



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO  
GERIATRÍA

Caracterización y Participación de proteínas estructurales del músculo (Actina, Miosina) mediante inmunohistoquímica y su relación con el trabajo muscular así como en la inflamación y expresión de los genes de autofagia y apoptosis.

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA:  
JOSÉ DE JESUS RIVERA SÁNCHEZ

Tutor:  
Dra. Gloria Eugenia Queipo García  
Hospital General de México

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José de Jesús Rivera Sánchez'.

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

Septiembre 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**A DIOS QUE TODO LO HACE POSIBLE Y PERMITIO QUE MI FAMILIA LLEGARA HASTA EL DIA DE HOY JUNTA A PESAR DE DOS INFARTOS Y UNA COXOARTROSIS GRADO IV.**

**A MI ABUELO, EN DONDE ESTE, PORQUE MI PROMESA SE MANTIENE FIRME E INQUEBRANTABLE GRACIAS POR TODO, ESTO TAMBIEN ES PARA TI.**

**AGRADEZCO A MIS PADRES POR TODO SU AMOR, SU DEDICACION, SU APOYO, PORQUE ME ENSEÑARON FE, DEVOCION Y ENTEREZA EN LOS MOMENTOS MAS DIFICILES, PORQUE GUARDAN EN SUS CUERPOS LAS HUELLAS DEL ESFUERZO QUE ME TRAJO AQUÍ, NO TENGO CON QUE PAGARLES TODO, MAS QUE MI ESFUERZO Y MI INTEGRIDAD, DIOS LOS BENDIGA SIEMPRE.**

**A LORENA POR ESTAR CONMIGO EN ESTA ETAPA DE MI VIDA QUE HA SIDO MAS DIFICIL, POR CONFIAR, APOYARME Y QUERERME COMO LO HACE A DIARIO.**

**A LA DOCTORA GLORIA QUEIPO, PORQUE A PESAR DE MIS DEFICIENCIAS SUPO EXPLOTAR MIS VIRTUDES Y A PESAR DE LOS ALTIBAJOS ME ENSEÑO ADEMAS DE REDACTAR ARTICULOS DE MANERA EXCEPCIONAL, EL VERDADERO PODER DE LA AMISTAD, NO TENGO CON QUE PAGARLE; A MI MENTOR Y AMIGO, DR. ADOLFO CHAVEZ NEGRETE PORQUE SIN TENER QUE HACERLO, ME BRINDO CONSEJO, CARIÑO Y AMISTAD, ESPERO PODER CAMINAR CON USTED MUCHOS AÑOS; DR. DAMIAN CARRILLO, POR ESTRUCTURARME, ENSEÑARME SENCILLEZ, DISCIPLINA Y CALIDAD HUMANA; A MI AMIGO MIGUEL ANGEL FONSECA, EJEMPLO DE TENACIDAD Y EXCELENCIA ACADEMICA Y HUMANA, CUYAS DISCUSIONES Y OBSERVACIONES FUERON NECESARIOS Y EXCELENTES; A RUBEN FOSSION POR COMPARTIR SU LOCURA Y PASION POR LA CIENCIA.**

**A JESUS GARCIA POR SU IMPULSIVIDAD Y LEALTAD, A ALBERTO LUCE POR SU CALIDAD HUMANA Y AMISTAD, A DANIEL CASTILLO POR SU PASION, ALEGRIA Y CAPACIDAD DE TRABAJO, A GERARDO MENDEZ POR SU APACIBLE CAPACIDAD DE ANALISIS Y COMPARTIR SUS SUEÑOS, A MIS AMIGOS ETERNOS ANAMARIA, JUAN ESTEBAN, ALHELI POR SU AMOR Y SU CARIÑO EN LAS HORAS OSCURAS**

**A TODOS MIS MAESTROS EN MI CARRERA, PORQUE UN DOCTORADO NO ES EL RESULTADO DE UN SOLO ACTO, ES MUESTRA DE LA CAPACIDAD Y DEDICACION DE CADA PERSONA QUE VIO EN MI ALGO ESPECIAL Y ME IMPULSO DESINTERESADAMENTE CON VOCACION Y CARIÑO, TENGO UNA DEUDA SOCIAL Y MORAL CON MI PAIS, Y DEDICARE CADA DIA DE MI VIDA A PROMOVER Y DEFENDER EL LIBRE PESAMIENTO CON DICIPLINA, DEVOCION, CARIÑO Y TRABAJO, PERO SOBRE TODO CON EL EJEMPLO.**

**GRACIAS**

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>2. MARCO TEORICO</b>	<b>6</b>
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>28</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>29</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
<b>6. METODOLOGÍA</b>	<b>30</b>
<b>7. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>38</b>
<b>8. PROBLEMA</b>	<b>38</b>
<b>9. CARACTERISTICAS DE LA POBLACIÓN</b>	<b>38</b>
<b>10. DEFINICIÓN DE VARIABLES</b>	<b>39</b>
<b>11. DISEÑO DEL ESTUDIO</b>	<b>40</b>
<b>12. ANÁLISIS ESTADISTICO</b>	<b>40</b>
<b>13. RESULTADOS</b>	<b>40</b>
<b>14. DISCUSIÓN</b>	<b>59</b>
<b>15. CONCLUSIONES</b>	<b>62</b>
<b>16. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>63</b>

## ÍNDICE DE FIGURA Y TABLAS

<b>FIGURA 1. Cambios celulares y morfológicos en envejecimiento</b>	<b>10</b>
<b>FIGURA 2. Cambios musculo esqueléticos asociados a la edad</b>	<b>14</b>
<b>FIGURA 3. Mecanismos moleculares asociados a sarcopenia</b>	<b>16</b>
<b>FIGURA 4. Regulación de la pérdida del volumen muscular con edad</b>	<b>17</b>
<b>FIGURA 5. Componentes diagnósticos de la sarcopenia según consenso europeo 2010</b>	<b>18</b>
<b>FIGURA 6. Plataforma de QUIAGEN de diseño para la PCR de TR</b>	<b>34</b>
<b>FIGURA 7. Gráfico de cajas y bigotes de comparación de parámetros funcionales por edad, sexo, actividad física</b>	<b>47</b>
<b>FIGURA 8. Inmunohistoquímica con peroxidasa</b>	<b>54</b>
<b>FIGURA 9. Inmunohistoquímica con peroxisoma para BCL-X en el musculo por grupo funcional</b>	<b>55</b>
<b>FIGURA 10. Microscopia de inmunohistoquímica con focal de fibras musculares control actina, miosina y colocación</b>	<b>57</b>
<b>FIGURA 11. Inmunohistoquímica de expresión de actina, miosina a sus fibras muscular por grupos funcionales</b>	<b>58</b>
<b>TABLA 1. Especificaciones de anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia e inmunohistoquímica</b>	<b>37</b>
<b>TABLA 2. Definición de variables operativas</b>	<b>39</b>
<b>TABLA 3. Análisis descriptivos de los parámetros funcionales por sexo y grupo de estudio.</b>	<b>41</b>
<b>TABLA 4. ANOVA de parámetros funcionales comparados por grupo en mujeres</b>	<b>44</b>
<b>TABLA 5. ANOVA de parámetros funcionales comparados por grupo en hombres</b>	<b>45</b>
<b>TABLA 6. Análisis de ANOVA con pos hoc BONFERRONI de las pruebas de desempeño funcional con significancia estadística <math>conp &lt; 0.05</math> en hombres.</b>	<b>46</b>
<b>TABLA 7. Análisis de ANOVA con POS HOC BONFERRONI de las pruebas de desempeño funcional con significancia estadística <math>conP &lt; 0.05</math> en mujeres</b>	<b>49</b>
<b>TABLA 8. Lista de los genes de las vías de apoptosis, autofagia e inflamación que se utilizaron para buscar diferencias de expresión relativa entre grupos.</b>	<b>52</b>

## 1.INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un proceso multifactorial que afecta cada órgano del cuerpo. En el pasado, la investigación del envejecimiento estaba centrada principalmente en los procesos neurodegenerativos y la pérdida de la masa ósea. No se enfocó la atención en la pérdida de masa muscular este fenómeno biológico es conocido como sarcopenia y que puede llegar a considerarse como un cambio propio del envejecimiento. Sin embargo al paso de los años y del aumento de la sobrevivencia se ha observado que este proceso es crítico en el envejecimiento y que su estudio es una pieza fundamental para poder entender mecanismos del sistema neuroendocrino-humoral además puede explicar la mayor vulnerabilidad de los individuos al envejecer. La prevalencia de sarcopenia en una muestra de la población de Nuevo México, EUA; encontró que en sujetos masculinos menores de 70 años es del 13.5% al 16.9%, y en mujeres del 23.1% al 24.1%. En promedio los hombres mayores de 70 años tuvieron una prevalencia del 35.2% y las mujeres mayores de 70 años del 40.5%, estas cifras mayores por encima de los 80 años del 52.6% al 57.6% en hombres y del 43.2% al 60.0% en mujeres. Esta evidencia deja claro que la sarcopenia es un problema grave de salud pública mundial, en el año 2000 Estados Unidos gasto 18.5 billones de dólares en ello derivado no solo de patologías y sus complicaciones, esto incluyó los gastos de cuidados de alta dependencia en estas personas (1). La sarcopenia y sus efectos están presentes en todos los adultos mayores independientemente del grupo étnico, género o estado de salud. Los ancianos frágiles quienes han perdido una gran cantidad de masa muscular y fuerza son los que requieren mayor apoyo y asistencia por la dificultad que conlleva para ellos los más sencillos retos y actividades cotidianas de la vida. Este proceso tiene como consecuencia un incremento significativo de lesión, caídas y fracturas (2). La pérdida de la funcionalidad es un proceso doloroso como individuo, debido al impacto que tiene al condicionamiento de la independencia y en ocasiones en la autonomía. Estos cambios relacionados con la edad tanto en el músculo esquelético como en el sistema neuromuscular tienen un origen multifactorial en el que participan factores físicos como celulares, moleculares, y metabólicos. Los cambios relacionados con la edad en el músculo esquelético pueden exacerbarse a presencia de otras

comorbilidades que aceleran la pérdida de masa muscular como enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia cardiaca, aterosclerosis sistémica, falla renal crónica, insuficiencia arterial, diabetes, y cáncer, condiciones frecuentes en el anciano (3).

## **2. MARCO TEORICO**

### **Envejecimiento y masa muscular**

El deterioro de la función muscular asociado al envejecimiento es uno de los principales factores que influyen en la disminución de la capacidad de vida independiente de los ancianos. Con el paso de los años, la masa muscular del adulto cambia su conformación y tamaño; se trata de un proceso multifactorial complejo que involucra numerosos cambios que incluyen nivel celular como molecular y que se encuentran mediados por diversos mecanismos biológicos de forma intrínseca y/o extrínseca así como el ambiental. Un punto importante en investigación es definir los principales cambios morfológicos y funcionales en el sistema muscular así como elucidar aquellos que alteran la homeostasis muscular de acuerdo a los mecanismos de deterioro que hasta ahora se han definido.

El envejecimiento humano está asociado a pérdida de masa muscular y fuerza esto se considera como pérdida de la masa muscular de aproximadamente el 1% al año. A partir de los 40 años esta pérdida se acelera con el transcurso de los años.(4) La disminución de la fuerza muscular impacta negativamente sobre el desempeño físico y limita la movilidad, lo que se asocia con dependencia funcional y aumento de morbilidad y mortalidad. Las limitaciones funcionales, definidas como la restricción de las capacidades físicas o mentales para efectuar las tareas que se requiere en una vida independiente, son importantes predictores de mortalidad, morbilidad y discapacidad en el adulto mayor. (5, 6)

Entre los factores implicados en la pérdida de masa y funcionalidad del músculo esquelético podemos destacar las alteraciones en la síntesis y degradación de proteínas, la inflamación, las alteraciones hormonales y la disfunción mitocondrial, la

mayor parte de estas alteraciones se relacionan directamente con el estrés oxidativo.(4)

Hasta la fecha se han establecido diferentes mecanismos por los que el músculo cambia su conformación. Los mecanismos mejor estudiados son: el músculo disminuye su masa, y es infiltrado con grasa y tejido conectivo, hay una disminución especialmente significativa de las fibras tipo 2, desorganización de las miofibrillas, disminución de las unidades motoras con disminución del flujo sanguíneo. A nivel subcelular hay acumulación de moléculas con daño por estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, acumulación de lipofuscina, falla en la síntesis de nuevas proteínas relevantes para la formación de miofibrillas, entre otros. Todos estos cambios se traducen en una menor capacidad contráctil del músculo y con ello una menor capacidad para generar fuerza.(7)

### **Desarrollo muscular**

La infancia representa un período crítico de crecimiento y desarrollo que depende de una dieta equilibrada. El crecimiento muscular y esquelético progresa rápidamente, por lo que el niño se vuelve más fuerte. Estos cambios les permiten desarrollar habilidades motoras propias de la edad además cambios neuromusculares, mielinización y coordinación. Por tanto el desarrollo de la fuerza muscular en etapas tempranas es atribuido a un aumento en el tamaño y la masa muscular.(9)

El músculo se va desarrollando lentamente durante la infancia, con un incremento drástico al llegar a la adolescencia. En los niños, a diferencia de los adultos, la relación entre hueso y músculo es distinta, ya que el músculo es más fuerte que el hueso en las primeras etapas porque el sistema óseo tarda más en madurar, en cambio el músculo sufre una hipertrofia de las fibras existentes con entrenamiento, aumentando su fuerza. Sin embargo, la masa muscular no se ve influenciada por presentar incremento en el número de fibras musculares en comparación con su tamaño.(9)

Ambos sexos aumentan la masa muscular obteniendo un punto máximo al llegar a la pubertad, sin embargo este aumento es 150% mayor en niños, esto se ha visto

relacionado con el aumento del número de eritrocitos en niños y por tanto mayor aporte de oxígeno desde los pulmones hasta el músculo y principalmente por el pico alto de liberación de hormonas.(10)

### **Adulto**

La fuerza y la masa muscular alcanzan su máxima expresión entre la segunda y la cuarta décadas de la vida y desde entonces se produce un declive progresivo.(4)

La masa muscular decrece de acuerdo a la edad, aun cuando el peso es adecuado. Entre los 20 y 70 años se estima que perdemos aproximadamente 11% de masa muscular en mujeres y 15% en hombres.(11) Alrededor de los 50 años de edad, la masa muscular disminuye de 1 a 2% por año, y la fuerza muscular tiene una disminución anual de 1.5% entre los 50 y 60 años de edad, y posteriormente 3% cada año.(12)

Los primeros trabajos en este tema estiman que el ritmo de pérdida muscular se encuentra entre un 0,5 y un 2% por año a partir de los 50. Si bien la pérdida de masa muscular relativa es más temprana, situándose a la edad de 30 años, la masa muscular absoluta no comienza a descender hasta la quinta década de vida; siendo además mayor en las extremidades inferiores que en las superiores(13)

### **Adulto mayor**

Las fibras musculares se clasifican en función de la actividad ATPasa de las isoformas de las cadenas pesadas de miosina. Las fibras musculares tipo I son fibras rojas, de contracción lenta, resistentes a la fatiga y capaces de generar pequeñas cantidades de fuerza de larga duración. Tienen un metabolismo aerobio, un mayor número de mitocondrias, una red capilar extensa y mioglobina, proteína hemo capaz de unir y almacenar oxígeno de la sangre. Las fibras musculares IIA y IIB son fibras blancas, de contracción rápida y elevada capacidad glucolítica; las fibras IIA son las de mayor capacidad oxidativa y más resistentes a la fatiga que las fibras IIB. (14)

En el anciano se produce una disminución del número de fibras musculares, predominantemente del tipo II. Se produce un aumento relativo del número de fibras

tipo I y una disminución en la actividad oxidativa muscular y de la densidad capilar. Los sarcómeros, las unidades funcionales del músculo, son reemplazados en la fibra muscular por grasa y tejido fibroso, lo que causa un acortamiento de la fibra y una reducción de la capacidad de contracción. Se produce proliferación anómala del retículo sarcoplásmico y de núcleos internos, y también se puede ver fibras aberrantes, como las fibras en anillo. (15)

Con el envejecimiento también se ven cambios a nivel central, con una disminución del número de unidades motoras alfa del asta anterior de la médula espinal. Todos estos cambios redundan en una reducción de la fuerza muscular y de la eficiencia muscular, lo que implica un empobrecimiento de la coordinación de la acción muscular. (16)

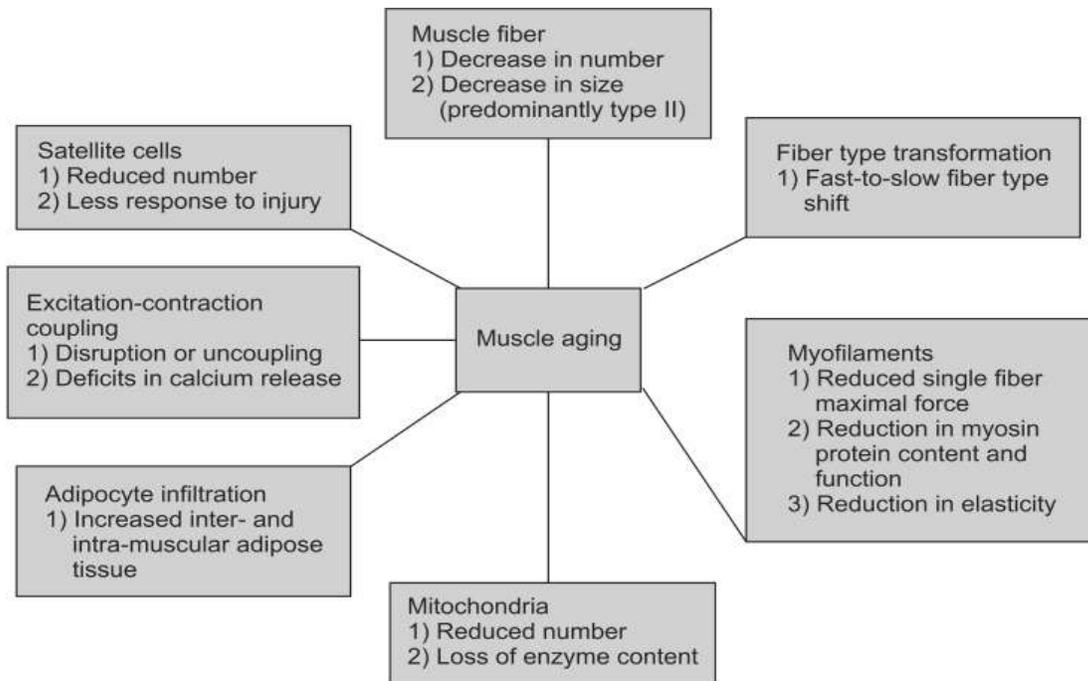
A nivel bioquímico se producen mutaciones en el ADN mitocondrial debido al daño oxidativo, con una reducción en la síntesis proteínica mitocondrial. Este fenómeno está ligado a la disminución en la actividad enzimática glucolítica y oxidativa, del fosfato de creatina, del almacén de adenosintrifosfato en la célula muscular y del volumen mitocondrial.(17) Estos cambios metabólicos en el músculo contribuyen a disminuir la capacidad física general del anciano y suponen un componente importante en la reducción de la capacidad de utilizar oxígeno durante el ejercicio. Diversas caspasas incrementan su actividad proteolítica con la edad, y en parte pueden causar el inicio de la degradación proteínica muscular y la pérdida de núcleos por la atrofia local y finalmente la muerte del miocito. (17)

### **Mecanismos de envejecimiento muscular**

A mitad de siglo XX, Rebeca Gershmán propuso que el envejecimiento se asociaba a alteraciones moleculares debidas a los radicales libres; posteriormente, Denham Harman postuló la teoría de los radicales libres en el envejecimiento en 1956. Esta teoría fue refinada por Jaime Miquel, que propuso que las mitocondrias eran, a su vez, causa de la producción de radicales y diana de las acciones deletéreas de los mismos. Diversos autores han relacionado la disfunción mitocondrial, con el acúmulo de alteraciones en el ADN mitocondrial y con la sarcopenia, tanto en seres humanos

como en animales.(17)

El envejecimiento, por tanto, se ha asociado a mutaciones en el ADN mitocondrial así como reducción en la señalización en el proceso de apoptosis, disminución de la actividad de la cadena de transporte electrónico y aumento de la producción mitocondrial de radicales libres.(17)



**Figura 1. Cambios celulares y moleculares que contribuyen al envejecimiento de la fibra muscular.(15)**

### **Denervación muscular**

La denervación muscular provoca en los ancianos una pérdida de unidades motoras y por tanto de fibras musculares. Hasta los 60 años se mantiene biológicamente aceptable el número de unidades motoras, pero a partir de esta edad, se aprecia una progresiva disminución en el número de neuronas motoras del asta anterior de la médula espinal, y del número de uniones neuromusculares en los nervios periféricos. (18) Estos cambios anatómicos pueden ser observados en los estudios electromiográficos, en los que se observa una pérdida del 25% en el número de unidades motoras en las personas ancianas. Por otra parte, se ha observado que

conforme avanza la edad se produce un aumento en la expresión de la molécula de adhesión de las células nerviosas (NCAM). Mecanismo muy similar a lo que se observa en el tejido muscular de animales jóvenes sometidos a denervación. No se conocen bien los mecanismos que determinan la aparición de este proceso, aunque cabe la posibilidad de que tenga relación con la disminución en el factor neurotrófico ciliar (CNTF), cuya producción disminuye con la edad en los nervios periféricos y que actúa estimulando la supervivencia de las motoneuronas.(18)

### **Metabolismo proteico**

La alteración en el metabolismo proteico podría explicar la discreta pérdida muscular que aparece antes de los 60 años. A diferencia de lo que ocurre con los procesos de denervación muscular, la síntesis proteica empieza a decaer a partir de los 50 años y continúa haciéndolo hasta edades más avanzadas. Esta disminución parece guardar relación con la menor disponibilidad de moléculas de ATP en el músculo. Se sugiere que sea debido a la disminución en el número de mitocondrias y a la afectación del ADN mitocondrial provocado por los fenómenos oxidativos que acompañan al aumento en la producción de radicales libres en los músculos de las personas mayores.(18)

### **Factores hormonales**

El envejecimiento se acompaña de una serie de cambios en hormonas que poseen importantes efectos anabólicos sobre el tejido músculo-esquelético. En los varones disminuye progresivamente la actividad androgénica, de modo que se reducen los niveles de testosterona total y libre. Además, la sensibilidad de los distintos tejidos diana, incluido el músculo, disminuye con la edad. Estos trastornos contribuyen al desarrollo de la sarcopenia, pues reducen la síntesis de proteínas en los músculos. La administración de testosterona mejora la fuerza y la masa muscular en los ancianos, aunque los posibles efectos secundarios de dicho tratamiento limitan su uso. En las mujeres, la caída brusca de los estrógenos contribuye también al desarrollo de la sarcopenia. Sin embargo, el menor desarrollo muscular del sexo femenino y la presencia de andrógenos suprarrenales tras la menopausia hace que este fenómeno sea en ocasiones menos aparente.(18)

La disminución en la concentración de la Hormona de crecimiento (GH) y factor parecido a insulina tipo 1 (IGF1) contribuiría también a explicar la pérdida de masa muscular en ambos sexos. La disminución de IGF1 aceleraría la degradación de las proteínas musculares y reduciría la expresión de los receptores dihidropiridínicos (DHPR) y rianodínicos (RyR1) que desempeñan un papel crucial en la regulación del calcio intracelular y en la contractilidad muscular. Así, en algunos estudios sobre ratones transgénicos que sobreexpresan la IGF1 se ha observado que la concentración de estos receptores no disminuye con la edad y se normaliza la concentración citosólica de calcio en las fibras musculares.(18)

### **Factores parácrinos**

Al igual que sucede con el tejido óseo, existen factores producidos por el propio músculo que parecen intervenir en el desarrollo de la sarcopenia. Por ejemplo, la IGF1 se sintetiza en el músculo, parece estimular la proliferación de las denominadas «células satélites». Estas células que están presentes en el sarcolema y pueden ceder sus núcleos para que se incorporen en el citoplasma de las fibras musculares cuando se hipertrofian. Esta isoforma específica de la IGF1, sintetizada localmente por el tejido muscular, ha recibido el nombre de «factor de crecimiento mecánico» (MGF), debido a que se produce en los músculos cuando se lesionan o son sometidos a una sobrecarga mecánica. Pues bien, la concentración de ARNm del MGF está disminuida en los músculos de los ancianos, tanto de forma basal como cuando se les somete a una sobrecarga mecánica. Por otra parte, la administración de este factor a animales de experimentación así como el desarrollo de animales transgénicos que sobreexpresan el MGF consigue prevenir la aparición de la sarcopenia, lo que abre nuevas perspectivas en la prevención y el tratamiento de este proceso.(18)

### **Alteraciones mitocondriales**

Recientemente, se ha sugerido que el envejecimiento puede estar asociado con una disminución de la biogénesis mitocondrial. El motivo por el que se produce una disminución de la biogénesis mitocondrial durante el envejecimiento todavía se desconoce; sin embargo, se especula. Se propone que la cascada de señalización que conducen al proceso de mitocondriogénesis participa como un mecanismo

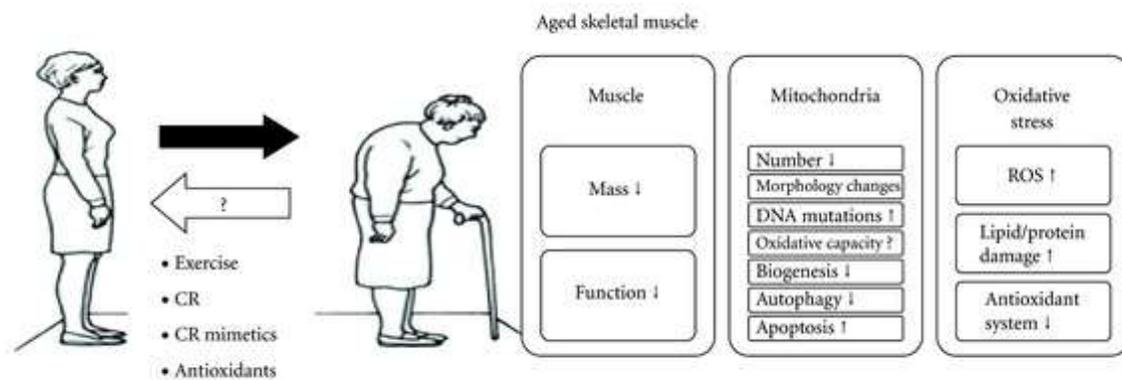
relevante que pudiera explicar dicha disminución. Se considera que el coactivador-1 del receptor activado por proliferación de los peroxisomas, podría ser un factor importante en la disminución de mitocondriogénesis durante el envejecimiento.(1)

### **Otros factores**

Se ha señalado que los leucocitos de las personas mayores liberan una mayor cantidad de IL6 que los de las personas jóvenes. Esta elevación podría desempeñar algún papel en la sarcopenia, debido a los efectos catabólicos y anorexígenos implicados a esta citoquina. También el déficit de vitamina D pudiera intervenir en este proceso.(16) El calcitriol actúa directamente sobre las células musculares estimulando la síntesis proteica y promoviendo la captación de fosfato, con lo que se generan moléculas de ATP y se favorece así la contractilidad muscular. La estimulación de los VDR presentes en el músculo determina un aumento en la concentración de fibras de tipo II. Por otra parte, en diversos estudios se ha señalado la existencia de una relación entre el riesgo de caídas y los niveles de 25OHD, que disminuye significativamente al administrar suplementos de Vitamina D. Finalmente, el déficit nutricional, la menor actividad física y la alta prevalencia de enfermedades crónicas de los ancianos, contribuiría también a explicar la pérdida de masa muscular que acompaña al proceso de envejecimiento.(16) Las citocinas están relacionadas con la disfunción muscular y el catabolismo. Se ha demostrado que con la edad se produce un incremento de distintas interleucinas (IL-1, IL-6), así como del factor de necrosis tumoral (TNF-) en sangre en humanos.

Los estudios recientes que han permitido estudiar los mecanismos moleculares en la fibra muscular contribuyen a identificar diversas vías de señalización de remodelación muscular. El uso de animales transgénicos posibilita el análisis de la activación o inhibición de vías de señalización celular específicas que promueven la conversión de las fibras musculares entre ellas. Lo que aumenta la masa muscular, la resistencia a la fatiga y disminuyendo su daño. Aunado a esto se encuentran en desarrollo nuevas tecnologías para regular la expresión génica en el músculo esquelético. En este sentido los micro-ARN están emergiendo como potentes reguladores de la expresión génica en múltiples tejidos, entre los que se encuentra el músculo esquelético.(1)

Como se ya se mencionó el envejecimiento y el comportamiento hormonal tienen una estrecha relación. La edad tiene un impacto sobre la disminución de hormonas que implican un deterioro muscular. La disminución en los niveles séricos de testosterona se relaciona con una pérdida de la masa y de la fuerza muscular, y la disminución de los niveles de estrógenos en la mujer, asociada a la menopausia, puede tener efectos similares. Los efectos anabólicos sobre la masa muscular que tienen estas hormonas pueden inhibir la producción de IL-1 e IL-6, con la edad esto supondría de forma indirecta un aumento del catabolismo. En las mujeres durante la menopausia a diferencia de los hombres se ha observado una rápida disminución en la fuerza muscular que correlaciona con este fenómeno. Estas observaciones sugieren que las hormonas sexuales femeninas pueden desempeñar un papel en la regulación del tamaño de la musculatura esquelética en mujeres de mediana y avanzada edad.(1)



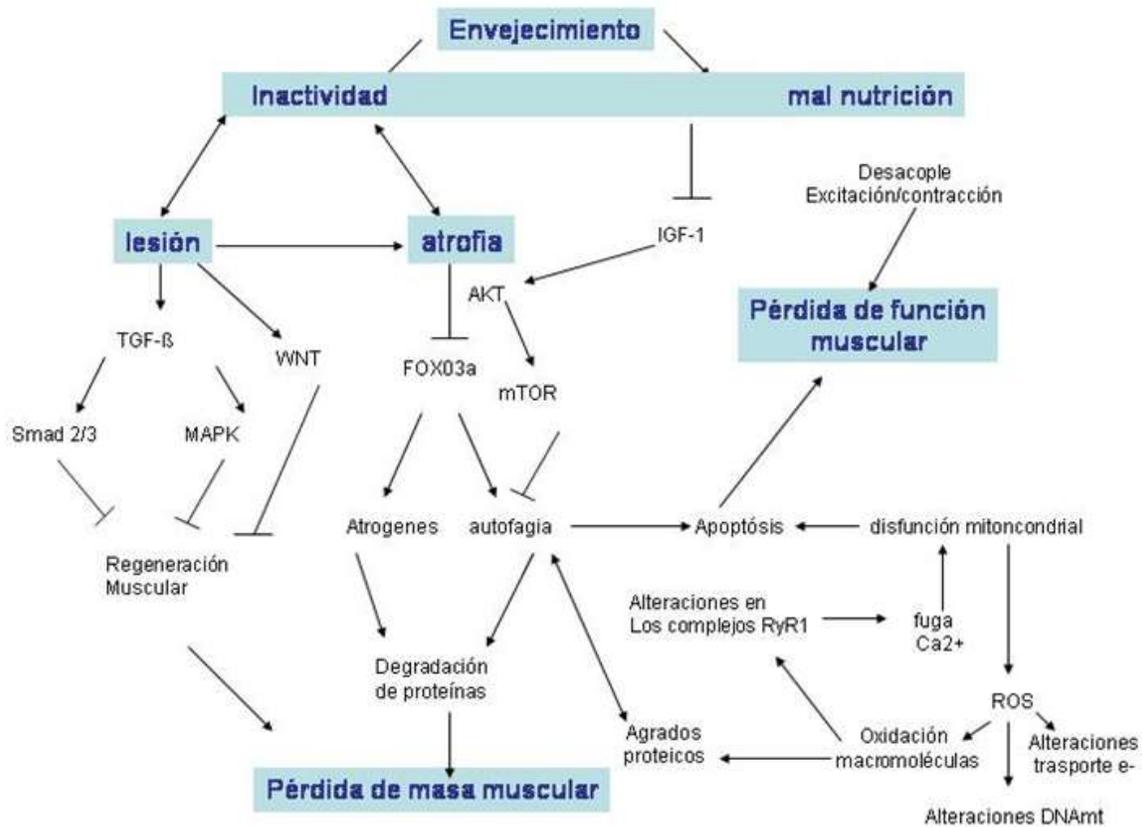
**Figura 2. Cambios a nivel musculoesquelético asociados con la edad y factores que retrasan el envejecimiento muscular.**

El envejecimiento muscular es un mecanismo único en el organismo, comparado con otros órganos. El músculo esquelético es un tejido, post-mitótico multinucleado, que no presenta senescencia celular como mecanismo de envejecimiento. El músculo se atrofia con la edad mientras que muchos otros tejidos se hipertrofian. Los mecanismos moleculares que intervienen en la sarcopenia no se encuentran totalmente dilucidados, sin embargo, existe evidencia que relaciona los cambios musculares con la edad. Los que se han estudiados en diferentes modelos animales principalmente son; apoptosis, estrés oxidativo (ROS), autofagia y modulación de las vías

involucradas en la homeostasis muscular como mTOR, además de la disminución de la función mitocondrial, y la formación de radicales libres. El incremento de ROS condiciona mutaciones en el DNA mitocondrial, aumenta la oxidación de macromoléculas, disfunción del transporte de electrones, y muerte (Harman D y cols., 2003; Humphries K y cols, 2006). En los últimos años a nivel celular se ha estudiado la participación de algunos genes en el envejecimiento, entre ellos destacan algunos como Beclin-1 y una disminución en LC3, LAMP2, Bnip-3 y Gabarap (Wohlgemuth S y cols, 2010). El envejecimiento también involucra vías de señalización, las mejor caracterizadas son las vías canónica y no canónica del factor de crecimiento transformante Beta (TGF- $\beta$ ), la de WNT y del factor de crecimiento semejante a la insulina -1 (IGF-1). También se ha relacionado con las vías AKT y mTOR (Brack A y cols, 2008; Carlson M y cols, 2009, Fry C y cols 2011). Sin embargo, no existe evidencia contundente, solo datos preliminares, acerca de los procesos moleculares del envejecimiento.

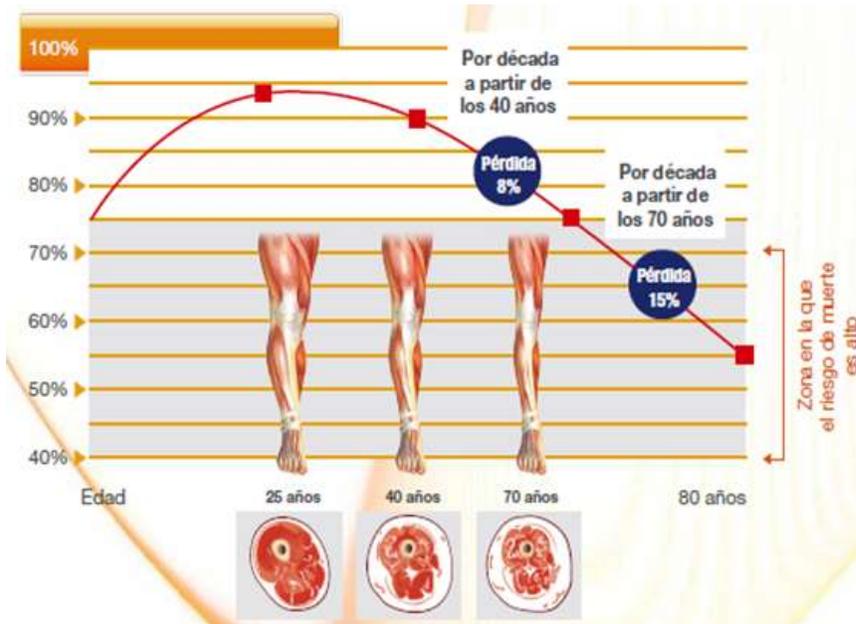
Histológicamente, la sarcopenia es caracterizada por una disminución del tamaño y número de las fibras musculares principalmente las tipo II (Holloszy J y cols, 1991; Lexel J y cols, 1998). Debido a una alteración en la habilidad del músculo esquelético para remodelarse, la pérdida de miofibras puede estar acompañada por infiltración grasa, inflamación y fibrosis. Debido a la naturaleza multinucleada de las células musculares se observa que la apoptosis se da en diferentes regiones de la fibra muscular. La observación de la apoptosis mionuclear apoya la hipótesis de que cada núcleo de la fibra muscular controla una región específica del citoplasma.

La figura 3 esquematiza la sinergia biológica y ambiental de los factores que contribuyen con la sarcopenia.



**Fig 3. Mecanismos moleculares asociados a sarcopenia**

En resumen podemos decir que la sarcopenia es un proceso biológico, fisiológico esperado, con una pérdida del 30% con respecto al volumen muscular en la juventud, (figura 2). Sin embargo aún queda por conocer porque una vez que se presenta las habilidades del individuo se van perdiendo y en lugar de parecer algo fisiológico se relaciona de manera directa con comorbilidades, que pueden disminuir la expectativa de vida.



**Fig. 4. Progresión de la pérdida de volumen muscular con la edad**

Estos antecedentes sugieren que los mecanismos fisiológicos del envejecimiento ocurren de forma paulatina, existen factores que pueden acelerar o retrasarlo y mejorar las condiciones del individuo. El conocimiento de los mecanismos moleculares y celulares del envejecimiento permitirán conocer de manera temprana a aquellos individuos que tienen un proceso acelerado, de pérdida muscular, y diseñar intervenciones y terapias que para intentar retrasar este proceso y por ende la calidad de vida del adulto mayor.



**Fig. 5. Componentes diagnósticos de sarcopenia según el consenso de sarcopenia de 2010**

## **FISIOLOGÍA MUSCULAR**

### **Fisiología de la contracción muscular**

La función muscular es la contracción coordinada de las fibras musculares en el músculo. Cada fibra muscular se compone de miles de miofibrillas que están a su vez compuestas por unidades más pequeñas conocidas como sarcómeros. El sarcómero es la unidad funcional fundamental de una fibra muscular y es la base de las propiedades contráctiles del músculo esquelético. Cada sarcómero contiene filamentos gruesos de miosina y filamentos delgados de actina que se superponen para permitir un ciclo de contracción de la fibra muscular. El proceso de acoplamiento excitación-contracción es el mecanismo fisiológico para la función del músculo esquelético. Un potencial de acción iniciado en el cerebro (voluntario) o en la médula espinal (involuntario) se propaga eléctricamente y químicamente a través de la médula espinal, los nervios motores, y las uniones neuromusculares a la membrana plasmática del miocito, conocido como el sarcolema. El potencial de acción se

propaga a través de la membrana y hacia el resto de la fibra muscular a través de invaginaciones en el sarcolema conocidas como túbulos T, donde se estimula la liberación de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) desde el retículo sarcoplásmico (SR). El  $\text{Ca}^{2+}$  liberado se difunde a poca distancia del complejo de actina-miosina, donde se une a la troponina, provocando un cambio conformacional de los filamentos de actina que expone el sitio de unión de la miosina y la actina. Una vez que la interacción ha sido iniciada, una molécula de adenosin trifosfato (ATP) se divide para activar la ATPasa de la miosina y la energía creada provoca la contracción de la fibra. Esta interacción se desacopla cuando una segunda molécula de ATP se une al puente de miosina-actina, desacoplando de ese modo la actina y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , después de lo cual espera su próxima activación. Este proceso se conoce como relajación muscular. El  $\text{Ca}^{2+}$  libre es entonces secuestrado por el SR hasta que el próximo ciclo de excitación-contracción. (5)

### **Miosina**

Proteína muscular constituida por dos cadenas polipeptídicas en disposición de  $\alpha$ -hélice denominadas cadenas pesadas a lo largo de toda su longitud y cuatro cadenas polipeptídicas de forma globular y de menor tamaño llamadas cadenas ligeras dispuestas en el extremo. La miosina tiene actividad ATPasa, y se une a la forma polimerizada de la actina.

### **Actina**

Está formada por dos cadenas helicoidales de actina, que son componente principal. A lo largo de esta cadena de actina, se enrolla una molécula de tropomiosina, que a su vez está formada por dos cadenas helicoidales y que en reposo está bloqueando los lugares de unión entre la actina y la miosina. La troponina está formada por tres complejos polipeptídicos: uno denominado C, que posee la capacidad de unirse a los iones calcio; otro denominado I, que se une a la molécula de actina y el tercero, denominado T, que se une a la tropomiosina. (15, 31, 32).

Estructuralmente la miofibrilla tiene diversas sub estructuras que han servido para su estudio y clasificación de acuerdo a su morfología, variaciones y características

fisiológicas e inmunohistoquímicas.

A lo largo de la miofibrilla se alternan bandas claras con bandas oscuras, las bandas claras o bandas I y las oscuras bandas A. En el centro de la banda I se encuentra una línea que se denomina Z. En la parte central de la banda A se observa una zona menos oscura que se denomina zona H y que a su vez está cruzada por otra línea denominada M.

La unidad funcional contráctil del músculo que se repite a lo largo de la miofibrilla, es la zona comprendida entre dos líneas Z y se denomina sarcómero. La banda I y la banda A, así como la zona H están determinadas por la distribución y superposición de los filamentos gruesos y delgados. De tal forma que la banda I está formada exclusivamente por filamentos delgados, mientras que la banda A, lo está por la superposición de filamentos delgados y gruesos. La zona H que se encontraba en el interior de la banda A se debe exclusivamente a filamentos gruesos. Al realizar un corte transversal en la zona de superposición de los filamentos delgados y gruesos, podemos observar que cada filamento grueso está rodeado de seis filamentos delgados y a su vez cada filamento delgado está rodeado de tres filamentos gruesos. Los filamentos gruesos están constituidos fundamentalmente por miosina. Los filamentos delgados están formados por las proteínas actina, troponina y tropomiosina. Estas son los componentes principales del sarcómero, aunque existen otras proteínas que están presentes en cantidades menores como la proteína M, que se localiza en la línea M; la proteína Cap Z y la  $\alpha$ -actinina que se localizan en la línea Z. (14)

## **CONTRACTILIDAD, FUNCIONALIDAD Y ESTRUCTURA MUSCULAR**

Como ya se comentó uno de cambios musculares en el envejecimiento, son las características de las fibras tipo I y II. Las primeras, con una alta actividad oxidativa y las segundas resistentes a la fatiga lo que le permite mantener una actividad contráctil por largos periodos de tiempo con poca pérdida tensil. La fatiga se define como la disminución en la tensión muscular, como resultado de actividad contráctil

previa, es decir, cuando una fibra del músculo esquelético es estimulada repetitivamente, la tensión desarrollada por la fibra va a disminuir eventualmente aunque la estimulación continúe. Las características de un músculo fatigado son disminución de la velocidad y del rango de relajación.

El músculo esquelético sufre importantes cambios en relación a la edad (Disminución del volumen, infiltrado graso y tejido conectivo, desarreglo miofibrilar). Existen factores que aumentan esta disfunción muscular como la disminución del flujo sanguíneo y la pérdida de masa muscular empeoran con la falta de actividad (desuso). Una vida sedentaria lo que aumenta la pérdida muscular. No cabe duda que la ganancia de fuerza en respuesta al entrenamiento de ejercicio de resistencia en los ancianos puede ser sustancial y de gran utilidad, claro que siempre será menor que en individuos jóvenes. (1,2)

En conclusión los factores relacionados con la pérdida muscular en los ancianos son: disminución en la regulación de actividad física en la juventud, cambio en el metabolismo proteico, déficit entre síntesis de proteína contra degradación y disminución de la ingesta de proteínas en la infancia, disminución de los niveles hormonales anabolizantes, como la GH, testosterona y estrógenos, lo que provoca una disminución de efecto trófico. A su vez produce atrofia muscular, pérdida de función neuromuscular principalmente las unidades motoras alfa de la médula espinal se van perdiendo lo que provoca atrofia muscular. Se ha planteado que la disminución de la fuerza muscular y la reducción de la masa muscular participan en la etiología de la sarcopenia, asociada a la reducción de las fibras musculares y a la denervación de las unidades motoras, que son reinervadas por neuronas más lentas. Otras alteraciones son en la expresión genética principalmente de vías de expresión de apoptosis, inflamación y autofagia. (1,3). A nivel subcelular, se acumulan proteínas oxidativas, esto a causa con el aumento de edad y disminución de eficiencia del sistema removedor de proteólisis (ubiquitinación y degradación lisosomal), lo anterior resulta en la acumulación de lipofuccina y proteínas reticuladas, más cierta disfunción mitocondrial. Esta acumulación de proteínas que no son removidas eficientemente del músculo, pueden incrementar la cantidad de

material no contráctil, lo cual explica por qué la fuerza muscular disminuye. Aunado a esto, existe deficiencia en la síntesis de nuevas proteínas relevantes para la formación de miofibrillas, especialmente en ancianos con enfermedades, traumatismos o consumo inadecuado de aminoácidos. De hecho se ha comprobado que los pacientes con menor ingesta nutricional tendrán una menor fuerza muscular y un menor diámetro de muñeca, lo cual nos habla de disfunción. (3, 5)

En el envejecimiento se ha descrito un estado proinflamatorio o estado de inflamación subclínica debido a que los niveles de interleucina 1 beta, factor de necrosis tumoral (TNF) e interleucina 6 se encuentran aumentados. Esto favorece la liberación de aminoácidos por el músculo. Todos estos cambios se traducen en una menor capacidad del músculo para generar fuerza. (1). El cambio relacionado con la edad hacia un fenotipo de las fibras musculares de contracción lenta contribuye a una disminución general de las propiedades contráctiles del músculo esquelético, provocando un cambio en la relación de frecuencia- vigor. Es posible que la cinética atenuada pueda reducir la tasa de actividad de la ATPasa de las fibras musculares de tipo I, lo que contribuiría a un aumento de la eficiencia en el equilibrio del mecanismo de energía de salida/energía de entrada metabólica, y por lo tanto a mayor fuerza relativa en bajas frecuencias de estimulación en la contracción del músculo esquelético de los adultos mayores, reduce la energía necesaria para el transporte de iones y reduce la fuerza necesaria para mantener una carga de trabajo relativa dada.(4)

El impacto en las modificaciones de las vías de síntesis de ATP y las diferencias relacionadas a la edad, evidencian que el flujo glucolítico durante la contracción muscular es menor en los ancianos en comparación con los jóvenes. Durante la isquemia el flujo de síntesis de ATP glucolítico permanece intacto en el musculo esquelético de los viejos. Se propone que es por esto que los ancianos se fatigan menos que los jóvenes durante la contracción muscular con o sin isquemia. Estos resultados proporcionan evidencia con respecto a la función glucolítica en el musculo esquelético de los adultos mayores durante la contracción, y sugieren que la economía metabólica tiene un aumento potencial relacionado con la edad lo

cual permite que los músculos se involucren más en el trabajo máximo con menos fatiga en comparación a los jóvenes.(5)

### **Fatiga muscular**

Este fenómeno anteriormente descrito mediante electromiografía, destaca la incapacidad de mantener una respuesta eléctrica uniforme y constante ante un esfuerzo muscular esvirtuando con ello a la actividad eléctrica tanto en su amplitud como en la frecuencia del potencial eléctrico durante el registro electromiográfico. Este fenómeno eléctrico ha sido estudiado tanto en atletas como en adultos mayores y se han hecho interesantes comparaciones en ambos. Lo estudios realizados en la contracción isométrica en diversos músculos, principalmente de miembros inferiores y la descripción de algunos puntos de referencia en cuanto a su aparición y su reversibilidad en el tiempo. No ha logrado hasta el día de hoy contamos con una correlación útil entre los fenómenos eléctricos y desempeño muscular.

Con lo anterior, la fatiga puede entenderse como la pérdida de la eficiencia contráctil y esta debe guardar relación con los resultados en el desempeño físico de los individuos. Por eficiencia contráctil entendemos la capacidad que tiene el músculo para contraerse de manera repetida con la misma fuerza y rapidez en una serie de movimientos isotónicos consecutivos, manteniendo una actividad constante y sin declinar entre contracciones previas y subsecuentes.

La eficacia contráctil, se definiría como la capacidad del musculo de realizar contracciones en un periodo, sin que estas repercutan en la ejecución continuada del movimiento. Clínicamente resulta ser la última función en perderse, pues el músculo preserva su capacidad de contracción a pesar de lesiones nerviosas, hipoxemia, traumatismos, etc. De esta manera todos los pacientes tanto frágiles o lesionados, continúan haciendo movimientos de limitada duración, independientemente de la calidad y eficiencia del mismo.

Por lo anterior es que se propuso en este estudio analizar los parámetros más sólidos de funcionalidad muscular como la fatiga muscular mediante su evaluación

electromiografía. El desempeño y el volumen de la masa muscular. Pero poder integrar en lo posible al fenómeno biológico que ocasiona las alteración del desempeño muscular per se.

La fatiga muscular podría representar el inicio de una serie de sucesos que en conjunto con lleven a una persona mayor para desarrollar sarcopenia. Y por ello en el presente trabajo evaluaremos la disminución de la masa muscular como fenómeno multifactorial (alteraciones celulares, hormonales, inmunológicas y clínicas) (2) asociado a la sarcopenia. (3,4).

### **Envejecimiento, actividad física y prevención.**

Los principales beneficios del ejercicio evidenciados científicamente son: control del peso corporal, disminución de la grasa corporal, aumento de la masa muscular, fuerza muscular, flexibilidad y densidad ósea, ganancia de la estabilidad postural y prevención de caídas; aumento del volumen sistólico, ventilación pulmonar, consumo máximo de oxígeno, disminución de la frecuencia cardiaca y de la presión arterial y mejora del perfil de lípidos. Existe también mejora del auto concepto, autoestima, imagen corporal y disminución del stress, ansiedad, insomnio, consumo de medicamentos y mejora de las funciones cognitivas y de la socialización. La etapa de inicio; suele abarcar de 4 a 6 semanas, durante las cuales el ejercicio debería realizarse a una intensidad suave, durante poco tiempo y pocas veces a la semana para evitar molestias musculares y/o lesiones. La etapa de mejora; suele durar de 4 a 5 meses, durante los cuales se va incrementando la duración, intensidad y la frecuencia cada 2-3 semanas. La etapa de mantenimiento; suele comenzar a partir del sexto mes. En el sistema músculo-esquelético se ha observado que existe hipertrofia muscular, aumento de mioglobina, una mejor capilarización del músculo y un menor riego sanguíneo. Aumentan las mitocondrias y las enzimas que intervienen en el metabolismo. Si el entrenamiento es de resistencia aumenta el número de fibras rojas. En la realización de un ejercicio de tipo estiramiento, el músculo responde a la tarea de alongarse para responder al estímulo realizado en la articulación, permitiendo ejecutar movimientos con facilidad en las tareas motrices. En el sistema neuromuscular, se afirma que el ejercicio estimula al cerebro de dos formas

principales: 1) Mantiene un aporte adecuado de nutrientes interviniendo en la homeostasis de la glucosa y del oxígeno y en los procesos de vascularización cerebral, y 2) Optimiza la eficacia funcional de las neuronas interviniendo en procesos de excitabilidad neuronal y de plasticidad sináptica. (18)

Por ello es importante mantener la actividad física en el adulto mayor debido a esto la Organización Mundial de la Salud (OMS) promueve el término "Envejecimiento Activo", lo cual se refiere aquel estilo de vida cuyo objetivo es la optimización de las oportunidades de salud, participación y seguridad con el fin de mejorar la calidad de vida a medida que las personas envejecen. La participación periódica en actividades físicas moderadas puede retrasar el declive funcional y reducir el riesgo de padecer enfermedades crónicas tanto en los ancianos sanos como en aquellos que las sufren. (17)

Por lo tanto, el ejercicio suficiente y moderado es crucial en la población de edad avanzada porque, en primer lugar, puede ayudar a prevenir que los adultos mayores se conviertan en frágiles mediante la mejora de la masa muscular, la fuerza muscular y, la densidad ósea,(31) el fortalecimiento del tejido conectivo y el aumento de la flexibilidad, por consiguiente, mejora la capacidad de hombres y mujeres mayores.; en segundo lugar, puede prevenir el sobrepeso y la obesidad. (17)

### **Funcionalidad**

Habilidad que posee la persona para realizar las tareas que demanda su vida diaria con el objetivo de mejorar la calidad de la misma. Este es el único parámetro que se utiliza para poder evaluar y tener indicadores de mal pronóstico como caídas y mortalidad. Desde hace 4 años se ha empezado a evaluar la funcionalidad , con el fin de medir el desempeño muscular, y así predecir mortalidad, caídas y mal pronóstico de vida en los individuos ancianos, pero es solo hasta los últimos años que estos test como "levántate y anda", velocidad de la marcha en 4 metros, y la prueba corta de desempeño físico" (SPPB) se han tomado como referencia de la función muscular, siendo el más recomendado para este fin el SPPB por el consenso europeo de 2010 (Guralnik y cols, 1994; Cruz-Jentoft y cols, 2010).

## **APOPTOSIS Y AUTOFAGIA EN SARCOPIENIA**

Como ya se ha comentado en párrafos anteriores la sarcopenia es un proceso de pérdida muscular de la función contráctil del mismo musculo. En diversos modelos animales y en tejido humano se han descrito mecanismos celulares que están estrechamente vinculados con las modificaciones morfofuncionales en el envejecimiento de la masa muscular, provocando el incremento de los depósitos grasos, acelerando la pérdida de masa muscular y aumentando la secreción de citosinas catabólicas que en su conjunto favorecerán la llamada resistencia a la insulina asociada al envejecimiento. Debemos comprender que el camino a la sarcopenia es un imbricada y compleja confluencia de múltiples factores desde los neuroendocrinos que incrementan la lesión inducida por esfuerzo, la disfunción de las células satélites musculares y los endocrinos como testosterona y hormona de crecimiento que se suman normalmente a la malnutrición y al abatimiento funcional, aunque algunos autores atribuyen este diverso número de modificaciones a la consecuencia de la acumulación de estrés oxidativo en las fibras musculares (38).

### **Vía apoptotica en musculo**

Al parecer el inicio de la vía apoptotica está regulado por fenómenos celulares como la misma pérdida de las miofibras así como la fragmentación del DNA mionuclear que se ha observado en músculos de ancianos. Debemos de entender que el proceso apoptotico es uno de los mecanismos que en su origen sustentan la homeostasis sobretodo en fenómenos de estrés y que últimamente se presenta como el probable protagonista de la progresión de la sarcopenia, este es el principal efector de la muerte celular utilizando dos vías principales llamadas caspasa dependiente y caspasa independiente ambas inducen la lesión de la mitocondria mediante su permeabilización, liberación de Citocromo C el cual es el principal iniciador de la via intrínseca de apoptosis así como la activación del factor -1 que funge una actividad de proteasa y en presencia de ATP/dATP resulta la formación del apoptosoma que activa caspa 9 que escinde a caspasa 3 y que es probablemente la responsable de los efectos proteolíticos en los defectos del DNA (38). Se ha visto en modelos animales que la restricción calórica podría modular o mitigar de alguna manera la

actividad de caspasa 9 mediante la disminución de caspasa 8 y expresión de TNF- $\alpha$ .

### **Autofagia en la sarcopenia**

La vía de desde su origen contribuye de manera muy importante a el proceso de homeostasis de manera intracelular pues es un proceso vital a nivel intracelular para la degradación de componentes caducos y reutilización de alguno de los elementos moleculares la autofagia se puede dividir como micro autofagia, que es aquella que se lleva a cabo mediante degradación de proteínas en el citosol por medio de lisosomas, inclusiones proteínicas y degradación de organelos.

El mecanismo B mediado por chaperonas, las cuales son proteínas solubles, forman un pentapeptido la cual es transportado a través de la pared lisosomal para su degradación y la llamada macro autofagia como tercer mecanismo, donde una porción del citoplasma incluyendo organelos subcelulares es secuestrada por una vacuola de doble membrana en el que se fusionan los lisosomas como se comentó en líneas anteriores es este último mecanismo el de mayor importancia porque es el que permite la degradación de proteínas constitutivas de vida media muy larga y otros organelos pero de manera muy importante de otros mecanismos que están relacionados con la muerte de la mitocondria. Es probable que la acumulación de daños progresivos intracelulares pueda contribuir a potenciar la vía de autofagia.

Como mecanismos relacionados en la supresión de la autofagia esta la supresión mediante aminoácidos y factores asociados a la insulina aunque también de manera paradójica se ha visto en el C- elgans que la restricción calórica activa la vía foinocitol3 cinasa formando un complejo con Beclin 1 y dando una regulación a la baja de la vía mTOR (38).

### **Mecanismos neuroendocrinos relacionados con sarcopenia**

Al parecer uno de los elementos más importantes para el mantenimiento de la masa muscular es el mantenimiento de la inervación normal del muscular y una activación normal la alteración de cualquiera de estos lleva al deterioro del musculo mediante diversas vías ya que la disfunción de este proceso altera la dinámica mitocondrial

llevando a mecanismos como la autofagia que, como ya se mencionó antes esta inmiscuida en la reutilización de cuerpos proteínicos a la de autofagia en donde este sistema disregulado aumenta la pérdida de organelos y mitocondrias en un gran número y que son esenciales para el mantenimiento de la masa muscular este fenómeno de alta complejidad también se ha observado en regiones postsinápticas en donde se altera la neurotransmisión mediante la disminución y el enlentecimiento de la liberación y transporte de las vesículas axonales lo que podría originar la propia disfunción neuronal impactando todas las funciones celulares incluyendo la expresión génica (39). Otros de los mecanismos que probablemente estén relacionados es el aumento de las concentraciones de Calcio ( $Ca^{**}$ ) ya que se han reportado abundantes inclusiones calciodensas en las mitocondrias presinápticas una consecuencia directa de esta sobrecarga de este  $Ca^{**}$  es la liberación de derivados apoptóticos como el citocromo C (39). Uno de los modelos animales en los que se ha logrado comprender mejor este mecanismo es por medio de ratones Knockout con fenotipo de sarcopenia en los que existe acumulación anormal de mitocondrias gigantes que aumentan su susceptibilidad al transporte de calcio mitocondrial aumentado la permeabilidad y transición de poros y apoptosis, relacionado con el daño oxidativo mitocondrial y la denervación neuromuscular.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La población mexicana está envejeciendo rápidamente. En el último siglo, la vida media de los mexicanos se duplicó; pasando de 36 años en 1950 a 74 años en el 2000 y se ha estimado que llegue o supere los 80 años de vida en el 2050. Aunado a esto, la población de nuestro país creció de 18 millones de habitantes en 1930 a 100 millones en el año 2000. Considerando esto, es posible advertir que la pirámide poblacional cambiará drásticamente, por ejemplo, en 1970 más de la mitad de la población era menor a 15 años. Las predicciones indican que para el año 2050 las generaciones que nacieron en la época de 1960-1980 engrosarán el extremo superior de la pirámide poblacional al alcanzar la edad de 60 años

Los censos poblacionales de nuestro país, indican que en el año 2000 había más de 6.9 millones de personas de 60 años o más y se estima que para el año 2050 serán 36.2 millones. Este dato se vuelve alarmante al considerar la prevalencia de la discapacidad en personas adultas, la cual se incrementa en ambos sexos a partir de los 45 años de edad, pero alcanza niveles importantes a partir de los 70 años de edad, en donde la discapacidad predominante entre los adultos mayores es la motriz, afectando al 56% de los hombres y 62% de las mujeres, en contraste, la discapacidad mental sólo afecta al 4% de la población en ambos sexos. Considerando que la discapacidad con mayor incidencia en los adultos mayores de nuestro país es la motriz y que ésta es atribuible al proceso de sarcopenia, es necesario generar medidas, planes y programas preventivos que permitan reducir la tasa de discapacidad motriz en adultos mayores y permitir que un mayor número de individuos disfrute su vejez en plenitud de condiciones físicas.

Sin embargo, la comprensión de los mecanismos fisiológicos, biológicos y ambientales que están implicados, favoreciendo o retrasando el proceso de la sarcopenia son aún escasos, lo cual limita las posibilidades de detección, tratamiento y prevención. Es por ello que el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de la sarcopenia contribuirá de forma importante a la generación de estrategias y herramientas clínicas que permitan identificar de manera temprana a las personas con un proceso de envejecimiento acelerado, así como diseñar intervenciones y terapias que permitan retrasar este proceso.

**Pregunta de trabajo:**

¿Qué relación existe entre los parámetros clínicos y los procesos moleculares que participan en la sarcopenia y en el deterioro de la función contráctil?

**4. HIPÓTESIS.**

Las diferencias en los resultados de las pruebas clínicas estarán relacionadas con cambios transcripcionales en las principales vías de señalización asociadas a sarcopenia en pacientes ancianos frágiles, ancianos activos comparados con jóvenes sedentarios y atletas.

## **5. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Identificar mediante pruebas clínicas y moleculares los procesos que involucran la pérdida muscular y su relación con la función contráctil los grupos de estudio.

### **Objetivos específicos**

- Estudiar en un espectro poblacional las diferencias que existen en los criterios clínicos que definen la pérdida muscular
- Estudiar la relación que existe entre la edad, el sexo, el desempeño y volumen muscular en un grupo de 97 sujetos sanos
- Analizar las principales vías de señalización asociadas con sarcopenia en los grupos de estudio mediante RTPCR array
- Validar aquellos genes candidatos mediante inmunohistoquímica

## **6. SUJETOS Y METODOS**

### **Estudio Clínico**

Se incluyeron 97 sujetos de ambos sexos entre 20 y 94 años, cada uno de los sujetos fue asignado a uno de los tres grupos de estudio: adulto mayor funcional y frágil (60-94 años), joven sedentario (20-40 años) y atletas (20-40 años). El grupo de atletas se definió de acuerdo al equivalente metabólico (MET) obtenidos durante la actividad física. El colegio Americano de Medicina establece que sujetos sanos y sedentarios de ambos sexos tienen un promedio de 8-10 METS, se consideran atletas aquellos con valores de 18-24. Todos los adultos mayores fueron sanos, activos, sin enfermedades crónicas o sin secuelas de estas. Ninguno de los participantes presentaban alteraciones visuales o auditivas severas, en todos los casos se realizaron medidas antropométricas. Las funciones básicas de la vida diaria fueron medidas utilizando la escala de Katz y Lawton. Todos los sujetos tuvieron un puntaje

de 6 y 8/8 respectivamente. Únicamente pacientes con enfermedad articular degenerativa grado I determinada por Rayos X fueron incluidos. Se realizó la prueba del monofilamento para descartar pie diabético en aquellos casos con Diabetes Mellitus controlada.

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó utilizando las diferencias en la mediana del volumen del cuádriceps femoral calculado mediante tomografía. Un mínimo de 412.09 cm<sup>3</sup> entre hombres y mujeres fue lo esperado con una desviación estándar de 305.51. El cálculo resultó en un mínimo de 86 sujetos para asegurar una muestra suficiente. Se incluyeron y se trabajaron con 97.

La prueba de prensión se realizó utilizando un dinamómetro hidráulico manual validado (Base Line TM USA) Los valores fueron capturados en kilogramos. Los sujetos sentados con los codos a los lados y los brazos flexionados en ángulo recto con las muñecas en posición neutra. EL dinamómetro se colocó en la posición II con soporte bajo el equipo. En esta posición y seguido del cálculo del promedio de tres intentos en cada mano. En la hoja de recolección se captura la lateralidad del participante.

El volumen muscular se realizó mediante tomografía de fase simple de acuerdo a los protocolos convencionales. En un equipo se realizó multicortes con reconstrucción tridimensional de los cuádriceps desde la espina iliaca antero superior a la confluencia con los cuádriceps antes del tendón común, aproximadamente 8 cm del borde de los cóndilos femorales.

El análisis estadístico de normalidad se realizó con la prueba de diferencias de Kolomogrov-Smirnov, la diferencia entre las variables se analizó utilizando chi-cuadrada y T de Student. El análisis de la varianza (ANOVA) y las pruebas pos-hoc de Bonferroni se utilizaron para evaluar cada uno de los componentes del desempeño muscular como la prueba de la silla, la prueba de marcha en 4 m y la prueba de prensión.

La evaluación de los aspectos moleculares incluyó una muestra por conveniencia dividida en cuatro grupos el grupo **A)** 10 adultos mayores (a partir de 70 años, sanos (sin co-morbimortalidades asociadas) **B)** 10 adultos mayores (a partir de 70 años, frágiles **C)** 10 adultos 20-40 años sanos **D)** 10 atletas

La totalidad del proyecto está aprobado por los comités de Bioética e Investigación del Hospital General de México con número DI/11/110/04/130

### **Extracción de RNA de biopsias de tejido muscular.**

Para obtener el RNA total, las muestras embebidas en buffer RLT. Fueron lisadas utilizando un homogeneizador de tejidos (Polytron). El procedimiento fue realizado en hielo, con 1-3 impulsos de 10 seg a máxima velocidad y descansos de 20 seg, evitando calentar la muestra. Posteriormente y acorde a las instrucciones del fabricante, (Quiagen. Fibrous Tissue Mini Kit) la muestra fue centrifugada a 12,000 g por 15 min a 4°C. Después de la centrifugación, al sobrenadante, el cual contiene el RNA, se le añadieron 200 µl de isopropanol y esta mezcla fue depositada en la columna de extracción. Se realizaron lavados a la columna y se realizó la eliminación de DNA genómico mediante un ensayo enzimático con DNAsal, seguido de lavados y la elución del RNA en 60 µl de agua libre de nucleasas.

### **Cuantificación y evaluación de la calidad del RNA total purificado.**

La calidad y cantidad del RNA fue evaluada obteniendo las densidades ópticas mediante espectroscopia óptica con luz ultravioleta y utilizando la relación de las mediciones a 260/280nm. Los ácidos nucleicos absorben la máxima energía a la  $\lambda=260$  y las proteínas a 280 este procedimiento garantiza que el RNA se encuentra limpio de proteínas que pudieran interferir con nuestros análisis o afectar la estabilidad del RNA. La cuantificación del RNA total fue realizada en un equipo nanodrop, con este fin se utilizó la fórmula de  $1 \text{ Abs} = 1\text{OD}=40 \text{ ug/mL RNA}$ . La pureza (contaminación de proteínas) se consideró en todas aquellas muestras que mostraron una relación  $260/280 =$  de 1.8-2. La integridad se evaluó mediante la observación directa de las unidades ribosomiales 28 y 18 S en geles desnaturalizantes de agarosa al 1.5%. Todas las muestras consideradas para la retro transcripción y análisis de expresión

contaron con las características óptimas de concentración, pureza e integridad

### **Transcripción reversa (RT) del RNAm.**

Para obtener los perfiles de expresión génica se realizó la retrotranscripción de los mensajeros de las biopsias del tejido muscular utilizando el RT2 First Strand Kit (Quiagen). De manera inicial, 3 µl (25 ng) de RNA total, son sumados a la mezcla que contiene: 0.80 µl de primers RT 10X; 0.20 µl de dNTPs con dTTP (100mM); 1.5 µl de la enzima transcriptasa reversa MultiScribe (50 U/ µl); 0.80 µl de buffer RT 10X; 0.90 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 0.10 µl de inhibidor de RNasa (20 U/l µl) y 0.20 µl de H<sub>2</sub>O libre de RNasa, que en total suman 7.5 µl por reacción. La mezcla fue mezclada suavemente e incubada por 5 min en hielo. La reacción de PCR se realizó en un termociclador Maxygenell (Axygen), programando un ciclo de tres temperaturas a 16°C por 2 min; 42°C por 1 min; 50°C por 1 s; seguido de un paso de 85°C por 5 min y un paso final a 4°C<sup>∞</sup>. Al finalizar la reacción la mezcla fue diluida con 112.5 µl de buffer TE.

### **Expresión de la vía de señalización de Insulina en tejido muscular**

Se analizó la expresión de las biopsias de tejido muscular mediante la plataforma RT-PCR Array (Quiagen), que consiste en arreglos de sondas taqman específicas para elementos que participan en la vía de señalización de Apoptosis, Autofagia, TNF-β, TGF-α, WNT e Interleucinas. Estas sondas están dispuestas en placas de 96 pozos a los cuales se les agrego 20 µl de la mezcla final del Mix de reacción (100 µl del RT más 2000 µl de PCR Master Mix). La placa fue sellada y centrifugada a 1000 RPM por 1 min. La lectura fue realizada en un equipo StepOne Plus (Applied Biosystems) programando la reacción con un paso a 95°C por 10 min; seguido de 40 ciclos de dos temperaturas 95°C por 15 s y 60°C por 1 min. Los resultados fueron exportados a archivos XLS, insertados en una matriz y evaluados mediante el uso del software Quiagen PCR Analyser mediante un análisis 2<sup>ΔΔct</sup>. Se utilizó la expresión del grupo de pacientes sedentarios como calibrador y genes de expresión constitutiva como normalizadores. El diseño de la placa consiste en 84 genes de interés, más 5 genes housekeeping, un control de la presencia de DNA genómico, 3 controles de la eficiencia de RT y 3 controles de PCR positivos. La disposición se observa en figura6:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ABL1 1	AKT1 2	APAF1 3	APP 4	ATG12 5	ATG16L1 6	ATG3 7	ATG5 8	ATG7 9	ATP6V1G2 10	BAX 11	BCL2 12
B	BCL2A1 13	BCL2L1 14	BCL2L11 15	BECN1 16	BIRC2 17	BIRC3 18	CASP1 19	CASP2 20	CASP3 21	CASP6 22	CASP7 23	CASP9 24
C	CD40 25	CD40LG 26	CFIAR 27	CTSB 28	CTSS 29	CYLD 30	DFFA 31	ESR1 32	FAS 33	FASLG 34	GAA 35	GADD45A 36
D	HTT 37	IFNG 38	IGF1 39	IGF1R 40	INS 41	IRGM 42	MAP1LC3A 43	MAPK8 44	MCL1 45	NFKB1 46	NOL3 47	PIK3C3 48
E	RPS6KB1 49	SNCA 50	SPATA2 51	SQSTM1 52	SYCP2 53	TNF 54	A 55	B 56	TNFRSF1A 57	TP53 58	TRAF2 59	ULK1 60
F	XIAP 61	IL10 62	IL2 63	IL4 64	IL6 65	IL8 66	IFNA2 67	TGFBI 68	TGFB2 69	TNFSF10 70	TNFSF14 71	TNFSF15 72
G	CD27 73	PAK2 74	JUN 75	PARP1 76	RB1 77	DCN 78	SMAD3 79	APC 80	CCND1 81	CTNNB1 82	MYC 83	WNT1 84
H	HPRT1 85	RPLP0 86	ACTB 87	GAPDH 88	B2M 89	HGDC 90	RTC 91	RTC 92	RTC 93	PPC 94	PPC 95	PPC 96

**Figura 6. Plataforma QUIAGEN de diseño para PCR RT.**

### Inmunohistoquímica

Las laminillas con cortes de 5 mm se retiró la parafina a una temperatura de 65°C durante 1hr y 10min con xileno, se rehidrataron en una serie gradual de etanol (100%,96%,90%,80% y 70%).

Una vez que las laminillas fueron re-hidratadas se lavaron con agua destilada y con solución salina de fosfatos (PBS) (ver tabla 6) a pH 7.2. Con el propósito de preservar la integridad de los antígenos del tejido, las laminillas fueron tratadas con amortiguador de citratos 1X (DakoCytomation, Target Retrieval Solution) y fueron sometidas de 20 a 25 lb/ de presión y 121°C durante 5min. Se dejaron enfriar durante 20 min. La peroxidasa fue bloqueada con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos a temperatura ambiente en agitación constante. Los cortes se lavaron con PBS-Tween 20 (PBS-T20) y se incubaron en agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente con una solución bloqueadora de proteínas (Biogenex, USA). Una vez decantado el bloqueador, las preparaciones se incubaron 12 horas en cámara húmeda a 4°C con el anticuerpo primario en la dilución estandarizada (DakoCytomation, Antibody Diluyente cat. S0809). En todos los casos se realizó un análisis de control negativo, incubando el tejido con PBS y bloqueador de proteínas. Una vez lavados los cortes con PBS-Tween20 se incubaron por 20 min con el anticuerpo secundario que es un polímero anti-IgG de ratón/conejo/cabra conjugado con estreptavidina-peroxidasa (Dako, USA). La reacción enzimática fue revelada

empleando la solución de sustrato-cromógeno durante 10 segundos (kit LSAB+Sys/HRP, Dako-Cytomation, Carpintería, CA, cat K0679) contrastadas con hematoxilina, usando entellan como medio de montaje. Las muestras se observaron empleando un microscopio de campo claro (Axioskop 2 FS plus, Zeiss) a 10X, 40X y 100X aumentos. Se tomaron fotos con una cámara AxioCam HR (Zeiss).

### **Inmunofluorescencia.**

Se realiza el mismo procedimiento de desparafinación que el de inmunohistoquímica. Las laminillas rehidratadas (serie gradual de etanol) se lavaron con agua destilada y PBS a pH 7.4. Con el propósito de preservar la integridad de los antígenos del tejido, las laminillas se trataron con amortiguador de citratos 1X y fueron sometidas a una presión 20 a 25 lb/pulgada y 121°C durante 5min. Se dejaron enfriar durante 20 min y se lavaron con PBS-T20, se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente con una solución bloqueadora de proteínas. Una vez decantado el bloqueador, las preparaciones se incubaron 12 horas en una cámara húmeda a temperatura ambiente con el anticuerpo primario. Posterior a los lavados el material se incubó nuevamente bajo las mismas condiciones con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón hecho en cabra y acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC). Las muestras fluoresceínadas fueron tratadas con RNAsa 20 minutos y lavadas con una solución SSC 1X (ver figura 6). Los núcleos se tiñeron en azul con DRAQ7™ con un pico de emisión de onda de 665 nm (Biostatus Limited, code: DR71000, UK) y como medio de montaje y potenciador de la fluorescencia se utilizó vectashiel (Vector, USA). El análisis de inmunofluorescencia se llevó a cabo en un microscopio confocal Axiovert 100M Software LSM 510, empleando un Laser de 488nm y 543nm, así como filtros de pase corto (BP 505-530) para FITC y pase largo (LP 560) para las tinciones de contraste del núcleo o citoplasma.

### **Doble inmunofluorescencia.**

Las laminillas rehidratadas en una serie gradual de etanol se lavaron con agua destilada y con PBS pH 7.4. Con el propósito de mantener los antígenos del tejido, las laminillas se trataron con amortiguador de citratos 1X y sometidas a una presión de 20 a 25 lb/pulgada y 121°C durante 5min. Se dejaron enfriar durante 20 min. Después

los cortes se lavaron con PBS-T20 y se incubaron 10 min. A temperatura ambiente con una solución bloqueadora de proteínas. Una vez decantado el bloqueador, las preparaciones se incubaron toda la noche a 4°C en una cámara húmeda con el anticuerpo primario. Después de los lavados con PBS-T20, los cortes se incubaron por 60 minutos con el anticuerpo secundario anti-ratón fracción IgG2b acoplado a CY5 (Alexa, Company) durante 1 hora. Transcurrido el tiempo y posterior a los lavados, se incubaron con el segundo anticuerpo primario durante 1hr. Una vez trascurrido ese tiempo se realizaron lavados con PBS-T20 y se incubó durante 30min el anticuerpo secundario acoplado en la fracción Fab a FITC durante 1 hora. Los núcleos se tiñeron en azul con DRAQ7™ con un pico de emisión de onda de 665 nm (Biostatus Limited, code: DR71000, UK). Finalmente, las laminillas fueron lavadas con una solución SSC 1X y se adicionó vectashiel como medio de montaje. El análisis de inmunofluorescencia se llevó a cabo en un microscopio confocal Axiovert 100M Software LSM 510, empleando los Laser de 488 y 543nm, así como filtros de pase corto (BP 505-530) para FITC y pase largo (LP 560) para CY5.

**Tabla.1 ESPECIFICACIONES DE ANTICUERPOS UTILIZADOS EN INMUNOFLUORESCENCIA E INMUNOHISTOQUÍMICA**

**Especificaciones de anticuerpos utilizados en Inmunofluorescencia e inmunohistoquímica**

Anticuerpo primario	Origen	Código	Dilución	Incubación	Anticuerpo secundario	Fluorocromo	Pico de emisión de onda Em (nm)
Mouse anti-ACTINA	Santa Cruz Bio-Technology, Santa Cruz California	376421	1/100	60 minutos	Goat Anti-Mouse IgG	FITC	519
Rabbit anti-MIOSINA	GeneTex International Corporation	In GTX734 32	1/50	60 minutos	Mouse Anti-rabbit IgG	CY5	670

**Criterios de selección del grupo de intervención:**

**Criterios de inclusión**

- Pacientes sanos en evento quirúrgico que acepten participar
- Pacientes con inmovilidad o fragilidad ancianos
- Pacientes sin patología alguna atletas y sedentarios que acepten participar

**Criterios de Exclusión:**

- Edad menor a 70 años
- Pacientes repetidos en la base de datos

### **Criterios de eliminación.**

- No completar la evaluación clínica o ser Incapaz de realizarla
- No aceptar la toma de biopsia

## **7. JUSTIFICACION**

El entendimiento del proceso del envejecimiento se ha conformado en un reto para las futuras generaciones debido a que los avances tecnológicos y médicos si han aumentado la expectativa de vida pero también han puesto al descubierto una serie de eventos no definidos previamente en la humanidad como es el caso de la sarcopenia/fragilidad que se han transformado en el punto principal del deterioro funcional y la dependencia que le significan a esta millones de dólares en atención, cuidados y solución de las complicaciones que se derivan de la alta dependencia. El realizar estudios en los que se busque la relación de procesos moleculares y su traducción clínica podrían, en un futuro ayudarnos a identificar TARGET del tratamiento o referencias biológicas para poder determinar si una intervención está modificando en realidad el proceso de envejecimiento.

## **8. PROBLEMA**

Los pacientes con fractura de diáfisis femoral tiene mayor morbilidad, discapacidad y muerte que los que presentan fractura de cadera ya que el inicio de la rehabilitación es muy tardío en los primeros llevando esto a una inmovilidad prolongada, fragilización y posterior muerte, por lo que queremos tipificarla en nuestro hospital con el fin de agilizar la rehabilitación de estos pacientes disminuyendo así la morbilidad y mortalidad.

## **9. CARACTERISTICAS DE LA POBLACION**

La muestra de la población es de 97 pacientes tomando como parámetros las edades de 20 a 94 años con lo que se dividió en cuatro grupos de pacientes, adultos jóvenes menores de 45 años sedentarios y atletas, adultos mayores de 75 años, frágiles y no frágiles

**Tabla 2. DEFINICION DE VARIBALES OPERATIVAS**

Variable	Tipo	Definición operacional	Unidad de medida	Análisis estadístico
Sexo	Nominal	Hombre/mujer	numeral	Frecuencias/%
Edad	Nominal	años	numeral	Frecuencias/%
Tipología	Cualitativa	Anciano Activo, Anciano Frágil; Adulto Sedentario, Atleta	Nominal	Frecuencia, %
Apoptosis	Cuantitativa	Expresión Relativa	Numeral Continua	Regresión Lineal, T de Student, ANOVA
Trabajo Muscular	Dimensional discreta	Numero de contracciones	Numeral discreta	Regresión Lineal, T de Student, ANOVA
Inmunohistoquímica	Cuantitativa	Numero de señales x campo Intensidad de la señal Área	Numeral discreta Cualitativa Numeral continua	Regresión Lineal, T de Student, ANOVA
Co-localización	Cuantitativa	Numero de señales x campo	Numeral discreta	Regresión Lineal, T de Student, ANOVA

## 10. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio prolectivo realizado mediante asignación directa de los pacientes, transversal, observacional y analítico en el cual se realizó el procedimiento de la obtención de biopsias musculares y pruebas musculares en adultos mayores y jóvenes en diferentes momentos clínicos para la obtención de los datos.

## 11. ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico se llevara a cabo mediante estadística descriptiva, porcentaje proporciones, análisis de la media, correlacione las variables mediante el modelo estadístico propuesto:.

- $VF = \alpha + VA + VM + V(AM) + E$
- En la segunda fase se podría agregar al modelo:
- - VI

El análisis de la relación de las variables moleculares, inflamación con las proteínas estructurales mediante análisis de componentes principales.

### **Estudio retrospectivo, ambilectivo, observacional, analítico.**

Se utilizó análisis estadístico descriptivo, demográfico y se realizó análisis de mortalidad por medio de curva de Kaplan – Meyer utilizando las 2 variable principales. Los datos se ingresaron al programa estadístico SPSS versión 21 para PC.

## 12. RESULTADOS

**Cada uno de los 97 pacientes incluidos en el estudio fue asignado a uno de los tres grupos poblacionales que cubren todo el espectro de edades. Los sujetos se dividieron según su sexo, en atletas, sujetos jóvenes sedentarios, adultos mayores activos y frágiles. De acuerdo a las pruebas descritas en material y métodos las variables analizadas fueron: el sexo, edad, volumen muscular, fuerza de prensión y las pruebas funcionales medidas por la prueba de la silla, la marcha en 4 m (Tabla 3). El análisis de normalidad mostró que en un intervalo**

de confianza del 95%, la mediana y la desviación estándar en los seis diferentes grupos fue homogénea, indicando que el análisis estadístico utilizados a lo largo del estudio son adecuado para evaluar las diferencias entre los grupos en el contexto de sexo, volumen y desempeño muscular.

**TABLA 3. ANÁLISIS DESCRIPTIVOS DE LOS PARÁMETROS FUNCIONALES POR SEXO Y GRUPO DE ESTUDIO.**

<b>Women N = 50</b>	<b>Variable</b>	<b>Activity Rate</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>IC 95%</b>
	Volume	Sedentary	15	952.11	214.03	524.64- 1283.23
		Old	20	1121.06	222.86	635.51- 1379.40
		Athlete	15	1416.06	148.62	1116.17- 1625.54
	Hand Grip	Sedentary	15	22.31	6.50	18.84-25.78
		Old	20	24.95	6.05	22.11-27.78
		Athlete	15	32.00	4.55	29.36-34.63
	Chair test	Sedentary	15	8.97	4.13	6.59-11.36
		Old	20	9.39	3.52	6.13-12.65
		Athlete	15	5.04	1.30	3.96-6.1
	4 meters test	Sedentary	15	3.11	1.13	2.46-3.77
		Old	20	3.25	1.13	2.21-4.30
		Athlete	15	2.00	0.36	1.66-2.34

<b>Men</b>						
<b>N = 47</b>						
	Volume	Sedentary	15	1213.58	294.85	1015.49-1411.66
		Old	17	1657.25	389.27	1480.05-1834.44
		Athlete	15	2562.74	342.88	2372.86-2752.63
	Hand Grip	Sedentary	15	29.30	10.61	22.17-36.44
		Old	17	42.14	10.83	37.21-47.07
		Athlete	15	60.26	9.94	54.75-65.77
	Chair test	Sedentary	15	8.63	2.63	6.60-10.65
		Old	17	8.11	2.00	6.90-9.32
		Athlete	15	4.12	0.45	3.83-4.41
	4 meters test	Sedentary	15	3.07	0.96	2.33-3.81
		Old	17	2.87	0.71	2.44-3.30
		Athlete	15	1.79	0.20	1.65-1.92

El primer grupo que se analizó fue el de los hombres, los resultados de la prueba de ANOVA y la prueba pos-hoc de Bonferroni, como era de esperarse mostró diferencias significativas entre en el volumen muscular comparando los adultos funcionales con el grupo de sedentarios y atletas, siendo los atletas los de volumen más grande. Estos primeros resultados apoyan la importancia del ejercicio a lo largo de vida del individuo, para mantener el volumen muscular y la funcionalidad a lo largo de la vida (Tabla 4 y figura 7<sup>a</sup>). El análisis del desempeño muscular medido por fuerza de prensión mostró correlación con el volumen muscular en todos los casos, a más

volumen muscular más Kg/repeticiones en la prueba de prensión, y este valor disminuyó con la falta de actividad física. Por lo que en los hombres la prueba de prensión refleja la fuerza muscular y está relacionado de manera directa con el volumen y con la presencia o no de sarcopenia. (Fig. 7 B). El siguiente paso fue explorar algunos de los componentes de la prueba de desempeño físico SPPB. Esta batería de estudios incluyó la prueba de marcha en 4 m y la prueba de la silla, considerados como buenos parámetros clínicos para evaluar funcionalidad y desempeño muscular. Se observaron nuevamente las diferencias esperadas entre el grupo de adultos mayores funcionales y atletas, de manera interesante no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de adultos funcionales y el grupo de jóvenes sedentarios (Tabla 4 Figura 7 C\_D). Este hallazgo indica que, en los hombres sedentarios sin ninguna actividad física, la presencia temprana de alteraciones en el desempeño muscular, lo que podría sugerir que existen deficiencias tempranas antes de iniciar la pérdida muscular. La prueba de la silla evalúa fuerza y de manera indirecta desempeño muscular. Los resultados mostraron diferencias entre los tres grupos, lo cual indica que la actividad física se relaciona con el volumen, incrementando la fuerza por lo tanto mejora el desempeño reduciendo la fatiga. Lo que en los hombres retrasa la fragilidad e incrementa la funcionalidad.

**TABLA 4. ANOVA DE PARAMETROS FUNCIONALES COMPARADOS POR GRUPO EN MUJERES**

Variable	Grupo de Estudio	Grupos de Comparación	DE	Sig.
<b>VOLUMEN (cm<sup>3</sup>)</b>	VIEJOS	Sedentarios	1208.68 (±104.29)	0.049
		atletas	1416.06 (±148.62)	0.0001
<b>HAND GRIP (Kg.)</b>	VIEJOS	Sedentarios	27.66 (±4.48)	0.55
		atletas	32 (±4.55)	0.003
<b>VELOCIDAD 4 METTROS (Seg.)</b>	VIEJOS	Sedentarios	2.19 (±0.163)	0.073
		atletas	2.01 (±0.289)	0.83
<b>PRUEBA DE LA SILLA (Seg.)</b>	VIEJOS	Sedentarios	6.0 (±1.03)	0.066
		atletas	4.94 (±1.01)	0.049

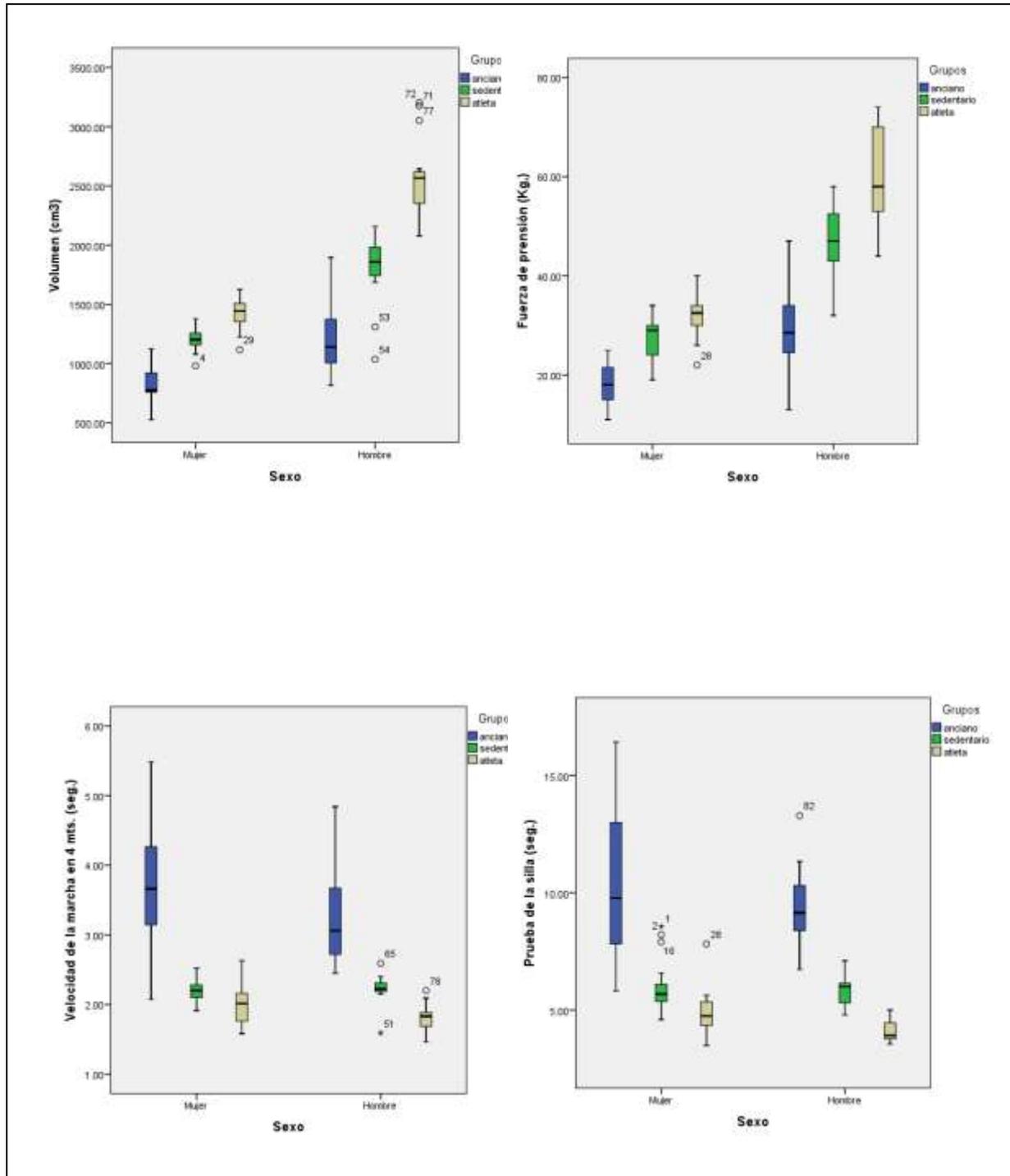
El análisis de ANOVA en las mujeres mostró en los tres grupos de estudio diferencias importantes en el volumen muscular. El volumen muscular si fue diferente entre los grupos, pero es importante resaltar que el ejercicio entre el grupo de adultas mayores funcionales y el sedentario no tiene el mismo impacto que en los hombres. La prueba de prensión mostró diferencias únicamente en el grupo de atletas, los otros dos grupos fueron similares, lo cual apunta a que en las mujeres el volumen muscular no tiene un efecto directo en la fuerza. La prueba de marcha en 4 m no mostró ninguna diferencia entre grupos, mientras que la prueba de la silla observo una diferencia marginal con el grupo de atletas y adultos mayores (Tabla 5 Figura 7<sup>a</sup>-C). Estas observaciones sugieren que en las mujeres el volumen muscular y la fuerza son independiente de la actividad física, en las mujeres es evidente que no tiene el mismo impacto funcional que tiene en los hombres.

**TABLA 5. ANOVA DE PARAMETROS FUNCIONALES COMPARADOS POR GRUPO EN HOMBRES**

<b>Variable</b>	<b>Grupo de Estudio</b>	<b>Grupos de Comparación</b>	<b>DE</b>	<b>Sig.</b>
<b>VOLUME (cm3)</b>	VIEJOS	Sedentarios	1875 (±287.86)	0.005
		atletas	2562.7467 (±342.88)	0.0001
<b>HAND GRIP (Kg.)</b>	VIEJOS	Sedentarios	47.4000 (±6.62)	0.006
		atletas	60.2667 (±9.94)	0.0001
<b>VELOCIDAD 4 METTROS (Seg.)</b>	VIEJOS	Sedentarios	2.2275 (±0.203)	1.0
		atletas	1.8107 (±0.190)	0.001
<b>PRUEBA DE LA SILLA (Seg.)</b>	VIEJOS	Sedentarios	5.8281 (±0.635)	1.0
		atletas	4.0880 (±0.455)	0.001

**TABLA 6. ANALISIS DE ANOVA CON POS HOC BONFERRONI DE LAS PRUEBAS DE DESEMPEÑO FUNCIONAL CON SIGNIFICANCIA ESTADISTICA  $CONP < 0.05$  EN HOMBRES.**

Variable	(I) Tarifa de actividad	(J) Tarifa de actividad	Diferencia de hombre (I-J)	SE	P
Volumen	Viejo	Sedentario	-443.67143*	132.14083	0.005
		Atleta	-1349.16667*	140.93301	0.0001
Hand grip	Viejo	Sedentario	12.83377	3.91182	0.006
		Atleta	-18.12381*	3.55309	0.0001
Velocidad 4 metros	Viejo	Sedentario	-.19752	.29055	1.000
		Atleta	1.08526*	.26824	0.001
Test de silla		Sedentario	4.50417*	.81482	0.0001
		Atleta	3.98878*	.73973	0.0001



**FIGURA.7.** Gráfico de cajas y bigotes que muestran las diferencias de los cuatro Parámetros evaluados por sexo, edad y raza de actividad física: A. Volumen de los cuádriceps evaluado por TAC, B. Fuerza de prensión. C. Velocidad de la marcha a 4 metros y D. Prueba de la silla.

El análisis de ANOVA en las mujeres mostró en los tres grupos de estudio diferencias importantes en el volumen muscular. El volumen muscular si fue diferente entre los grupos, pero es importante resaltar que el ejercicio entre el grupo de adultas mayores funcionales y el sedentario no tiene el mismo impacto que en los hombres. La prueba de prensión mostró diferencias únicamente en el grupo de atletas, los otros dos grupos fueron similares, lo cual apunta a que en las mujeres el volumen muscular no tiene un efecto directo en la fuerza. La prueba de marcha en 4 m no mostró ninguna diferencia entre grupos, mientras que la prueba de la silla observo una diferencia marginal con el grupo de atletas y adultos mayores (Tabla 5 Figura 7<sup>a</sup>-C). Estas observaciones sugieren que en las mujeres el volumen muscular y la fuerza son independiente de la actividad física, en las mujeres es evidente que no tiene el mismo impacto funcional que tiene en los hombres.

**TABLA 7. ANALISIS DE ANOVA CON POS HOC BONFERRONI DE LAS PRUEBAS DE DESEMPEÑO FUNCIONAL CON SIGNIFICANCIA ESTADISTICA  $CON P < 0.05$**

Variable	(I)	(J) Tarifa de actividad	Diferencia de hombre (I-J)	SE	P
Volumen	Viejo	Sedentario	-168.95	67.75	0.049
		Atleta	-463.94	73.92	0.0001
Hand grip	Viejo	Sedentario	2.63	1.95	0.55
		Atleta	-7.05	2.03	0.003
Velocidad a 4metros	Viejo	Sedentario	1.11	0.46	0.073
		Atleta	0.14	0.46	0.83
Test de la silla	Viejo	Sedentario	4.34	1.78	0.066
		Atleta	-3.92	1.52	0.049

### **EN MUJERES**

Los resultados de esta primera parte del estudio sugieren de manera consistente que la funcionalidad muscular tiene diferentes mecanismos en ambos sexos, mientras que en el hombre depende del volumen muscular y actividad física, en las mujeres no.

La siguiente parte del estudio se enfocó a explorar algunos de las vías de señalización asociadas con sarcopenia en los grupos de estudio descritos en material y métodos. Para ello se analizaron biopsias de vasto externo de cuádriceps femoral en los cuatro grupos.

## **La apoptosis e inflamación modulan de manera positiva la fibra muscular en el en adulto frágil.**

Con el fin de conocer los cambios a nivel molecular existentes entre cada uno de los grupos analizados, se evaluó la expresión génica conforme al procedimiento descrito en metodología. Se estudiaron a través de RT-PCR, elementos de la vía de señalización de Apoptosis, Autofagia, Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Factor de Crecimiento Transformante- $\beta$  (TGB- $\beta$ ) Gen de Mosca sin Alas (WNT) así como Interleucinas. El análisis incluyó 61 genes relacionados con apoptosis, 10 asociados a la vía del Factor de necrosis tumoral, se evaluaron las interleucinas 10,2,4,6,8, interferón alfa 2, dos del factor transformante del crecimiento (TGFB1 y B2).

Los grupos fueron designados de acuerdo a los resultados obtenidos en la parte clínica de la presente tesis y en un muestreo por conveniencia se establecieron 10 sujetos de cada grupo de estudio. Una vez realizada la biopsia muscular el tejido se mantuvo en el buffer de lisis para la extracción del RNA, la extracción se realizó mediante el Quiagen. Fibrous Tissue Mini Kit

La calidad y cantidad del RNA fue evaluada obteniendo las densidades ópticas mediante espectroscopia óptica con luz ultravioleta y utilizando la relación de las mediciones a 260/280nm. Los ácidos nucleicos absorben la máxima energía a la  $\lambda=260$  y las proteínas a 280. Para la cuantificación se utilizó la fórmula de  $1 \text{ Abs} = 1\text{OD}=40 \text{ ug/mL RNA}$ . La pureza (contaminación de proteínas) se consideró en todas aquellas muestras que mostraron una relación  $260/280 =$  de 1.8-2. La integridad se evaluó mediante la observación directa de las unidades ribosomales 28 y 18 S en geles desnaturalizantes de agarosa al 1%. Todas las muestras consideradas para la retro transcripción y análisis de expresión contaron con las características óptimas de concentración, pureza e integridad. De acuerdo a material y métodos se realizaron los estudios de expresión y se obtuvieron los siguientes resultados. Se decidió utilizar al grupo de adultos funcionales como calibrador de la expresión génica. Este grupo es distinto al grupo de Adultos Frágiles por tener un proceso sarcopenico incipiente o inexistente por lo que lo hace un candidato adecuado para comparar y tener resultados confiables. Una tasa de valor de cambio de  $2.0 \pm$  calculada mediante un

análisis  $2^{\Delta\Delta CT}$ , fue considerada como un cambio significativo en los patrones de expresión.

Los adultos frágiles mostraron una expresión elevada de genes apoptóticos,

Los adultos sedentarios tuvieron patrones de expresión similares a los viejos funcionales en la totalidad de los genes estudiados. El grupo de ancianos frágiles comparados con los grupos de ancianos activos y jóvenes sedentarios. Como se ha demostrado en los resultados clínicos, se observó una disminución en la funcionalidad muscular en adultos frágiles en comparación con los adultos funcionales. La hipótesis de este proyecto plantea que estos cambios pueden ser relacionados con características moleculares relacionadas con la sarcopenia. La tabla muestra los resultados del análisis de expresión diferencial.

Los Jóvenes Atletas muestran una actividad de recambio celular elevado. El tercer grupo de estudio corresponde al de los jóvenes atletas. Este grupo mostró la mayor diferencia en eficiencia muscular por lo que se esperaba encontrar una diferencia a nivel de expresión distinta al de los adultos funcionales. La tabla muestra los resultados del análisis de expresión diferencial correspondiente a este análisis.

**TABLA 8. LISTA DE LOS GENES DE LAS VÍAS DE APOPTOSIS, AUTOFAGIA E INFLAMACIÓN QUE SE UTILIZARON PARA BUSCAR DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN RELATIVA ENTRE GRUPOS.**

Symbol	Official Full Name	Frágiles	
BAX	BCL2-associated X protein	1.8938	0.037658
BCL2L1	BCL2-like 1	2.0316	0.02496
BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	2.1234	0.128015
CASP7	Caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase	1.7486	0.169504
CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	3.8757	0.038929
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	1.9401	0.024844
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	1.9292	0.139643
GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	3.9093	0.022338
NOL3	Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)	1.5224	0.101119
SPATA2	Spermatogenesis associated 2	2.767	0.049444
TNFRSF10A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	1.5426	0.106266
TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	1.8675	0.077497
TP53	Tumor protein p53	1.5719	0.215069
BCL2A1	BCL2-related protein A1	-1.8565	0.243413
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	1.9154	0.068092
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2	2.2212	0.052156
ATG16L1	ATG16 autophagy related 16-like 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )	1.7053	0.060558
ATG7	ATG7 autophagy related 7 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	1.62	0.030977
CTSB	Cathepsin B	1.5734	0.058562
GAA	Glucosidase, alpha; acid	2.0634	0.096525
HTT	Huntingtin	2.7082	0.034431
IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	-1.5292	0.342785
INS	Insulin	1.7585	0.119357
IRGM	Immunity-related GTPase family, M	1.7585	0.119357

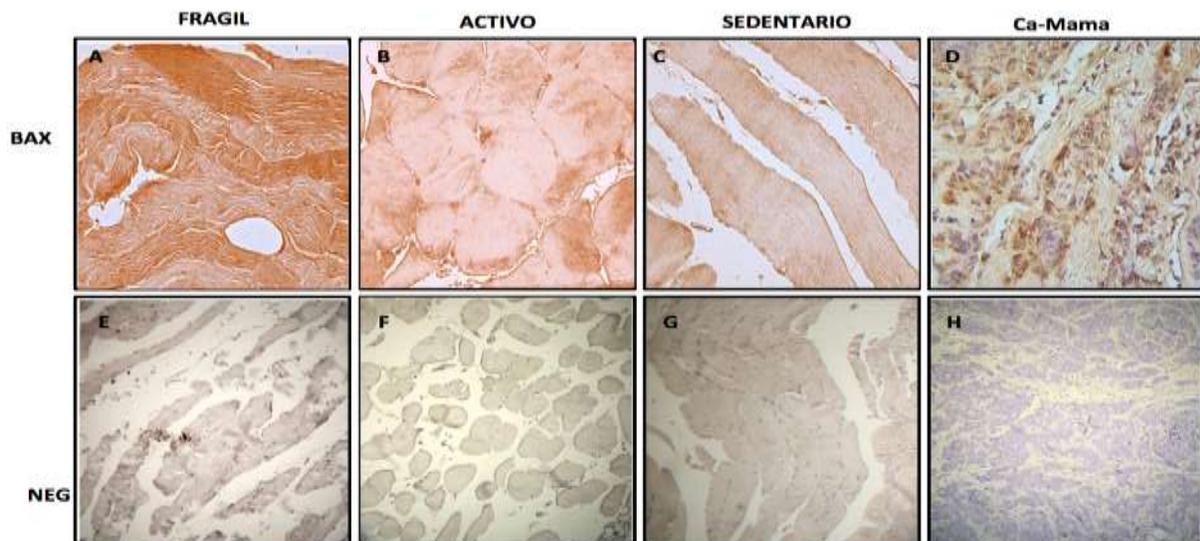
MAP1LC3A	Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha	2.0103	0.062444
SQSTM1	Sequestosome 1	1.8006	0.067972
ULK1	Unc-51-like kinase 1 (C. elegans)	1.9649	0.071519
JUN	Jun proto-oncogene	1.5845	0.107947
WNT1	Wingless-type MMTV integration site family, member 1	1.7585	0.119357
DCN	Decorin	-1.7653	0.370363
CD27	CD27 molecule	1.6896	0.11807
PARP1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1	1.611	0.146692
TNFSF14	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14	1.8356	0.09659
TNFSF15	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	1.7585	0.119357
IL2	Interleukin 2	1.7585	0.119357
IL4	Interleukin 4	1.7585	0.119357
IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	-1.5127	0.492306
IL8	Interleukin 8	-2.508	0.227902
IL10	Interleukin 10	1.8488	0.630765
IFNA2	Interferon, alpha 2	1.5026	0.223797

Con los resultados anteriores podemos decir que en el tejido muscular de los adultos frágiles se desencadena un proceso inflamatorio y otro apoptótico.

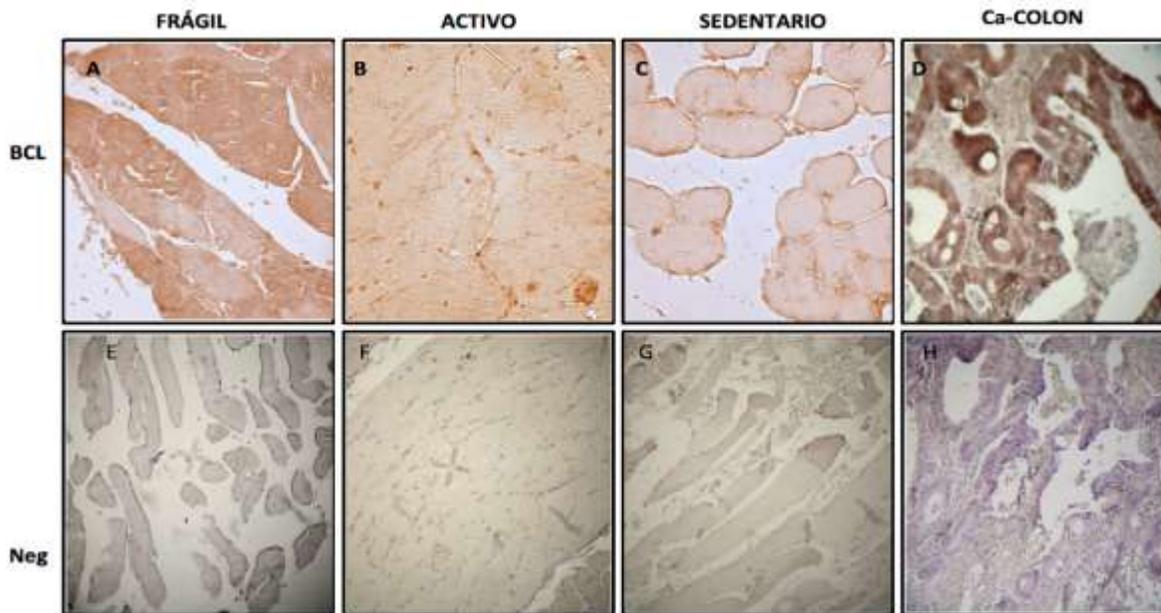
Para validar los hallazgos observados en los microarreglos se eligieron al azar algunas de las moléculas sobrerreguladas, dos moléculas de la vía apoptótica y una de la vía asociada a inflamación.

Para validar el hallazgo de expresión se realizaron estudios de inmunohistoquímica, se compararon adultos frágiles contra adultos jóvenes sedentarios y activos, controles positivos y en todos los casos se incluyó un control negativo en ausencia de anticuerpo. En las figuras 8 y 9 se observan los resultados representativos de la inmunohistoquímica con inmunoperoxidasa. Se utilizó un anticuerpo policlonal contra BCL-XL y un anticuerpo monoclonal contra BAX se estudiaron cortes longitudinales y transversales de biopsias musculares incluidas en parafina. En cada caso se leyeron 5 campos diferentes con dos observadores. En la figura 8A se muestra la imagen de

un corte longitudinal de un adulto mayor frágil, en donde se observa el incremento en la expresión de la proteína apoptótica BAX. 8B muestra un corte transversal de un adulto mayor funcional en donde observamos una menor expresión proteica, lo que concuerda con los datos observados en el microarreglo. 8C corte longitudinal de un adulto joven sedentario que muestra una expresión similar al activo. 8D muestra un corte de tejido neoplásico mamario que se utilizó como control positivo. Las imágenes 8E-H muestran los respectivos controles negativos (sin anticuerpo). La figura 8 son los resultados utilizando el anticuerpo BCL-XL donde se observan resultados semejantes a lo obtenido en el microarreglo.



**Figura 8. Inmunohistoquímica con peroxidasa utilizando anticuerpo contra BAX, resolución 20X imagen representativa cortes longitudinales y transversales, del análisis en 5 campos. 2ª Corte longitudinal adulto mayor frágil. 2B Corte transeversal de adulto mayor funcional. 2C Corte longitudinal adulto joven sedentario. 2D tejido neoplásico mamario (control positivo). 2E-H Cotroles negativos (sin anticuerpo)**

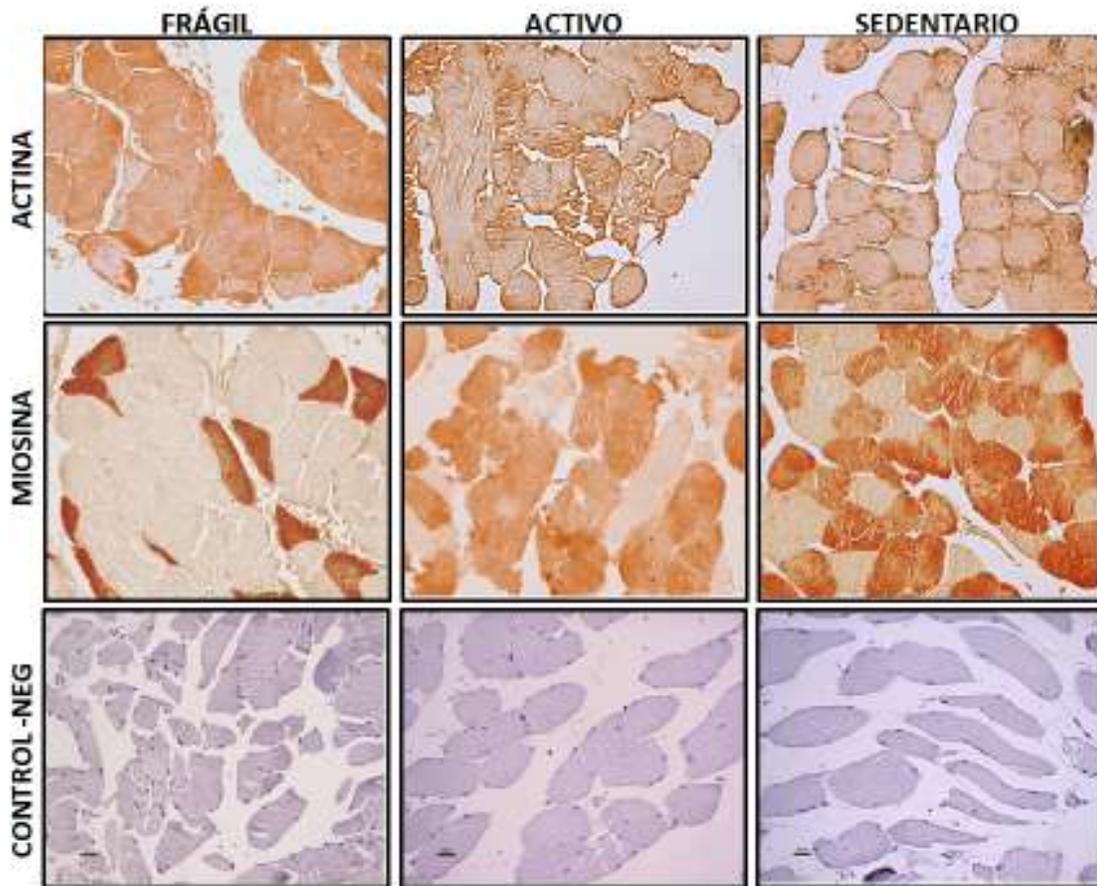


**Figura 9. Inmunohistoquímica con peroxidasa utilizando anticuerpo BCL-XL, resolución 20X imagen representativa de cortes longitudinales y transversales, del análisis de 5 campos. 2ª Corte longitudinal adulto mayor frágil. 2B Corte transversal de adulto mayor funcional. 2C Corte longitudinal adulto joven sedentario. 2D Carcinoma de colón (control positivo). 2E-H Controles negativos (sin anticuerpo).**

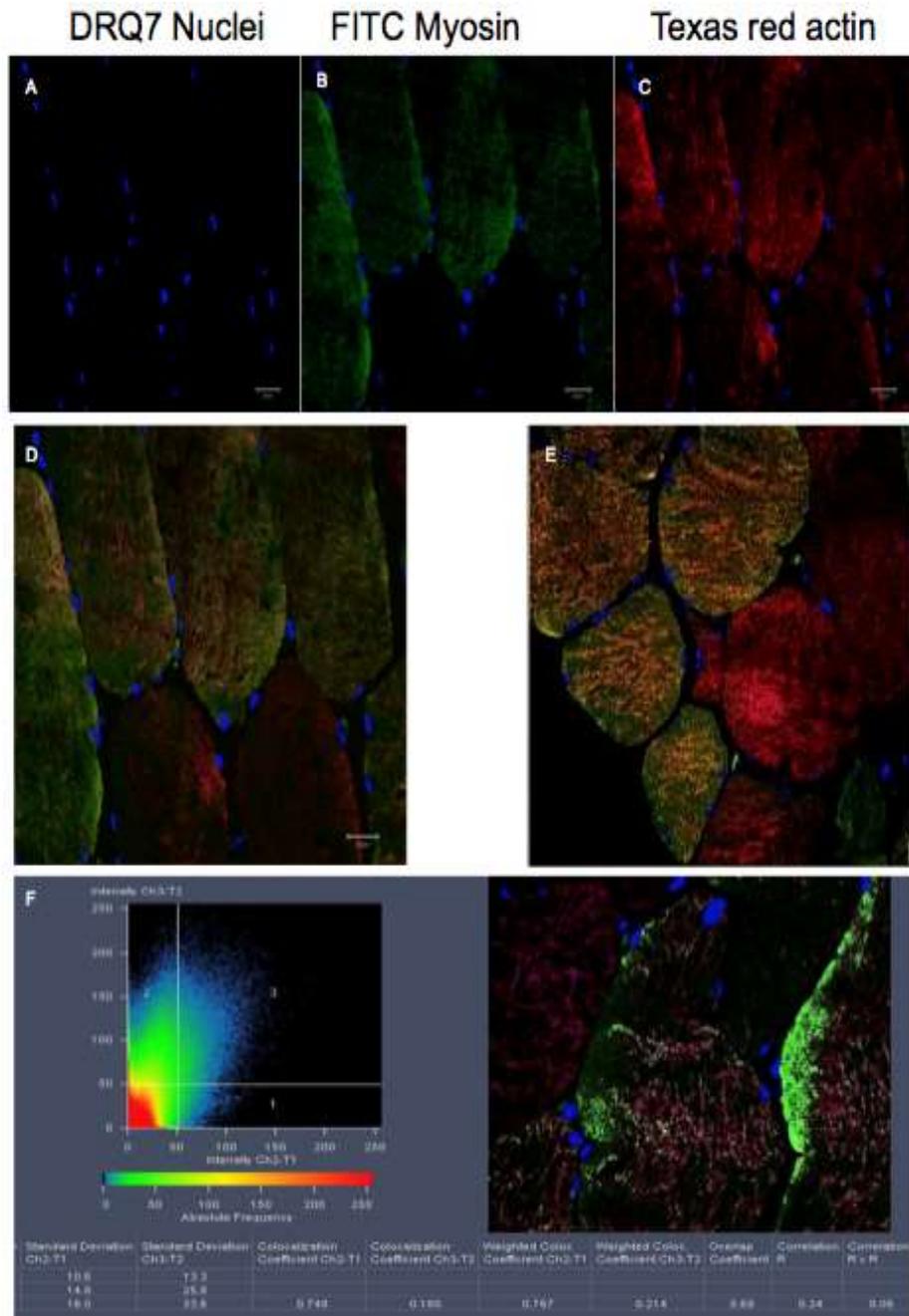
Los resultados de la inmunohistoquímica mostraron resultados que concuerdan con los obtenidos del microarreglos, concluyendo que los resultados de expresión son consistentes. Con esto podemos sugerir que la inflamación y la apoptosis son dos mecanismos que participan en la pérdida de la funcionalidad de la fibra muscular, están activos en pacientes mayores frágiles y no se encuentran en adultos mayores activos. Sugerimos que uno de los mecanismos por el cual se llega a la fragilidad en el anciano es un estado inflamatorio que conlleva a apoptosis de la fibra muscular.

La última pregunta en este proyecto fue conocer, si los mecanismos de inflamación y apoptosis identificados en el grupo de adultos frágiles tenían impacto directo en la distribución de proteínas contráctiles como actina y miosina, y que esta fuera la explicación clínica para la pérdida de funcionalidad muscular. Para responder esta

pregunta se realizaron estudios de inmunohistoquímica con fluorescencia y análisis con focal en los pacientes frágiles y activos. Se utilizaron anticuerpos primarios para miosina y actina y anticuerpos secundarios marcados con FITC y rojo Texas los núcleos se marcaron con DRQ7. Se analizaron cortes longitudinales y transversales de la fibra muscular. Los resultados se muestran en la figura 10 en donde se observan diferencias cuali y cuantitativas en la distribución de las proteínas analizadas entre los grupos principalmente en la miosina, la cual se encontró prácticamente ausente en la fibra muscular de los adultos frágiles. Se conoce que el mecanismo por el cual se da la contracción es la interacción de ambas proteínas contráctiles, por lo que estudiamos las diferencias en la colocalización de las proteínas analizadas entre los grupos de estudio. La figura 11 muestra que los resultados obtenidos confirmaron que las diferencias cuantitativas observadas en la inmunohistoquímica resultan en un patrón anormal de colocalización entre ellas, lo que sugiere que los eventos moleculares identificados tienen un efecto directo sobre la contractilidad.



**Figura10. Inmunohistoquímica con peroxidasa utilizando anticuerpo contra actina y miosina en cortes longitudinales y trnasversales de sujetos frágiles, activos, y jóvenes sedentarios. resolución 20X imagen representativa del análisis de 5 campos. 2ª Corte transversal adulto mayor frágil que muestra expresión homogénea de actina, 2B Corte longitudinal de adulto mayor activo con un patrón homogéneo de actinia al igual que en el adulto joven edentario. 2C. 2D Corte transversal de adulto mayor frágil que muestra una disminución significativa en el patrón de expresión de miosina. 2E Corte longitudinal de adulto mayor activo que muestra una disminución heterogénea de miosina resultado similar al observado en los jóvenes sedentarios que muestran un patrón con pérdida de miosian en diferentes regiones del campo 2F. 2G-I controles negativos.**



**Figura 11. Estudio de microscopia con inmunohistoquímica y análisis con focal en adultos mayores frágiles y activos. (A-C) anticuerpos con fluoróforos (D) Análisis cofocal en los pacientes frágiles no funcionales mostrando diferencias en la distribución de las proteínas actina y miosina. E) análisis en los adultos funcionales mostrando las distribución diferencial de las proteínas en una patron cuali y cuantitativo.**

### 13. DISCUSIÓN

La evaluación entre el volumen muscular y el desempeño tiene importantes implicaciones en el adulto mayor, sin embargo, al explorar las variables y contrastarlas con los resultados que obtenían los jóvenes se logró generar consideraciones diferentes a lo que se infiere en la literatura. Existen algunos estudios que demuestran que el desempeño muscular y el volumen no reflejan la capacidad contráctil de la fibra muscular, siendo diferente entre hombres y mujeres evaluados según grupos étnicos y tasa de actividad física. Los hallazgos clínicos más significativos en el grupo de hombres muestran que la actividad física tiene un impacto directo sobre el volumen muscular y este sobre los resultados de la medición del desempeño físico.

Los resultados sugieren que la falta de actividad física a lo largo de la vida del hombre es un determinante para la pérdida del volumen muscular la cual inicia de manera temprana, va incrementándose con el tiempo y tiene un impacto funcional grave en la vejez. Las pruebas de desempeño en este grupo de sujetos, mostro que todos los parámetros están relacionados con el volumen muscular, lo cual apoya la premisa de que la actividad física incrementa el desempeño muscular. Es importante discutir los resultados observados en la prueba de los 4 m de los grupos de hombres atletas, jóvenes sedentarios y adultos mayores, estos datos sugieren que la sarcopenia es un proceso que pudiera iniciarse en la juventud, y que la actividad física tiene un impacto protector. Se demostró que la prueba de 4 m no es el mejor parámetro para valorar desempeño muscular. Por el contrario, los resultados observados en la prueba de la silla, apoyan de manera más consistente que esta evaluación es útil en el desempeño muscular, se relaciona con fuerza y volumen, siendo aplicable en poblaciones jóvenes para evaluar alteraciones en el desempeño muscular y en el desarrollo de sarcopenia temprana. En el grupo de mujeres los hallazgos fueron interesantes en el sentido de que la masa muscular a pesar de ser diferente según edad y actividad física, no determinaron los resultados de ninguna de las pruebas, por lo que no fue posible encontrar diferencias significativas estadísticamente.

Estos resultados se robustecieron con los hallazgos de un protocolo de tesis realizado

por un alumno de especialidad médica en el que se evaluó composición corporal en 300 pacientes divididos solo en grupo de jóvenes sedentarios y ancianos activos en los que el porcentaje de masa muscular magra no tuvo relación con el desempeño en ancianos, y si logro una correlación media en jóvenes, al separarlos por sexo el mismo hallazgo de diferencias entre hombres y mujeres se replicó.

Estos resultados reforzaron la necesidad de abordar el fenómeno del desempeño bajo parámetros distintos como el de la contracción repetida, y la evaluación molecular para intentar dilucidar las características del fenómeno contráctil.

Como se ha demostrado en los resultados anteriores, las pruebas clínicas mostraron una disminución en la funcionalidad muscular en adultos frágiles en comparación con los adultos activos. La hipótesis de este proyecto plantea que estos cambios pueden estar relacionados con características moleculares de la sarcopenia; entre ellos la expresión de genes de las vías de señalización de Apoptosis, Autofagia, TNF  $\beta$ , TGF  $\alpha$ , WNT e Interleucinas. Con este fin, mediante arreglos de baja densidad se analizaron los genes más representativos de las vías antes mencionadas. Los resultados fueron normalizados utilizando la expresión de los genes GAPDH y RPLP0 y se empleó la expresión del grupo de Adultos Sedentarios como grupo calibrador. Una tasa de valor de cambio de  $2.0 \pm$  calculada mediante un análisis  $2^{\Delta\Delta CT}$ , fue considerada como un cambio significativo. La tabla XX es representativa de los resultados encontrados en este análisis.

Como se puede observar, al considerar la expresión entre los atletas, sedentarios y los adultos mayores, no se encontraron cambios significativos en las vías analizadas, lo que implica que un adulto sedentario y un adulto mayor activo, son similares a nivel de expresión génica. Esto es reflejado en lo evaluado mediante pruebas clínicas, en donde se demostró que la funcionalidad muscular es muy similar entre ambos grupos. Sin embargo, es posible observar una clara tendencia (fold 1.0) en los genes de apoptosis y autofagia, lo que sugiere que estos procesos se encuentran activos en niveles muy bajos en adultos mayores activos, y que, conforme se avanza al estado de fragilidad estas vías incrementan su expresión lo que conlleva al declive de la

funcionalidad muscular.

En el caso de los adultos frágiles, estos mostraron un cambio considerable respecto al grupo de adultos sedentarios. Los resultados de los frágiles muestran una elevada expresión, principalmente de genes que participan en apoptosis, no así autofagia, WNT o TGF- $\alpha$ , lo que sugiere que el proceso de apoptosis es el principal mecanismo a través del cual el volumen muscular es disminuido en adultos frágiles. Experimentos adicionales a este respecto serán propuestos con el fin de ahondar en este tópico.

Notablemente, nuestros resultados muestran que los genes asociados al proceso de inflamación no muestran ningún tipo de cambio o tendencia entre el grupo de Adultos Sedentarios y ancianos activos, lo que demuestra que este evento no está presente en ninguno de los dos grupos, en contraste estos genes se encuentran expresados en el grupo de Adultos Frágiles, lo que nos lleva a proponer una relación entre la elevación del proceso inflamatorio y el aumento de la apoptosis, como parte del mecanismo de pérdida muscular causada por sarcopenia.

Por otra parte, los resultados en la expresión de miosina disminuida en los grupos de adultos mayores frágiles y activos con respecto a los jóvenes muestran coherencia con la idea de alteraciones de la contractilidad que se evidencian en las pruebas clínicas pero que es independiente del volumen muscular. Como se observa en las imágenes, a pesar de que en morfología la fibra está presente y es de tamaño similar ente jóvenes sedentarios y ancianos activos la expresión de miosina esta disminuida y prácticamente ausente en los ancianos frágiles. La miosina es una proteína determinante de la actividad mecánica de la fibra muscular, ya que su modificación conformacional permite el acortamiento de la fibra muscular. El tener estos resultados nos permite, primero considerar que si existe un fenómeno biológico independiente al volumen muscular que modifica el desempeño, puede estar modificado por fenómenos de transcripción y traducción de proteínas relacionadas con apoptosis. Nuestra manera de evaluar a los pacientes nos permite determinar cual ya presenta alteraciones funcionales severas, pero no es capaz de cubrir el espectro de inicio en la aparición del deterioro funcional en el viejo.

## 14. CONCLUSIONES

- ✚ Existen diferencias en el desempeño muscular asociadas al sexo
- ✚ Con estos datos decidimos utilizar los parámetros de Hand Grip y un parámetro de repeticiones isotónicas contra carga como parámetros clínicos a lo largo del estudio, por su consistencia ante la influencia de sexo, edad y actividad física.
- ✚ Divididos por grupos por edad y actividad física exploramos la relación de los parámetros clínicos con los mecanismos biológicos descritos.
- ✚ Analizamos la expresión en la transcripción de genes asociados a envejecimiento
- ✚ En los sujetos frágiles se observó aumento de expresión de los genes de la vía apoptótica e inflamación, principalmente interleucina 6 y 8 y lo que sugiere la participación de estos en la pérdida muscular.
- ✚ Evaluamos la distribución de proteínas actina y miosina realizando estudios de IH e IF confocal.
- ✚ La manera de evaluar actualmente a los pacientes no discrimina el espectro de las poblaciones en riesgo.
- ✚ Adultos Frágiles existe sobre expresión de genes que participan en apoptosis, lo que sugiere a este mecanismo como partícipe en la pérdida muscular.
- ✚ Nuestros resultados sugieren que a pesar de morfología en la fibra muscular conservada, la expresión de miosina está prácticamente ausente en los ancianos frágiles.

- ✚ La miosina como proteína determinante en la actividad contráctil muscular apoya la existencia de fenómeno biológico independiente al volumen muscular y relacionado al desempeño

## 15. REFERENCIAS

1. Janssen I, Shepard DS, Katzmarzyk PT, Roubenoff R. The healthcare costs of sarcopenia in the United States. *J Am Geriatr Soc.* 2004; 52:80-85
2. Stevens JA, Olson S. Reducing falls and resulting hip fractures among older women. *Home Care Provid.* 2000; 5:134-139; quiz 140-131  
Rivera JJ, Carrillo-Ruiz J, Queipo G, *JAGS*, Volume 61, issue 5, pages 834–835, May 2013
3. Lang , Streeper, Cawthon, Baldwin, Taaffe, Harris, Sarcopenia: etiology, clinical consequences, intervention and assessment, *Osteoporos Int* (2010) 21:543–559
4. Cruz-Jentoft AJ, Triana FC, Gómez-Cabrera MC, López-Soto A, Masanés F, Martín PM, et al. [The emergent role of sarcopenia: Preliminary Report of the Observatory of Sarcopenia of the Spanish Society of Geriatrics and Gerontology]. *Rev española Geriatr y Gerontol.* Elsevier; 2011 Jan 1;46(2):100–10.
5. Arroyo P, Lera L, Sánchez H, Bunout D, Santos JL, Albala C. Indicadores antropométricos, composición corporal y limitaciones funcionales en ancianos. *Rev Med Chil.* Sociedad Médica de Santiago; 2007 Jul;135(7):846–54.
6. Pannérec A, Springer M, Migliavacca E, Ireland A, Piasecki M, Karaz S, et al. A robust neuromuscular system protects rat and human skeletal muscle from sarcopenia. *Aging (Albany NY).* 2016 Mar 24;
7. Felipe Salech M, Rafael Jara L, Luis Michea A. Cambios fisiológicos asociados al envejecimiento. *Rev Médica Clínica Las Condes.* 2012 Jan;23(1):19–29.

8. Hazell TJ, DeGuire JR, Weiler HA. Vitamin D: an overview of its role in skeletal muscle physiology in children and adolescents. *Nutr Rev.* 2012 Sep;70(9):520–33.
9. JF J. Crecimiento y desarrollo motor en las diferentes etapas evolutivas de la persona. *Módulo de bases anatómicas y fisiológicas del paciente.* 2016;12(2):2–6
10. Fry AC, Irwin CC, Nicoll JX, Ferebee DE. Muscular Strength and Power in 3-to 7-Year-Old Children. *Pediatr Exerc Sci.* 2015 Aug;27(3):345–54.
11. Goodpaster BH, Park SW, Harris TB, Kritchevsky SB, Nevitt M, Schwartz A V, et al. The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2006 Oct;61(10):1059–64.
12. R. Carrillo Esper, J. Muciño Bermejo, C. Peña Pérez UGCC. Fragilidad y sarcopenia. *Rev la Fac Med la UNAM.* 2011;54(5):12–21.
13. Gómez-Cabello A, Vicente Rodríguez G, Vila-Maldonado S, Casajús JA, Ara I. Envejecimiento y composición corporal: la obesidad sarcopénica en España. *Nutr Hosp. Grupo Arán;* 27(1):22–30.
14. Nair KS. Aging muscle. *Am J Clin Nutr.* 2005 May;81(5):953–63.
15. Volpi E, Nazemi R, Fujita S. Muscle tissue changes with aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2004 Jul;7(4):405–10.
16. Kamel HK. Sarcopenia and aging. *Nutr Rev.* 2003 May;61(5 Pt 1):157–67.
17. Leeuwenburgh C. Role of apoptosis in sarcopenia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2003 Nov;58(11):999–1001.

18. Miljkovic N, Lim J-Y, Miljkovic I, Frontera WR. Aging of skeletal muscle fibers. *Ann Rehabil Med.* 2015 Apr;39(2):155–62.
19. Olmos Martínez JM, Martínez García J, González Macías J. Envejecimiento músculo-esquelético. *Rev Española Enfermedades Metabólicas Óseas.* Elsevier; 2007 Jan 1;16(1):1–7.
20. McMurdo ME. A healthy old age: realistic or futile goal? *BMJ.* 2000 Nov 4;321(7269):1149–51.
21. Riebe D, Garber CE, Rossi JS, Greaney ML, Nigg CR, Lees FD, et al. Physical activity, physical function, and stages of change in older adults. *Am J Health Behav.* Jan;29(1):70–80.
22. Clark BC, Manini TM, Functional consequences of sarcopenia and dynapenia in the elderly, *Curr opin. clin. Nutr. Metab. care* 2010, 13 (3) 1363-1950.
23. Costa AM, Breitenfeld A, Silva AJ, et al, Genetic Inheritance Effects on Endurance and Muscle Strength, *Sports Med* 2012; 42 (6): 449-458.
24. Ordóñez F, Medrano I, Elvar J.R, González S, Becerro, et al, M.E. (2013). Sarcopenia and resistance training: actual evidence. *Journal of Sport and Health Research.* 5(1):7-24.
25. Theou O, Jones GR, Overend TJ, Kossek M, Vandervoort AA, An exploration of association between Frailty and Fatigue, *Appl. Physiol. Nutr.* March (2008) 33, 651-665.
26. Banker, Kelly, Robbins, Neuromuscular transmission and correlative morphology in young and old mice. *Journal de Physiologie,* 1983, 339, 355–377

27. Baumgartner, Koehler, Gallagher, Romero, Heymstleld, Ross, Garry, Epidemiology of Sarcopenia among the Elderly in New Mexico *Am J Epidemiol* 1998; 147:755-63.
28. Berger MJ, Doherty TJ. Sarcopenia: prevalence, mechanisms, and functional consequences. *Interdiscip Top Gerontol*. 2010; 37:94-114
29. Brack AS, Conboy IM, Conboy MJ, Shen J, Rando TA. A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell*. 2008; 2:50-59.
30. Carlson ME, Hsu M, Conboy IM. Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells. *Nature* 2008; 454:528-532
31. Cruz-Jentoft, Baeyens, Bauer, Boirie, Cederholm, Landi, Martin, Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People, *Age and Ageing* 2010; 39: 412–423.
32. Cruz-Jentoft, Baeyens, Bauer, Boirie, Cederholm, Landi, Martin, Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People, *Age and Ageing* 2010; 39: 412–423.
33. Delbono, Neural control of aging skeletal muscle. *Aging Cell*, 2003, 2, 21–29
34. Fry CS, Drummond MJ, Glynn EL, Dickinson JM, Gundermann DM, Timmerman KL, Walker DK, Dhanani S, Volpi E, Rasmussen BB. Aging impairs contraction-induced human skeletal muscle mTORC1 signaling and protein synthesis. *Skelet Muscle*. 2011; 1:11
35. Gonzalez-Izal, Falla, Izquierdo, Farina, Predicting force loss during dynamic fatiguing exercises from non-linear mapping of features of the surface electromyogram, *Journal of Neuroscience Methods*, 2010, 271–278

36. Guralnik, Simonsick, Ferrucci, Glynn, A short physical performance battery assessing lower extremity function: association with self-reported disability and prediction of mortality and nursing home admission, *Journal of Gerontology*, 1994, 85-94
37. Harman D. The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal*. 2003; 5:557-561
38. Emanuele Marzetti, Hazel Anne, Stephanie Eva Wolgemuth, Christiaan Leeuwenburgh. Sarcopenia of aging: Underlying cellular mechanisms and protection by calorie restriction.
39. Karolina A. Rygiel, Martin Picard, Doug M. Turnbull. The ageing neuromuscular system and sarcopenia: a mitochondrial perspective
40. Hashizume, Kanda, Differential effects of aging on motoneurons and peripheral nerves innervating the hindlimb and forelimb muscles of rats. *Neuroscience Research*, 1995, 22, 189–196
41. Holloszy JO, Chen M, Cartee GD, Young JC. Skeletal muscle atrophy in old rats: differential changes in the three fiber types. *Mech Ageing Dev*. 1991; 60:199-213
42. Humphries KM, Szweda PA, Szweda LI. Aging: a shift from redox regulation to oxidative damage. *Free Radic Res*. 2006; 40:1239-1243
43. Lexell J, Taylor CC, Sjostrom M. What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J Neurol Sci*. 1988; 84:275-294

44. Mantilla, Sieck. Trophic factor expression in phrenic motor neurons. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 2008, 164, 252–262
45. Muscaritoli, Anker, Argiles, Aversa, Consensus definition of sarcopenia, cachexia and precachexia, *Clinical Nutrition* 2010, 1-6
46. SV, Faulkner JA. Skeletal muscle weakness in old age: underlying mechanisms. *Med Sci Sports Exerc.* 1994; 26:432- 439
47. Tyesha N. Burks<sup>1</sup> and Ronald D. Cohn. One size may not fit all: anti- aging therapies and sarcopenia. *AGING*, December 2011, Vol.3 No.12 A
48. Wohlgemuth SE, Seo AY, Marzetti E, Lees HA, Leeuwenburgh C. Skeletal muscle autophagy and apoptosis during aging: effects of calorie restriction and life-long exercise. *Exp Gerontol.* 2010; 45:138-148
49. Zech, Witte, Pfeifer, Reliability and performance-dependent variations of muscle function variables during isometric knee extension, *Journal of Electromyography and Kinesiology*, 2008, 262–269.
50. McMurdo ME. A healthy old age: realistic or futile goal? *BMJ.* 2000 Nov 4;321(7269):1149–51.
51. Riebe D, Garber CE, Rossi JS, Greaney ML, Nigg CR, Lees FD, et al. Physical activity, physical function, and stages of change in older adults. *Am J Health Behav.* Jan;29(1):70–80.
52. Salech FM, Jara RL, Michea LA. Cambios fisiológicos asociados al envejecimiento. *Rev Med Clin Condes.* 2012; 23(1) 19-29
53. Charles P, Lambert, Evans W. Effects of aging and resistance exercise on determinants of muscle strength. *J. Amer. Aging Assoc.* 2002; Vol. 25, 73-78.

54. Emanuele C, Alfredo V. Short dietary assessment improves muscle dysfunction identification by Geriatric Nutritional Risk Index in uncomplicated institutionalised patients over 70 years old. *Clinical Nutrition*. 2008; 27: 126-132.
55. Point: Skeletal muscle mechanical efficiency does/does not increase with age. *J Appl Physiol* 114: 1108–1113, 2013; doi:10.1152/jappphysiol.01438.2012
56. Lanza IR, Larsen RG, Kent-braun JA. Effects of old age on human skeletal muscle energetics during fatiguing contractions with and without blood flow. *Journal of Physiology*. 2007 Sep 15;583(3):1093-1105. Available from: 10.1113/jphysiol.2007.138362