-free mass, skeletal muscle, body cell mass and fat mass between 18 and 94 years. *Eur J Clin Nutr.* 55(8):663-72.
- Le Moal E, Pialoux V, Juban G, Groussard C, Zouhal H, Chazaud B, Mounier R. (2017) Redox Control of Skeletal Muscle Regeneration. *Antioxid Redox Signal.* 27(5):276-310.
- Lee J, Cho JY, Kim WK. (2014). Anti-inflammation effect of Exercise and Korean red ginseng in aging model rats with diet-induced atherosclerosis. *Nutr Res Pract.* 2014 Jun;8(3):284-91.
- Lee K. (2020). Association of osteosarcopenic obesity and its components: osteoporosis, sarcopenia and obesity with insulin resistance. *J Bone Miner Metab.* 38(5):695-701.
- Lee M, Oikawa S, Ushida T, Suzuki K, Akimoto T. (2019). Effects of Exercise Training on Growth and Differentiation Factor 11 Expression in Aged Mice. *Front Physiol.*10:970.
- Lee PG, Jackson EA, Richardson CR. (2017). Exercise Prescriptions in Older Adults. *Am Fam Physician.*95(7):425-432.

- Lewis, J. W., Edwards, J. R., Naylor, A. J., & McGettrick, H. M. (2021). Adiponectin signalling in bone homeostasis, with age and in disease. *Bone research*, 9(1), 1.
- Li FH, Sun L, Zhu M, Li T, Gao HE, Wu DS, Zhu L, Duan R, Liu TC. (2018). Beneficial alterations in body composition, physical performance, oxidative stress, inflammatory markers, and adipocytokines induced by long-term high-intensity interval training in an aged rat model. *Exp Gerontol.*; 113:150-162.
- Li H, Li Y, Xiang L, Zhang J, Zhu B, Xiang L, Dong J, Liu M, Xiang G. (2017). GDF11 Attenuates Development of Type 2 Diabetes via Improvement of Islet  $\beta$ -Cell Function and Survival. *Diabetes*. 66(7):1914-1927.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*, 13, 757–772.
- Lin CL, Lee MC, Hsu YJ, Huang WC, Huang CC, Huang SW. (2018). Isolated Soy Protein Supplementation and Exercise Improve Fatigue-Related Biomarker Levels and Bone Strength in Ovariectomized Mice. *Nutrients*. 10(11):1792.
- Liu PY, Ilich JZ, Brummel-Smith K, Ghosh S. (2014). New insight into fat, muscle and bone relationship in women: determining the threshold at which body fat assumes negative relationship with bone mineral density. *Int J Prev Med*. 5(11):1452-63.
- Liu, R., & Nikolajczyk, B. S. (2019). Tissue Immune Cells Fuel Obesity-Associated Inflammation in Adipose Tissue and Beyond. *Frontiers in immunology*, 10, 1587.
- López-Díazguerrero NE, González Puertos VY, Hernández-Bautista RJ, Alarcón-Aguilar A, Luna-López A, Königsberg Fainstein M. (2013). Hormesis: lo que no mata, fortalece [Hormesis: What doesn't kill you makes you stronger]. *Gac Med Mex*. 149(4):438-47.
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217.
- Loffredo FS, Steinhauser ML, Jay SM, Gannon J, Pancoast JR, Yalamanchi P, Sinha M, Dall'Osso C, Khong D, Shadrach JL, Miller CM, Singer BS, Stewart A, Psychogios N, Gerszten RE, Hartigan AJ, Kim MJ, Serwold T, Wagers AJ, Lee RT. (2013). Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy. *Cell*. 153(4):828-39.

- Lozier NR, Kopchick JJ, de Lacalle S. (2018). Relative Contributions of Myostatin and the GH/IGF-1 Axis in Body Composition and Muscle Strength. *Front Physiol.* 9:1418.
- Lu B, Zhong J, Pan J, Yuan X, Ren M, Jiang L, Yang Y, Zhang G, Liu D, Zhang C. (2019). Gdf11 gene transfer prevents high fat diet-induced obesity and improves metabolic homeostasis in obese and STZ-induced diabetic mice. *J Transl Med.*17(1):422.
- Lu L, Bai X, Cao Y, Luo H, Yang X, Kang L, Shi MJ, Fan W, Zhao BQ. (2018). Growth Differentiation Factor 11 Promotes Neurovascular Recovery After Stroke in Mice. *Front Cell Neurosci.*12:205.
- Lu SC (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* 30(1-2):42-59.
- Lu S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et biophysica acta*, 1830(5), 3143–3153.
- Luan X, Tian X, Zhang H, Huang R, Li N, Chen P, Wang R. (2019). Exercise as a prescription for patients with various diseases. *J Sport Health Sci.* 8(5):422-441.
- Ma CL, Ma XT, Wang JJ, Liu H, Chen YF, Yang Y. (2017). Physical exercise induces hippocampal neurogenesis and prevents cognitive decline. *Behav Brain Res.* 317:332-339.
- Maggio M, Ceda GP, Ticinesi A, De Vita F, Gelmini G, Costantino C, Meschi T, Kressig RW, Cesari M, Fabi M, Lauretani F. (2016). Instrumental and Non-Instrumental Evaluation of 4-Meter Walking Speed in Older Individuals. *PLoS One.*11(4):e0153583.
- Mahon OR, Browe DC, Gonzalez-Fernandez T, Pitacco P, Whelan IT, Von Euw S, Hobbs C, Nicolosi V, Cunningham KT, Mills KHG, Kelly DJ, Dunne A. (2020). Nano-particle mediated M2 macrophage polarization enhances bone formation and MSC osteogenesis in an IL-10 dependent manner. *Biomaterials.*239:119833.
- Manna P, Jain SK. (2015). Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab Syndr Relat Disord.*; 13(10):423-44.
- Marcell TJ, Harman SM, Urban RJ, Metz DD, Rodgers BD, Blackman MR. (2001). Comparison of GH, IGF-I, and testosterone with mRNA of receptors and myostatin in skeletal muscle in older men. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 281(6):E1159-64.

- Marsh DR, Criswell DS, Carson JA, Booth FW. (1997). Myogenic regulatory factors during regeneration of skeletal muscle in young, adult, and old rats. *J Appl Physiol* (1985). Oct;83(4):1270-5.
- Masih D, Tripathi JK, Rakhra G, Vats A, Verma SK, Jha PK, Sharma M, Ashraf MZ, Singh SN. (2021). Deciphering Biochemical and Molecular Signatures Associated with Obesity in Context of Metabolic Health. *Genes (Basel)*. Feb 19;12(2):290.
- Mattson MP, Wan R. (2005). Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems. *J Nutr Biochem*.16(3):129-37.
- Mau T, Yung R. (2018). Adipose tissue inflammation in aging. *Exp Gerontol*. May;105:27-31.
- Mayoral, L. P., Andrade, G. M., Mayoral, E. P., Huerta, T. H., Canseco, S. P., Rodal Canales, F. J., Cabrera-Fuentes, H. A., Cruz, M. M., Pérez Santiago, A. D., Alpuche, J. J., Zenteno, E., Ruíz, H. M., Cruz, R. M., Jeronimo, J. H., & Perez-Campos, E. (2020). Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. *The Indian journal of medical research*, 151(1), 11–21.
- McLaughlin T, Liu LF, Lamendola C, Shen L, Morton J, Rivas H, Winer D, Tolentino L, Choi O, Zhang H, Hui Yen Chng M, Engleman E. (2014). T-cell profile in adipose tissue is associated with insulin resistance and systemic inflammation in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Dec;34(12):2637-43.
- McMullan RC, Kelly SA, Hua K, Buckley BK, Faber JE, Pardo-Manuel de Villena F, Pomp D. (2016). Long-term exercise in mice has sex-dependent benefits on body composition and metabolism during aging. *Physiol Rep*. 4(21):e13011.
- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new *tgf-beta* superfamily member. *Nature*.387:83–90.
- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. (1999). Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11. *Nat Genet*. 22(3):260-4.
- McPherron, A. C., Huynh, T. V., & Lee, S. J. (2009). Redundancy of myostatin and growth/differentiation factor 11 function. *BMC developmental biology*, 9, 24.

- Merksamer, P. I., Liu, Y., He, W., Hirschey, M. D., Chen, D., & Verdin, E. (2013). The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. *Aging*, 5(3), 144–150.
- Monteiro, R., Teixeira, D., & Calhau, C. (2014). Estrogen signaling in metabolic inflammation. *Mediators of inflammation*, 2014, 615917.
- Muller, FL., Song, W., Jang, YC., Liu, Y., Sabia, M., Richardson, A. (2007) Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293(3):R1159-68.
- Nakashima M, Toyono T, Akamine A, Joyner A. (1999). Expression of growth/differentiation factor 11, a new member of the bmp/tgfbeta superfamily during mouse embryogenesis. *Mech Dev.*80:185–189.
- Nigro, E., Scudiero, O., Monaco, M. L., Palmieri, A., Mazzarella, G., Costagliola, C., Bianco, A., & Daniele, A. (2014). New insight into adiponectin role in obesity and obesity-related diseases. *BioMed research international*, 2014, 658913.
- Nilwik R, Snijders T, Leenders M, Groen BB, van Kranenburg J, Verdijk LB, van Loon LJ. (2013). The decline in skeletal muscle mass with aging is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size. *Exp Gerontol.* May;48(5):492-8.
- Nilsson MI, Dobson JP, Greene NP, Wiggs MP, Shimkus KL, Wudeck EV, Davis AR, Laureano ML, Fluckey JD. (2013). Abnormal protein turnover and anabolic resistance to exercise in sarcopenic obesity. *FASEB J.* 27(10):3905-16.
- O'Keefe JH, O'Keefe EL, Lavie CJ. (2018). The Goldilocks Zone for Exercise: Not Too Little, Not Too Much. *Mo Med.*115(2):98-105.
- Ormsbee, M. J., Prado, C. M., Ilich, J. Z., Purcell, S., Siervo, M., Folsom, A., & Panton, L. (2014). Osteosarcopenic obesity: the role of bone, muscle, and fat on health. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 5(3), 183–192.
- Organización mundial de la Salud. (2020). Directrices de la OMS sobre actividad física y hábitos sedentarios: de un vistazo. <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789240014886>
- Organización Mundial de la Salud (2021). Recuperado de: [https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1)

- Oscai LB, Holloszy JO. (1969). Effects of weight changes produced by exercise, food restriction, or overeating on body composition. *J Clin Invest.* 48(11):2124-8.
- Patel AV, Friedenreich CM, Moore SC, Hayes SC, Silver JK, Campbell KL, Winters-Stone K, Gerber LH, George SM, Fulton JE, Denlinger C, Morris GS, Hue T, Schmitz KH, Matthews CE. (2019). American College of Sports Medicine Roundtable Report on Physical Activity, Sedentary Behavior, and Cancer Prevention and Control. *Med Sci Sports Exerc.* 51(11):2391-2402.
- Pérez Viviana, Felipe Sierra (2009). Biología del envejecimiento. *Rev Méd Chile;* 137: 296-302.
- Pérez VI, Bokov A, Van Remmen H, Mele J, Ran Q, Ikeno Y, Richardson A. (2009) Is the oxidative stress theory of aging dead? *Biochim Biophys Acta.*1790(10):1005-14.
- Pham HG, Mukherjee S, Choi MJ, Yun JW. (2021). BMP11 regulates thermogenesis in white and brown adipocytes. *Cell Biochem Funct.* 39(4):496-510.
- Poggioli, T., Vujic, A., Yang, P., Macias-Trevino, C., Uygur, A., Loffredo, F. S., Pancoast, J. R., Cho, M., Goldstein, J., Tandias, R. M., Gonzalez, E., Walker, R. G., Thompson, T. B., Wagers, A. J., Fong, Y. W., & Lee, R. T. (2016). Circulating Growth Differentiation Factor 11/8 Levels Decline With Age. *Circulation research*, 118(1), 29–37.
- Pomatto LCD, Davies KJA. (2018). Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing. *Free Radic Biol Med.* Aug 20;124:420-430.
- Powers SK, Deminice R, Ozdemir M, Yoshihara T, Bomkamp MP, Hyatt H. (2020). Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe? *J Sport Health Sci.* 9(5):415-425.
- Radak, Z., Ishihara, K., Tekus, E., Varga, C., Posa, A., Balogh, L., Boldogh, I., & Koltai, E. (2017). Exercise, oxidants, and antioxidants change the shape of the bell-shaped hormesis curve. *Redox biology*, 12, 285–290.
- Radak, Z., Zhao, Z., Koltai, E., Ohno, H., & Atalay, M. (2013). Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxidants & redox signaling*, 18(10), 1208–1246.
- Rajbhandari P, Thomas BJ, Feng AC, Hong C, Wang J, Vergnes L, Sallam T, Wang B, Sandhu J, Seldin MM, Lusic AJ, Fong LG, Katz M, Lee R, Young SG, Reue K, Smale ST, Tontonoz P. (2018). IL-10 Signaling Remodels

Adipose Chromatin Architecture to Limit Thermogenesis and Energy Expenditure. *Cell*. 172(1-2):218-233.e17.

- Rebelo-Marques A, De Sousa Lages A, Andrade R, Ribeiro CF, Mota-Pinto A, Carrilho F, Espregueira-Mendes J. (2018). Aging Hallmarks: The Benefits of Physical Exercise. *Front Endocrinol (Lausanne)*.9:258.
- Reid MB. (2001). Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Med Sci Sports Exerc*. 33(3):371-6.
- Rios JL, Bomhof MR, Reimer RA, Hart DA, Collins KH, Herzog W. Protective effect of prebiotic and exercise intervention on knee health in a rat model of diet-induced obesity. *Sci Rep*. 9(1):3893.
- Rochette L, Mazini L, Meloux A, Zeller M, Cottin Y, Vergely C, Malka G. (2020). Anti-Aging Effects of GDF11 on Skin. *Int J Mol Sci*. 21(7):2598.
- Rolland Y, Lauwers-Cances V, Cristini C, Abellan van Kan G, Janssen I, Morley JE, Vellas B. (2009). Difficulties with physical function associated with obesity, sarcopenia, and sarcopenic-obesity in community-dwelling elderly women: the EPIDOS (EPIDemiologie de l'OSteoporose) Study. *Am J Clin Nutr*. 89(6):1895-900.
- Rong, Y. D., Bian, A. L., Hu, H. Y., Ma, Y., & Zhou, X. Z. (2018). Study on relationship between elderly sarcopenia and inflammatory cytokine IL-6, anti-inflammatory cytokine IL-10. *BMC geriatrics*, 18(1), 308.
- Rosas-Carrasco O, Juarez-Cedillo T, Ruiz-Arregui L, Garcia Pena C, Vargas-Alarcon G, Sánchez-García S. (2012). Overweight and obesity as markers for the evaluation of disease risk in older adults. *J Nutr Health Aging*. Jan;16(1):14-20.
- Rossi JF, Lu ZY, Jourdan M, Klein B. (2015). Interleukin-6 as a therapeutic target. *Clin Cancer Res*.21(6):1248-57.
- Sansano-Nadal O, Giné-Garriga M, Brach JS, Wert DM, Jerez-Roig J, Guerra-Balic M, Oviedo G, Fortuño J, Gómara-Toldrà N, Soto-Bagaria L, Pérez LM, Inzitari M, Solà I, Martín-Borràs C, Roqué M. (2019). Exercise-Based Interventions to Enhance Long-Term Sustainability of Physical Activity in Older Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Int J Environ Res Public Health*.16(14):2527.
- Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. (2020). Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med*. 217(1):e20190418.

- San-Miguel A., Martin-Gil F.J (2009). Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. *Gac Med Bilbao*. 106:106-113.
- Schmidlin, C. J., Dodson, M. B., Madhavan, L., & Zhang, D. D. (2019). Redox regulation by NRF2 in aging and disease. *Free radical biology & medicine*, 134, 702–707.
- Sciorati C, Gamberale R, Monno A, Citterio L, Lanzani C, De Lorenzo R, Ramirez GA, Esposito A, Manunta P, Manfredi AA, Rovere-Querini P. (2020). Pharmacological blockade of TNF $\alpha$  prevents sarcopenia and prolongs survival in aging mice. *Aging (Albany NY)*.12(23):23497-23508.
- Semba RD, Zhang P, Zhu M, Fabbri E, Gonzalez-Freire M, Carlson OD, Moaddel R, Tanaka T, Egan JM, Ferrucci L. (2019). Relationship of Circulating Growth and Differentiation Factors 8 and 11 and Their Antagonists as Measured Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry With Age and Skeletal Muscle Strength in Healthy Adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 74(1):129-136.
- Sertié RA, Caminhotto R de O, Andreotti S, Campaña AB, de Proença AR, de Castro NC, Lima FB. (2015). Metabolic adaptations in the adipose tissue that underlie the body fat mass gain in middle-aged rats. *Age (Dordr)*.; 37(5):87.
- Shefer G, Van de Mark DP, Richardson JB, Yablonka-Reuveni Z. (2006). Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Dev Biol*. Jun 1;294(1):50-66.
- Shefer G, Rauner G, Yablonka-Reuveni Z, Benayahu D. (2010). Reduced satellite cell numbers and myogenic capacity in aging can be alleviated by endurance exercise. *PLoS One*. 5(10):e13307.
- Shen GS, Zhou HB, Zhang H, Chen B, Liu ZP, Yuan Y, Zhou XZ, Xu YJ. (2018). The GDF11-FTO-PPAR $\gamma$  axis controls the shift of osteoporotic MSC fate to adipocyte and inhibits bone formation during osteoporosis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*.1864(12):3644-3654.
- Sheweita SA, Khoshhal KI. (2007). Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: role of antioxidants. *Curr Drug Metab*. 8(5):519-25.
- Sies H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*. 2015;4:180-3.
- Silawal S, Willauschus M, Schulze-Tanzil G, Gögele C, Geßlein M, Schwarz S. (2019) IL-10 Could Play a Role in the Interrelation between Diabetes Mellitus and Osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 20(3):768.

- Silbermann M, Bar-Shira-Maymon B, Coleman R, Reznick A, Weisman Y, Steinhagen-Thiessen E, von der Mark H, von der Mark K. (1990). Long-term physical exercise retards trabecular bone loss in lumbar vertebrae of aging female mice. *Calcif Tissue Int.* 46(2):80-93.
- Silva-Palacios A, Ostolga-Chavarría M, Zazueta C, Königsberg M. (2018). Nrf2: Molecular and epigenetic regulation during aging. *Ageing Res Rev.* 47:31-40.
- Singel KL, Segal BH. (2016). NOX2-dependent regulation of inflammation. *Clin Sci (Lond).*; 130(7):479-90.
- Sinha M, Jang YC, Oh J, Khong D, Wu EY, Manohar R, Miller C, Regalado SG, Loffredo FS, Pancoast JR, Hirshman MF, Lebowitz J, Shadrach JL, Cerletti M, Kim MJ, Serwold T, Goodyear LJ, Rosner B, Lee RT, Wagers AJ. (2014). Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle. *Science.* 344(6184):649-52.
- Siris ES, Adler R, Bilezikian J, Bolognese M, Dawson-Hughes B, Favus MJ, Harris ST, Jan de Beur SM, Khosla S, Lane NE, Lindsay R, Nana AD, Orwoll ES, Saag K, Silverman S, Watts NB. (2014). The clinical diagnosis of osteoporosis: a position statement from the National Bone Health Alliance Working Group. *Osteoporos Int.* May;25(5):1439-43.
- Smith SC, Zhang X, Zhang X, Gross P, Starosta T, Mohsin S, Franti M, Gupta P, Hayes D, Myzithras M, Kahn J, Tanner J, Weldon SM, Khalil A, Guo X, Sabri A, Chen X, MacDonnell S, Houser SR. (2015). GDF11 does not rescue aging-related pathological hypertrophy. *Circ Res.* 117(11):926-32.
- Son, D. H., Park, W. J., & Lee, Y. J. (2019). Recent Advances in Anti-Aging Medicine. *Korean journal of family medicine*, 40(5), 289–296.
- Su HH, Liao JM, Wang YH, Chen KM, Lin CW, Lee IH, Li YJ, Huang JY, Tsai SK, Yen JC, Huang SS. (2019). Exogenous GDF11 attenuates non-canonical TGF- $\beta$  signaling to protect the heart from acute myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol.*; 114(3):20.
- Suh, J., & Lee, Y. S. (2020). Similar sequences but dissimilar biological functions of GDF11 and myostatin. *Experimental & molecular medicine*, 52(10), 1673–1693.
- Suh J, Kim NK, Lee SH, Eom JH, Lee Y, Park JC, Woo KM, Baek JH, Kim JE, Ryoo HM, Lee SJ, Lee YS. (2020). GDF11 promotes osteogenesis as opposed to MSTN, and follistatin, a MSTN/GDF11 inhibitor, increases muscle mass but weakens bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 117(9):4910-4920.

- Szlejf C, Parra-Rodríguez L, Rosas-Carrasco O. (2017). Osteosarcopenic Obesity: Prevalence and Relation With Frailty and Physical Performance in Middle-Aged and Older Women. *J Am Med Dir Assoc.* 18(8):733.e1-733.e5.
- Taekema DG, Ling CH, Blauw GJ, Meskers CG, Westendorp RG, de Craen AJ, Maier AB. (2011). Circulating levels of IGF1 are associated with muscle strength in middle-aged- and oldest-old women. *Eur J Endocrinol.* Feb;164(2):189-96.
- Tanaka R, Sugiura H, Yamada M, Ichikawa T, Koarai A, Fujino N, Yanagisawa S, Onodera K, Numakura T, Sato K, Kyogoku Y, Sano H, Yamanaka S, Okazaki T, Tamada T, Miura M, Takahashi T, Ichinose M. (2018). Physical inactivity is associated with decreased growth differentiation factor 11 in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.*13:1333-1342.
- Tanaka R, Koarai A, Yamada M, Fujino N, Ichikawa T, Numakura T, Onodera K, Kyogoku Y, Tamada T, Miura M, Minakata Y, Ichinose M, Sugiura H. (2021). Longitudinal Relationship Between Growth Differentiation Factor 11 and Physical Activity in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 16:999-1006.
- Tardif N, Salles J, Guillet C, Tordjman J, Reggio S, Landrier JF, Giraudet C, Patrac V, Bertrand-Michel J, Migne C, Collin ML, Chardigny JM, Boirie Y, Walrand S. (2014). Muscle ectopic fat deposition contributes to anabolic resistance in obese sarcopenic old rats through eIF2 $\alpha$  activation. *Aging Cell.* 13(6):1001-11.
- Tazawa, R., Uchida, K., Fujimaki, H., Miyagi, M., Inoue, G., Sekiguchi, H., Murata, K., Takata, K., Kawakubo, A., & Takaso, M. (2019). Elevated leptin levels induce inflammation through IL-6 in skeletal muscle of aged female rats. *BMC musculoskeletal disorders*, 20(1), 199.
- Trejo Maturana, Carlos. (2001). El viejo en la historia. *Acta bioethica*, 7(1), 107-119. <https://dx.doi.org/10.4067/S1726-569X2001000100008>
- Tsai WJ, McCormick KM, Brazeau DA, Brazeau GA. (2007). Estrogen effects on skeletal muscle insulin-like growth factor 1 and myostatin in ovariectomized rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 232(10):1314-25.
- Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K. (2010). Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol.*12(2):143-52.

- Upadhyay, J., Farr, O. M., & Mantzoros, C. S. (2015). The role of leptin in regulating bone metabolism. *Metabolism: clinical and experimental*, 64(1), 105–113.
- van Herpen NA, Schrauwen-Hinderling VB. (2008). Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. *Physiol Behav.* 94(2):231-41.
- Venereo Gutiérrez JR (2002). Daño oxidante, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar.* 31(2), 126-133.
- Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, Stan TM, Fainberg N, Ding Z, Eggel A, Lucin KM, Czirr E, Park JS, Couillard-Després S, Aigner L, Li G, Peskind ER, Kaye JA, Quinn JF, Galasko DR, Xie XS, Rando TA, Wyss-Coray T. (2011). The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature.* 477(7362):90-4.
- Visser M, Pahor M, Taaffe DR, Goodpaster BH, Simonsick EM, Newman AB, Nevitt M, Harris TB. (2002). Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha with muscle mass and muscle strength in elderly men and women: the Health ABC Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.*; 57:M326–M332.
- Vuolo MM, Lima GC, Batista ÂG, Carazin CBB, Cintra DE, Prado MA, Júnior MRM. (2020). Passion fruit peel intake decreases inflammatory response and reverts lipid peroxidation and adiposity in diet-induced obese rats. *Nutr Res.* 76:106-117.
- Walker, R. G., Czepnik, M., Goebel, E. J., McCoy, J. C., Vujic, A., Cho, M., Oh, J., Aykul, S., Walton, K. L., Schang, G., Bernard, D. J., Hinck, A. P., Harrison, C. A., Martinez-Hackert, E., Wagers, A. J., Lee, R. T., & Thompson, T. B. (2017). Structural basis for potency differences between GDF8 and GDF11. *BMC biology*, 15(1), 19.
- Walker RG, Barrandon O, Poggioli T, Dagdeviren S, Carroll SH, Mills MJ, Mendello KR, Gomez Y, Loffredo FS, Pancoast JR, Macias-Trevino C, Marts C, LeClair KB, Noh HL, Kim T, Banks AS, Kim JK, Cohen DE, Wagers AJ, Melton DA, Lee RT. (2020). Exogenous GDF11, but not GDF8, reduces body weight and improves glucose homeostasis in mice. *Sci Rep.* 10(1):4561.
- Walker, R. G., Poggioli, T., Katsimpardi, L., Buchanan, S. M., Oh, J., Wattrus, S., Heidecker, B., Fong, Y. W., Rubin, L. L., Ganz, P., Thompson, T. B., Wagers, A. J., & Lee, R. T. (2016). Biochemistry and Biology of GDF11 and Myostatin: Similarities, Differences, and Questions for Future Investigation. *Circulation research*, 118(7), 1125–1142.

- Walker RG, Barrandon O, Poggioli T, Dagdeviren S, Carroll SH, Mills MJ, Mendello KR, Gomez Y, Loffredo FS, Pancoast JR, Macias-Trevino C, Marts C, LeClair KB, Noh HL, Kim T, Banks AS, Kim JK, Cohen DE, Wagers AJ, Melton DA, Lee RT. (2020). Exogenous GDF11, but not GDF8, reduces body weight and improves glucose homeostasis in mice. *Sci Rep.* 10(1):4561.
- Wen CP, Wai JP, Tsai MK, Yang YC, Cheng TY, Lee MC, Chan HT, Tsao CK, Tsai SP, Wu X. (2011). Minimum amount of physical activity for reduced mortality and extended life expectancy: a prospective cohort study. *Lancet.* 378(9798):1244-53.
- Wenz T, Rossi SG, Rotundo RL, Spiegelman BM, Moraes CT. (2009). Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 1;106(48):20405-10.
- Winger EE, Reed JL, Ashoush S, El-Toukhy T, Ahuja S, Taranissi M. (2011). Degree of TNF- $\alpha$ /IL-10 cytokine elevation correlates with IVF success rates in women undergoing treatment with Adalimumab (Humira) and IVIG. *Am J Reprod Immunol.* 65(6):610-8.
- Xiao W, Wang Y, Pacios S, Li S, Graves DT. (2016). Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. *Front Oral Biol.*;18:9-16.
- Xu B, Huang Y, Zhang R, Tang M, He Z, Jin L, Zong Y, Hu C, Jia W. (2021). Serum growth differentiation factor 11 is closely related to metabolic syndrome in a Chinese cohort. *J Diabetes Investig.* 12(2):234-243.
- Yu B, Wang CY. (2016). Osteoporosis: The Result of an 'Aged' Bone Microenvironment. *Trends Mol Med.* Aug;22(8):641-644
- Yu G, Luo H, Zhang N, Wang Y, Li Y, Huang H, Liu Y, Hu Y, Liu H, Zhang J, Tang Y, Huang Y. (2019). Loss of p53 Sensitizes Cells to Palmitic Acid-Induced Apoptosis by Reactive Oxygen Species Accumulation. *Int J Mol Sci.* Dec 12;20(24):6268.
- Yu Q, Xia Z, Liang EC, Tipoe GL (2019). Chronic aerobic exercise improves insulin sensitivity and modulates Nrf2 and NF  $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  pathways in the skeletal muscle of rats fed with a high fat diet. *Mol Med Rep.* 2019 20(6):4963-4972.
- Zaleski, A. L., Taylor, B. A., Panza, G. A., Wu, Y., Pescatello, L. S., Thompson, P. D., & Fernandez, A. B. (2016). Coming of Age: Considerations in the Prescription of Exercise for Older Adults. *Methodist DeBakey cardiovascular journal*, 12(2), 98–104.

- Zamboni M, Mazzali G, Fantin F, Rossi A, Di Francesco V. (2008) Sarcopenic obesity: a new category of obesity in the elderly. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*18(5):388-95.
- Zamboni M, Rubele S, Rossi AP. (2019). Sarcopenia and obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.*22(1):13-19.
- Zhang H, Liu H, Dickinson DA, Liu RM, Postlethwait EM, Laperche Y, Forman HJ (2006). gamma-Glutamyl transpeptidase is induced by 4-hydroxynonenal via EpRE/Nrf2 signaling in rat epithelial type II cells. *Free Radic Biol Med.* 40(8):1281-92.
- Zhang H, Davies KJA, Forman HJ (2015). Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radic Biol Med.* 88(Pt B):314-336.
- Zhang J, Li Y, Li H, Zhu B, Wang L, Guo B, Xiang L, Dong J, Liu M, Xiang G. (2018). GDF11 Improves Angiogenic Function of EPCs in Diabetic Limb Ischemia. *Diabetes.* 67(10):2084-2095.
- Zheng, L., Wang, W., Ni, J., Mao, X., Song, D., Liu, T., Wei, J., & Zhou, H. (2017). Role of autophagy in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis of osteoblast cells. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*, 65(6), 1014–1020.
- Zhou Y, Song L, Ni S, Zhang Y, Zhang S. (2019). Administration of rGDF11 retards the aging process in male mice via action of anti-oxidant system. *Biogerontology.* 20(4):433-443.
- Zhou Y, Jiang Z, Harris EC, Reeves J, Chen X, Pazdro R. (2016). Circulating Concentrations of Growth Differentiation Factor 11 Are Heritable and Correlate With Life Span. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 71(12):1560-1563.
- Zhu HZ, Zhang LY, Zhai ME, Xia L, Cao Y, Xu L, Li KF, Jiang LQ, Shi H, Li X, Zhou YN, Ding W, Wang DX, Gao EH, Liu JC, Yu SQ, Duan WX. (2021). GDF11 Alleviates Pathological Myocardial Remodeling in Diabetic Cardiomyopathy Through SIRT1-Dependent Regulation of Oxidative Stress and Apoptosis. *Front Cell Dev Biol.* 9:686848.
- Zhou Q, Zhu L, Zhang D, Li N, Li Q, Dai P, Mao Y, Li X, Ma J, Huang S. (2016). Oxidative Stress-Related Biomarkers in Postmenopausal Osteoporosis: A Systematic Review and Meta-Analyses. *Dis Markers.*7067984.
- Zimmers TA, Jiang Y, Wang M, Liang TW, Rupert JE, Au ED, Marino FE, Couch ME, Koniaris LG. (2017). Exogenous GDF11 induces cardiac and skeletal muscle dysfunction and wasting. *Basic Res Cardiol.*112(4):48