



universidad
de león

Departamento de Ciencias Biomédicas

***Mecanismos moleculares implicados en la
regulación de la autofagia tras la realización
de programas de entrenamiento físico en
personas mayores***



Memoria presentada por la Licenciada Yubisay Noiraly Mejías Peña para la
obtención del grado de Doctor por la Universidad de León

León, 2015



universidad
de león

INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Los Dres. María José Cuevas González y José Antonio de Paz Fernández, directores de la Tesis Doctoral titulada “Mecanismos moleculares implicados en la regulación de la autofagia tras la realización de programas de entrenamiento físico en personas mayores” realizada por la Lcda. Yubisay Noiraly Mejías Peña, en el programa de doctorado Ciencias de la Actividad Física y el Deporte del Departamento de Ciencias Biomédicas, informan favorablemente del depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firman, en León a __ de 2015.

Los directores de la Tesis Doctoral

Fdo. Dra. María José Cuevas González

Fdo. Dr. José Antonio de Paz Fernández



universidad
de león

ADMISIÓN A TRÁMITE DE LA TESIS DOCTORAL

El Departamento de Ciencias Biomédicas en su reunión celebrada el día ___ de 2015 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “Mecanismos moleculares implicados en la regulación de la autofagia tras la realización de programas de entrenamiento físico en personas mayores”, dirigida por los Dres. María José Cuevas González y José Antonio de Paz Fernández, y elaborada por la Lcda. Yubisay Noiraly Mejías Peña, cuyo título en inglés es: “Molecular mechanisms involved in the regulation of autophagy after performing physical training programs in elderly”.

Lo que firmo, en León a ___ de 2015

VºBº

La Secretaria,

Fdo. Dra. Rosa María Reguera Torres

Fdo. Dra. María José Cuevas González

Parte de los resultados expuestos en la presente memoria han sido objeto de las siguientes publicaciones:

“Role of Toll-like receptor 2 and 4 signaling pathways on the inflammatory response to resistance training in elderly subjects” Paula Rodríguez-Miguélez, Rodrigo Fernández-Gonzalo, Mar Almar, Yubisay Mejías, Ana Rivas, José A. de Paz, María J. Cuevas and Javier González-Gallego
AGE 36(6): 9734, 2014

“Effects of aerobic training on autophagic signaling in the elderly”
Yubisay Mejías-Peña, Paula Rodríguez-Miguélez, Rodrigo Fernandez-Gonzalo, Susana Martínez-Florez, Mar Almar, José A. de Paz, María J. Cuevas and Javier González-Gallego
AGE. (En revisión), 2015

“Effects of aerobic training on autophagic signaling in the elderly”
Yubisay Mejías-Peña, Paula Rodríguez-Miguélez, Susana Martínez-Florez, María J. Cuevas and José A. de Paz
III Congreso Internacional Ejercicio Físico y Salud. Hermosillo (México), noviembre 2015

Financiación

Este proyecto ha sido financiado por el Plan Nacional I+D+i (DEP2013-47659-R)

Para la realización de la presente tesis doctoral, Yubisay Noiraly Mejías Peña ha sido beneficiaria por dos años del Programa de Becas para personal Docente y de Investigación de la Universidad de Los Andes y del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación. Venezuela

Además, esta Tesis Doctoral se enmarca dentro del área de Envejecimiento del Campus de Excelencia Internacional Triangular E³ “Los Horizontes del Hombre”, perteneciente al programa Internacional del Ministerio de Educación. España

*“La única manera de descubrir los límites de lo posible
es aventurarse un poco más allá, hacia lo imposible”*

Arthur C. Clarke

A mis padres por estar, siempre incondicionalmente

Agradecimientos

A todos los que han formado parte de este trayecto que finalmente se materializa con un aporte.

A mis directores de tesis y del Instituto de Biomedicina, por creer en mí y permitirme formar parte de este gran equipo. Gracias por las orientaciones y ayuda. Les debo todo

A los compañeros/as del IBIOMED y del Laboratorio de Fisiología del Ejercicio de la Universidad de León, con quienes compartí muchas horas de trabajo.

A la Universidad de Los Andes-Venezuela, por la oportunidad para consolidar una etapa de crecimiento profesional.

A las personas que me brindaron apoyo y me hicieron sentir parte de su familia, ahora amigos/as que ya ocupan un lugar especial en mí.

A los que en la distancia me tuvieron presente y oportunamente me hacían llegar una palabra alentadora.

A mi familia, por la energía que constantemente recibo de todos ellos.

A León, por recibirme en esta hermosa tierra...

Por siempre agradecida

“Si consigo ver más lejos es porque he conseguido auparme a hombros de gigantes”

Isaac Newton

Abreviaturas y símbolos

1RM	Una repetición máxima
ACSM	Colegio Americano de Medicina del Deporte
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKT	Proteína quinasa B
AMP	Adenosín monofosfato
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ATG	Gen relacionado con la autofagia
ATP	Adenosín trifosfato
Bcl-2	Familia de la célula B del linfoma 2
Beclin-1	Ortólogo en mamíferos del gen ATG6
CMA	Autofagia mediada por chaperonas
CR	Restricción calórica
DAMPs	Moléculas intracelulares asociadas a daños
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
EGC	Electrocardiograma
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FC _{máx}	Frecuencia cardíaca máxima
FMI	Fuerza máxima isolumétrica
FoxO	Proteínas con un dominio <i>forkhead O</i>
GC	Grupo control
GF	Grupo de entrenamiento de fuerza
GR	Grupo de entrenamiento de resistencia
GV	Grupo de entrenamiento de vibración
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
Hz	Herz
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina
IMC	Índice de masa corporal
INE	Instituto nacional de estadística
IRAK-4	Quinasa 4 asociada al receptor de interleucina 1
IRF3	Factor regulador de interferón
kDa	Kilodalton
LAMP-2	Proteína de membrana asociada al lisosoma 2
LC3	Proteína 1 asociada a la cadena ligera 3 de los microtubulos
LC3I	Forma I de LC3
LC3II	Forma II de LC3
MAPKs	Protein-quinasas activadas por mitógenos
mm	Milímetros
mTOR	Diana de la rapamicina en mamíferos
mTORC1	Complejo 1 de la diana de rapamicina
MyD88	Gen 88 de respuesta primaria a diferenciación mieloide
NF-kB	Factor nuclear de cadenas ligeras kappa de células B activadas

OMS	Organización mundial de la salud
P62/SQSTM1	Proteína del secuestrosoma 1
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PAR-Q	Cuestionario de aptitud física
PAR-Q	Cuestionario de aptitud para la actividad física
PBMCS	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PBS-t	PBS con tween
PE	Fosfatidiletanolamina
PE-LC3I	Forma 1 de LC3 asociado a fosfatidiletanolamina
PI3P	Fosfatidinositol 3-fosfato
Rheb	Homologo de Ras en encéfalo
SDS	Dodecil sulfato sódico
Sirt1	Sirtuína 1
TIR	Receptor Toll/interleucina-1
TIRAP	Adaptador TIR con dominio que contiene una proteína adaptadora
TLRs	Receptores tipo Toll
TRAF6	Factor-6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
TRAM	Molécula adaptadora del receptor del receptor TLR4
TRIF	Adaptador TIR con dominio inductor de beta interferón
TSC2	Proteína de la esclerosis tuberosa 2
ULK1/2	Quinasas 1 y 2 activadoras de la autofagia tipo Unc-51
VO ₂	Consumo de oxígeno
VO ₂ máx	Consumo máximo de oxígeno
VPS34	Proteína vacuolar tipo 34

Tabla de contenidos

Lista de figuras.....	IV
Lista de tablas.....	VII
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	3
REVISIÓN DE LA LITERATURA	6
2.1. Envejecimiento.....	7
2.1.2. Situación actual.....	7
2.1.3 Cambios fisiológicos del envejecimiento	9
2.1.4. Causas de envejecimiento	11
2.1.4.1 Estrés oxidativo.....	12
2.1.4.2 Inflamación.....	13
2.1.4.3 Autofagia.....	15
2.2. Autofagia	16
2.2.1. Definición	17
2.2.2 Tipos de autofagia.....	18
2.2.3 Proceso de autofagia.....	20
2.2.4 Vías de señalización que regulan la autofagia.....	24
2.2.5 Factores que pueden modificar la autofagia.....	25
2.2.5.1 Edad.....	26
2.2.5.2 Restricción calórica	26
2.2.5.3 Ejercicio físico	27
2.3. Receptores tipo TOLL.....	28
2.3.1 Autofagia inducida por TLR	31
2.3.2 TLR, ejercicio y edad.....	31
2.4 Ejercicio	32
2.4.1 Ejercicio y envejecimiento	34
2.4.2 Programas de entrenamiento físico en ancianos	35
2.4.2.1 Fuerza	35
2.4.2.2 Resistencia	37
2.4.2.3 Vibración	38

MÉTODO	41
3.1. Diseño general	43
3.2. Participantes	44
3.3. Evaluación ergométrica submáxima	46
3.4. Valoración de la fuerza máxima dinámica	46
3.5. Valoración de la fuerza máxima isométrica	47
3.6. Protocolos de entrenamientos	50
3.6.1. Entrenamiento de fuerza	50
3.6.2. Entrenamiento de resistencia	50
3.6.3. Entrenamiento de vibración	53
3.7. Obtención de células sanguíneas	52
3.8. Cuantificación de proteínas totales	52
3.9. Cuantificación de proteínas por western blot	53
3.10. Analisis estadístico	54
RESULTADOS	56
4.1. Fuerza máxima	57
4.1.1. Efectos de un programa de entrenamiento de fuerza	57
4.1.2. Efectos de un programa de entrenamiento de resistencia	58
4.1.3. Efectos de un programa de entrenamiento de vibración	58
4.2. Consumo de oxígeno	59
4.2.1. Efectos de un programa de entrenamiento de fuerza	640
4.2.2. Efectos de un programa de entrenamiento de resistencia	640
4.2.3. Efectos de un programa de entrenamiento de vibración	640
4.3. Efecto de diferentes programas de entrenamiento físico sobre las rutas de señalización de la autofagia	651
4.3.1. Efectos de un programa de entrenamiento de fuerza	62
4.3.2. Efectos de un programa de entrenamiento de resistencia	66
4.3.3. Efectos de un programa de entrenamiento de vibración	70
4.4. Efecto de un programas de entrenamiento físico sobre la ruta de señalización de los receptores tipo TOLL	74
4.4.1. Efectos de un programa de entrenamiento de fuerza	77

4.4.2. Efectos de un programa de entrenamiento de resistencia	77
4.4.3. Efectos de un programa de entrenamiento de vibración.....	78
DISCUSIÓN	79
CONCLUSIONES	
Resumen	
Abstract in english	
REFERENCIAS	

Lista de figuras

Figura 1. Pirámide de la población de España	9
Figura 2. Envejecimiento: causas y cambios relacionados con la edad	14
Figura 3. Autofagia y genes asociados a la inflamación	16
Figura 4. Principales vías de la autofagia.....	20
Figura 5. Etapas del proceso de autofagia.....	23
Figura 6. Proteínas implicadas en la formación del autofagosoma.....	23
Figura 7. Activadores del proceso de autofagia.....	28
Figura 8. Ejercicio físico y autofagia en músculo esquelético.....	33
Figura 9. Diseño del experimento.....	43
Figura 10. Evaluación de las manifestaciones de la fuerza press de piernas.....	48
Figura 11. Evaluación de las manifestaciones de la fuerza curl de bíceps.....	49
Figura 12. Evaluación de las manifestaciones de la fuerza pectoral contractor.....	49
Figura 13. Representación gráfica de una sesión de entrenamiento de resistencia.....	51
Figura 14. Entrenamiento de vibración de cuerpo completo.....	53
Figura 15. Cuantificación densitométrica y western blots representativos de LC3I y LC3II en PBMCS de jóvenes y ancianos	61
Figura 16. Cuantificación densitométrica y western blots representativos de beclín-1 en PBMCS de jóvenes y ancianos.....	61
Figura 17. Cuantificación densitométrica y western blots representativos de LC3I, LC3II y p62/SQSTM1 en PBMCS de ancianos antes y después de un período de entrenamiento de fuerza	63
Figura 18. Cuantificación densitométrica y western blots representativos de Atg12 y Atg16 en PBMCS de ancianos antes y después de un período de entrenamiento de fuerza	64

Figura 19. Cuantificación densitométrica y western blots representativos de Ser757 FosfoULK-1 y beclín-1 en PBMCS de ancianos antes y después de un período de entrenamiento de fuerza	65
Figura 20. Cuantificación densitométrica y western blots representativos de LAMP-2 en PBMCS de ancianos antes y después de un período de entrenamiento de fuerza ..	66
Figura 21. Cuantificación densitométrica y western blots representativos de LC3I, LC3II y p62/SQSTM1 en PBMCS de ancianos antes y después de un período de entrenamiento de resistencia	67
Figura 22. Cuantificación densitométrica y western blots representativos de Atg12 y Atg16 en PBMCS de ancianos antes y después de un período de entrenamiento de resistencia	68
Figura 23. Cuantificación densitométrica y western blots representativos de Ser757 FosfoULK-1 y beclín-1 en PBMCS de ancianos antes y después de un período de entrenamiento de resistencia	69
Figura 24. Cuantificación densitométrica y western blots representativos de LAMP-2 en PBMCS de ancianos antes y después de un período de entrenamiento de resistencia	70
Figura 25. Cuantificación densitométrica y western blots representativos de LC3I,LC3II y p62/SQSTM1 de ancianos antes y después de un período de entrenamiento de vibración	71
Figura 26. Cuantificación densitométrica y western blots representativos de Atg12 y Atg16 en PBMCS de ancianos antes y después de un período de entrenamiento de vibración	72
Figura 27. Cuantificación densitométrica y western blots representativos de Ser757 FosfoULK-1 y beclín-1 en PBMCS de ancianos antes y después de un período de entrenamiento de resistencia	73
Figura 28. Cuantificación densitométrica y western blots representativos de LAMP-2 en PBMCS de ancianos antes y después de un período de entrenamiento de vibración	74

Lista de tablas

Table 1. Características descriptivas de los participantes.....	45
Table 2. Programa de entrenamiento de fuerza.	50
Table 3. Programa de entrenamiento de resistencia.	52
Table 4. Programa de entrenamiento de vibración de cuerpo completo.....	54
Table 5. Anticuerpos primarios utilizados en western blot.	624
Tabla 6. Fuerza máxima antes y después del período de entrenamiento.....	59
Tabla 7. Consumo de oxígeno máximo antes y después del período del período de entrenamiento.....	60
Tabla 8. Distribución de PBMCS antes y después del período de entrenamiento.....	76
Tabla 9. Expresión proteica de TLR2, TLR4, MyD88 y TRIF antes y después del período de entrenamiento	77

Introducción y objetivos

Es una realidad que el cambio demográfico, asociado a un aumento de la población mayor de 65 años, tiene diversas repercusiones en la salud pública. La sociedad tiene que hacer frente a una gran población de personas mayores que cada vez es menos independiente y a medida que su salud se va deteriorando requiere de más cuidados.

El envejecimiento es un proceso complejo, irreversible, de naturaleza multifactorial y que se produce de forma paulatina a lo largo de la vida. Este proceso se caracteriza por una progresiva disminución de la capacidad de respuesta y de adaptación en el mantenimiento de la homeostasis del medio interno. En los últimos años también han aparecido numerosos estudios que sugieren que el envejecimiento está íntimamente relacionado con el proceso autofágico.

La autofagia desempeña un papel importante en varios procesos fisiológicos incluyendo el crecimiento, diferenciación y supervivencia celular y las respuestas inmunes e inflamatorias, así como en diversos tipos de enfermedades tales como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y el síndrome metabólico. Además, el correcto flujo autofágico es imprescindible para evitar/retrasar el envejecimiento celular, debido a su participación en la liberación de sustratos citosólicos en los lisosomas para su posterior degradación. En este sentido, la inhibición de la autofagia disminuye la vida mientras que su inducción puede aumentar la longevidad.

Entre los factores que pueden activar el potencial autofágico en ancianos se encuentra el ejercicio físico. De hecho, existen numerosas evidencias que ponen de manifiesto la implicación de la autofagia en el envejecimiento, la inflamación, el control de la vía de señalización de los receptores tipo Toll, así como la activación de la autofagia por ejercicio. No obstante, hasta el momento, son muy escasos los estudios centrados en la autofagia, envejecimiento y ejercicio físico y prácticamente se restringen a nivel muscular, lo que inevitablemente conduce a que el siguiente paso lógico sea profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares que determinan como los programas de ejercicio físico inducen los procesos autofágicos, y afectan a diversas rutas de señalización relacionadas con la autofagia, en las células

mononucleares de sujetos de edad avanzada. De esta forma, una vez que podamos identificar, en los diferentes protocolos de actividad física ensayados, aquellos factores más directamente involucrados en tales respuestas, se podría prescribir en la población anciana un tipo de ejercicio físico agradable, de fácil realización, de intensidad controlada y con efectos claros sobre las capacidades físicas más limitadas y limitantes en los ancianos, pudiendo contrarrestar los efectos ocasionados por el declive de la autofagia.

En función de todo lo mencionado previamente, el propósito de este estudio fue profundizar en los mecanismos moleculares implicados en la regulación de autofagia, a través de la vía de señalización de los receptores TLR, en personas mayores sometidas a un entrenamiento de fuerza, aeróbico o de vibración de cuerpo completo, respectivamente.

Se plantearon como objetivos específicos los siguientes:

- Identificar las adaptaciones funcionales producidas en las personas mayores como consecuencia de los diferentes protocolos de actividad física realizados.
- Comprobar si los programas de actividad física prescritos son capaces de provocar modificaciones en la expresión génica de diversos marcadores de macroautofagia en las células mononucleares de ancianos.
- Analizar la disfunción autofágica y su relación con la vía de señalización de los receptores TLR, en personas mayores sometidas a diferentes programas de entrenamiento físico.
- Determinar el tipo de ejercicio más recomendable en ancianos para incrementar su nivel de autofagia.

Revisión de la literatura

2.1. ENVEJECIMIENTO

El proceso de envejecimiento es complejo y común a todos los organismos multicelulares. El envejecimiento se caracteriza por un declive progresivo en la eficacia de procesos fisiológicos, incluidos los mecanismos de mantenimiento y reparación de las vías que mantienen la homeostasis celular (Gelino and Hansen, 2012). A medida que el organismo envejece, la acumulación gradual de macromoléculas y orgánulos dañados pueden conducir a un deterioro progresivo de diferentes funciones biológicas o interferir en la actividad de macromoléculas funcionales, lo que conduce a una mayor disfunción de los sistemas. Dicho declive progresivo en la integridad celular conlleva envejecimiento, enfermedades y en última instancia a la muerte celular (Gelino and Hansen, 2012). Este proceso multifactorial puede verse afectado de manera extrínseca (medio ambiente, hábitos nutricionales, ejercicio, exposición a microorganismos, contaminantes o radiación ionizante) o bien, de manera intrínseca (factores genéticos) (Nigam *et al.*, 2012). La modulación de las vías intrínsecas a través de intervenciones extrínsecas puede afectar, no sólo al estilo de vida, sino también modular la capacidad de impacto sobre el metabolismo de la energía celular y la respuesta al estrés (Schiavi and Ventura, 2014). Entre las causas que participan a nivel molecular se incluyen la oxidación de moléculas, la formación de agregados moleculares, alteraciones en el plegamiento de proteínas, entrecruzamiento de moléculas. Todo ello afecta directamente a las funciones celulares o interfieren en la actividad molecular o en la función de orgánulos. El resultado final es la pérdida de integridad y funcionalidad de tejidos y órganos (Gelino and Hansen, 2012).

2.1.2. Situación actual

El envejecimiento a nivel mundial representa un gran cambio social y económico. De acuerdo con la predicción de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2025 la población mundial mayor de 60 años alcanzará aproximadamente 1,2 mil millones, la mayoría perteneciente a la edad de

“transición” hasta alcanzar 74 años. En el 2050, el mundo tendrá casi 400 millones de personas de 80 años o más (Balasko *et al.*, 2014). Este envejecimiento progresivo de la población a nivel mundial es un indicador de mejores políticas de salud pública y del desarrollo socioeconómico de un país, lo que se traduce en una mejor condición de vida de las personas. Por tanto, el incremento en la expectativa de vida es el resultado del aumento de la esperanza de vida pero también del descenso de la fecundidad. No obstante, el aumento de la población mayor representa un desafío en cuanto a la atención sanitaria, especialmente en los países desarrollados que es donde mejor se observa este incremento de envejecimiento en la población.

En España este fenómeno representará una dificultad socioeconómica a largo plazo, por tanto las políticas de gobierno se deben orientar hacia la creación de programas que fomente la independencia funcional y la autonomía de las personas mayores. Los datos reflejados por el Instituto Nacional de Estadística (INE) del 2015 muestran una proyección de la población española a largo plazo (2014-2064), observándose una tendencia clara del progresivo envejecimiento del país. Las estadísticas indican que, para 2064, la esperanza de vida de las mujeres españolas será de aproximadamente 85 años, y de los hombres 81. Así, la pirámide de la población se incrementaría en la zona superior, observándose un crecimiento efectivo a partir de los 70 años (Figura 1). Estos datos sugieren con claridad que el grupo de la población más numeroso en 2064 será el de entre 85 y 89 años, mientras que en la actualidad se sitúa entre los 35 y 39 años (Instituto Nacional de Estadística, 2015). Por tanto, los valores representados indican que para 2064 vivirían en España 15,8 millones de personas con más de 64 años, esta cifra representa un 40% de la población, cuando hoy en día no alcanzan el 20%. Este aumento significativo pone de manifiesto los posibles problemas sociales y económicos que supondrían estos niveles de envejecimiento en una población y la necesidad de analizar las consecuencias que tendría el incremento de la tasa de dependencia. Por todo ello, es necesario buscar medidas paliativas que pudiesen reducir el impacto socioeconómico de esta tendencia de rectangulización de la pirámide poblacional, que no sólo

estarían referidas al bienestar social, sino también al gasto público que implica el envejecimiento de la población en el país.

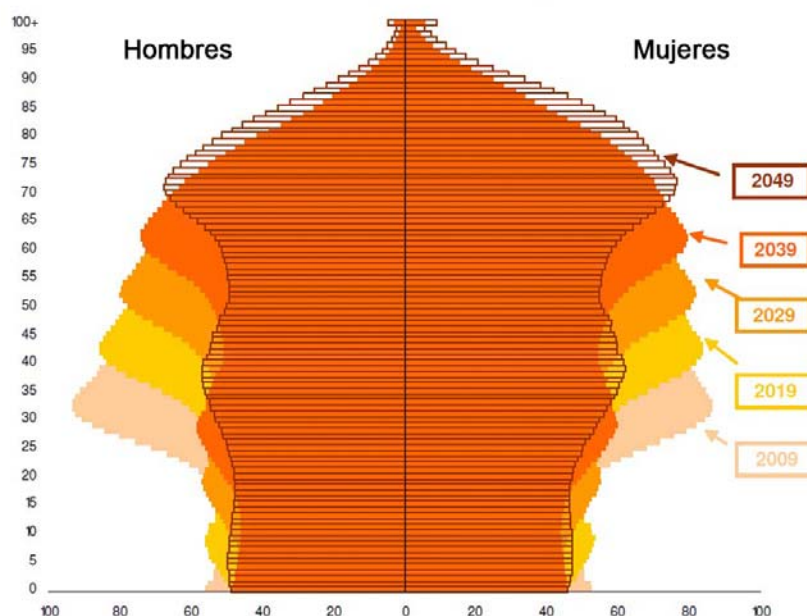


Figura 1. Pirámide de la población de España: previsiones del 2014 al 2049. (Instituto Nacional de Estadística, 2015)

2.1.3. Cambios fisiológicos del envejecimiento

Los cambios graduales y progresivos que ocurren durante el proceso del envejecimiento se dan a diferentes velocidades. Estos cambios se han observado tanto a nivel celular como tisular. A nivel de los sistemas, en mamíferos se ha evidenciado modificaciones macroscópicas y bioquímicas responsables de las características comunes del envejecimiento y que conducen a una mayor susceptibilidad y vulnerabilidad frente a las enfermedades y, por consiguiente, un incremento de la mortalidad.

Dentro de las modificaciones que experimentan los diferentes sistemas, se ha puesto de manifiesto que el *sistema nervioso* muestra cambios a nivel central y autónomo que pueden estar asociados a alteraciones como la demencia, depresión, pérdida de memoria, enfermedades de Alzheimer y Parkinson. El *sistema*

cardiovascular experimenta cambios morfológicos y funcionales, viéndose disminuida la capacidad de enfrentar cargas extras de trabajo por estrés, incrementándose la presión arterial por aumento del grosor y endurecimiento de las arterias y otras enfermedades vasculares (Laurent, 2012). Paralelamente, el *sistema respiratorio* presenta una disminución en el número de alveolos y capilares que se traduce en un descenso de la capacidad máxima respiratoria; mientras que el intercambio gaseoso muestra tasas de flujo más lento debido a la disminución de la elasticidad (Ketata *et al.*, 2012). En cuanto al *sistema excretor*, disminuye el número y tamaño de las nefronas, que junto con la alteración en los vasos sanguíneos, pueden producir incontinencias e insuficiencias renales agudas o crónicas; en general la función tubular y capacidad de la vejiga disminuyen (Kanasaki *et al.*, 2012). Los cambios en el *sistema esquelético y muscular* se manifiestan en que el tejido óseo tiende a reducir el tamaño y perder densidad, lo que genera cambios en la postura, movilidad, y mayor riesgo de fracturas, especialmente en mujeres de edad avanzada. También disminuye la masa corporal magra (sarcopenia), perdiéndose fuerza y ocasionando debilidad muscular e incapacidad de realizar esfuerzos extenuantes (Syed and Ng, 2010). Además, se promueve aún más la deposición de grasa, lo que se relaciona con enfermedades metabólicas como la hiperlipidemia, diabetes tipo 2, aterosclerosis e hipertensión (Roberts and Rosenberg, 2006). El *sistema digestivo* presenta cambios en el aparato masticador, reducción en la motilidad gástrica, la absorción gastrointestinal y la actividad enzimática, alteraciones en la secreción gástrica e intestinal, gastritis atrófica y alteración del flujo sanguíneo hepático (Grassi *et al.*, 2011). El *sistema endocrino* también se deteriora con la edad, evidenciándose alteraciones en la secreción hormonal, pérdida de sensibilidad de los receptores hormonales y degradación progresiva en el número y función de las células beta productoras de insulina (Gunasekaran and Gannon, 2011). Las mujeres de edad avanzada experimentan una caída en la producción natural de estrógenos (menopausia), con efectos sobre la piel y los huesos (Santoro, 2005). El *sistema inmunitario* también muestra alteraciones mostrando una disminución lenta y permanente de la inmunidad (Katz *et al.*, 2004), incrementos en la aparición de enfermedades infecciosas, virales o bacterianas y trastornos autoinmunes (Murasko

and Jiang, 2005, Pawelec *et al.*, 2006, Prelog, 2006), disminución de respuesta a las vacunas (Simpson *et al.*, 2012) y alteraciones en la función de los órganos periféricos del sistema inmune (Gruver *et al.*, 2007), Finalmente, en los *órganos sensoriales* también se observan alteraciones especialmente disminución auditiva y pérdida de agudeza visual.

2.1.4. Causas del envejecimiento

Con la edad, los organismos presentan alteraciones en las características morfológicas y fisiológicas, algunos pueden ser causas del proceso del envejecimiento mientras que otros pueden ser respuestas compensatorias. Aunque existen diversas teorías que intentan explicar el proceso de envejecimiento, actualmente, a pesar de los grandes avances en biología molecular y en genética, no hay consenso (Goldsmith, 2012). No obstante, hay dos teorías sobre senescencia humana que parecen haberse postulado como las principales. La primera es la teoría del envejecimiento no programado. Esta teoría se basa en el concepto de evolución y considera que el envejecimiento es el resultado de la incapacidad de un organismo a responder adecuadamente debido al deterioro de los procesos naturales. Otra teoría es la del envejecimiento programado que considera que el envejecimiento es, en última instancia, el resultado de un mecanismo o programa biológico que causa el deterioro y la muerte con el fin de obtener un beneficio evolutivo más allá de una vida útil óptima (Goldsmith, 2014).

Los cambios en la función de los órganos y sistemas pueden explicarse en parte por la acumulación descontrolada de ADN y proteínas, así como por el daño oxidativo asociado a alteraciones de macromoleculares y de membranas (Bergamini *et al.*, 2004) . Otras teorías apunta a la existencia de un bajo grado de inflamación crónica asociado directamente al proceso de envejecimiento (Giunta, 2006, Goto, 2008). Este estado inflamatorio se denomina inmunosenescencia (Franceschi, 2003, Franceschi *et al.*, 2000).

2.1.4.1 Estrés oxidativo

El oxígeno es fundamental para la existencia y esencial para los organismos aeróbicos, siendo este un aceptor final de electrones en la mitocondria. Sin embargo, esta molécula también posee un lado no deseable y representa un papel nocivo en la célula. El oxígeno es capaz de generar continuamente especies reactivas de oxígeno (EROs), las cuales poseen alta reactividad. Estas EROs se postula que podrían ser uno de los factores que causan el envejecimiento en un organismo (Peng *et al.*, 2014). Las EROs se generan constantemente a bajas concentraciones dentro de las células. Durante el envejecimiento los contenidos de estas especies reactivas del oxígeno pueden aumentar debido a una limitada capacidad de los sistemas antioxidantes y los mecanismos de reparación (Hohn *et al.*, 2013). Una de las teorías del envejecimiento que se ha propuesto es la “teoría de los radicales libres” Según esta teoría, en el proceso de envejecimiento, el daño molecular es causado por especies reactivas de oxígeno que se generan principalmente durante la respiración mitocondrial. Aunque el daño oxidativo se incrementa con la edad no se sabe si está causalmente relacionada con el envejecimiento. No obstante, la reducción de la función de la cadena de transporte de electrones disminuye los niveles de EROs y aumenta la longevidad en algunas especies (Gelino and Hansen, 2012). El estrés oxidativo, definido como el desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, se produce a nivel celular. Por lo tanto, las EROs son capaces de atacar a componentes celulares tales como hidratos de carbono, ácidos grasos poliinsaturados, ADN y proteínas. La modificación de las proteínas dañadas puede formar enlaces cruzados y proporcionar una base para muchas alteraciones asociadas a la senescencia y contribuir a una amplia gama de patologías humanas. Se han descrito dos sistemas proteolíticos responsables de asegurar el mantenimiento de las funciones celulares, el proteosomal y el lisosomal. Ambos sistemas proporcionan una línea de protección antioxidante, eliminando las proteínas dañadas y reciclando aminoácidos para la síntesis continua de proteínas. Sin embargo, durante el envejecimiento ambos sistemas son afectados disminuyendo su actividad proteolítica significativamente (Hohn *et al.*, 2013).

2.1.4.2 Inflamación

La inflamación se define “como una amplia variedad de adaptaciones fisiológicas y procesos patológicos para evitar la infección y reparar el daño, restaurando el organismo al estado habitual de la homeostasis” (Majno and Joris, 1995). La inflamación constituye una de las primeras respuestas del sistema inmune a la infección. Además, se ha reconocido clásicamente por algunos síntomas que incluyen dolor, calor, enrojecimiento, hinchazón y pérdida de la función del tejido (Takeuchi and Akira, 2010). Actualmente se sabe que en respuesta a una lesión o estimulación anormal causada por un agente físico, químico o biológico, este proceso inicia una larga cadena de reacciones, como cambios citológicos, infiltración celular y mediadores de liberación que se producen en los vasos sanguíneos afectados y tejidos adyacentes. Como consecuencia de ello se desencadena la respuesta inflamatoria, que finaliza rápidamente, y el tejido afectado se repara (Akira *et al.*, 2006).

Durante los primeros estadios de la vida, la inflamación constituye una respuesta positiva fundamental para proteger al organismo contra las enfermedades infecciosas y otros agentes dañinos logrando un estado más fuerte (Franceschi, 2007). Sin embargo la inflamación en las personas de edad avanzada puede ser un proceso perjudicial con la importante contribución en el desarrollo de múltiples enfermedades crónicas relacionadas con la edad, tales como la aterosclerosis (Libby, 2006), la diabetes tipo 2 (Asrih and Jornayvaz, 2013) y la artritis reumatoide (Ferraccioli *et al.*, 2012). De hecho, una característica asociada al envejecimiento es un aumento de las concentraciones plasmáticas de citoquinas proinflamatorias, así como una mayor producción celular de las mismas (Fig. 2).

El proceso del envejecimiento se ve influenciado por cambios en el sistema inmunitario. Debido al aumento de la expectativa de vida de la población mundial los individuos están expuestos durante mayor tiempo a antígenos endógenos y ambientales que permitan una activación del sistema inmune innato y posteriormente un estado pro-inflamatorio. Esta perspectiva se ha confirmado con

las múltiples evidencias que relacionan la inflamación con el envejecimiento, lo que previamente se ha descrito como inmunosenescencia (Franceschi *et al.*, 2000, Franceschi, 2003). La inmunosenescencia se caracteriza por un bajo grado de inflamación crónica que es asintomática y no representa un estado patológico del sistema inflamatorio en los ancianos (Giunta, 2006, Goto, 2008). La evolución del estado pro-inflamatorio en los ancianos se ha sugerido que es el resultado de activación crónica de los macrófagos (Franceschi *et al.*, 2000) y de la función de los monocitos, que también se ve comprometida con la edad (Gomez *et al.*, 2005). Además, los efectos perjudiciales del envejecimiento se manifiestan en otras células del sistema inmune. Los neutrófilos muestran una habilidad de reducir su capacidad fagocítica en la síntesis de especies reactivas de oxígeno y en su eficiencia para eliminarlas intracelularmente (Fulop *et al.*, 2004). También los linfocitos son afectados al inducir la expansión de células memoria, la disminución y el agotamiento de las células primarias y la disminución de la población de células T (Gomez *et al.*, 2008). En un amplio espectro, el número total de células innatas del sistema inmune se modifica en los ancianos y algunas de sus capacidades como la actividad fagocítica, la secreción de citoquinas, la defensa antibacteriana o el deterioro de antígenos se ven seriamente comprometidas como consecuencia de la edad (Sebastian *et al.*, 2005).

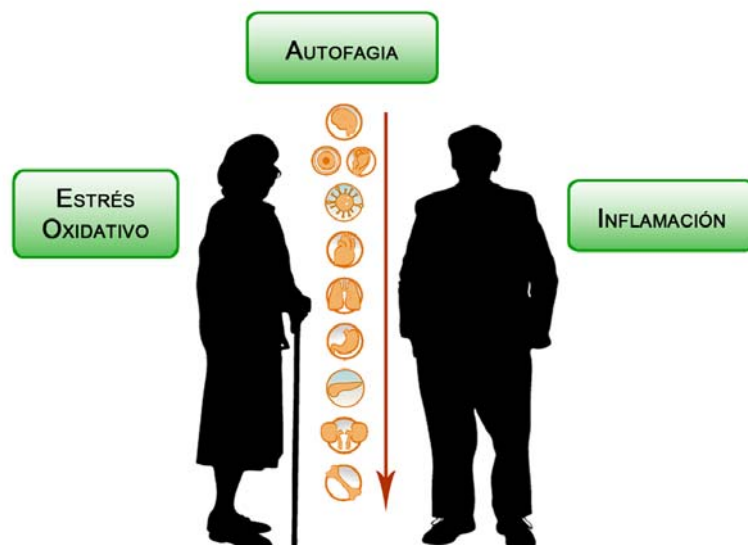


Figura 2. Envejecimiento: causas y cambios relacionados con la edad

2.1.4.3 Autofagia

En los últimos años se ha puesto de manifiesto que, durante el proceso de envejecimiento, casi todos los organismos comparten una disminución gradual del sistema ubiquitinproteosoma y de la actividad autofágica. La autofagia es un proceso capaz de realizar un control de calidad en las células eliminando los orgánulos dañados y que, además, se ha demostrado que disminuye a medida que las personas envejecen (Tan *et al.*, 2014). La disminución de la autofagia con la edad se observa en la mayoría de tejidos y organismos, lo que conlleva un mal funcionamiento de este proceso y una señal de envejecimiento celular. Sin embargo, la progresión de la autofagia durante el envejecimiento es un tema controvertido. Aunque algunos estudios indican un aumento de determinados marcadores de la autofagia, lo más probable es que el flujo autofagico esté alterado durante la vejez, provocando acumulación de orgánulos disfuncionales y proteínas nocivas (Vainshtein *et al.*, 2014).

Varios estudios indican que determinadas vías de señalización que regulan el envejecimiento podrían estar relacionadas con la autofagia para extender la esperanza de vida. Entre estas rutas de señalización se puede destacar la vía de la insulina/IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina), mTOR (*del inglés target of rapamycin*) y la activación de la ruta de la proteína kinasa AMP. Aunque diversos estudios establecen una estrecha relación entre la autofagia y el envejecimiento, la relación causa-efecto aún está pobremente establecida (Tan *et al.*, 2014).

2.2. AUTOFAGIA

La autofagia es un proceso activo en casi todos los tejidos de los mamíferos (Grumati *et al.*, 2011), siendo esencial para la homeostasis metabólica en condiciones fisiológicas de todo el cuerpo y puede ser más aumentada durante el desequilibrio nutricional (Vainshtein *et al.*, 2014). Así, la autofagia es crítica en un amplio rango de procesos fisiológicos normales en humanos y un flujo defectuoso de este proceso se relaciona con diversas enfermedades (Papackova and Cahova, 2014). De hecho, estudios realizados sobre la maquinaria molecular autofagica ponen de manifiesto

que la alteración en dicho flujo se asocia con trastornos comunes como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas y musculares, así como a síndrome metabólico e infecciones (Papackova and Cahova, 2014). Además, la autofagia es un componente crucial en la respuesta a la inmunidad innata, la eliminación de patógenos, el transporte de moléculas endógenas y exógenas al compartimiento intracelular, la modulación de la actividad del inflamosoma, el control de la secreción de citoquinas y la regulación de la fagocitosis (Cuervo and Macian, 2014) (Fig. 3). Por otra parte, un mal funcionamiento de la autofagia, especialmente en el organismo de los ancianos, podría contribuir a la pérdida de la función y muerte celular (Schiavi and Ventura, 2014). Esto puede ser debido a la limitada capacidad de la célula para mantener en condiciones óptimas el proteosoma y los orgánulos, haciéndolos más vulnerables a factores de estrés y patógenos celulares y provocando una incapacidad de adaptarse a las demandas energéticas (Cuervo and Macian, 2014). Por tanto, la activación basal de la autofagia es requerida para mantener la homeostasis celular bajo condiciones fisiológicas normales y puede ser estimulado como un mecanismo de protección contra diferentes formas de estrés (privación de nutrientes, hipoxia, daño del ADN o mitocondrias, orgánulos y macromoléculas disfuncionales) (Schiavi and Ventura, 2014).

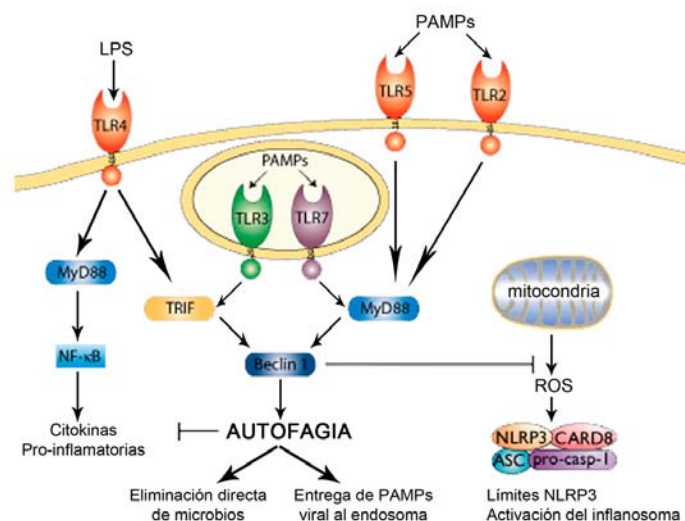


Figura 3. Autofagia y genes asociados a la inflamación. Modificado de (Sviháľková and Vasíček, 2012)

2.2.2. Definición

La autofagia se define como un importante proceso de renovación citosólica. El proceso consiste en un mecanismo catabólico básico que implica la degradación de componentes celulares disfuncionales como orgánulos, proteínas y lípidos (Zhang, 2015) del citoplasma. Estos componentes se fusionan para formar estructuras vacuolares denominadas autofagosomas que finalmente son transportados a los lisosomas para ser degradados (Grumati *et al.*, 2011, Tan *et al.*, 2014, Zhang, 2015). Además de este importante papel, el proceso autofágico suministra energía y compuestos para la síntesis de biomacromoléculas esenciales (Papackova and Cahova, 2014), proporcionando de este modo aminoácidos libres para la síntesis de nuevas proteínas, la oxidación, la gluconeogénesis y la cetogénesis. Este proceso permite a la célula sobrevivir al estrés del ambiente externo (Papackova and Cahova, 2014).

No obstante, aunque en principio el principal papel que se atribuía a la autofagia se centraba en la función energética por la contribución de aminoácidos libres a través de la degradación de proteínas, estudios recientes apoyan que la autofagia también contribuye a mantener un equilibrio energético celular positivo a través de la movilización de lípidos intracelulares y almacenes de glucógeno (Cuervo and Macian, 2014, Papackova and Cahova, 2014). También se han descrito otras funciones importantes de la autofagia a nivel celular como el control de calidad y la defensa de las células. Además, la autofagia contribuye en la regulación del balance energético al degradar selectivamente enzimas implicadas en vías metabólicas esenciales (Cuervo and Macian, 2014)

En el proceso de la autofagia se involucran más de 30 proteínas (Zhang, 2015) y participan diversos componentes celulares como los lisosomas, las proteínas de la membrana plasmática y otros componentes intracelulares que necesitan ser

degradados por ser disfuncionales o en respuesta a demandas metabólicas energéticas específicas (Papackova and Cahova, 2014)

2.2.3. Tipos de autofagia

Como puede observarse en la figura 4, se han descrito tres formas principales de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (Into *et al.*, 2012). La diferencia entre ellas estriba en el mecanismo de selección y el tipo de sustrato involucrado. La microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas (CMA) degradan pequeñas porciones de citosol y proteínas seleccionadas que son entregadas, bien directamente a los lisosomas o bien mediante la intervención de proteínas chaperonas (Cuervo and Macian, 2014). Por el contrario, la macroautofagia destruye orgánulos celulares dañados o proteínas inútiles atrapándolos en unas estructuras denominadas autofagosomas.

La microautofagia introduce directamente pequeñas porciones de material citoplasmático en el lisosoma mediante una invaginación de la membrana de éste. El material que queda en su interior, que puede contener incluso orgánulos citoplasmáticos, termina por degradarse por acción de las hidrolasas que están dentro del lisosoma. Este tipo de autofagia es un fenómeno poco estudiado en mamíferos (Moruno Manchón, 2013).

La CMA es un proceso de renovación individual de proteínas y péptidos los cuales son reconocidos específicamente por una proteína chaperona, la más común es la proteína de choque térmico 70 (HSP70). El sistema de chaperonas HSP se encarga, tanto en eucariotas como en procariontes, de plegar y ensamblar proteínas así como de plegar de nuevo o facilitar la eliminación de proteínas irreversiblemente desnaturalizadas a causa de algún agente estresante. Una vez formado el complejo con la proteína chaperona, éste se traslada al lisosoma donde se asocia con la proteína de membrana asociada al lisosoma 2 (LAMP-2) (Papackova and Cahova, 2014). Esto hace de la autofagia mediada por chaperonas un sistema eficiente y altamente específico para degradar proteínas dañadas o anormales. Además, esta

selectividad permite a la CMA jugar un importante papel como regulador en procesos celulares múltiples, contribuyendo a modular los niveles intracelulares de enzimas, factores de transcripción y el mantenimiento de las proteínas celulares (Cuervo and Macian, 2014).

La macroautofagia (denominada comúnmente como autofagia, por ser el tipo mayoritario y también el más estudiado) es un proceso más complejo que involucra una gran porción del citosol y orgánulos enteros, a los cuales se envuelve para la formación de una estructura de doble membrana (el autofagosoma), y los transporta al lisosoma donde se fusionan y son degradadas por enzimas y constituyentes celulares secuestrados en el autofagosoma (Papackova and Cahova, 2014). La autofagia se ha descrito como un proceso muy selectivo que depende del material específico que se degrade, algunos ejemplos de autofagia selectiva es la mitofagia (mitocondrias), lipofagia (gotas de lípidos), ribofagia (ribosomas), xenofagia (patógenos extracelulares) (Cuervo and Macian, 2014). En concreto la mitofagia ejerce un control de calidad específicamente sobre las mitocondrias, eliminando las que se encuentran dañadas. El daño acumulado en las mitocondrias provoca cambios en las mismas, haciéndolas disfuncionales y estimulando, entre otros eventos, la producción de especies reactivas del oxígeno. Por lo tanto, a través de la mitofagia la célula reduce el estrés oxidativo provocado por las EROs. Como se comentó en apartados previos, las mitocondrias son la mayor fuente de EROs y, por tanto, su ADN y sus proteínas están muy expuestas al daño oxidativo. Teniendo en cuenta esto, y la implicación de las EROs en el proceso de envejecimiento, encontramos que la mitofagia es un evento fundamental en el aumento de la esperanza de vida (Pyo *et al.*, 2013).

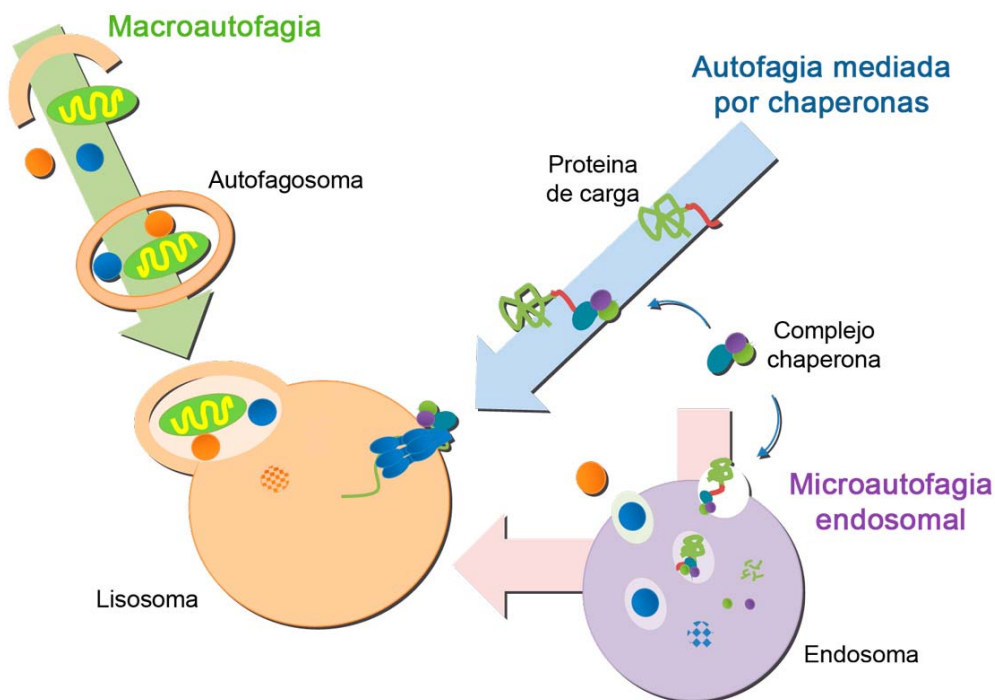


Figura 4. Principales vías de la autofagia. Modificado de (Cuervo and Macian, 2014)

2.2.4. Proceso de autofagia

El proceso de la autofagia puede ser dividido en 4 etapas mediadas por complejos de macromoléculas grandes (Fig. 5): 1/ iniciación (inducción y nucleación de la membrana), 2/ elongación (formación del fagoforo y elongación de la vesícula), 3/ maduración (acoplamiento del autofagosoma y fusión con los lisosoma) y 4/ degradación del contenido (Schiavi and Ventura, 2014).

1/ Inducción y nucleación de la membrana

El inicio de la formación del pre-autofagosoma, o fagoforo, ocurre generalmente a partir de unas estructuras situadas cerca o en el interior de las membranas del RER (retículo endoplasmático rugoso), o de otros orgánulos, como el aparato de Golgi o las mitocondrias (Papackova and Cahova, 2014), donde la proteína VPS34 (proteína vacuolar tipo 34) se activa mediante fosforilación, y se incorpora en complejos con la proteína Beclin-1 (ortólogo en mamíferos del gen 6 relacionado con

la autofagia en levaduras). La activación de la proteína VPS34 genera, a su vez, PI3P (fosfatidinositol 3-fosfato), que permite la prolongación de las membranas y la formación del fagóforo.

Estos eventos iniciales son activados por el complejo ULK1/2 (quinasas 1 y 2 activadoras de la autofagia tipo Unc-51). Este complejo ULK incluye un amplio repertorio de moléculas que se inactivan cuando se les une el complejo mTOR 1 (mTORC1). mTOR es la diana de rapamicina en células de mamífero. Se trata de una serín/treonín quinasa altamente conservada que tiene un papel importante como regulador de la inducción de la autofagia, como se ha visto, inhibiendo las primeras fases por unión al complejo ULK. Así, cuando mTORC1 no se encuentra inhibiendo al complejo ULK, se permite que los complejos con VPS34 formen PI3P. En condiciones basales, el complejo ULK1 es inactivado por fosforilación a través del complejo mTOR1 (mTORC1), por el contrario durante la inducción de la autofagia mTORC1 es inhibido mejorando así la inducción del ULK-1 (Into *et al.*, 2012).

Durante este proceso, el complejo ULK1 está localizado en la membrana de aislamiento donde se facilita la formación del autofagosoma a través de la interacción con el complejo Beclin1 (Pagano *et al.*, 2014). Los dos complejos están estrictamente ligados a través de interacciones proteína-proteína. Beclin1 es directamente fosforilado por ULK-1 (Vainshtein *et al.*, 2014).

Las membranas ricas en PI3P actúan como plataformas para el reclutamiento de proteínas ATG (proteínas relacionadas con la autofagia) permitiendo la formación del fagóforo (Into *et al.*, 2012).

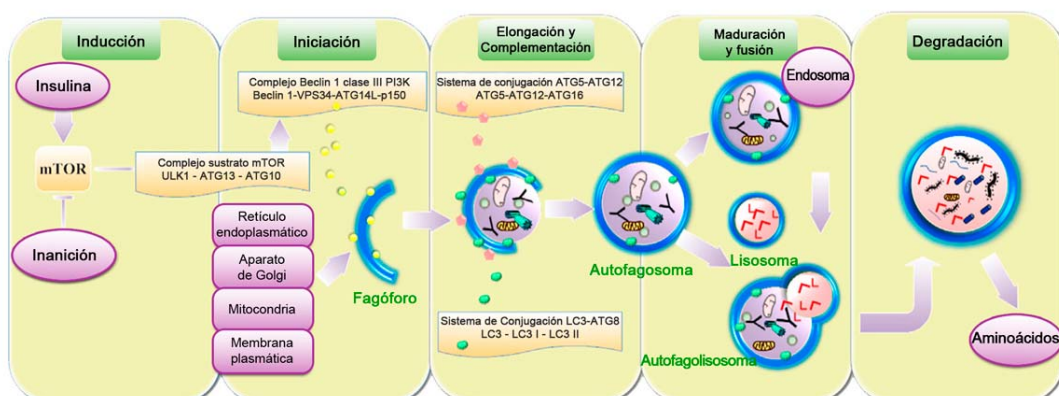


Figura 5. Etapas del proceso de autofagia. Modificado de (Tan *et al.*, 2014)

2/ Formación del fagoforo y elongación de la vesícula

El posterior crecimiento de la membrana aislada para dar lugar a la elongación y expansión del fagóforo depende de dos sistemas de conjugación de proteína ATG. El primero está mediado por la interacción de ATG12, ATG5 y ATG16L1, que junto con ATG7, forman un complejo multimérico que activa el segundo sistema. El segundo culmina con la lipidación de las proteínas ATG8, de las cuales, la más importante en el proceso de autofagia es LC3. Pro-LC3 se transforma primero en su forma madura LC3I y posteriormente se conjuga con el lípido fosfatidiletanolamina (PE). EL nuevo conjugado PE-LC3I, también denominado LC3II, se une fuertemente a las membranas autofagosomales y permite la fusión de las membranas lipídicas (Into *et al.*, 2012).

Por tanto, la formación del autofagosoma está regulado por al menos tres complejos moleculares: el sistema de conjugación LC3 y la regulación de los complejos ULK1 y Beclin-1 (Fig. 6).

3/ Maduración del autofagosoma

El fagóforo se cierra sobre sí mismo para formar el autofagosoma, una vacuola de doble membrana. El autofagosoma contiene las moléculas capturadas y proteínas LC3-PE (Into *et al.*, 2012), que desempeñan un papel crucial en la fusión de la membrana y en la selección de los sustratos a degradar (Nakatogawa *et al.*, 2007). A continuación, el adaptador de autofagia p62/SQSTM1 (sequestosoma 1), el cual contiene múltiples dominios de interacción proteína-proteína, interacciona con LC3, permitiendo la entrada de cargas ubiquitizadas en el interior del autofagosoma (Pankiv *et al.*, 2007).

4/ Degradación del contenido

La maduración del autofagosoma se promueve a través de la fusión de estos con los lisosomas (y endosomas tardíos), formando un orgánulo llamado

autolisosoma delimitado por una membrana única. Los lisosomas poseen enzimas capaces de degradar el material que se ha internalizado. Al final del proceso, el autolisosoma lleva en su interior productos de la degradación de las moléculas capturadas (Into *et al.*, 2012).

Finalmente, existen estudios que proponen que un mayor contenido de autofagosomas no confirma un aumento de la autofagia, más bien refleja la incapacidad de la célula para degradarlos y por tanto una expresión incompleta de la autofagia (Cuervo and Macian, 2014). Sin embargo, la regulación del proceso autofágico puede conducir a la disminución de los niveles de agregados tóxicos de proteínas generando beneficios en el contexto del envejecimiento y varios modelos de enfermedades neurodegenerativas (Tan *et al.*, 2014)

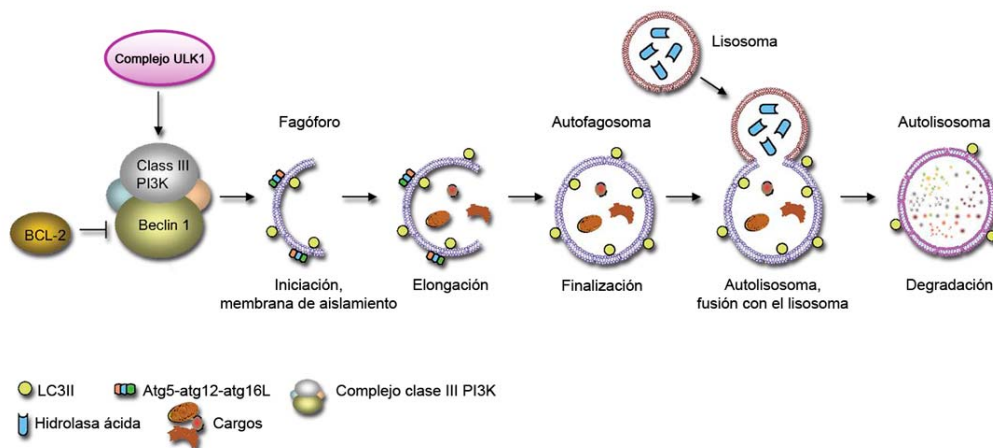


Figura 6. Proteínas implicadas en la formación del autofagosoma. Modificado de (Zhang, 2015)

2.2.5. Vías de señalización que regulan la autofagia

La autofagia, como proceso fundamental de limpieza celular, debe estar finamente regulada para poder controlar la supervivencia de la célula y organismo. De hecho, se ha demostrado que una activación defectuosa del proceso autofágico se encuentra asociado con diferentes enfermedades y con un envejecimiento acelerado (Schiavi and Ventura, 2014). El flujo autofágico ocurre en el interior de la célula por la

exposición a condiciones de estrés durante minutos u horas y es mediado por la modificación de proteínas post-traduccionales que dependen de la activación de programas transcripcionales específicos (Grumati *et al.*, 2011). La regulación de éste proceso, como ya se ha mencionado, es compleja y está controlada por acciones coordinadas de más de 30 genes (Papackova and Cahova, 2014). Se han descrito diversas rutas de señalización implicadas en la regulación del proceso autofágico.

Regulación vía mTOR

Como ya se ha apuntado en el apartado 2.2.4., mTOR participa en la regulación la autofagia. Además, mTOR tiene un papel fisiológico actuando como sensor para diversas señales, como factores de crecimiento, nutrientes, hipoxia o estado energético, entre otras. Aunque existen dos complejos mTOR diferentes, C1 y C2, mTORC1 es el que está específicamente implicado en la regulación negativa del proceso de autofagia mediante la inhibición del complejo ULK1/2 (Into *et al.*, 2012).

La regulación negativa que ejerce mTORC1 sobre la autofagia puede llevarse a cabo por el inmunosupresor rapamicina, por lo que ésta molécula se utiliza clásicamente para activar el proceso de autofagia. La inactivación y disociación de mTORC1 se produce por mecanismos de fosforilación.

Regulación vía AMPK

La vía AMPK (proteína activada por AMP) es una vía independiente de mTOR. AMPK es un sensor del estado bioenergético que participa en el mantenimiento de la homeostasis energética de la célula. Se piensa que AMPK desempeña también un papel como activador de la autofagia (Into *et al.*, 2012). Cuando hay falta de nutrientes, decrece la cantidad de ATP (adenosín trifosfato), por tanto, la relación AMP/ATP aumenta y AMPK se activa. Su papel como activador de la autofagia se lleva a cabo por varias vías, de las cuales la más importante es la fosforilación de la molécula TSC2 (proteína de la esclerosis tuberosa 2), que se encuentra formando un complejo con TSC1 (complejo TSC1/2), el cual inhibe mTOR a través de otra molécula, Rheb (Moruno Manchón, 2013). Esta ruta de activación iniciada directamente por AMPK también conduce, finalmente, a la fosforilación de ULK-1 y beclin-1.

Regulación vía Bcl-2

La apoptosis, también conocida como muerte celular programada, es un proceso por el cual las células, cuando no son necesarias o están dañadas, se suicidan de una forma controlada que minimiza el daño en sus alrededores (Alberts *et al.*, 2002). La familia Bcl-2 (familia de la célula B del linfoma 2) es bien conocida por su papel como regulador, a nivel mitocondrial, de la muerte celular por la vía apoptótica, bien inhibiéndola o bien activándola (Into *et al.*, 2012).

Algunos miembros de la familia Bcl-2, como Bcl-2 o Bcl-XL son conocidos inhibidores de apoptosis pero, recientemente, se ha demostrado que también pueden actuar como inhibidores de la autofagia. Dicha inhibición autofágica la realizan uniéndose y separando el complejo Beclin1-VPS34, necesario, recordemos, para la formación del fagóforo (Into *et al.*, 2012). Por tanto, beclin1 es un importante nexo de unión entre la autofagia y la muerte celular programada, ya que las proteínas anti-apoptosis Bcl-2 y Bcl-XL se unen a beclin1 para inhibir la autofagia.

2.2.6. Factores que pueden modificar la autofagia

Para el mantenimiento de la homeostasis celular es esencial un correcto flujo autofagico. Sin embargo, existen múltiples factores que actúan como inhibidores o activadores de dicho proceso. Aunque fisiológicamente la autofagia ocurre a un nivel basal baja, el aumento de especies reactivas de oxígeno y el estrés de nutrientes durante la inanición, activan el proceso de la autofagia por la interacción entre FoxO, AMPK, AKT y mTOR (Vainshtein *et al.*, 2014). Además, también se ha observado un incremento en el flujo autofagico como respuesta al ejercicio físico (Vainshtein *et al.*, 2014) provocando beneficios metabólicos en respuesta a las adaptaciones de los sistemas (Fig. 7). Por el contrario, estudios recientes indican que la autofagia está comprometida durante la senescencia, conduciendo a la acumulación de orgánulos disfuncionales y agregados de proteínas que pueden resultar dañinos para la célula (Cuervo and Macian, 2014).

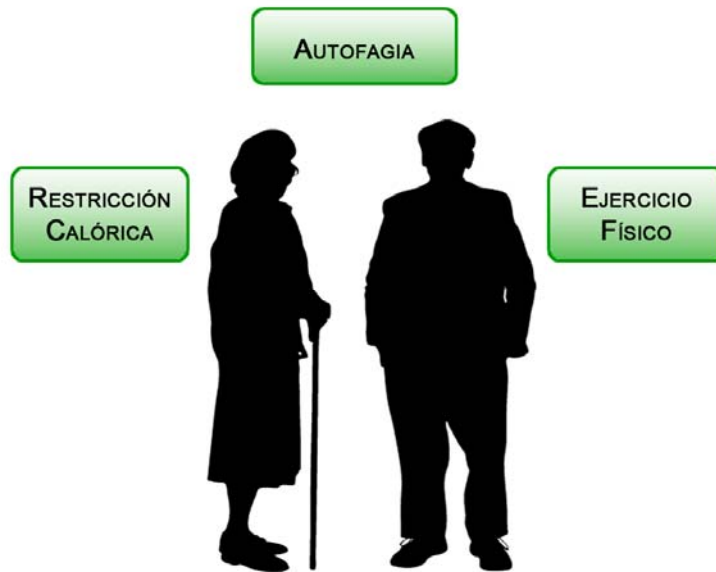


Figura 7. Activadores del proceso de autofagia.

2.2.5.1 Edad

Con la edad, no sólo disminuye la formación de autofagosomas, sino también, e incluso más marcadamente, su fusión con los lisosomas, con lo que se produce acumulación de vacuolas autofágicas (Luo *et al.*, 2013). De hecho, existen numerosos estudios que evidencian que la autofagia decae con la edad. Las posibles causas de esta reducción de la eficiencia de la autofagia con la edad serían la disminución de la expresión de algunos genes importantes para el proceso, como Beclin1 o las proteínas ATG. En esta línea, se ha detectado, por ejemplo, una baja expresión de genes relacionados con la autofagia, como ATG5 y ATG7, en el cerebro de personas mayores en comparación con el de jóvenes (Tan *et al.*, 2014).

2.2.5.2 Restricción calórica

La restricción calórica (CR, del inglés *caloric restriction*) o restricción de energía es la reducción moderada de los nutrientes disponibles sin llegar a la malnutrición (Peng *et al.*, 2014). Los beneficios que se derivan de la privación de nutrientes

parecen estar mediados por un estrés energético que activa automáticamente la autofagia, como respuesta a dicho estrés celular (Vainshtein *et al.*, 2014). Así, diversos estudios indican que la CR es un potente inductor de la autofagia en la mayoría de las especies. De hecho, Wohlgemuth y cols. demostraron que, restringiendo un 40 % de las calorías, se activa la autofagia en el musculo cardíaco de ratas (Wohlgemuth *et al.*, 2010).

La ingesta baja de calorías también se ha considerado que tiene efectos beneficiosos sobre la salud humana, poniéndose de manifiesto beneficios en la disminución de la progresión de muchos procesos moleculares fisiológicos y patológicos asociados a la edad, principalmente los que se producen en tejidos con altas demandas oxidativas (Dong *et al.*, 2015). Se ha descrito que la restricción calórica generalmente prolonga el período de vida y mejora la salud, además de reducir la frecuencia de dolencias crónicas. Una de las hipótesis que puede explicar los efectos de la restricción calórica sobre la longevidad es la reducción del gasto energético con la consiguiente reducción en la producción de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, no deben excluirse otros efectos metabólicos asociados a la restricción calórica como las modificaciones en la sensibilidad a la insulina y la señalización de la función neuroendocrina (Heilbronn *et al.*, 2006).

Por otra parte, los mecanismos sobre el impacto de la restricción de nutrientes en la autofagia implican múltiples vías como la de la señalización de la insulina y las vías mTOR o la activación de autofagia a través de las vías de Sirt1 (Wohlgemuth *et al.*, 2010).

2.2.5.3 Ejercicio físico

Estudios recientes han demostrado que el ejercicio induce una activación de las vías de señalización de la autofagia como respuesta al estrés mecánico que se origina (Garber, 2012) (Fig. 8). Incluso, diversos estudios han identificado al ejercicio físico como un inductor de la autofagia *in vivo*, cuyo efecto podría traducirse en un retraso del envejecimiento.

La activación de la autofagia durante la contracción muscular es clave para el mantenimiento de la homeostasis energética y para el reciclaje correcto de orgánulos y proteínas durante el ejercicio (Vainshtein *et al.*, 2014). La clave de esta regulación estaría en la vía relacionada con las proteínas de la familia Bcl-2. El ejercicio disminuiría la interacción entre éstas y Beclin1, con lo que permitiría la formación de las vesículas autofagosomales, como se ha explicado anteriormente. (He *et al.*, 2012) demuestran que, tras un cuarto de hora de ejercicio físico extenuante, disminuye la inmunoprecipitación del complejo Bcl-2-Beclin1 en músculo de ratón. Además, tras otro cuarto de hora, el complejo es indetectable (He *et al.*, 2012). Otros estudios han demostrado que la realización de ejercicio físico resulta en un incremento de marcadores de autofagia como Beclin1, ATG5, ATG12 y ATG7 (Luo *et al.*, 2013). De hecho, dichos biomarcadores se elevaron tras una carrera de ultra-resistencia (Jamart *et al.*, 2012), después de la realización de protocolos de entrenamiento continuos e interválicos (Weng *et al.*, 2013) o tras una prueba ciclista de alta intensidad (Schwalm *et al.*, 2015).

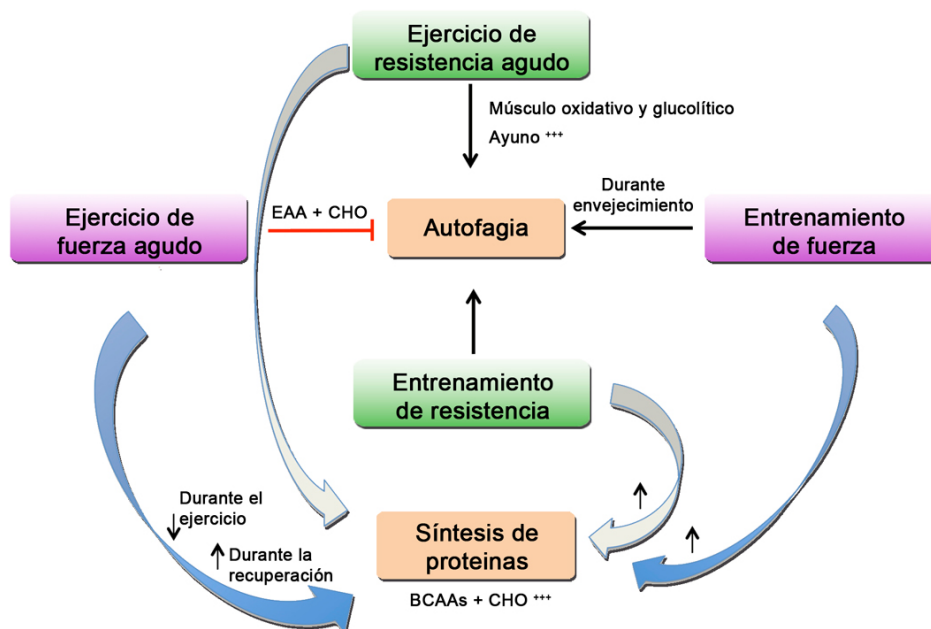


Figura 8. Ejercicio físico y autofagia en músculo esquelético. Modificado de (Zhang, 2015).

2.3. RECEPTORES TIPO TOLL

Los receptores tipo Toll (TLRs) deben su nombre a su homólogo en el género *Drosophila*, el gen para la proteína Toll, el cual se descubrió que tenía un importante papel en la defensa de esta mosca contra microorganismos (Takeda and Akira, 2005). Los TLRs son proteínas transmembrana que se expresan generalmente en la membrana plasmática, aunque algunos de ellos se encuentran en la membrana de algunos compartimentos intracelulares. Allí son capaces de reconocer partículas microbianas (PAMPs, patrones moleculares asociados a patógenos) y moléculas endógenas producidas por rotura celular o daño tisular (DAMPs, moléculas intracelulares asociadas a daños). Tras el reconocimiento, los TLRs activan una cascada de señalización, responsable de la respuesta celular que se produce (Plociennikowska *et al.*, 2015).

En cada TLR se pueden diferenciar tres dominios principales: un dominio extracelular con repeticiones ricas en leucina, encargado de mediar el reconocimiento de los patógenos, una región transmembrana y una región intracelular TIR (receptor Toll/interleucina-1), necesaria para la transducción de la señal (Into *et al.*, 2012). El perfil de expresión de los TLR varía en función del tejido y el tipo de célula. En humanos se han encontrado 10 tipos de TLR, del TLR1 al TLR10, todos localizados en la membrana plasmática a excepción de los TLR3, TLR7 y TLR9.

Las principales proteínas adaptadoras de los TLRs son MyD88 (gen 88 de respuesta primaria a diferenciación mieloide) y TRIF (adaptador TIR que contiene el dominio de inducción de β -interferón), aunque también son importantes TIRAP (dominio TIR que contiene una proteína adaptadora) y TRAM, molécula adaptadora del receptor TLR4 (Into *et al.*, 2012). MyD88 media en las vías de señalización que regulan la activación del factor de transcripción NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) y de las cascadas de MAPKs (proteín-quinasas activadas por mitógenos). Esta molécula adaptadora es usada por

todos los TLR, excepto TLR3. Por su parte, TRIF media la activación tardía de NF- κ B y del factor de transcripción IRF3 (factor 3 regulador del interferón) a través de los TLR3 y TLR4.

Vía MyD88-dependiente

La interacción de la proteína MyD88 con los TLR provoca el reclutamiento de IRAK-4 (quinasa 4 asociada al receptor de interleucina 1), seguido de IRAK-1 o IRAK-2. Se piensa que la activación de las IRAKs es necesaria para que el complejo MyD88-IRAK4-IRAK1/2 interactúe con TRAF6 (factor-6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral), que actúa como esqueleto de la señal de poliubiquitinación de algunas proteínas como IRAK-1 y ella misma.

Las cadenas de ubiquitina de TRAF6 se unen a los complejos regulatorios de la quinasa TAK1, activándola. TAK1 se une ahora a los componentes regulatorios del complejo quinasa I κ B α (complejo IKK), activando IKK α e IKK β , que fosforilan la quinasa I κ B α . NF- κ B representa una familia de factores de transcripción que normalmente permanecen inactivos en el citoplasma a través de la interacción con I κ B α . La fosforilación de I κ B α permite su poliubiquitinación y consecuente destrucción. De esta forma, NF- κ B es liberado y entra en el núcleo activando la transcripción de una gran variedad de genes que participan en la respuesta inmune e inflamatoria, adhesión celular, control del crecimiento y protección contra la apoptosis (Israel, 2010). NF- κ B puede, además, activarse en diversos tipos de células por una serie de agentes reguladores del estado oxidativo de la célula (Siomek, 2012).

TRAF6 también activa las cascadas de MAPK a través del reclutamiento de bastantes miembros MAP3Ks. La vía de señalización de MyD88 induce de esta forma una amplia gama de genes, entre los que se encuentran: citoquinas, moléculas de adhesión, moléculas antimicrobianas, factores coestimuladores, moléculas antiapoptóticas, moduladores de señal, genes relacionados con el estrés oxidativo, reguladores transcripcionales y, ocasionalmente, varias respuestas celulares e inmunes.

Vía TRIF-dependiente

Esta vía de señalización es directamente activada por TLR3 o TLR4 endosomales, a través de la propia oligomerización de TRIF, que interactúa con TRAF6. A partir de TRAF6, participa en la activación tardía del factor de transcripción NF- κ B y de las cascadas de MAPKs (de forma muy similar a como lo hacía Myd88).

Además, TRIF interactúa con TRAF3, formando un complejo de señalización que implica a IKKs: TBK1 y IKK ϵ . TRAF3 provoca la fosforilación de IRF3 permitiendo su translocación al núcleo donde induce interferones (IFNs) tipo I y genes antivirales. Los IFNs son un grupo de proteínas señalizadoras que están implicadas en la respuesta celular a patógenos (Into *et al.*, 2012).

2.3.1 Autofagia inducida por TLR

Tan solo la macroautofagia, de entre los tres tipos de autofagia, ha sido relacionada con la señalización vía TLR. De hecho, numerosos estudios hacen pensar que los TLR tienen una capacidad intrínseca de inducción del proceso de autofagia.

Se ha hablado de que existen tres vías principales de regulación de la autofagia: mTOR, Bcl-2 y AMPK. La señalización vía TLR es capaz de inducir estas vías y activar la autofagia. Esta relación se explica más detalladamente a continuación.

Inducción de la autofagia vía mTOR

Esta inducción tendría lugar a través de ambas vías, MyD88 y TRIF que ejercerían una regulación negativa sobre mTORC1. Como ya se ha visto, TRAF6 activa a TAK1, que a su vez activa AMPK, que actúa como inhibidor de mTORC1 promoviendo la autofagia (Into *et al.*, 2012).

Inducción de la autofagia vía Bcl-2

Del mismo modo que el caso anterior, la inducción de la autofagia por Bcl-2 se realizaría a través de MyD88 y TRIF, en su interacción con Beclin1 a través de TRAF6. La interacción con Beclin1 disminuiría la unión de TRAF6 a Bcl-2. Como ya se ha visto, Bcl-2 inhibe la autofagia uniéndose al complejo Beclin1-VPS34. Al disminuir esta

unión, el complejo podría realizar su función participando en la síntesis de PI3P y en la formación del fagóforo (Into *et al.*, 2012).

Inducción de la autofagia vía AMPK

Se trata de la misma inducción que se hace a través de mTOR. TRAF6 activa TAK 1, que a su vez activa AMPK. Como ya se ha explicado antes, esta molécula es capaz de inhibir mTOR y así promover la autofagia.

2.3.2. TLR, ejercicio y edad

Estudios recientes han puesto de manifiesto que programas de entrenamiento físico, de tipo aeróbico o de fuerza, son capaces de producir modificaciones en la ruta de señalización de los receptores TLR2 y TLR4 (Gleeson *et al.*, 2006, Fernandez-Gonzalo *et al.*, 2012, Fernandez-Gonzalo *et al.*, 2014). Sin embargo, el nivel de actividad física parece ser más importante que la edad respecto a la expresión de Toll 4 y la producción de citoquinas inflamatorias estimuladas por LPS (Gleeson *et al.*, 2006). De hecho, en ancianos, se ha relacionado la práctica de ejercicios agudos o crónicos con disminuciones en los niveles de citoquinas proinflamatorias y del contenido de TLR4 (Flynn *et al.*, 2003, McFarlin *et al.*, 2006). También se ha descrito que la realización frecuente de actividades de tipo aeróbico de baja intensidad, puede dar lugar a la reducción de la concentración de citoquinas proinflamatorias, y a su vez, a un aumento de los mediadores antiinflamatorios. Estos efectos también se han relacionado con disminuciones en la expresión de TLR2 y o de NF- κ B (Oliveira *et al.*, 2011). En este sentido, recientemente nuestro grupo de investigación también ha demostrado que el entranamiento de fuerza y el entrenamiento en plataforma de vibración inducen mejoras en el estado anti-inflamatorio de sujetos ancianos a través de la atenuación de las vías de señalización de TLRs, tanto dependientes como independientes de MyD88 (Rodríguez-Miguel *et al.*, 2014, Rodríguez-Miguel *et al.*, 2015). Sin embargo, hay que poner de manifiesto que la aplicación de otros protocolos diferentes en intensidad o duración, no han producido estos cambios (Zbinden-Foncea *et al.*, 2012).

2.4. EJERCICIO

Durante muchas generaciones se han establecido diferentes paradigmas respecto al ejercicio físico, demostrándose una relación entre los hábitos de la actividad física y el estado de salud (Sallis *et al.*, 2015). La actividad física se define como el movimiento corporal producido por los músculos esqueléticos que requiere un incremento significativo del gasto energético. Los términos actividad física y ejercicio suelen usarse indistintamente, sin embargo el término ejercicio se define como un tipo de actividad física planificada, estructurada y repetitiva para mejorar o mantener uno o más componentes de la aptitud física. En los últimos tiempos se ha propuesto que el ejercicio físico debe ser visto como un fármaco de bajo coste muy eficaz para la prevención primaria y secundaria de casi todas las enfermedades crónicas más prevalentes. En general, el ejercicio físico moderado está asociado a un menor riesgo de obesidad, enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular, varios tipos de cáncer y a una menor mortalidad por cualquier causa (Aucella *et al.*, 2015). De hecho, la organización mundial de la salud (OMS) ha reconocido recientemente la inactividad física como el cuarto factor de riesgo principal de morbilidad global y mortalidad prematura (Geneva and World Health Organization, 2010).

2.4.1. Ejercicio y envejecimiento

El envejecimiento produce en el organismo cambios que, en parte, son similares a los que produce el desuso, especialmente en las masas ósea y muscular. Generalmente durante el proceso de envejecimiento se tiende a disminuir los niveles de actividad física, mostrándose en las estadísticas que más del 30% de los adultos mayores son completamente sedentarios (Allen and Morelli, 2011). Esto hace que actualmente exista una clara preocupación social por las enfermedades hipocinéticas: obesidad, diabetes y, de manera directa o indirecta, por las enfermedades relacionadas con ellas como la sarcopenia, la osteoporosis, las hiperlipidemias, las enfermedades cardiovasculares y determinados tipos de cánceres.

En el último siglo se ha añadido a la esperanza de vida más de 30 años. Esta nueva situación exige el desarrollo de la medicina preventiva para contrarrestar la aparición de los trastornos crónicos propios del envejecimiento y extender al máximo la duración de la vida activa autosuficiente. Además, se ha atribuido al ejercicio físico una característica importante como es la de mejorar la calidad de vida en la edad avanzada. Las adaptaciones que produce el ejercicio son, en numerosas ocasiones, opuestas a las provocadas por el envejecimiento. De hecho, recientemente se ha demostrado que las personas que presentan un fenotipo ultralongevo pueden retrasar la pérdida de masa muscular (sarcopenia) que se asocia con patologías ligadas a la edad (Vainshtein *et al.*, 2014). Paralelamente, este grupo de personas también suelen tener más acentuadas aquellas funciones que se ven mejoradas por el ejercicio.

Dentro de los beneficios que proporciona el ejercicio físico se puede mencionar la menor incidencia de enfermedades cardiovasculares y diabetes; mejora de la presión arterial y del perfil lipídico y una más adecuada tolerancia a la glucosa y mejor respuesta de la insulina; reducción del peso graso y del riesgo de caídas; incremento de la densidad ósea, de la masa muscular, del nivel metabólico, del tránsito intestinal así como aumento de la expectativa de vida; mejora de la calidad del sueño y la seguridad en sí mismo. Por estas razones, se viene aconsejando el incremento del nivel de actividad física en cualquier edad de la vida. En las personas mayores, la OMS (2010) aconseja realizar una media de 75-150 minutos de ejercicio intenso/moderado, ejercicios de flexibilidad y agilidad y además, al menos 2 veces a la semana, ejercicios de fortalecimiento osteomuscular, es decir de fuerza en los grandes grupos musculares (Geneva and World Health Organization, 2010).

2.4.2. Programas de entrenamiento físico en ancianos

En los últimos 75 años, se han estudiado los mecanismos a través de los cuales el ejercicio produce sus efectos beneficiosos para la salud de las personas, incluidos los ancianos. La edad se acompaña de pérdidas en la capacidad cardiorrespiratoria, muscular, coordinativa, etc. Sin embargo, a pesar de los estudios realizados, no está

clara la modalidad óptima de ejercicio y la intensidad que se debe emplear para este tipo de población. La principal diferencia en la prescripción de ejercicio para adultos sanos y personas de la edad avanzada es la intensidad del programa de entrenamiento (Avila-Funes and Garcia-Mayo, 2004). Está descrito que el entrenamiento de resistencia aeróbica puede mejorar la capacidad aeróbica y el ejercicio de fuerza puede aumentar el tamaño del músculo (hipertrofia) y el reclutamiento de fibras musculares, mejorando así tanto la capacidad aeróbica como anaeróbica (Slade *et al.*, 2002). Por todo ello, el diseño de los planes de entrenamiento físico se debe realizar tomando en cuenta algunos factores como el hábito de ejercicio, tiempo de ocio, actividad profesional, desplazamientos, enfermedades asociadas, etc.

2.3.5.1 Fuerza

Los efectos progresivos que ocurren por el proceso del envejecimiento afectan la capacidad funcional de las personas mayores y la pérdida de independencia, provocando una reducción en la fuerza muscular, en la densidad ósea y otros factores metabólicos que pueden afectar la capacidad para realizar las tareas de la vida cotidiana. La reducción de la fuerza muscular es consecuencia de un menor número de unidades motoras y disminución de las fibras tipo II. Si se une todo esto a la sarcopenia, que con cierta frecuencia acompaña al envejecimiento, hace que la fuerza disminuya en un tercio entre los 50 y los 70 años y especialmente a partir de los 80 años de edad (López Chicharro and López Mojares, 2008). La capacidad de la fuerza-resistencia en los mayores también es aún más limitada que la fuerza muscular máxima (Foldvari *et al.*, 2000). Esta limitación ocurre por atrofia de algunas fibras además de menor actividad física y reducción en el número de unidades motoras. Ambos factores van a interferir en actividades diarias tales como levantarse y caminar con rapidez, subir escaleras, etc; es decir, las que requieren potencia muscular. Por esta razón es importante promover el desarrollo de programas de entrenamiento de fuerza que produzcan adaptaciones para mantener o mejorar la capacidad funcional de las personas de edad avanzada. Este tipo de entrenamiento debe estar enfocado a

grupos musculares que ayuden a mantener la funcionalidad que se requiere para las actividades de la vida diaria.

El entrenamiento de fuerza de intensidad moderada es recomendado para el fortalecimiento muscular en personas mayores (Nelson *et al.*, 2007) y se describe como la activación voluntaria de los músculos esqueléticos específicos frente a algunas formas de resistencia externa (American College of Sports Medicine *et al.*, 2009). Las acciones musculares contra resistencia inducen importantes efectos en el sistema osteomuscular, contribuyendo en las personas mayores al mantenimiento y mejora de la capacidad funcional, además de estar estrechamente relacionadas con la hipertrofia muscular (Sanchez *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que este tipo de acción muscular puede prevenir en parte la osteoporosis, condición ósea afectada por el envejecimiento sufriendo pérdida de masa y densidad mineral (Marcus, 2001). También puede disminuir el tejido adiposo visceral (Strasser *et al.*, 2012) y mejorar el perfil lipídico y proteico. Además, un ejercicio de fuerza agudo puede estimular la síntesis de proteínas entre el 40 y 150% por encima de los niveles basales (Sanchez *et al.*, 2014), aumentar el índice metabólico en reposo (Strasser *et al.*, 2012), reducir la presión arterial, y prevenir la aparición de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Strasser *et al.*, 2013).

Con el entrenamiento de fuerza se pueden obtener beneficios con la realización de 15 o 20 minutos dos veces por semana (Feigenbaum and Pollock, 1999). Se debe destacar que es importante realizar modificaciones en la frecuencia, duración e intensidad con la finalidad de conseguir las adaptaciones esperadas. Estas modificaciones deben ser consideradas de manera individualizada tras una evaluación de la fuerza máxima (1RM) para determinar la carga del entrenamiento. Las autoridades sanitarias recomiendan, para los adultos mayores, intensidades del 65 al 75% de 1RM para provocar efectos significativos en el aumento de la fuerza muscular. Además, en el diseño del programa de entrenamiento se puede contemplar una relación inversa entre la intensidad y el volumen (a medida que la intensidad aumenta las repeticiones deben disminuir) (American College of Sports Medicine *et*

al., 2009). Algunos estudios proponen realizar 3 series de entre 8 y 12 repeticiones por ejercicio (Harris *et al.*, 2004). También se ha sugerido que el entrenamiento de fuerza en personas mayores sea aproximadamente entre 20 y 45 minutos por sesión y para mejorar el estado de salud general la capacidad física y aumentar la fuerza muscular se recomienda dos o tres sesiones de entrenamiento por semana (American College of Sports Medicine *et al.*, 2009)

2.3.5.1 Resistencia

La respuesta fisiológica al ejercicio cardiorrespiratorio se atenúa con la edad. El envejecimiento hace que se debiliten los músculos respiratorios que aumente la tensión arterial tanto en reposo como en ejercicio y que se modifiquen otros componentes del sistema cardiorrespiratorio. El envejecimiento puede afectar también el nivel de condición física de resistencia. Por otra lado, las adaptaciones al entrenamiento de resistencia pueden mediar deteniendo o mejorando estos efectos provocados por el envejecimiento. El ejercicio de resistencia o aeróbico descrito como la capacidad para mantener una actividad física durante el tiempo que requiere un esfuerzo adicional del sistema cardiorrespiratorio, abarca actividades o ejercicios que requieren del metabolismo aeróbico u oxidativo. Dentro de estas actividades se puede incluir caminar, trotar, pedalear, nadar, etc. La actividad física aeróbica mejora la capacidad de extracción de oxígeno de la sangre, además incrementa la función y el contenido mitocondrial, lo cual mejora la capacidad oxidativa y la resistencia muscular (Sanchez *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que el entrenamiento de resistencia durante seis u ocho semanas es suficiente para producir adaptaciones en la capacidad aeróbica, efectos cardioprotectores y beneficios en la sensibilidad a la insulina (Vainshtein *et al.*, 2014). Por otro lado, también existen evidencias suficientes que apoyan que el entrenamiento de resistencia provoca una disminución del tejido adiposo, promoviendo una modificación de la distribución de la grasa abdominal en adultos mayores, lo que reduce el riesgo a desarrollar trastornos metabólicos asociados a la obesidad (Strasser, 2013). De igual manera se ha observado una disminución de la

presión sanguínea, niveles de colesterol total, glicemia, reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares e incremento de la capacidad pulmonar (López Chicharro and López Mojares, 2008)

Para la prescripción del ejercicio físico de resistencia, la selección del tipo de actividad debe basarse en el nivel de condición física y las preferencias de cada persona. La intensidad del ejercicio para personas mayores se recomienda que sea moderada y debe programarse según la capacidad aeróbica ($VO_{2máx}$) que refleja el nivel de aptitud física de la persona. EL tiempo recomendado para la práctica de ejercicio aeróbico en las personas mayores es de, al menos, 150 minutos semanales de intensidad moderada casi todos los días de la semana.

2.3.5.1 Vibración

El trabajo en plataformas vibratorias de cuerpo completo es otra modalidad de actividad física propuesta como método alternativo por su bajo impacto y seguridad. En los últimos años, este tipo de entrenamiento se ha asociado a mejoras en el sistema músculoesquelético y parece combatir algunos deterioros relacionados con la edad (Mikhael *et al.*, 2010). Recientemente se ha demostrado que además de mejorar la fuerza muscular, el equilibrio y el control postural en adultos mayores resulta un método atractivo para pacientes con enfermedades neurológicas (Orr, 2015). Este tipo de actividad física es un paradigma innovador que utiliza mecanismos multidimensionales con oscilaciones de bajas a moderadas, generadas por una plataforma vibratoria y transmitidas a todo el cuerpo (Hazell *et al.*, 2010).

El ejercicio de vibración de cuerpo completo también se ha promovido como una alternativa segura en personas con movilidad limitada e intolerancia al ejercicio (Cochrane, 2011). La vibración se realiza situando al individuo de pie sobre las plataformas oscilantes. La generación de energía se produce de tres formas: la transmisión mecánica directa y sistemas oscilante masa-muelle. La mayoría de plataformas de vibración usan este último, donde la producción de oscilaciones sinusoidales del sistema de energía se transfiere de la máquina vibratoria al cuerpo completo (Rittweger, 2010). Para realizar un programa de entrenamiento en

plataformas vibratorias, se deben tener presente ciertos parámetros como la duración de exposición, amplitud, frecuencia y aceleración. La frecuencia es el número de ciclos por unidad de tiempo y la unidad de medida es en hercio (Hz) que equivale a un ciclo por segundo (Bullock *et al.*, 2008). La amplitud se conoce como el desplazamiento de la oscilación desde el punto más bajo hasta el más alto de la onda de vibración (Rauch *et al.*, 2010), la unidad de medida es expresada en milímetros (mm). La aceleración es el producto de la velocidad angular y la amplitud, existiendo una relación directa entre la aceleración y la fuerza aplicada. Por tanto, el aumento de la aceleración se basa en cambios en la frecuencia y la amplitud (Cardinale and Wakeling, 2005).

Algunos estudios sugieren este ejercicio como alternativa para mejorar la actividad y la fuerza muscular (Rodríguez-Miguel *et al.*, 2015). Sin embargo otros no han encontrado efectos. Estas incongruencias podrían atribuirse a diferentes protocolos empleados, los cuales varían en función del tipo de plataforma de vibración, el desplazamiento de frecuencia y la duración del entrenamiento (Marin and Rhea, 2010, Osawa and Oguma, 2013). En cualquier caso, en los adultos mayores se ha sugerido como un método de entrenamiento seguro, de bajo impacto (Tsuji *et al.*, 2014), además de sugerir beneficios en el equilibrio, movilidad y riesgos de caídas en este grupo poblacional (Orr, 2015)

Método

1.1. DISEÑO GENERAL

El diseño general consistió en un estudio longitudinal de casos y controles, llevado a cabo durante 10 semanas. En la primera y última semana se realizaron determinaciones de pre y post intervención del consumo de oxígeno, la fuerza máxima y las extracciones sanguíneas.

Durante las 8 semanas intermedias se realizó la fase experimental, en la que los 59 participantes, aleatoriamente, fueron asignados al grupo control (GC), al grupo de entrenamiento de fuerza (GF), al grupo de resistencia (GR) o al de vibración (GV). Durante este tiempo, los tres grupos experimentales (GF, GR, GV) realizaron sus entrenamientos con una frecuencia de 2 veces a la semana (Fig. 9).

La fase experimental comprendió dos etapas: los respectivos programas de entrenamiento físico, realizados en el laboratorio de Fisiología del Ejercicio de la Facultad de Ciencias de la Actividad Física y el Deporte, perteneciente al Departamento de Ciencias Biomédicas, y los análisis de biología molecular que se llevaron a cabo en el Instituto Universitario de Biomedicina (IBIOMED), ambos pertenecientes a la Universidad de León-España.

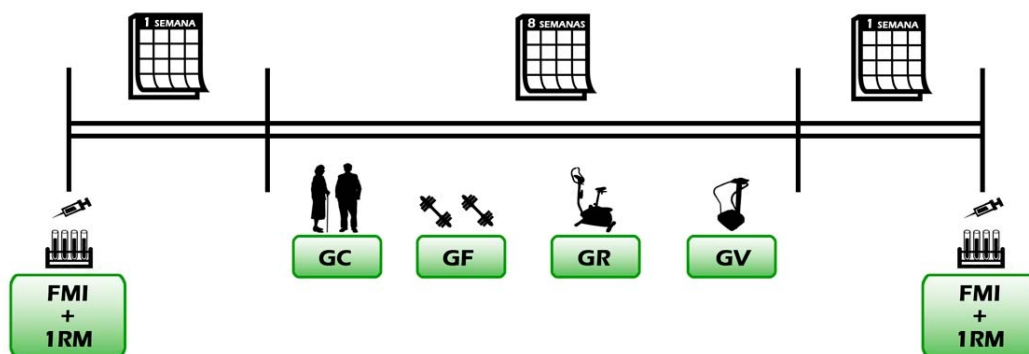


Figura 9. Diseño del experimento.

1.2. PARTICIPANTES

La población estuvo representada por 150 personas de 65 y 75 años pertenecientes a los Centros de Ocio del Ayuntamiento de León, a quienes se convocó para informarles sobre el protocolo del estudio. Un total de cincuenta y nueve participantes sanos, aceptaron voluntariamente participar en el estudio. Los criterios de inclusión empleados en este estudio fueron: tener 65 años o más, no padecer trastornos cardíacos, carecer de implantes metálicos de columna vertebral o cualquier otra patología que les impidiera la realización regular de ejercicios físicos y que no estuvieran empleando, con anterioridad a la fase experimental, medicamentos hormonales o antiinflamatorios. Posteriormente, a los participantes seleccionados se les informó detalladamente sobre los propósitos, riesgos y/o posibles beneficios asociados con la participación en el estudio. Igualmente, se les solicitó a todos los admitidos en el estudio que manifestaran su consentimiento por escrito (investigación revisada y aprobada por el Comité de Ética de la Universidad de León y que sigue la Declaración de Helsinki) (World Medical Association General Assembly, 2001).

Seguidamente, los participantes fueron asignados aleatoriamente a uno de los cuatro grupos experimentales: 13 al grupo control (GC), 15 al grupo de entrenamiento de fuerza (GF), 16 al grupo de entrenamiento de resistencia (GR) y 15 al grupo de entrenamiento de vibración (GV). No existía experiencia previa a la realización de entrenamientos regulares por parte de ninguno de los participantes.

Cada voluntario completó una ficha donde se les pidió información sobre los datos sociodemográficos, además de un cuestionario sobre los factores de riesgo cardiovascular y osteomuscular. De igual manera, todos los participantes cumplieron otro cuestionario de contraindicación para la práctica deportiva (*Physical Activity Readiness Questionnaire*, PAR-Q) (Warburton *et al.*, 2011). Posteriormente, se les realizó una exhaustiva valoración médica, así como la obtención de datos de presión arterial para finalmente realizar un electrocardiograma (ECG). Las variables antropométricas (Tabla 1) también fueron determinadas en cada

uno de los participantes del estudio: estatura (estadiómetro Detecto D52, Webb City, MO, EE.UU.), peso corporal (báscula Cobol 20TM, Barcelona, España), además del índice de masa corporal (IMC) mediante la relación existente entre la masa y el cuadrado de la estatura a través de la siguiente fórmula:

$$IMC = \frac{masacorporal}{(estatura)^2} = \frac{Kg}{m^2}$$

	<i>n</i>	<i>Edad (años)</i>	<i>Estatura (m)</i>	<i>Peso (kg)</i>	<i>IMC (kg/m²)</i>
Grupo Control (GC)	13	70,7 ± 0,9	1,58 ± 0,09	68,1 ± 2,5	27,0 ± 0,8
Grupo entrenamiento fuerza (GF)	15	69,1 ± 1,1	1,57 ± 0,14	67,4 ± 2,3	27,2 ± 0,6
Grupo entrenamiento resistencia (GR)	16	69,6 ± 1,0	1,61 ± 0,12	70,6 ± 3,1	26,9 ± 0,7
Grupo entrenamiento vibración (GV)	15	71,0 ± 1,5	1,56 ± 0,17	65,7 ± 3,1	26,8 ± 1,0

Tabla 1. Características descriptivas de los participantes. Edad (años). *Altura (cm)*. *Peso (kg)*. Índice de *masa corporal (kg/m²)*. Los datos se expresan como media ± EEM

También en el presente estudio participaron 8 jóvenes (todos varones), con la finalidad de conocer los valores de referencia de las variables de este estudio en un grupo de personas con sus capacidades funcionales en plenitud. De esta manera se puede conocer si, tras la realización de los diferentes programas de entrenamiento, los valores en determinados genes de autofagia se acercan a los valores de los jóvenes. Nunca ha sido la intención comparar ambos grupos. Las características descriptivas de los jóvenes incluidos en el estudio fueron: edad de 26,9 ± 1,3 años, estatura 1,80 ± 0,80 m, peso 83,2 ± 4,7 kg e IMC 25,4 ± 0,80 kg/m².

1.3 EVALUACIÓN ERGOMÉTRICA SUBMÁXIMA

Para determinar el consumo de oxígeno (VO_2) de los participantes en el estudio, se realizó una ergoespirometría, con análisis de gases espirados, hasta alcanzar entre el 80 y 85% de la frecuencia cardiaca teórica máxima. De esta manera, se estableció individualmente la relación existente entre el VO_2 y la frecuencia cardiaca. Una vez establecida esta relación para cada uno de los participantes, se estimó el $VO_{2\text{máximo}}$ extrapolando esta relación hasta la frecuencia cardiaca teórica máxima. La prueba fue monitorizada mediante ECG de 10 derivaciones para descartar problemas cardiológicos, al menos, hasta esa intensidad de esfuerzo.

La ergometría se realizó sobre un cicloergómetro (Ergoline-Ergo-metrics 900, Germany, Berlin), con una carga inicial de 20 vatios e incrementos de 20 vatios cada minuto, hasta alcanzar la frecuencia cardiaca objetivo.

1.4 VALORACIÓN DE LA FUERZA MÁXIMA DINÁMICA (1RM)

La fuerza máxima dinámica fue determinada una semana antes y una después del período de entrenamiento para cada uno de los participantes. Antes de comenzar la evaluación de la fuerza, los participantes realizaron un calentamiento estandarizado de 10 minutos en una bicicleta ergometría (Tunturi F35, Tunturi®, Turku, Finlandia) ejercitándose a una frecuencia cardiaca entre 80 y 100 latidos por minuto (lpm). Se evaluó la fuerza máxima dinámica de los extensores de rodilla en una prensa de piernas inclinada a 45° (Gervasport™, Madrid, España) (Fig. 10), las de los músculos flexores del codo en un banco para bíceps (Gervasport) y la de los pectorales (contractor pectoral) en una máquina de pectoral contractor (MEP BH Fitness Nevada Pro-T® España). La fuerza máxima dinámica (una repetición máxima, 1RM) de los extensores de la rodilla y de los flexores del codo se llevó a cabo usando el protocolo "*The National Strength and Conditioning Association (NSCA)*" (Baechle and Earle, 2000). En el caso de la prensa de piernas ya descrita se evaluó, de forma bilateral, realizando un movimiento desde 90° de flexión hasta 180° grados en extensión de la rodilla; con una carga inicial, a modo de calentamiento, de 1,2 por el

peso correspondiente de la persona. En el caso de la flexión del codo y contructor de pectoral, la carga inicial fue el 50% de la fuerza máxima esperable. Progresivamente se iba incrementando la carga (entre 15 y 25 kg, en la prensa; en 3 en el contructor y en 2 en la máquina de bíceps), en función de la percepción subjetiva del esfuerzo, o disminuyendo a una carga intermedia respecto a la última repetición válida, si no alcanzaba la carga anterior. Las pruebas de 1RM concluían cuando los participantes no lograban superar una resistencia dada dos repeticiones sucesivas. Fueron necesarios entre 4 y 5 intentos para conseguir 1RM. Para cada uno de los test, se dieron algunas instrucciones básicas sobre la posición correcta del cuerpo en cada una de las pruebas. De esta forma, con la finalidad de evitar lesiones; se les pidió que la cabeza y espalda descansaran sobre las superficies acolchadas de la plataforma, así como que mantuviesen las manos sobre el asidero lateral durante el momento del esfuerzo.



Figura 10. Evaluación de las manifestaciones de la fuerza (press de piernas).

El protocolo fue similar para 1RM de bíceps al descrito anteriormente y partiendo de una posición inicial de extensión del codo de unos 160° se realizaba el recorrido completo hasta alcanzar una posición final próxima a 90° de flexión de codo (Fig. 11). El contructor de pectoral bilateral se realizó con la espalda apoyada sobre el respaldo de la silla, los antebrazos contra el acolchado de la máquina, los brazos en ubicación de 90° , los codos flexionados a 90° y las manos agarrando el asidero de la máquina. En esta posición, se debía completar todo el recorrido que ofrece la máquina, hasta intentar juntar el asidero de un lado con el del otro en el plano

sagital. Para 1RM de bíceps y contractor pectoral, tras cada intento se les daban 2 minutos de recuperación.



Figura 11. Evaluación de las manifestaciones de la fuerza (curl de bíceps).

1.5 VALORACIÓN DE LA FUERZA MÁXIMA ISOMÉTRICA

Para la evaluación de la fuerza máxima isométrica (FMI) se empleó una célula de carga o galga extensiométrica (*Globus Ergometer*®) con frecuencia de muestreo de 1000 Hz y el software *Globus Ergo Tester v1,5*, Italia. La FMI de los extensores de rodillas se realizó en una prensa inclinada a 45° (*Gervasport*™, Madrid, España). La galga estaba interpuesta entre dos eslabones consecutivos de una cadena, fijándose la cadena a la parte baja del soporte del asiento y el otro extremo a la plataforma sobre la que se ejerce la fuerza de presión máquina. La posición de muslo y pierna formaban un ángulo de 90°, posteriormente se realizó una tensión isométrica máxima del cuádriceps femoral durante 5 segundos. Para la FMI de curl de bíceps se empleó una máquina de curl de bíceps (*Gervasport*™, Madrid, España). La cadena que contenía la célula se fijó por un extremo al piso en una base metálica, mientras el otro extremo se aseguró en la barra de los asideros para realizar la flexión de brazos. El

ángulo de ejecución de la prueba fue de aproximadamente 110° de flexión de los codos (Fig. 12). Durante 5 segundos los participantes realizaron una contracción máxima de los flexores de codo, después de lograr dos intentos efectivos en la ejecución se registró el valor más alto obtenido. Los ángulos de las articulaciones fueron verificados con un goniómetro (TEC®, España).



Figura 12. Evaluación de las manifestaciones de la fuerza (pectoral contractor)

1.6 PROTOCOLOS DE ENTRENAMIENTO

1.6.1 Entrenamiento de fuerza

Los participantes pertenecientes al grupo de entrenamiento de fuerza completaron 16 sesiones de entrenamiento a lo largo de 8 semanas (2 sesiones por semana), con al menos 48 horas de recuperación entre cada una de las sesiones. El programa se inició una semana después de las evaluaciones y cada sesión de entrenamiento comenzaba con un calentamiento estandarizado de 10 min en cicloergómetro, seguido de tres ejercicios de resistencia tanto para el tren superior como inferior: *press* de piernas, *curl* de bíceps y pectoral contractor (realizados en los mismos aparatos descritos anteriormente para la evaluación de la fuerza máxima). Las repeticiones y cargas fueron incrementándose progresivamente, siguiendo el

protocolo que se detalla en la Tabla 2. La recuperación entre las series fue de 2 min y de 5 min entre cada grupo muscular.

Semana	1	2	3	4	5	6	7	8
Sesiones por semana	2	2	2	2	2	2	2	2
Series x repeticiones	3x8	3x10	3x12	3x8	3x10	3x12	3x8	3x10
Carga (% 1RM)	60%	60%	60%	70%	70%	70%	80%	80%

Tabla 2. Programa de entrenamiento de fuerza. Cada sesión de entrenamiento se dividió en prensa de piernas, flexor de bíceps, pectoral contractor.

1.6.2 Entrenamiento de resistencia

El protocolo del grupo de entrenamiento de resistencia (GR), fue diseñado para que los participantes pedalearan en una bicicleta estática, incrementándose progresivamente la carga. Para ello se realizaron dos sesiones de entrenamiento a la semana, con al menos uno de descanso entre dos sesiones consecutivas, para completar un total de 16 sesiones. Cada participante usaba un monitor de frecuencia cardiaca (Polar, Lake Success, NY, EE.UU.) programado para registrar el ritmo de la frecuencia cardíaca alcanzado en cada entrenamiento. El protocolo fue diseñado en tres etapas para cada sesión. Primero comenzaban pedaleando con 5 minutos sin carga luego, desarrollaban un trabajo continuo entre el 70 y 75 % de la frecuencia cardiaca teórica máxima y a partir de la tercera semana se intercalaban sprint de 1 minuto conforme a la tabla 3. Finalmente, para lograr el descenso de la frecuencia cardíaca se bajaba la intensidad gradualmente y se continuaba pedaleando por un lapso de 5 minutos. Las características del protocolo empleado se pueden ver en la Tabla 3 y el perfil detallado de una sesión en la Figura 13.

Semanas	Sesiones	Duración de la sesión	Intensidad	Calentamiento	Intervalo 1	Tiempo entre intervalos	Intervalo 2	Tiempo entre intervalos	Intervalo 3	Tiempo entre intervalos	Intervalo 4	Tiempo entre intervalos	Descenso de la FC
		min	%HRmax	min	min	min	min	min	min	min	min	min	min
1	1	25	70%	5									5
	2	25	70%	5									5
2	3	25	70%	5									5
	4	25	70%	5									5
3	5	26	75%	5	1	7	1	7					5
	6	25	75%	5	1	6	1	6	1				5
4	7	27	75%	5	1	7	1	7	1				5
	8	25	75%	5	1	6	1	6	1				5
5	9	23	75%	5	1	5	1	5	1				5
	10	28	75%	5	1	5	1	5	1	5			5
6	11	29	75%	5	1	5	1	5	1	5	1		5
	12	28	75%	5	1	5	1	5	1	4	1		5
7	13	27	75%	5	1	5	1	5	1	4	1		5
	14	27	75%	5	1	4	1	5	1	4	1		5
8	15	26	75%	5	1	4	1	4	1	4	1		5
	16	30	75%	5	1	4	1	4	1	4	1	4	5

Tabla 3. Programa de entrenamiento de resistencia. Cada sesión de entrenamiento incluía tres etapas: acondicionamiento 5 min hasta 70% $FC_{máx}$, períodos de esfuerzo máximo con intervalos de menos intensidad según el % de $FC_{máx}$ y finalmente 5min de descenso de la FC.

La figura 13, muestra un perfil de las sesiones de entrenamiento de resistencia, basadas en tres períodos de máximo esfuerzo y dos períodos de menos intensidad.

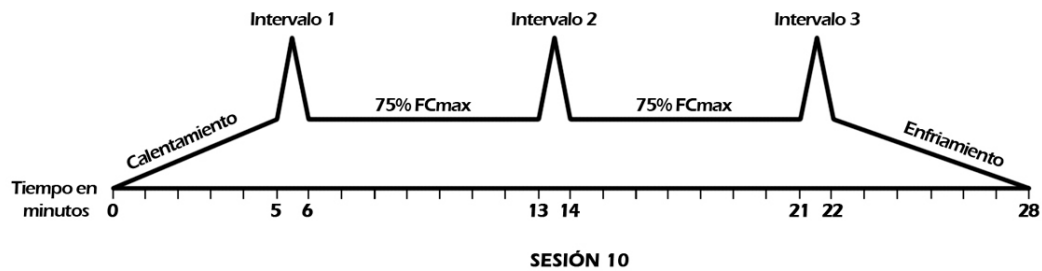


Figura 13. Representación gráfica de una sesión de entrenamiento de resistencia. Sesión # 10 realizada en la 5ª semana del programa. La sesión de ciclismo consistió en un total de 28 min: 5' de calentamiento, 3 períodos de intervalos de 1' de máximo esfuerzo, 2 etapas al 75% de la $FC_{\text{máx}}$ y una final de 5' de descenso de FC.

1.6.3 Entrenamiento de vibración

Los voluntarios que fueron asignados al GV (grupo de entrenamiento de vibración) realizaron sesiones de entrenamientos en una plataforma de vibratoria (*Fitvibe, Gymna Uniphy NV, Bilzen, Belgium*) durante las 8 semanas que se prescribían en el protocolo de entrenamiento de la fase experimental. Cada sesión comenzaba con un acondicionamiento de 10 minutos en bicicleta ergométrica para, posteriormente, continuar con ejercicios estáticos o dinámicos (dependían del protocolo de entrenamiento de cada sesión) sobre la plataforma de vibración y siempre sujetos o apoyados en el soporte vertical de la máquina. Los ejercicios correspondían a: media sentadilla con ángulo entre 120° y 130° de flexión de rodillas (Fig. 14A), sentadilla a 90° con apoyo de la espalda sobre el soporte de la máquina (Fig. 14B), sentadilla en cuclillas separando los pies y las rodillas (Fig. 14C), y en flexión plantar con el talón elevado con ángulo de flexión de rodillas entre 120° y 130° (Fig. 14D). El volumen del entrenamiento (repeticiones y tiempo), así como, la frecuencia de cada sesión se fue incrementando gradualmente en cada semana de manera progresiva. El diseño del protocolo, se detallada en la Tabla 4.

La amplitud del desplazamiento de la superficie de la máquina vibratoria fue constante de 4mm, y la frecuencia de la oscilación varió a lo largo de las 8 semanas entre 20 y 35 Hz.

Semanas	Volumen							Intensidad		
	Frecuencia del entrenamiento	Repeticiones por series y por ejercicio				Duración de cada ejercicio	Descanso entre series	Amplitud	Frecuencia	Modalidad
		sesiones/sem	A	B	C					
1	2	1	1	1	-	30	5	4	20	Estático
2	2	1	1	1	1	30	5	4	25	Estático
3	2	2	2	1	1	30	5	4	30	Estático
4	2	1	1	2	2	30	5	4	30	Dinámico
5	2	2	2	1	1	45	5	4	35	Dinámico
6	2	1	1	2	2	45	5	4	35	Dinámico
7	2	2	1	2	2	60	5	4	35	Dinámico
8	2	1	2	2	2	60	5	4	35	Dinámico

Tabla 4. Programa de entrenamiento de vibración cuerpo completo. Se muestra cada sesión con la modalidad del ejercicio, frecuencia, volumen e intensidades. (A) media sentadilla, (B) sentadilla profunda, (C) postura en cuclillas, (D) gemelos.

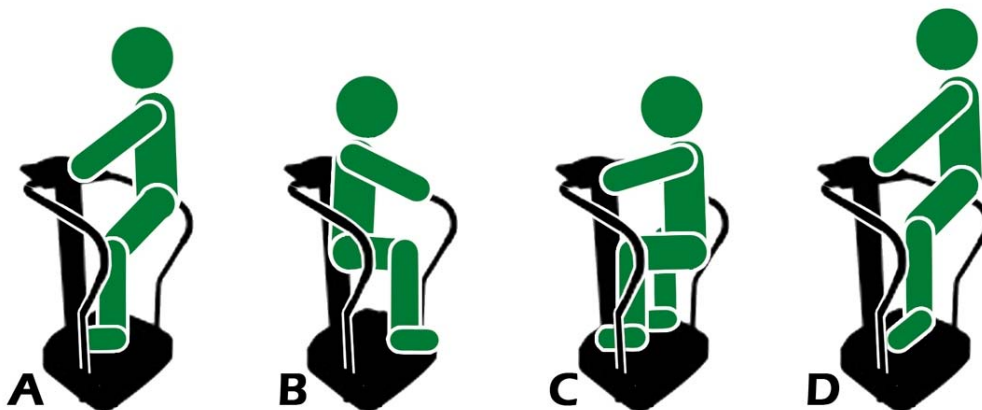


Figura 14. Entrenamiento de vibración de cuerpo completo. Cada sesión consistió en ejercicios estáticos o dinámicos: (A) media sentadilla, (B) sentadilla profunda, (C) postura en cuclillas y (D) gemelos.

1.7. OBTENCIÓN DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

Se recogió un volumen de 30 ml de sangre por punción de la vena braquiocefálica, entre 5 y 6 días antes y después del período de entrenamiento, usando el sistema Vacutainer (BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y heparina como anticoagulantes, siempre a la misma hora y en condiciones de ayuno de 8 horas.

Las muestras recogidas con heparina se usaron para el recuento leucocitario que se realizó mediante recuento en una cámara de contaje estándar.

La sangre con EDTA, se centrifugó a 1500 xg durante 10 min (4 °C) para separar el plasma. Con el resto de la muestra, reconstituida con PBS (tampón fosfato salino), se llevó a cabo un gradiente de densidad con solución separadora de Ficoll (Biochrom AG, Berlin, Alemania) para proceder al aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCS, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*) (Cuevas *et al*, 2005). Una vez aspirada la interfaz correspondiente a dichas células, se transfirieron a un nuevo tubo donde se añadió PBS hasta un volumen final de 10 ml y se centrifugó a 890 xg (a temperatura ambiente) durante 10 min. Posteriormente, se decantó el PBS y se resuspendió el precipitado en 1 ml de PBS, seguido de una última centrifugación de 5 min a 2630 rpm, para finalmente extraer cuidadosamente el sobrenadante y congelar el precipitado de PBMCS a -80 °C.

1.8. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

La cuantificación de proteínas totales en una muestra de células mononucleares se llevó a cabo mediante una modificación del método de Bradford (Bradford, 1976). El primer paso consistió en la realización de una recta patrón de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) para, posteriormente, interpolar las muestras de concentración desconocida. Brevemente, tras la adición de

40 μ l de reactivo de Bradford (Biorad, Hercules, CA, EE.UU.) en cada microcubeta de una placa de 96 pocillos se añadieron 2 μ l de muestra o patrón, según corresponda. A continuación se leyó la absorbancia a 595nm en un lector de placas. La absorbancia debe haber aumentado gracias a la unión del Bradford con las proteínas que contiene la muestra y la recta patrón.

1.9. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Las células mononucleares se homogeneizaron en 150 μ l de tampón de sonicación al que previamente se le había añadido una mezcla comercial de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) Tras el análisis de la concentración de proteína por el método Bradford, se tomó una cantidad de muestra equivalente a 40 μ g de proteína, para su separación mediante electroforesis en geles de diferentes porcentajes de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS). Para el análisis de Beclin-1, Atg12, Atg16, LAMP-2 y fosfo-ULK-1 se usaron geles del 8%; para TLR2, TLR4 y TRIF geles al 9%; del 12% para MyD88 y finalmente para LC3A/B (LC3I/II) y SQSTM1/p62 geles al 13%. Además, en cada uno de los geles también se analizó la proteína β -actina con el fin de verificar que se había cargado la misma cantidad de proteína.

Una vez separadas las muestras, fueron transferidas a una membrana de PVDF Immobilon-P (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) mediante el sistema Trans Blot Turbo Transfer (Biorad, Hercules, CA, EE.UU.). La membrana se incubó a continuación, durante media hora, en solución de bloqueo (2,5% de leche en polvo desnatada en PBS-t) a 37 °C, para proceder posteriormente a su exposición, a 4 °C durante toda la noche, con un anticuerpo específico para cada proteína (Tabla 5).

A la mañana siguiente, la membrana se lavó 8 veces con PBS-t y posteriormente se incubó durante una hora con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Dako, Glostrup, Dinamarca) adecuado al origen del primer anticuerpo. Luego, la membrana se lavó 12 veces con PBS-t y posteriormente, se incubó la membrana con una mezcla comercial de HRP y

quimioluminiscencia (Luminol Reagent, Santa Cruz Biotechnology) y se expuso a películas fotográficas (Amersham Hyperfilm ECL, Amersham, Little Chalfont, Reino Unido), para su revelado. El último paso consistió en la cuantificación mediante densitometría, utilizando para ello el programa Image J (Bethesda, MD, EE.UU.)

Antibody	Molecular weight	Commercial	reference
TLR2	90-100 kDa	Santa Cruz Biotechnology	sc-8690
TLR4	95 kDa	Santa Cruz Biotechnology	sc-293072
MyD88	33 kDa	Santa Cruz Biotechnology	sc-11356
TRIF	66 kDa	Abcam [®]	ab13810
LC3A/B	14-16 kDa	Cell Signalling Technology [®]	12741
Phospho-ULK1 (ULK1)	140-150 kDa	Cell Signalling Technology [®]	6888
SQSTM1/p62	60 kDa	Cell Signalling Technology [®]	5114
Atg12	21 kDa	Santa Cruz Biotechnology	Sc-68884
Atg16	63/71 kDa	Santa Cruz Biotechnology	Sc-70133
Beclin-1	60 kDa	Santa Cruz Biotechnology	Sc-11427
LAMP-2	120 kDa	Santa Cruz Biotechnology	Sc-5571
β-actina	42 kDa	Sigma-Aldrich	A5060

Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados en la técnica de western blot para detectar y cuantificar proteínas específicas. Abcam[®] (Cambridge, UK, USA); Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); Cell Signalling Technology[®] (Beverly, MA, USA) and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

1.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores se presentaron como la media \pm el error estándar de la media (EEM). Para verificar la distribución normal de los datos se utilizó el test de Saphiro-

Wilk. Todos los datos se analizaron estadísticamente usando un análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas para los grupos (GC, GF, GR y GV) y tiempo (pre y post). Se utilizó un análisis post hoc con corrección Bonferroni, cuando fue preciso. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$. Todos los análisis se llevaron a cabo usando el programa SPSS, versión 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.).

Resultados

4.1. FUERZA MÁXIMA

Los resultados obtenidos de la fuerza máxima dinámica (1RM) para *press* de piernas, *curl* de bíceps y *contractor* de pectoral se muestran en la tabla 6, así como también se representan los datos obtenidos de la evaluación de la fuerza máxima isométrica (FMI). Todos los valores se representan como la media \pm EEM.

No se aprecian diferencias significativas, entre los grupos en ninguna de las manifestaciones de la fuerza analizadas antes de la intervención de los programas de entrenamiento físico.

En los valores que se muestran del grupo GC, se observa que no existen cambios significativos en ninguno de los test de fuerza realizados, tanto de fuerza máxima dinámica (1RM) como de fuerza máxima voluntaria isométrica (FMI), tras 8 semanas de intervención.

4.1.1. Efecto de un programa de entrenamiento de fuerza

Los valores obtenidos para el GF muestran un incremento significativo tras el entrenamiento para los test de 1RM de *press* de pierna ($p < 0,03$), *curl* de bíceps ($p < 0,04$) y *pectoral contractor* ($p < 0,04$). De igual manera, como puede observarse en la tabla 6, los valores de fuerza máxima para el test de FMI también fueron significativamente mayores después de 16 sesiones de ejercicio de resistencia de *press* de pierna ($p < 0,05$) y *curl* de bíceps ($p < 0,04$). Además se observó que existen diferencias significativas al comparar estos resultados con los valores obtenidos para el GC (1RM de *press* de pierna, $p < 0,05$; 1RM de *curl* de bíceps, $p < 0,05$; 1RM de *pectoral contractor*, $p < 0,05$; FMI de *press* de pierna, $p < 0,04$; FMI de *curl* de bíceps, $p < 0,05$).

4.1.2. Efecto de un programa de entrenamiento de resistencia

En la tabla 6, los valores revelan que tras la intervención del programa de entrenamiento de resistencia la valoración de la fuerza máxima para el GR, no existen cambios significativos en la mayoría de los test realizados. Sin embargo, en la FMI de *press* de piernas se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) al comparar estos valores con los resultados descritos para GC. De igual manera tampoco se evidencian diferencias significativas para el resto de los parámetros analizados excepto en el FMI de *press* de pierna ($p < 0,04$).

4.1.3. Efecto de un programa de entrenamiento de vibración

En los test realizados para evaluar la fuerza máxima en el GV, se observa que se elevaron significativamente algunos de los valores analizados en este grupo, al comparar con los resultados previos y después de realizar las 8 semanas de entrenamiento (1RM de *press* de pierna $p < 0,04$ 1RM de pectoral contractor $p < 0,05$ y en FMI de *press* de pierna $p < 0,04$ FMI de *curl* de bíceps $p < 0,05$). Como se representa en la tabla 6, también se obtuvieron diferencias significativas entre algunos de los valores de GV y los descritos para GC (1RM de *press* de pierna $p < 0,05$ 1RM de pectoral contractor $p < 0,05$ FMI de *press* de pierna $p < 0,03$ FMI de *curl* de bíceps $p < 0,05$).

		Press de pierna						Curl de bíceps						Pectoral contractor		
		1RM			FMI			1RM			FMI			1RM		
Grupo Control (GC)	Pre	160,4	±	13,5	96,3	±	13,1	19,0	±	3,2	15,1	±	2,1	25,7	±	4,0
	Post	171,3	±	18,2	98,1	±	15,8	21,2	±	4,8	16,3	±	3,3	27,6	±	5,4
Grupo de entrenamiento de fuerza (GF)	Pre	157,0	±	13,1	109,8	±	12,2	19,7	±	3,1	13,2	±	1,1	24,1	±	4,3
	Post	198,4	±	14,3*#	137,4	±	12,8*#	26,0	±	3,2*#	19,4	±	2,0*#	31,5	±	5,0*#

Grupo de entrenamiento de resistencia (GR)	Pre	168,6	±	12,4	108,8	±	10,4	16,5	±	2,5	16,1	±	2,6	25,4	±	4,6
	Post	177,1	±	10,1	127,9	±	11,3*#	17,4	±	2,2	17,7	±	2,2	27,0	±	4,3
Grupo de entrenamiento de vibración (GV)	Pre	160,0	±	13,5	106,7	±	15,8	15,3	±	2,0	14,1	±	2,0	25,7	±	3,5
	Post	190,4	±	18,7*#	140,4	±	16,7*#	16,6	±	2,2	18,8	±	2,2*#	30,1	±	4,8*#

Tabla 6. Fuerza máxima antes (pre) y después (post) del período de entrenamiento de 8 semanas. Los valores representan la media \pm EEM. Grupo control (GC), grupo de entrenamiento de fuerza (GF), grupo de entrenamiento de resistencia (GR) y grupo de entrenamiento de vibración (GV) durante una repetición máxima (1RM) y fuerza máxima isométrica (FMI) en kilogramos (kg). * Diferencias significativas en comparación con el valor basal, en el mismo grupo; # diferencias significativas comparadas con el grupo control.

4.2. CONSUMO DE OXÍGENO

Los resultados obtenidos respecto a la variable fisiológica, consumo de oxígeno ($VO_{2m\acute{a}x}$), estimado a través de un test submáximo en cicloergómetro, se muestran en la Tabla 7.

En los valores del GC se observa que no existen diferencias significativas antes y después de 8 semanas de rutina diaria de este grupo.

		$VO_{2m\acute{a}x}$		
Grupo control (GC)	Pre	30,5	±	1,3
	Post	30,7	±	1,5
Grupo de entrenamiento de ejercicio de fuerza (GF)	Pre	30,3	±	0,9
	Post	32,3	±	1,1
Grupo de entrenamiento de resistencia (GR)	Pre	31,0	±	1,3
	Post	37,5	±	1,7*#
Grupo de entrenamiento de vibración (GV)	Pre	30,7	±	1,1
	Post	31,1	±	1,3

Tabla 7. Consumo de oxígeno máximo antes (pre) y después (post) de un período de entrenamiento de 8 semanas. Los valores se presentan como la media \pm EEM. Grupo control (GC), grupo entrenamiento de Fuerza (GF), grupo entrenamiento de resistencia (GR) y grupo de entrenamiento de vibración (GV). Valores en (ml/kg/min) *Diferencias significativas respecto al valor basal del mismo grupo. #Diferencias significativas en comparación con el grupo control.

4.2.1. Efecto de un programa de entrenamiento de fuerza

Los resultados del consumo de oxígeno máximo reportados tras la evaluación indican que no existen diferencias estadísticamente significativas en el grupo GF al comparar los valores previos y posteriores a las 16 sesiones de ejercicios de fuerza que este grupo realizó. Tampoco se observaron diferencias al comparar estos datos con los obtenidos por GC.

4.2.2. Efecto de un programa de entrenamiento de resistencia

En el test submáximo de consumo de oxígeno que se aplicó para el GR se observaron valores incrementados ($p < 0,03$) entre los valores antes y después de las 8 semanas de ejercicios aeróbicos realizados por este grupo. De igual manera, se observan cambios significativos ($p < 0.02$) al comparar estos resultados con los obtenidos por GC.

4.2.3. Efecto de un programa de entrenamiento de vibración

Los datos obtenidos para GV tras la realización del test de consumo de oxígeno, antes y después del programa de entrenamiento, muestran que no existieron cambios significativos entre ambos puntos, así como tampoco al comparar estos resultados con los obtenidos del GC.

4.3. EFECTO DE DIFERENTES PROGRAMAS DE ENTRENAMIENTO FÍSICO SOBRE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA AUTOFAGIA

Aunque existen múltiples investigaciones que asocian el envejecimiento con un descenso del proceso autofágico (Cuervo and Macian, 2014), el presente estudio tuvo, como primer objetivo, confirmar que la actividad autofágica se encontraba reducida en los ancianos participantes en el mismo. Para ello, se analizaron los contenidos proteicos de dos marcadores del proceso autofágico, el ratio LC3II/LC3I y beclín-1, en un grupo de 8 sujetos jóvenes y se compararon con los ancianos, ambos en condiciones basales y sin haber realizado ningún tipo de ejercicio en las últimas semanas.

En la figura 15 se puede observar como el ratio LC3II/LC3I es significativamente menor en las células mononucleares de ancianos comparado con el grupo de jóvenes ($p < 0.04$).

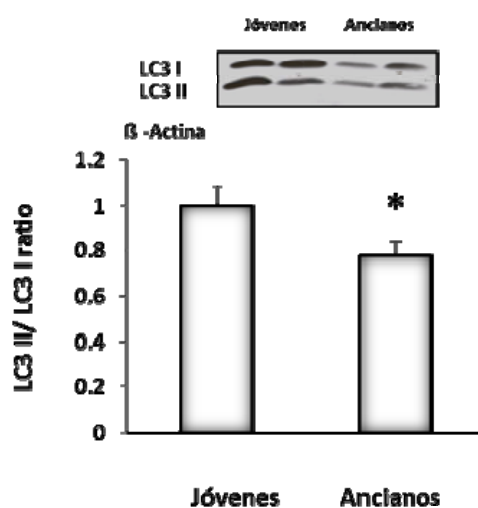


Figura 15. Cuantificación densitométrica y Western blots representativos de LC3I y LC3II en PBMCS de jóvenes y ancianos. Los valores se presentan como la media \pm EEM. *Diferencias significativas respecto al valor basal de jóvenes.

Los contenidos basales de la expresión proteica de beclín-1, en células mononucleares de jóvenes y ancianos, se muestran en la figura 16. Este resultado

puso de manifiesto una marcada disminución de la proteína beclín-1 en los sujetos de edad avanzada respecto a los jóvenes ($p < 0.03$).

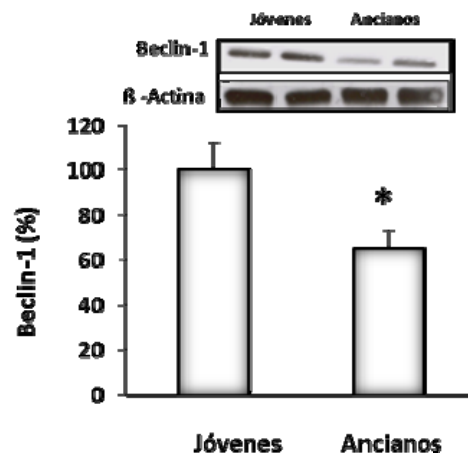


Figura 16. Cuantificación densitométrica y Western blot representativo de beclín-1 en PBMCs de jóvenes y ancianos. Los valores se presentan como la media \pm EEM. *Diferencias significativas respecto al valor basal de jóvenes.

Una vez comprobado el declive de la autofagia con la edad, se procedió a analizar los efectos de los diferentes programas de entrenamiento propuestos sobre la actividad autofágica en sujetos ancianos. Para ello, se analizaron las concentraciones proteicas de LC3II, LC3I, p62/SQSTM1 y LAMP-2 protein en PBMCs de los ancianos. Además, con objeto de seguir profundizando en la compleja relación entre ejercicio físico, autofagia y edad, también se midió, por Western blot, la expresión diferentes proteínas involucradas en la iniciación del proceso autofágico: Atg12, Atg16, beclín-1 y la forma fosforilada en la serina 57 (Ser757) de ULK-1.

4.3.1. Efecto de un programa de entrenamiento de fuerza

Los resultados obtenidos tras el analisis de la expresion proteica de LC3I y LC3II para el grupo GF (Fig. 17A) no mostraron cambios significativos entre los valores previos y posteriores a la realizacion del entrenamiento aerobico. Al contrastar estos datos con los descritos en el grupo control, tampoco se identificaron diferencias significativas. Por tanto, como cabía esperar a la vista de estos resultados, el ratio proteico LC3II/LC3I, tampoco se vio modificado por efecto del entrenamiento.

Los resultados de la expresión proteica de p62/SQSTM1 tras completar las 8 semanas de ejercicios de fuerza que el grupo GF llevó a cabo (Fig. 17B), pusieron de manifiesto como la actividad física realizada a lo largo de las 16 sesiones tampoco modificó los valores proteicos iniciales de p62/SQSTM1.

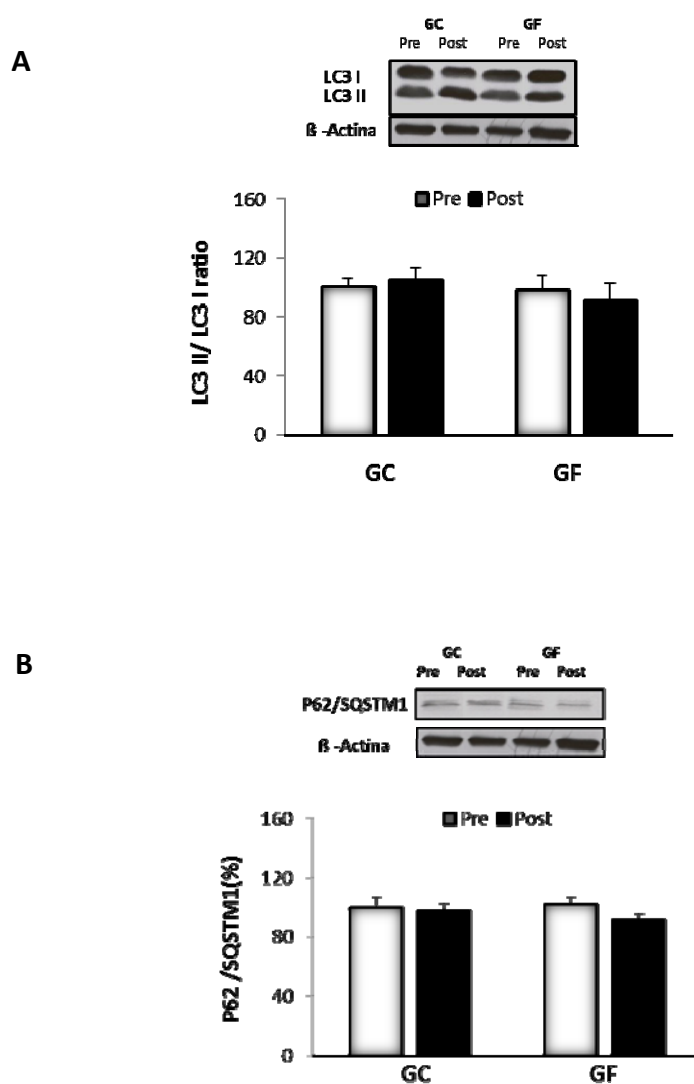


Figura 17. Cuantificación densitométrica y Western blots representativos de LC3I, LC3II (A) y p62/SQSTM1 (B) en PBMCs de ancianos, antes (pre) y después (post) de un período de entrenamiento de 8 semanas. Los valores se presentan como la media \pm EEM. Grupo control (GC) y grupo entrenamiento de fuerza (GF).

En relación a los genes relacionados con la autofagia, Atg12 (Fig. 18 A) y Atg16 (Fig. 18B), los contenidos de proteína pusieron de manifiesto como el entrenamiento de fuerza realizado por este grupo estimuló un aumento significativo ($p < 0,03$ y $p < 0,02$ respectivamente), si tenemos en cuenta los valores iniciales del propio grupo. El mismo efecto se detectó cuando se realizó la comparación con el grupo control después de 8 semanas de intervención (Atg12, $p < 0,03$; Atg16, $p < 0,02$).

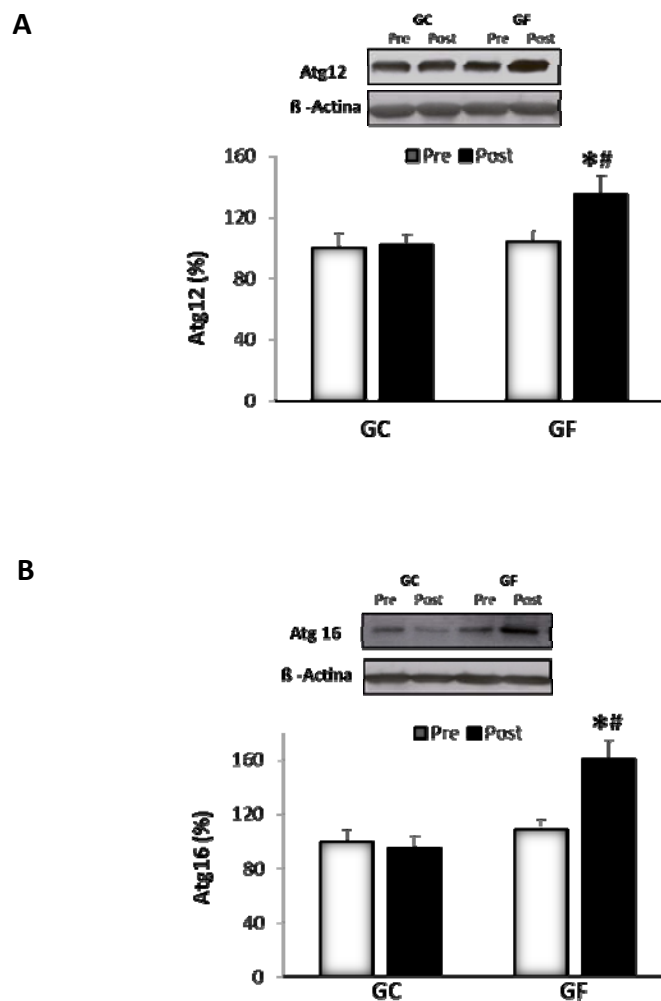
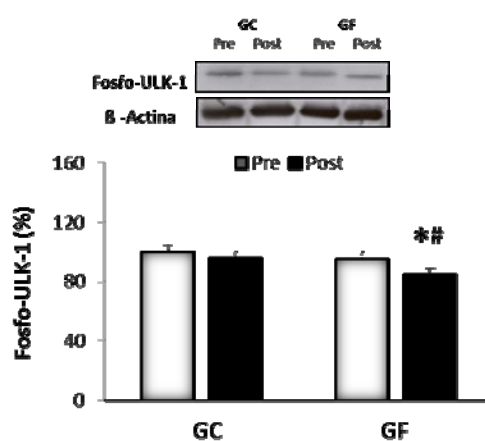


Figura 18. Cuantificación densitométrica y Western blots representativos de Atg12 (A) y Atg16 (B) en PBMCS de ancianos, antes (pre) y después (post) de un período de entrenamiento de 8 semanas. Los valores se presentan como la media \pm EEM. Grupo control (GC) y grupo entrenamiento de fuerza (GF) *Diferencias significativas respecto al valor basal del mismo grupo. #Diferencias significativas en comparación con el grupo control.

El entrenamiento de fuerza realizado por los sujetos del grupo GF puso de manifiesto un efecto diferenciado del mismo sobre los contenidos proteicos de beclín1 y la forma fosforilada de ULK-1 (Fig. 19A y 19B). Mientras que fosfo-ULK-1 disminuyó significativamente ($p < 0,05$) tras finalizar el entrenamiento, los valores de beclín-1 se incrementaron ($p < 0,05$), como resultado de las 8 semanas de ejercicios realizados. Al contrastar ambos valores con los obtenidos para el grupo sedentario, se evidenció la misma tendencia; es decir, una disminución en la fosforilación de ULK-1 acompañada de un incremento en la proteína beclín-1 ($p < 0,05$).

A



B

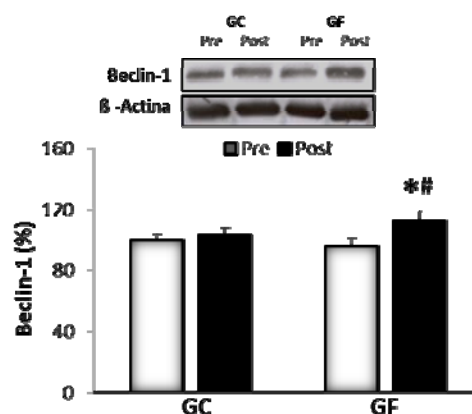


Figura 19. Cuantificación densitométrica y Western blots representativos de Ser757 FosfoULK-1 (A) y beclín-1 (B) en PBMCS de ancianos, antes (pre) y después (post) de un período de entrenamiento de 8 semanas. Los valores se presentan como la media \pm EEM. Grupo control (GC) y grupo entrenamiento de fuerza (GF) *Diferencias significativas respecto al valor basal del mismo grupo. #Diferencias significativas en comparación con el grupo control.

Como se muestra en la figura 20, los resultados de la expresión proteica de la proteína del lisosoma LAMP-2 indican que la expresión de esta proteína se incrementó significativamente después del programa de entrenamiento de fuerza desarrollado ($p < 0.05$). Además los valores posteriores al entrenamiento en el grupo GF fueron significativamente mayores que los obtenidos en el grupo control tras la intervención ($p < 0.05$).

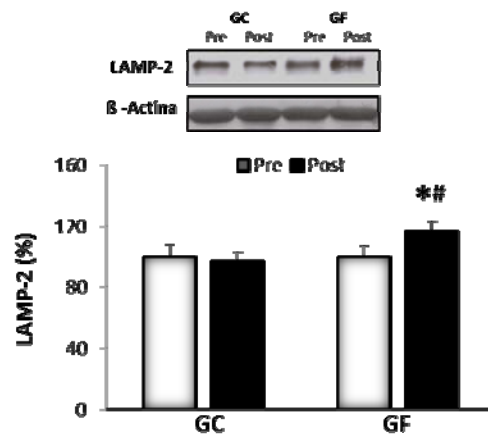


Figura 20. Cuantificación densitométrica y Western blot representativo de LAMP-2 en PBMCs de ancianos, antes (pre) y después (post) de un período de entrenamiento de 8 semanas. Los valores se presentan como la media \pm EEM. Grupo control (GC) y grupo entrenamiento de fuerza (GF). *Diferencias significativas respecto al valor basal del mismo grupo. #Diferencias significativas en comparación con el grupo control.

4.3.2. Efecto de un programa de entrenamiento de resistencia

Como se ilustra en la figura 21A, se detectó un incremento significativo en el ratio LC3II/LC3I en respuesta al protocolo de ejercicio aeróbico ($p < 0.04$), con valores para el grupo GR superiores a los encontrados en el grupo control después de 8 semanas de intervención ($p < 0.04$). Por el contrario, la expresión de la proteína p62/SQSTM1 mostró un descenso estadísticamente significativo ($p < 0.05$) después del entrenamiento. En esta línea, los contenidos proteicos de p62/SQSTM1 fueron significativamente menores a los obtenidos para el grupo sedentario en mismo punto de muestreo ($p < 0.05$) (Fig. 21B).

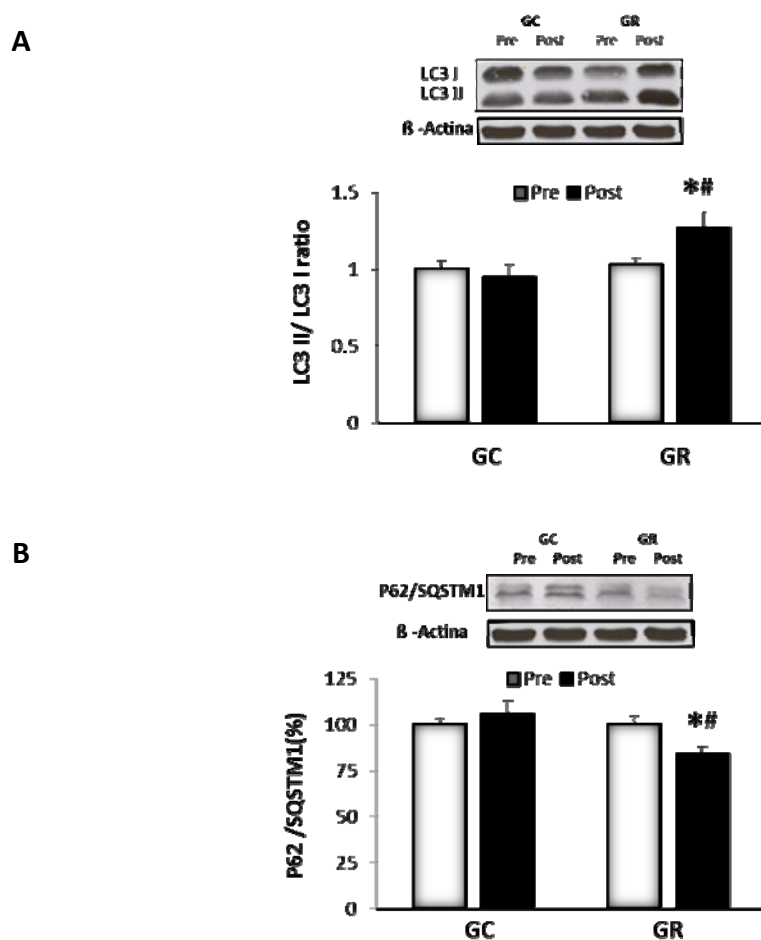


Figura 21. Cuantificación densitométrica y Western blots representativos de LC3I, LC3II (A) y p62/SQSTM1 (B) en PBMCs de ancianos, antes (pre) y después (post) de un período de entrenamiento de 8 semanas. Los valores se presentan como la media \pm EEM. Grupo control (GC) y grupo entrenamiento de resistencia (GR) *Diferencias significativas respecto al valor basal del mismo grupo. #Diferencias significativas en comparación con el grupo control.

El programa de entrenamiento aeróbico disparó un incremento significativo en las concentraciones proteicas de Atg12 y Atg16 comparado con los datos previos y posteriores a las 16 sesiones de ejercicio de resistencia ($p < 0.03$ y $p < 0.05$, respectivamente). Los valores de ambas proteínas Atg también mostraron un aumento significativo (Atg12, $p < 0,03$; Atg16, $p < 0,05$) al contrastarlos con los resultados correspondientes al grupo GC en el punto post (Fig. 22A y 22B).

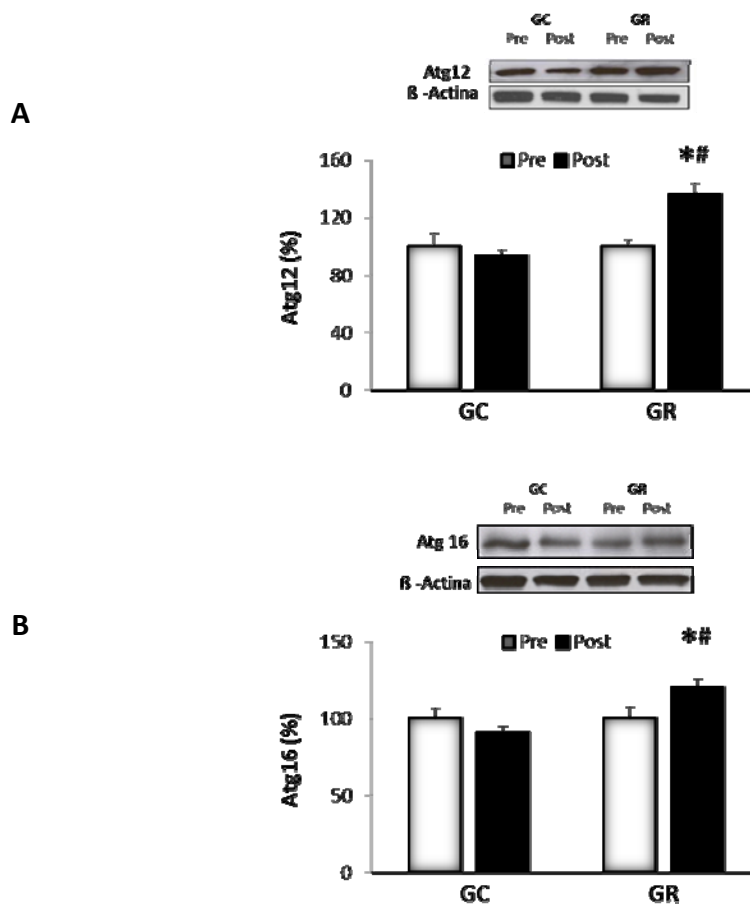


Figura 22. Cuantificación densitométrica y Western blots representativos de Atg12 (A) y Atg16 (B) en PBMCS de ancianos, antes (pre) y después (post) de un período de entrenamiento de 8 semanas. Los valores se presentan como la media \pm EEM. Grupo control (GC) y grupo entrenamiento de resistencia (GR) *Diferencias significativas respecto al valor basal del mismo grupo. #Diferencias significativas en comparación con el grupo control.

En la figura 23A se puede observar como el ejercicio de resistencia indujo una reducción en la fosforilación de la Ser757 de la proteína ULK-1; es decir, supuso un descenso en la inhibición de la autofagia que se tradujo en diferencias significativas entre el antes y el después de la intervención ($p < 0.04$). También se evidenció una reducción significativa al comparar estos resultados con los valores obtenidos por el grupo que siguió con su rutina diaria ($p < 0,04$).

Esta disminución en la expresión de la forma fosforilada de ULK-1 se acompañó de un incremento en los contenidos proteicos de beclín-1 en el grupo sometido al protocolo de ejercicio aeróbico ($p < 0.04$), los cuales también fueron

diferentes, desde el punto de vista estadístico, a los valores del grupo sedentario tras 8 semanas de estudio ($p < 0.04$) (Fig. 23B).

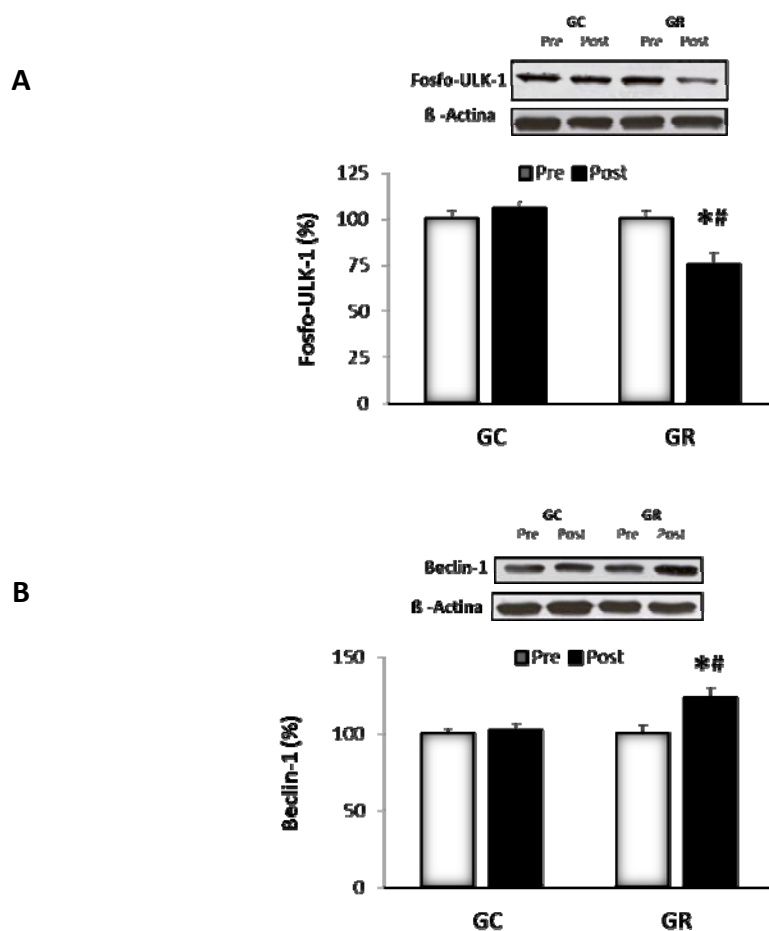


Figura 23. Cuantificación densitométrica y Western blots representativos de Ser757 FosfoULK-1 (A) y beclín-1 (B) en PBMCS de ancianos, antes (pre) y después (post) de un período de entrenamiento de 8 semanas. Los valores se presentan como la media \pm EEM. Grupo control (GC) y grupo entrenamiento de resistencia (GR) *Diferencias significativas respecto al valor basal del mismo grupo. #Diferencias significativas en comparación con el grupo control.

La figura 24 representa el contenido proteico de LAMP-2 después de 8 semanas de entrenamiento de resistencia o de continuar con la rutina diaria. La expresión de LAMP-2 se mantuvo inalterada en los dos grupos estudiados y en ambos puntos de muestreo.

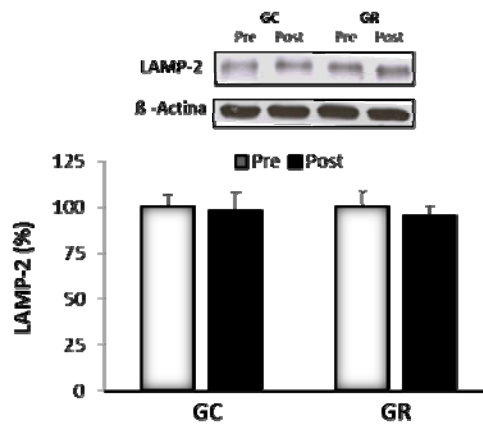


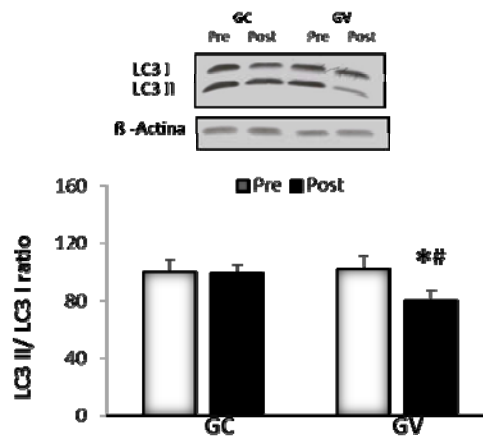
Figura 24. Cuantificación densitométrica y Western blot representativo de LAMP-2 en PBMCS de ancianos, antes (pre) y después (post) de un periodo de entrenamiento de 8 semanas. Los valores se presentan como la media \pm EEM. Grupo control (GC) y grupo entrenamiento de resistencia (GR).

4.3.3. Efecto de un programa de entrenamiento de vibración

En la Figura 25A se muestra el resultado obtenido para el ratio LC3II/LC3I después de completar las 8 semanas del programa de ejercicios de vibración de cuerpo completo. Tras el análisis de los Western blots correspondientes a LC3I y LC3II se puso de manifiesto un descenso significativo en el ratio correspondiente ($p < 0,05$) tras el entrenamiento. La misma diferencia significativa se obtuvo al contrastar los valores con los resultados obtenidos de GC ($p < 0,05$).

El contenido proteico de p62/SQSTM1 tras completar la intervención (Figura 25B) indica que esta proteína sigue una tendencia idéntica a la previamente observada para el ratio LC3II/LC3I, evidenciándose una disminución significativa ($p < 0,03$) al comparar los valores antes y después del entrenamiento en dicho grupo. De nuevo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas al contrastar el grupo GV con GC en el momento post ($p < 0,03$).

A



B

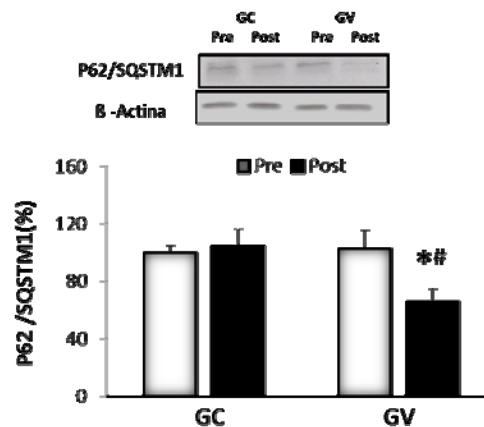
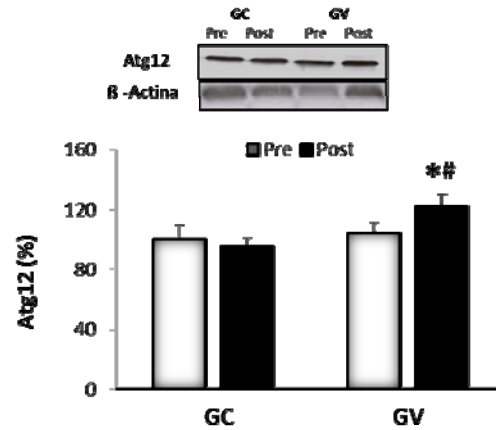


Figura 25. Cuantificación densitométrica y Western blots representativos de LC3I, LC3II (A) y p62/SQSTM1 (B) en PBMCs de ancianos, antes (pre) y después (post) de un período de entrenamiento de 8 semanas. Los valores se presentan como la media \pm EEM. Grupo control (GC) y grupo entrenamiento de vibración (GV) *Diferencias significativas respecto al valor basal del mismo grupo. #Diferencias significativas en comparación con el grupo control.

Los valores de la expresión proteica de Atg12, tras completar el protocolo de entrenamiento de vibración (Fig. 26A), muestran como Atg12 se incrementó significativamente ($p < 0,04$) tras las 16 sesiones de ejercicio. En relación a los valores del grupo GC, también se detectó un incremento del contenido de Atg12 en GV ($p < 0,04$). Sorprendentemente, el análisis de la expresión de la proteína Atg16 (Fig. 26B) puso de manifiesto un resultado totalmente opuesto y que difiere de los resultados obtenidos para los otros dos programas de entrenamiento analizados. Atg16 disminuyó significativamente ($p < 0,03$) en el grupo que completó el entrenamiento

de vibración. También se observaron diferencias estadísticamente significativas tras contrastar los valores del grupo GV con los valores correspondientes de control ($p < 0,03$).

A



B

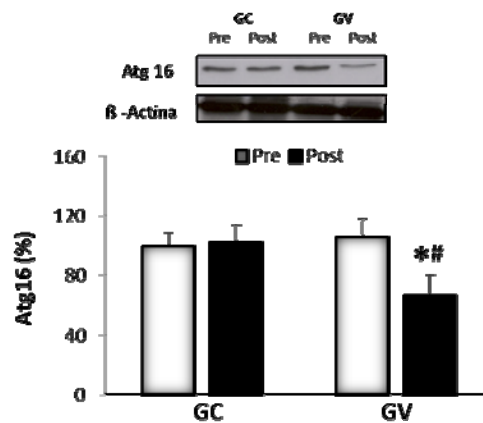


Figura 26. Cuantificación densitométrica y Western blots representativos de Atg12 (A) y Atg16 (B) en PBMCS de ancianos, antes (pre) y después (post) de un período de entrenamiento de 8 semanas. Los valores se presentan como la media \pm EEM. Grupo control (GC) y grupo entrenamiento de vibración (GV) *Diferencias significativas respecto al valor basal del mismo grupo. #Diferencias significativas en comparación con el grupo control.

Para otra de las proteínas del proceso autofágico, ULK-1, el contenido proteico de su forma fosforilada experimentó un descenso estadísticamente significativo (p

<0,02) en el grupo entrenado tras compararlo con los valores iniciales. El mismo resultado se observó cuando se realizó la comparación con los datos obtenidos en el grupo sedentario ($p < 0,02$) (Fig. 28A).

La figura 28B muestra como el entrenamiento de vibración no fue capaz de incrementar los contenidos de beclín-1 sino que, por el contrario los disminuyó de forma significativa tanto al comparar valores iniciales y finales ($p < 0,05$) como al comparar GV y GC ($p < 0,05$).

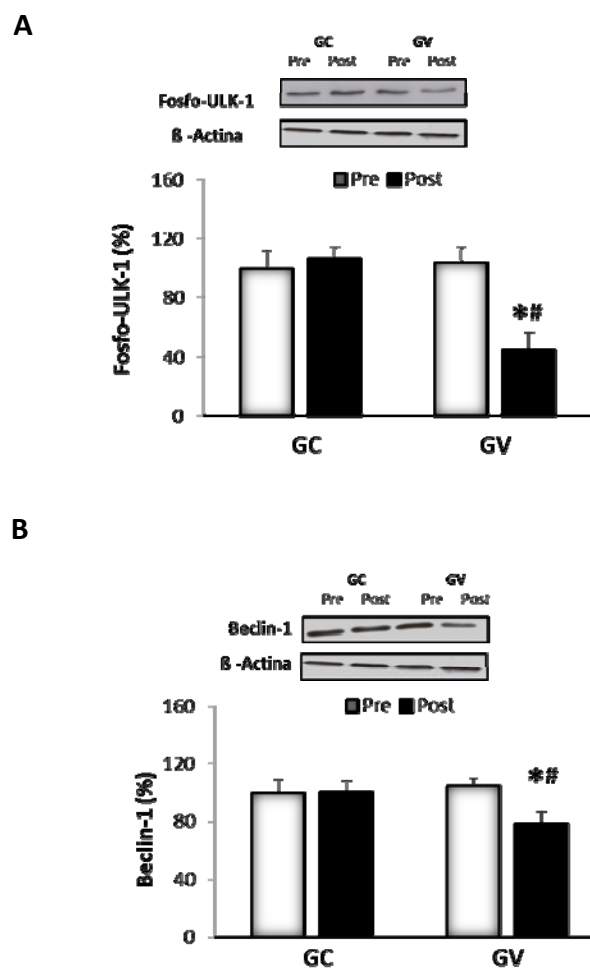


Figura 27. Cuantificación densitométrica y Western blots representativos de Ser757 FosfoULK-1 (A) y beclín-1 (B) en PBMCS de ancianos, antes (pre) y después (post) de un período de entrenamiento de 8 semanas. Los valores se presentan como la media \pm EEM. Grupo control (GC) y grupo entrenamiento de vibración (GV) *Diferencias significativas respecto al valor basal del mismo grupo. #Diferencias significativas en comparación con el grupo control.

El contenido proteico de LAMP-2 fue significativamente menor ($p < 0,03$) en aquellos ancianos que finalizaron las 16 sesiones de ejercicios sobre plataforma de vibracion. Estos resultados mostraron el mismo patron al contrastarlos con los valores obtenidos para el grupo control ($p < 0,03$) (Fig. 29).

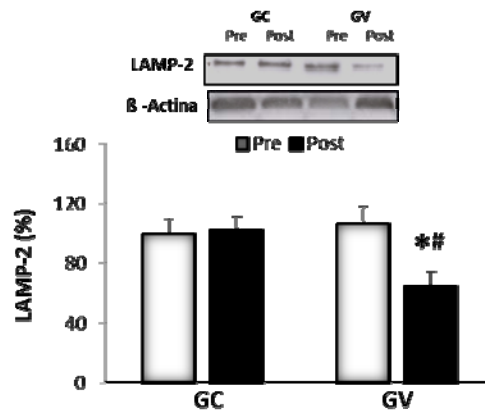


Figura 28. Cuantificación densitométrica y Western blot representativo de LAMP-2 en PBMCs de ancianos, antes (pre) y después (post) de un período de entrenamiento de 8 semanas. Los valores se presentan como la media \pm EEM. Grupo control (GC) y grupo entrenamiento de vibración (GV) *Diferencias significativas respecto al valor basal del mismo grupo. #Diferencias significativas en comparación con el grupo control.

4.4. EFECTO DE UN PROGRAMA DE ENTRENAMIENTO FÍSICO SOBRE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES TIPO TOLL

Existen evidencias en la literatura que describen como la autofagia puede regular negativamente la inducción de la inflamación que se manifiesta en diversas situaciones, incluida el proceso de senescencia (Netea-Maier et al., 2015). Esta regulación podría ser llevada a cabo a través de la respuesta pro-inflamatoria inducida por los receptores de tipo Toll, y más concretamente, por el TLR2 y el TLR4. Tras la estimulación de ambos receptores se inicia el reclutamiento de diferentes adaptadores que presentan una secuencia TIR. Uno de los principales mediadores es el MyD88; sin embargo, además de esta cascada de señalización algunos TLRs también pueden activar otra vía, la ruta dependiente de TRIF (Moynagh, 2005).

Previo al análisis por técnicas de Biología Molecular de los diferentes genes estudiados se procedió al recuento de PBMCS con el fin de descartar si las posibles variaciones obtenidas podrían deberse a cambios en la distribución de las subpoblaciones celulares. En la tabla 8 se puede observar que no existió ninguna variación entre los puntos de muestreo antes y después de los diferentes protocolos de ejercicio planteados en el estudio. En función de los datos obtenidos se decidió no corregir los resultados en función de dichos valores.

	(ml/mm ³)	%	%	%	%	%
	Leucocitos	Neutrofilos	Eosinofilos	Basofilos	Monocitos	Linfocitos
Grupo control Pre (GC)	5,38 ± 1,89	56,08 ± 6,86	2,30 ± 1,26	0,53 ± 0,30	8,10 ± 2,03	32,81 ± 5,37
Grupo control Post (GC)	5,49 ± 1,80	57,05 ± 7,62	2,32 ± 1,04	0,68 ± 0,45	8,09 ± 1,85	31,75 ± 7,84
Grupo de entrenamiento de fuerza Pre (GF)	6,27 ± 2,25	54,77 ± 8,29	2,57 ± 2,01	0,44 ± 0,33	8,93 ± 1,55	33,30 ± 8,36
Grupo de entrenamiento de fuerza Post (GF)	6,24 ± 1,43	52,80 ± 7,04	2,26 ± 1,66	0,59 ± 0,41	8,82 ± 1,64	35,53 ± 6,81
Grupo de entrenamiento de resistencia Pre (GR)	6,20 ± 2,14	52,14 ± 8,23	3,31 ± 1,55	0,51 ± 0,42	8,07 ± 2,03	35,97 ± 8,08
Grupo de entrenamiento de resistencia Post (GR)	6,32 ± 2,52	50,29 ± 5,66	3,11 ± 1,49	0,44 ± 0,40	7,76 ± 2,01	38,39 ± 5,93
Grupo de entrenamiento de vibración Pre (GV)	5,46 ± 1,04	56,76 ± 9,56	2,46 ± 0,87	0,56 ± 0,52	8,43 ± 1,61	31,13 ± 9,92
Grupo de entrenamiento de vibración Post (GV)	5,12 ± 1,11	53,60 ± 6,89	2,50 ± 0,85	0,56 ± 0,56	8,39 ± 1,85	33,61 ± 8,59

Post (GV)						
------------------	--	--	--	--	--	--

Tabla 8. Distribución de PBMCS antes (pre) y después (post) de 8 semanas entrenamiento del grupo control y de entrenamiento. Los valores se presentan como la media \pm EEM. Grupo control (GC), grupo entrenamiento de fuerza (GF), grupo entrenamiento de resistencia (GR) y grupo de entrenamiento de vibración (GV).

En el caso del grupo que continuó con su rutina diaria, la expresión proteica de los receptores TLR2 y TLR4 no mostró cambios significativos entre las muestras tomadas inicialmente y tras las 8 semanas.

Los datos obtenidos tras la evaluación de los valores de MyD88 para GC revelaron una ausencia de cambios significativos en la expresión de esta proteína. El mismo patrón se observó en la expresión proteica de TRIF; es decir, no se encontraron cambios estadísticamente significativos en el grupo no sometido a un programa de entrenamiento físico (Tabla 9).

		TLR2 (%)			TLR4 (%)			MyD88 (%)			TRIF (%)		
Grupo Control (GC)	Pre	100	\pm	8	100	\pm	4	100	\pm	9	100	\pm	9
	Post	95	\pm	6	100	\pm	8	103	\pm	10	105	\pm	8
Grupo de entrenamiento de fuerza (GF)	Pre	100	\pm	10	100	\pm	7	100	\pm	10	100	\pm	9
	Post	65,3	\pm	8*#	83,7	\pm	6*#	80	\pm	9*#	75,2	\pm	11*#
Grupo de entrenamiento de resistencia (GR)	Pre	100	\pm	6	99	\pm	6	100	\pm	10	100	\pm	5
	Post	88	\pm	12	88	\pm	13*#	93	\pm	12	109	\pm	11
Grupo de entrenamiento de vibración	Pre	100	\pm	5	102	\pm	4	100	\pm	7	100	\pm	6

(GV)	Post	58,7	±	11*#	70,8	±	12*#	61,9	±	11*#	88,3	±	4*#
------	------	------	---	------	------	---	------	------	---	------	------	---	-----

Tabla 9. Expresión proteica de TLR2, TLR4, MyD88 y TRIF antes (pre) y después (post) del período de entrenamiento de 8 semanas. Los valores representan la media ± EEM. Grupo control (GC), grupo de entrenamiento de fuerza (GF), grupo de entrenamiento de resistencia (GR) y grupo de entrenamiento de vibración (GV). * Diferencias significativas en comparación con el valor basal, en el mismo grupo; # diferencias significativas comparadas con el grupo control.

4.4.1. Efecto de un programa de entrenamiento de fuerza

La expresión proteica de TLR2 y TLR4 disminuyeron significativamente ($p < 0,03$ y $p < 0,04$, respectivamente) tras el entrenamiento de fuerza realizado cuando se comparan con los valores basales del mismo grupo. Del mismo modo se detectó una disminución significativa al comparar dichos valores con los del CG (TLR2, $p < 0,03$; TLR4, $p < 0,04$). En la tabla 9 también se puede observar una disminución significativa en la expresión proteica de MyD88 ($p < 0,05$) al comparar los valores pre y post entrenamiento y de $p < 0,04$, cuando los resultados se contrastan con los obtenidos por el grupo sedentario. La misma tendencia se observó para la principal proteína analizada de la vía independiente de MyD88. Así, el contenido proteico de TRIF disminuyó significativamente ($p < 0,05$;) en respuesta al entrenamiento de fuerza y también cuando se compararon estos valores con los obtenidos por el grupo CG ($p < 0,05$).

4.4.2. Efecto de un programa de entrenamiento de resistencia

El contenido proteico de TLR2 y TLR4 mostrado en la tabla 9, pone de manifiesto que la expresión de ambos receptores permaneció constante en el grupo que llevó a cabo el entrenamiento de resistencia durante 16 semanas. Tampoco se observaron cambios significativos en relación a los valores del grupo CG. Resultados similares se obtuvieron para las concentraciones proteicas de los adaptadores MyD88 y TRIF; no evidenciándose cambios significativos entre los valores iniciales y finales

tras completar el entrenamiento aerobico ni al comparar estos resultados con los valores obtenidos por el grupo control.

4.4.3. Efectos de un programa de entrenamiento de vibración

La expresión proteica de TLR2 y TLR4 recogida en la tabla 9 para el grupo de sujetos que realizaron un entrenamiento de vibración también se redujo significativamente después de la intervención ($p < 0.03$ y $p < 0.04$, respectivamente). También se observaron diferencias estadísticamente significativas tras contrastar los valores post-entrenamiento de ambos receptores con los valores correspondientes al grupo control (TLR2, $p < 0,04$; TLR4, $p < 0,04$).

La cuantificación por Western blot de MyD88, tras completar el protocolo de entrenamiento de vibración (Tabla 9), mostró como MyD88 disminuyó significativamente ($p < 0,04$) tras las 16 sesiones de ejercicio. El análisis de los contenidos proteicos de TRIF puso de manifiesto cambios similares ($p < 0,03$). Tras contrastar estos datos con los obtenidos por el grupo que continuó con su rutina diaria, también se observaron diferencias estadísticamente significativas tanto en MyD88 ($p < 0.04$) como en TRIF ($p < 0,05$).

Discusión

La evolución demográfica que afecta a los países desarrollados en los últimos años acarrea importantes consecuencias. Por una parte, el envejecimiento de la población puede considerarse un éxito de las políticas de salud pública y el desarrollo socioeconómico, pero también constituye un reto para la sociedad, que debe adaptarse a ello para mejorar al máximo la salud y la capacidad funcional de las personas mayores, así como su participación social y su seguridad.

Desde el punto de vista funcional, la población anciana se caracteriza, entre otros aspectos, por una reducción de la eficacia del sistema neuromuscular, cardiovascular y respiratorio acompañándose de sarcopenia. Dichos cambios acontecen durante el proceso del envejecimiento, pero no todos ellos pueden ser atribuidos a este proceso sino que, una buena parte de la magnitud de los mismos, se deben al desuso funcional y no únicamente al envejecimiento (Kostka *et al.*, 2000). En general, se han utilizado entrenamientos basados en ejercicios de fuerza o de tipo aeróbico, en los que se ha demostrado el papel beneficioso de las adaptaciones inducidas por el ejercicio para prevenir o retardar el envejecimiento (Giannopoulou *et al.*, 2005; Oberbach *et al.*, 2006; Stewart *et al.*, 2005). Además de estos protocolos, y como una nueva alternativa, se está empezado a considerar la práctica de ejercicios de vibración con el objetivo de mejorar las habilidades funcionales de los mayores y como inductor de posibles beneficios, sobre todo de tipo inmunológico. No obstante, este último aspecto aún no está suficientemente contrastado.

Sin embargo, hasta la fecha, los especialistas aún no han establecido ni la modalidad óptima ni la intensidad que debe ser empleada para obtener beneficios, especialmente, de tipo inmunológico y de mejora de la autofagia. Con esta finalidad, en este estudio se llevó a cabo el diseño de tres protocolos de ejercicio, siguiendo las recomendaciones generales realizadas por las guías de salud para personas mayores. Los valores obtenidos tras el entrenamiento de fuerza muestran como dicho grupo presentó un incremento significativo tras el entrenamiento para los test de 1RM de press de pierna, curl de bíceps y pectoral contractor y para el test de fuerza máxima isométrica de press de pierna y curl de bíceps. Los test para la evaluación de la fuerza máxima realizados en el grupo sometido al entrenamiento de vibración también

pusieron de manifiesto como los participantes aumentaron significativamente algunos de los valores analizados, al comparar los resultados obtenidos antes y después de llevar a cabo las 8 semanas de entrenamiento. Finalmente, los resultados obtenidos tras realizar la valoración de la fuerza máxima para el grupo que realizó el programa de entrenamiento aeróbico, no muestran incrementos significativos en la mayoría de los test realizados, salvo en el de FMI de press de piernas, en el que se observaron diferencias estadísticamente significativas. No obstante, el test submáximo realizado en el grupo aeróbico mostró valores significativamente elevados respecto a los valores previos tras las 8 semanas de ejercicio aeróbico. Analizando juntos estos resultados, se puede sugerir que los protocolos de ejercicio empleados representan una herramienta útil para lograr adaptaciones funcionales beneficiosas en ancianos. De hecho, estudios previos han evaluado la efectividad de protocolos similares a éstos en la mejora de las características funcionales de las personas mayores (García-López *et al.*, 2007; Hakkinen *et al.*, 1998, Machado *et al.*, 2010), pero hasta la actualidad, no existen resultados publicados de como puedan influir estas rutinas de ejercicios, sobre el declive de la autofagia asociado al envejecimiento.

La disfunción en el flujo autofágico se produce en muchos órganos y tejidos como consecuencia de la edad. Este mal funcionamiento podría contribuir a la pérdida de la función celular y, a menudo, a la muerte celular al limitar la capacidad de la célula para mantener un proteosoma y unos orgánulos sanos. Esto les hace cada vez, no sólo más vulnerables al estrés celular y a los patógenos, sino incapaces de adaptarse a las demandas energéticas existentes (Tam *et al.*, 2014). De hecho, el declive progresivo de la actividad autofágica junto con la reducción de la expresión de los diferentes genes que regulan la autofagia, representan algunas de las principales características implicadas en el proceso de envejecimiento (López-Otín *et al.*, 2013). En la presente memoria se observó que dos importantes marcadores de la actividad autofágica, la relación LC3II/I y los contenidos de la proteína beclín-1, estaban significativamente disminuidos en las PBMCs de los ancianos comparados con las muestras obtenidas del grupo de jóvenes voluntarios. Estos datos confirman datos

que se han descrito previamente, los cuales sostienen que existe una atenuación de la maquinaria autofágica en diferentes órganos y tejidos, incluyendo las células sanguíneas, como resultado del envejecimiento (Haung *et al.*, 2012).

Entre las intervenciones destinadas a prevenir o revertir estos efectos no deseados de la edad, el ejercicio está jugando un papel cada vez más relevante (Vainshtein *et al.*, 2014). Así, la realización de ejercicio físico también se ha identificado como un inductor de la autofagia in vivo (He *et al.*, 2012), retrasando el envejecimiento y la aparición de comorbilidades asociadas. De hecho, en los últimos años se ha documentado que el ejercicio de resistencia crónico puede afectar a la vía de la autofagia en el músculo esquelético humano y linfocitos (Jamart *et al.*, 2012; Schwalm *et al.*, 2015; Weng *et al.*, 2013). Sin embargo, hasta la fecha, los datos disponibles relativos a los efectos inducidos por el ejercicio sobre la expresión de las proteínas de la autofagia, en diferentes tejidos, se han obtenido casi exclusivamente en roedores. Así, correr en una cinta, 1 hora diaria durante 8 semanas, provocó un aumento significativo en la expresión de la proteína beclín-1 y en el ratio LC3I/II analizado en el músculo sóleo de ratas (Kim *et al.*, 2013). De igual manera, cuando se estudió la expresión de LC3I, LC3II y p62/SQSTM1 en el vasto lateral y en el músculo cardíaco de ratas después de un 8 semanas de entrenamiento 50 min/día, se observó un incremento del ratio LC3II/I asociado a una baja expresión de p62/SQSTM1 (He *et al.*, 2012). En la misma línea, se puso de manifiesto un incremento en la expresión de la proteína LC3II y una reducción del contenido de p62/SQSTM1 en el músculo plantar de ratones, los cuales libremente tuvieron acceso a diferentes protocolos de correr en la rueda durante un periodo de 1 a 5 meses (Lira *et al.*, 2013; Tam *et al.*, 2015). Periodos de entrenamientos más largos, por ejemplo, 36 semanas, también parecen inducir un aumento de la relación LC3II/I y una reducción de la expresión de p62/SQSTM1 en la corteza cerebral de los ratones (Bayod *et al.*, 2014). Como se ha mencionado con anterioridad, siguen siendo muy escasos los estudios que, utilizando un modelo de roedores, se han centrado en los efectos del ejercicio físico sobre el declive asociado a la edad. Kim y sus colaboradores demostraron que la expresión de beclín-1 y Atg7 fueron más bajas en el músculo extensor largo de los dedos y en el

gastrocnemio de los ratones ancianos en comparación con los ratones jóvenes. Estos valores se incrementaron tras un ejercicio de 40 minutos diarios en tapiz rodante durante 8 semanas (Kim *et al.*, 2013). Sin embargo, a nuestro entender, el presente trabajo es el primero en demostrar los efectos del entrenamiento de resistencia sobre el declive de la maquinaria autofágica en adultos mayores. Entre las proteínas de autofagia, LC3II, que participan en la selección del sustrato para la degradación y también juegan un papel en la fusión de la membrana, se usa comúnmente como un marcador de la activación de la autofagia (Barth *et al.*, 2010). Los resultados de nuestro estudio indican que la expresión de ambos LC3I y II aumentó en respuesta al programa de ejercicio, con una elevación significativa de la relación de LC3II/I. Esto refuerza la hipótesis de un mayor número de autofagosomas. Sin embargo, estos resultados no permiten aclarar si el incremento es la consecuencia de una mayor formación de autofagosoma o un defecto en su degradación a través del lisosoma (Pagano *et al.*, 2014). Con el fin de tener una mejor idea de los cambios en el flujo autofágico, las mediciones de LC3II deben combinarse con otros marcadores de autofagia. Así, p62/SQSTM1, una proteína de unión a ubiquitina que se asocia con LC3, puede servir para unir sustratos ubiquitinados a la maquinaria de la autofagia y ser autodegradada por los lisosomas. Por lo tanto, debido a que p62/SQSTM1 se acumula cuando se inhibe la autofagia, y disminuye cuando se induce la autofagia, la modulación de los niveles de p62/SQSTM1 pueden ser utilizados como un marcador para supervisar el flujo de autofagia (Klionsky *et al.*, 2013). Los datos obtenidos en esta memoria demuestran que el ejercicio de resistencia induce una caída en la expresión de p62/SQSTM1, lo que sugiere un aumento en el flujo de autofagia después del programa de entrenamiento. Los resultados están de acuerdo con estudios que encontraron un aumento en LC3II y una disminución de la expresión de p62/SQSTM1 en diferentes modelos de roedores (He *et al.*, 2012; Lira *et al.*, 2013; Bayod *et al.*, 2014) y en humanos (Schwalm *et al.*, 2015). Todos ellos apoyan la idea de que el ejercicio de alta intensidad induce un aumento de la actividad autofágica.

Los resultados de la expresión proteica de p62/SQSTM1 y del ratio LC3II/LC3I pusieron de manifiesto que, tras completar las 8 semanas de ejercicios de fuerza, no

se detectaron cambios significativos en ambos marcadores. El ratio LC3BII/LC3I (LC3B) es reconocido como un marcador fiable de la síntesis de autofagosomas; sin embargo, LC3BII está involucrado en etapas tempranas y tardías del flujo autofagico desde la formación del autofagosoma hasta la degradación en el lisosoma, por lo que es importante evaluar otros marcadores que permitan interpretar cambios en el flujo autofagico (Schwalm *et al.*, 2015; Jamart *et al.*, 2014). Por su parte, p62 es degradado en el proceso de autofagia y se acumula cuando este proceso esta inhibido. Es posible que el aumento en la producción de p62 iguale al aumento en la degradación de p62 durante el ejercicio. Por ello, está descrito que los contenidos de esta proteína que no siempre guardan una correlación inversa con la actividad autofagica (Moller *et al.*, 2015). Además, la activación de la autofagia parece no ser esencial para las adaptaciones musculares en ejercicios de fuerza en comparación con ejercicios de resistencia (Sanchez *et al.*, 2014). En el caso del entrenamiento de vibración, existe una marcada disminución del ratio LC3BII/LC3I y de p62 tras completar la intervención, al comparar los valores antes y después del entrenamiento en dicho grupo. Este dato es sorprendente y quizás la explicación habría que buscarla en la posible activación de otras rutas metabólicas como consecuencia del protocolo de vibración empleado. Además, debe tenerse en cuenta que el tiempo de duración del entrenamiento en plataforma de vibración es muy inferior al empleado por las otras dos modalidades de ejercicio.

Para profundizar aún más en la activación de la maquinaria autofágica inducida por la práctica de ejercicio físico, e intentar dar explicación a los resultados obtenidos para los dos marcadores anteriores, también se midió la expresión de diferentes proteínas que contribuyen a promover el ensamblaje inicial de la membrana del autofagosoma. El primer sistema de conjugación de ubiquitina implicado en la formación del autofagosoma es el Atg12/Atg5/Atg16 (Walczak and Martens, 2013). Los estudios previos han demostrado que la proteína Atg12 está sobre-expresada al final de una carrera de 24 horas (Jamart *et al.*, 2012), al igual que sucede en modelos de atrofia muscular, como la denervación y la privación de comida (Zhao *et al.*, 2007). Los resultados del presente estudio indican que la expresión de las

proteínas Atg12 y Atg16 aumentó tras la práctica del programa de entramiento de resistencia que llevaron a cabo los ancianos. Además, el ejercicio también afectó a otras proteínas de la ruta autofágica. En concreto, se detectó una reducción en la fosforilación de ULK-1 en la serina 757 y una mayor expresión beclín-1. Es importante destacar que ULK-1 desempeña un papel crítico en la iniciación de la autofagia. De hecho, la fosforilación de ULK-1 en el residuo de serina 555 es un importante estímulo para activar la autofagia, mientras que la fosforilación en la serina 757 posee un efecto inhibitorio (Kim *et al.*, 2011). La regulación de la forma fosforilada de ULK-1 por la alimentación se ha asociado con una activación de la proteína quinasa α activada por AMP en humanos (Schwalm *et al.*, 2015). Además, la realización de un ejercicio aeróbico a corto plazo, al 50% del consumo máximo de oxígeno, también parece incrementar la expresión de ULK-1 fosforilado en Ser⁵⁵⁵, junto con una disminución de la lipidadación de LC3 en el músculo esquelético humano (Moller *et al.*, 2015). En ratones también se ha observado que la lipidadación de LC3, en respuesta a la realización de un ejercicio en tapiz rodante, se acompañó de una disminución en la fosforilación de la serina 757 de ULK-1 (Pagano *et al.*, 2014). En la memoria de tesis presentada también se observó una disminución en la expresión de la forma fosforilada en serina 757 de ULK-1, lo que refuerza el hecho de que el ejercicio de resistencia estimula la autofagia. En relación al programa de entrenamiento de fuerza, a pesar de que en un principio no se detectaron cambios significativos ni en el ratio LC3II/LC3I ni en p62, el resto de marcadores analizados sigue la misma tendencia que los resultados obtenidos para el entrenamiento de resistencia. Esto sugiere que también otros procesos celulares, como la autofagia, podrían estar implicados en las adaptaciones beneficiosas inducidas por el ejercicio de fuerza en personas mayores.

Beclín-1, es una proteína que juega un papel esencial en la fase inicial de secuestro. Además, está involucrada en la fase de síntesis del autofagosoma que es importante en el reclutamiento de otras proteínas Atg (Sanchez *et al.*, 2014). Aunque no se han descrito cambios en el músculo esquelético después de una carrera de ultra resistencia (Jamart *et al.*, 2012), los contenidos de beclín-1 se incrementaron en

roedores tras un entrenamiento en tapiz rodante (Kim *et al.*, 2013). Nuestros resultados son similares a un estudio previo donde la hipoxia dificulta la autofagia en linfocitos CD4. En dicho estudio, un entrenamiento de 5 semanas donde se realizaban ejercicios continuos e interválicos, demostró ser efectivo para inducir la expresión de beclín-1 y, de esta forma, atenuar la reducción de la autofagia inducida por las condiciones de hipoxia (Weng *et al.*, 2013). En este sentido, el incremento detectado en los contenidos de la proteína beclín-1 en el grupo que GF, concuerdan con estudios previos que examinaron los efectos de un entrenamiento de fuerza crónico en ratas ancianas (Luo *et al.*, 2013). Todo ello apoya la hipótesis de que el ejercicio físico, realizado de forma habitual, podría tener un efecto preventivo sobre la pérdida de eficiencia del proceso autofágico asociada al envejecimiento.

Otro hallazgo importante está relacionado con la expresión de LAMP-2, una proteína requerida para la fusión del autofagosoma con el lisosoma para formar autofagolisosomas, los cuales, a su vez, están involucrados en el proceso de degradación autofágica lisosomal (Wohlgemuth *et al.*, 2010). En el presente estudio, las concentraciones de LAMP-2 no se vieron afectados por el entrenamiento aeróbico ni el de vibración de cuerpo completo, este hecho ha sido descrito anteriormente en músculo esquelético de ratones entrenados, tanto jóvenes como de edad avanzada (Kim *et al.*, 2013). Aunque los contenidos de ARNm de LAMP-2 se han descrito en adultos obesos que realizan ejercicio de intensidad moderada, los cambios observados no se debieron únicamente a los efectos del ejercicio sino a una combinación de la actividad física con la restricción calórica (Wohlgemuth *et al.*, 2011). Por lo tanto, para potenciar los potenciales efectos del ejercicio sobre el proceso de autofagia en ancianos, en el futuro, se deben realizar investigaciones donde se combinen intervenciones dietéticas con la práctica de ejercicio.

En cualquier caso, tanto la duración como la intensidad del ejercicio pueden ser factores a tener en cuenta a la hora de justificar las contradicciones encontradas en el presente estudio tras analizar el efecto de diferentes programas de ejercicio sobre el flujo autofágico. De hecho, diferencias en el consumo de energía durante los distintos tipos de ejercicio pueden determinar una respuesta autofágica diferente. En

segundo lugar, y no por ello menos importante, existen numerosos factores extrínsecos e intrínsecos que pueden afectar el resultado de los estudios. Entre estos factores cabe destacar: el tipo de tejido analizado, el método de recogida de la muestra, el nivel de entrenamiento previo y el estado nutricional de los sujetos.

La vía de señalización de los receptores TLR está finamente regulada con el fin de evitar las respuestas inmunes nocivas y la inflamación grave. Además, existen suficientes evidencias que apoyan que la autofagia tiene importantes efectos sobre la inducción y modulación de la reacción inflamatoria mediada por los TLR, con una potencial entrecruzamiento de las dos vías (Into *et al.*, 2012). De hecho, Shi *et al.* demostraron que la autofagia activada por los receptores TLR está regulada por la interacción de MyD88 o TRIF con beclin-1, lo que a menudo resulta en la aparición de grandes agregados en el citoplasma. Para la formación de estos agregados se necesita la colaboración del receptor autofágico sequestosoma 1) (Into *et al.*, 2010). El reclutamiento de p62 al complejo MyD88 está estrechamente relacionado con TRAF6. Además, p62 media la formación, inducida por TLR4, de agregados LC3 positivos (posiblemente autofagosomas), lo que conduce a la degradación autofágica. Durante este proceso la vía de señalización TLR4-MyD88 induce la activación de la MAPK-p38. La interacción de los adaptadores de TLR con beclin-1 también parece estar mediada por TRAF6, provocando una reducción en la unión de beclin-1 a Bcl-2. A su vez, mTORC1 regula negativamente la ruta de señalización del NFkappaB activada por TLR y la producción de citoquinas como IL-12, mientras que regula positivamente la producción de IL-10.

Para comprobar esta hipótesis, en el presente estudio se investigó si la activación de la autofagia inducida por el ejercicio podría estar asociada con una menor regulación de las vías dependientes de TLR2 y TLR4. La intervención basada en el ejercicio de resistencia, contradiciendo la hipótesis propuesta, no modificó la expresión ni de TLR2 ni TLR4, y tampoco puso de manifiesto efectos significativos en las concentraciones de proteínas MyD88 y TRIF. Otras investigaciones previas no han podido demostrar cambios inducidos por el ejercicio aeróbico en las vías de señalización de TLR2 y TLR4 después de un programa de entrenamiento de 15 días en

pacientes diabéticos (Reyna *et al.*, 2013) ni después de 10 semanas de entrenamiento de resistencia en atletas obesos (Nickel *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos tras analizar la vía de señalización de los TLR después del programa de entrenamiento aeróbico contradicen los observados en las otras dos modalidades de ejercicio llevadas a cabo en los ancianos, entrenamiento de fuerza o de vibración del cuerpo completo. Ambos tipos de ejercicio son capaces de disminuir la expresión de los receptores tipo Toll en personas mayores lo que resulta en un menor estado proinflamatorio (Rodríguez-Miguel *et al.*, 2014; Rodríguez-Miguel *et al.*, 2015). Así, tras la realización de las técnicas de Western blot correspondientes, los resultados obtenidos para el grupo de fuerza concuerdan con la bibliografía revisada, demostrando que los ancianos que completaron las 8 semanas de ejercicios de fuerza mostraron contenidos de TLR2 y TLR4 más reducidos que los sujetos que continuaban con su rutina diaria. En este sentido, en el grupo de entrenamiento de vibración, también se observó cómo sus participantes manifestaron una disminución significativa tanto de TLR2 como de TLR4 tras completar la intervención. Estos resultados confirman los hallazgos de otros estudios, donde se puso de manifiesto que la realización de diferentes actividades físicas tienen como resultado un descenso de la expresión de TLR2 y TLR4 (Flynn *et al.*, 2003; Lancaster *et al.*, 2005). En aquellos sujetos sometidos a un protocolo de entrenamiento de vibración se detectó una disminución significativa tanto de TLR2 como de TLR4 tras completar la intervención. En este punto es importante destacar que, a excepción de los descritos por nuestro grupo de investigación, no existen resultados previos en la bibliografía que hayan analizado el efecto que puede tener un estímulo de vibración sobre la expresión de estos receptores (Rodríguez-Miguel *et al.*, 2015).

También son escasos los estudios que han profundizado en el efecto del ejercicio físico sobre las rutas dependiente e independiente de MyD88. Un trabajo ha demostrado como un entrenamiento previo, basado en ejercicios de tipo excéntrico realizado en sujetos jóvenes, fue capaz de reducir la expresión proteica de MyD88 y TRIF tras una sesión de ejercicio excéntrico agudo (Fernández-Gonzalo *et al.*, 2012). De manera similar y mostrando un resultado parecido a dicho estudio, los

participantes que realizaron el ejercicio de fuerza en el presente estudio, también han mostrado una disminución del contenido de este adaptador tras completar las 16 sesiones del protocolo diseñado. Por otra parte, y en relación a la disminución de la expresión de TLR2 y TLR4 descrita en el grupo entrenado en plataforma de vibración, también se observa una reducción en el contenido proteico de MyD88 y TRIF tras la finalización del protocolo de entrenamiento. Por tanto, los cambios fisiológicos inducidos por las actividades de vibración parecen correr en paralelo a los observados tras la realización de varias semanas de ejercicios de fuerza (Bosco *et al.*, 1999).

Conclusiones

CONCLUSIONES

Conclusión primera

Los resultados obtenidos en la presente memoria demuestran que 8 semanas de entrenamiento de resistencia atenúan la pérdida de la actividad autofágica en PBMCs de ancianos. Esta mejora de la autofagia se puso de manifiesto por un incremento en el ratio LC3II/I, la reducción de los niveles de la proteína de p62/SQSTM1, y la sobreexpresión de las proteínas reguladoras de autofagia, incluyendo beclin-1, fosforilada ULK-1, Atg12 y Atg16.

Conclusión segunda

Los efectos inducidos por el ejercicio de resistencia sobre la actividad autofágica no parecen estar relacionados con la regulación de las vías de TLR2 y TLR4 MyD88 dependiente e independiente, las cuales no cambiaron significativamente en los participantes sometidos a entrenamiento con ejercicio de resistencia.

Conclusión tercera

Los resultados de la presente memoria sugieren que el protocolo de ejercicio de fuerza empleado es capaz de producir modificaciones en los eventos que regulan el proceso de autofagia en ancianos. Además, el descenso en la fosforilación de ULK-1, asociado al incremento en los contenidos de beclín-1 y las proteínas Atg parece indicar una mejoría en el proceso de disfunción autofágica asociado al envejecimiento.

Conclusión cuarta

La regulación de los cambios en la autofagia, inducidos por 8 semanas de ejercicio de fuerza, se relacionaron con una menor expresión de las proteínas más

representativas de las vías de señalización de los receptores tipo Toll, tanto dependientes como independientes de MyD88.

Conclusión quinta

El entrenamiento de vibración de cuerpo completo no sólo no revirtió el declive de la autofagia observada en los ancianos participantes en el estudio, sino que lo agudizó aún más. Por tanto, sería necesario realizar más estudios para determinar si los cambios en la autofagia son generales para cualquier tipo de ejercicio, o como, parece indican nuestros resultados, las modificaciones en la respuesta autofágica van a ser específicas según la modalidad de entrenamiento desarrollada.

Conclusión general

Los resultados de la presente memoria ponen de manifiesto que los entrenamientos de fuerza y resistencia son capaces de inducir una activación del proceso autofágico en PBMCs de ancianos. Por el contrario, el entrenamiento en plataforma de vibración provocó un mayor declive de la autofagia en este grupo poblacional. Además, también se han encontrado discrepancias sobre la relación existente entre la autofagia y la ruta de señalización de los receptores TLR. Mientras que en el ejercicio de fuerza, las adaptaciones inducidas por la actividad física corrieron en paralelo a una menor expresión de la ruta de señalización de los receptores TLR2 y TLR4; en el entrenamiento de resistencia no se observó dicha relación. Por tanto, permanece por dilucidar el mecanismo concreto por el que los ejercicios de fuerza y resistencia mejoran la autofagia en personas de edad avanzada, haciéndose necesario profundizar en este tema.

Referencias

-
- Akira, S, Uematsu, S & Takeuchi, O (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**: 783-801, S0092-8674(06)00190-5 [pii].
- Alberts, B, Johnson, A & Lewis, J (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Nueva York: Garland Science.
- Allen, J, Morelli, V (2011). Aging and exercise. *Clin Geriatr Med* **27**: 661-71, 10.1016/j.cger.2011.07.010 [doi].
- American College of Sports Medicine, Chodzko-Zajko, WJ, Proctor, DN, Fiatarone Singh, MA, Minson, CT, Nigg, CR, *et al.* (2009). American College of Sports Medicine position stand. Exercise and physical activity for older adults. *Med Sci Sports Exerc* **41**: 1510-30, 10.1249/MSS.0b013e3181a0c95c [doi].
- Asrih, M, Jornayvaz, FR (2013). Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *J Endocrinol* **218**: R25-36, 10.1530/JOE-13-0201 [doi].
- Aucella, F, Battaglia, Y, Bellizzi, V, Bolignano, D, Capitanini, A & Cupisti, A (2015). Physical exercise programs in CKD: lights, shades and perspectives [corrected]. *J Nephrol* **28**: 143-50, 10.1007/s40620-014-0169-6 [doi].
- Avila-Funes, JA, Garcia-Mayo, EJ (2004). The benefits of doing exercise in the elderly. *Gac Med Mex* **140**: 431-6.
- Balasko, M, Soos, S, Szekely, M & Petervari, E (2014). Leptin and aging: Review and questions with particular emphasis on its role in the central regulation of energy balance. *J Chem Neuroanat* **61-62**: 248-55, 10.1016/j.jchemneu.2014.08.006 [doi].
- Barth, S, Glick, D & Macleod, KF (2010). Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol* **221**: 117-24, 10.1002/path.2694 [doi].
- Bayod, S, Del Valle, J, Pelegri, C, Vilaplana, J, Canudas, AM, Camins, A, *et al.* (2014). Macroautophagic process was differentially modulated by long-term moderate exercise in rat brain and peripheral tissues. *J Physiol Pharmacol* **65**: 229-39.
- Bergamini, E, Cavallini, G, Donati, A & Gori, Z (2004). The role of macroautophagy in the ageing process, anti-ageing intervention and age-associated diseases. *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 2392-404, 10.1016/j.biocel.2004.05.007 [doi].
- Bosco, C, Cardinale, M and Tarpela, O (1999). Influence of vibration on mechanical power and electromyogram activity in human arm flexor muscles. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **79**: 306-311.
- Bullock, N, Martin, DT, Ross, A, Rosemond, CD, Jordan, MJ & Marino, FE (2008). Acute effect of whole-body vibration on sprint and jumping performance in elite skeleton athletes. *J Strength Cond Res* **22**: 1371-4, 10.1519/JSC.0b013e31816a44b5 [doi].

- Cardinale, M, Wakeling, J (2005). Whole body vibration exercise: are vibrations good for you? *Br J Sports Med* **39**: 585,9; discussion 589, 39/9/585 [pii].
- Cochrane, DJ (2011). Vibration exercise: the potential benefits. *Int J Sports Med* **32**: 75-99, 10.1055/s-0030-1268010 [doi].
- Cuervo, AM, Macian, F (2014). Autophagy and the immune function in aging. *Curr Opin Immunol* **29**: 97-104, 10.1016/j.coi.2014.05.006 [doi].
- Dong, W, Wang, R, Ma, LN, Xu, BL, Zhang, JS, Zhao, ZW, *et al.* (2015). Autophagy involving age-related cognitive behavior and hippocampus injury is modulated by different caloric intake in mice. *Int J Clin Exp Med* **8**: 11843-53.
- Feigenbaum, MS, Pollock, ML (1999). Prescription of resistance training for health and disease. *Med Sci Sports Exerc* **31**: 38-45.
- Fernandez-Gonzalo, R, De Paz, JA, Rodriguez-Miguel, P, Cuevas, MJ & Gonzalez-Gallego, J (2014). TLR4-mediated blunting of inflammatory responses to eccentric exercise in young women. *Mediators Inflamm* **2014**: 479395, 10.1155/2014/479395 [doi].
- Fernandez-Gonzalo, R, De Paz, JA, Rodriguez-Miguel, P, Cuevas, MJ & Gonzalez-Gallego, J (2012). Effects of eccentric exercise on toll-like receptor 4 signaling pathway in peripheral blood mononuclear cells. *J Appl Physiol (1985)* **112**: 2011-8, 10.1152/jappphysiol.01499.2011 [doi].
- Ferraccioli, G, Carbonella, A, Gremese, E & Alivernini, S (2012). Rheumatoid arthritis and Alzheimer's disease: genetic and epigenetic links in inflammatory regulation. *Discov Med* **14**: 379-88.
- Flynn, MG, McFarlin, BK, Phillips, MD, Stewart, LK & Timmerman, KL (2003). Toll-like receptor 4 and CD14 mRNA expression are lower in resistive exercise-trained elderly women. *J Appl Physiol (1985)* **95**: 1833-42, 10.1152/jappphysiol.00359.2003 [doi].
- Foldvari, M, Clark, M, Laviolette, LC, Bernstein, MA, Kaliton, D, Castaneda, C, *et al.* (2000). Association of muscle power with functional status in community-dwelling elderly women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **55**: M192-9.
- Franceschi, C (2007). Inflammaging as a major characteristic of old people: can it be prevented or cured? *Nutr Rev* **65**: S173-6.
- Franceschi, C (2003). Continuous remodeling as a key to aging and survival: an interview with Claudio Franceschi. Interview by Suresh I S Rattan. *Biogerontology* **4**: 329-34, 5141012 [pii].
- Franceschi, C, Bonafe, M, Valensin, S, Olivieri, F, De Luca, M, Ottaviani, E, *et al.* (2000). Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* **908**: 244-54.
- Fulop, T, Larbi, A, Douziech, N, Fortin, C, Guerard, KP, Lesur, O, *et al.* (2004). Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Aging Cell* **3**: 217-26, 10.1111/j.1474-9728.2004.00110.x [doi].

-
- Garber, K (2012). Autophagy. Explaining exercise. *Science* **335**: 281, 10.1126/science.335.6066.281 [doi].
- García-López, D, Cuevas, MJ, Almar, M, Lima, E, De Paz, JA, and González-Gallego, J (2007). Effects of eccentric exercise on NF-kappaB activation in blood mononuclear cells. *Med Sci Sports Exerc* **39**: 653-664.
- Gelino, S, Hansen, M (2012). Autophagy - An Emerging Anti-Aging Mechanism. *J Clin Exp Pathol Suppl* **4**: 006, 006 [pii].
- Geneva, World Health Organization (2010). **Global Recommendations on Physical Activity for Health.**
- Giannopoulou, I, Fernhall, B, Carhart, R, Weinstock, RS, Baynard, T, Figueroa, A and Kanaley, JA (2005). Effects of diet and/or exercise on the adipocytokine and inflammatory cytokine levels of postmenopausal women with type 2 diabetes. *Metabolism* **54**, 866-875.
- Giunta, S (2006). Is inflammaging an auto[innate]immunity subclinical syndrome? *Immun Ageing* **3**: 12, 1742-4933-3-12 [pii].
- Gleeson, M, McFarlin, B & Flynn, M (2006). Exercise and Toll-like receptors. *Exerc Immunol Rev* **12**: 34-53.
- Goldsmith, TC (2014). Modern evolutionary mechanics theories and resolving the programmed/non-programmed aging controversy. *Biochemistry (Mosc)* **79**: 1049-55, 10.1134/S000629791410006X [doi].
- Goldsmith, TC (2012). On the programmed/non-programmed aging controversy. *Biochemistry (Mosc)* **77**: 729-32, 10.1134/S000629791207005X [doi].
- Gomez, CR, Boehmer, ED & Kovacs, EJ (2005). The aging innate immune system. *Curr Opin Immunol* **17**: 457-62, S0952-7915(05)00117-2 [pii].
- Gomez, CR, Nomellini, V, Faunce, DE & Kovacs, EJ (2008). Innate immunity and aging. *Exp Gerontol* **43**: 718-28, 10.1016/j.exger.2008.05.016 [doi].
- Goto, M (2008). Inflammaging (inflammation + aging): A driving force for human aging based on an evolutionarily antagonistic pleiotropy theory? *Biosci Trends* **2**: 218-30.
- Grassi, M, Petraccia, L, Mennuni, G, Fontana, M, Scarno, A, Sabetta, S, et al. (2011). Changes, functional disorders, and diseases in the gastrointestinal tract of elderly. *Nutr Hosp* **26**: 659-68, 10.1590/S0212-16112011000400001 [doi].
- Grumati, P, Coletto, L, Schiavinato, A, Castagnaro, S, Bertaggia, E, Sandri, M, et al. (2011). Physical exercise stimulates autophagy in normal skeletal muscles but is detrimental for collagen VI-deficient muscles. *Autophagy* **7**: 1415-23, 17877 [pii].
- Gruver, AL, Hudson, LL & Sempowski, GD (2007). Immunosenescence of ageing. *J Pathol* **211**: 144-56, 10.1002/path.2104 [doi].
-

Gunasekaran, U, Gannon, M (2011). Type 2 diabetes and the aging pancreatic beta cell. *Aging (Albany NY)* **3**: 565-75, 100350 [pii].

Häkkinen, K, Newton, RU, Gordon, SE, McCormick, M, Volek JS, Nindl BC, *et al.* (1998). Changes in muscle morphology, electromyographic activity, and force production characteristics during progressive strength training in young and older men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **53**: B415-23.

Harris, C, DeBeliso, MA, Spitzer-Gibson, TA & Adams, KJ (2004). The effect of resistance-training intensity on strength-gain response in the older adult. *J Strength Cond Res* **18**: 833-8, 14758 [pii].

Hazell, TJ, Kenno, KA & Jakobi, JM (2010). Evaluation of muscle activity for loaded and unloaded dynamic squats during vertical whole-body vibration. *J Strength Cond Res* **24**: 1860-5, 10.1519/JSC.0b013e3181ddf6c8 [doi].

He, C, Bassik, MC, Moresi, V, Sun, K, Wei, Y, Zou, Z, *et al.* (2012). Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature* **481**: 511-5, 10.1038/nature10758 [doi].

Heilbronn, LK, de Jonge, L, Frisard, MI, DeLany, JP, Larson-Meyer, DE, Rood, J, *et al.* (2006). Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. *JAMA* **295**: 1539-48, 295/13/1539 [pii].

Hohn, A, König, J & Grune, T (2013). Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *J Proteomics* **92**: 132-59, 10.1016/j.jprot.2013.01.004 [doi].

Huang, J, Xu, J, Pang, S, Bai, B, Yan, B (2012). Age-related decrease of the LAMP-2 gene expression in human leukocytes. *Clin Biochem* **45**:1229-1232

Instituto Nacional de Estadística (2015). *Censo de la sal 1631*. Madrid: Ine.

Into, T, Inomata, M, Niida, S, Murakami, Y & Shibata, K (2010). Regulation of MyD88 aggregation and the MyD88-dependent signaling pathway by sequestosome 1 and histone deacetylase 6. *J Biol Chem* **285**: 35759-69, 10.1074/jbc.M110.126904 [doi].

Into, T, Inomata, M, Takayama, E & Takigawa, T (2012). Autophagy in regulation of Toll-like receptor signaling. *Cell Signal* **24**: 1150-62, 10.1016/j.cellsig.2012.01.020 [doi].

Israel, A (2010). The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a000158, 10.1101/cshperspect.a000158 [doi].

Jamart, C, Francaux, M, Millet, GY, Deldicque, L, Frere, D & Feasson, L (2012). Modulation of autophagy and ubiquitin-proteasome pathways during ultra-endurance running. *J Appl Physiol (1985)* **112**: 1529-37, 10.1152/jappphysiol.00952.2011 [doi].

Jamart, C, Gomes, AV, Dewey, S, Deldicque, L, Raymackers, JM & Francaux, M (2014). Regulation of ubiquitin-proteasome and autophagy pathways after acute LPS and epoxomicin

administration in mice. *BMC Musculoskelet Disord* **15**: 166,2474-15-166, 10.1186/1471-2474-15-166 [doi].

Kanasaki, K, Kitada, M & Koya, D (2012). Pathophysiology of the aging kidney and therapeutic interventions. *Hypertens Res* **35**: 1121-8, 10.1038/hr.2012.159 [doi].

Katz, JM, Plowden, J, Renshaw-Hoelscher, M, Lu, X, Tumpey, TM & Sambhara, S (2004). Immunity to influenza: the challenges of protecting an aging population. *Immunol Res* **29**: 113-24, IR:29:1-3:113 [pii].

Ketata, W, Rekik, WK, Ayadi, H & Kammoun, S (2012). Aging of the respiratory system: anatomical changes and physiological consequences. *Rev Pneumol Clin* **68**: 282-9, 10.1016/j.pneumo.2012.06.003 [doi].

Kim, J, Kundu, M, Viollet, B & Guan, KL (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* **13**: 132-41, 10.1038/ncb2152 [doi].

Kim, YA, Kim, YS, Oh, SL, Kim, HJ & Song, W (2013). Autophagic response to exercise training in skeletal muscle with age. *J Physiol Biochem* **69**: 697-705, 10.1007/s13105-013-0246-7 [doi].

Klionsky, DJ, Codogno, P (2013). The mechanism and physiological function of macroautophagy. *J Innate Immun* **5**: 427-33, 10.1159/000351979 [doi].

Kostka, T, Draï, J, Berthouze, SE, Lacour, JR, Bonnefoy M (2000). Physical activity, aerobic capacity and selected markers of oxidative stress and the anti-oxidant defence system in healthy active elderly men. *Clin Physiol* **20**: 185-90.

Laurent, S (2012). Defining vascular aging and cardiovascular risk. *J Hypertens* **30 Suppl**: S3-8, 10.1097/HJH.0b013e328353e501 [doi].

Libby, P (2006). Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr* **83**: 456S-60S, 83/2/456S [pii].

Lira, VA, Okutsu, M, Zhang, M, Greene, NP, Laker, RC, Breen, DS, *et al.* (2013). Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance. *FASEB J* **27**: 4184-93, 10.1096/fj.13-228486 [doi].

López Chicharro, J., López Mojares, L. (2008). Fisiología Clínica del Ejercicio. In: Anonymous Madrid: Médica Panamericana.

Lopez-Otin, C, Blasco, MA, Partridge, L, Serrano, M & Kroemer, G (2013). The hallmarks of aging. *Cell* **153**: 1194-217, 10.1016/j.cell.2013.05.039 [doi].

Luo, L, Lu, AM, Wang, Y, Hong, A, Chen, Y, Hu, J, *et al.* (2013). Chronic resistance training activates autophagy and reduces apoptosis of muscle cells by modulating IGF-1 and its receptors, Akt/mTOR and Akt/FOXO3a signaling in aged rats. *Exp Gerontol* **48**: 427-36, 10.1016/j.exger.2013.02.009 [doi].

Machado, A, García-López, D, González-Gallego, J, Garatachea, N (2010). Whole-body vibration training increases muscle strength and mass in older women: a randomized-controlled trial. *Scand J Med Sci Sports* **20**: 200-207.

Majno, G, Joris, I (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* **146**: 3-15.

Marcus, R (2001). Role of exercise in preventing and treating osteoporosis. *Rheum Dis Clin North Am* **27**: 131,41, vi.

Marin, PJ, Rhea, MR (2010). Effects of vibration training on muscle strength: a meta-analysis. *J Strength Cond Res* **24**: 548-56, 10.1519/JSC.0b013e3181c09d22 [doi].

McFarlin, BK, Flynn, MG, Campbell, WW, Craig, BA, Robinson, JP, Stewart, LK, *et al.* (2006). Physical activity status, but not age, influences inflammatory biomarkers and toll-like receptor 4. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **61**: 388-93, 61/4/388 [pii].

Mikhael, M, Orr, R & Fiatarone Singh, MA (2010). The effect of whole body vibration exposure on muscle or bone morphology and function in older adults: a systematic review of the literature. *Maturitas* **66**: 150-7, 10.1016/j.maturitas.2010.01.013 [doi].

Moller, AB, Vendelbo, MH, Christensen, B, Clasen, BF, Bak, AM, Jorgensen, JO, *et al.* (2015). Physical exercise increases autophagic signaling through ULK1 in human skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)* **118**: 971-9, 10.1152/jappphysiol.01116.2014 [doi].

Moruno Manchón, J. (2013). Regulación de la degradación intracelular de proteínas por glucosa.

Murasko, DM, Jiang, J (2005). Response of aged mice to primary virus infections. *Immunol Rev* **205**: 285-96, IMR273 [pii].

Nakatogawa, H, Ichimura, Y & Ohsumi, Y (2007). Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* **130**: 165-78, S0092-8674(07)00658-7 [pii].

Nelson, ME, Rejeski, WJ, Blair, SN, Duncan, PW, Judge, JO, King, AC, *et al.* (2007). Physical activity and public health in older adults: recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med Sci Sports Exerc* **39**: 1435-45, 10.1249/mss.0b013e3180616aa2 [doi].

Nickel, T, Hanssen, H, Emslander, I, Drexel, V, Hertel, G, Schmidt-Trucksass, A, *et al.* (2011). Immunomodulatory effects of aerobic training in obesity. *Mediators Inflamm* **2011**: 308965, 10.1155/2011/308965 [doi].

Nigam, Y, Knight, J, Bhattacharya, S & Bayer, A (2012). Physiological changes associated with aging and immobility. *J Aging Res* **2012**: 468469, 10.1155/2012/468469 [doi].

Oberbach, A, Tonjes, A, Kloting, N, Fasshauer, M, Kratzsch, J, Busse, MW, Paschke, R, Stumvoll, M and Bluher, M (2006). Effect of a 4 week physical training program on plasma

concentrations of inflammatory markers in patients with abnormal glucose tolerance. *Eur J Endocrinol* **154**: 577-585.

Oliveira, AG, Carvalho, BM, Tobar, N, Ropelle, ER, Pauli, JR, Bagarolli, RA, *et al.* (2011). Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. *Diabetes* **60**: 784-96, 10.2337/db09-1907 [doi].

Orr, R (2015). The effect of whole body vibration exposure on balance and functional mobility in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Maturitas* **80**: 342-58, 10.1016/j.maturitas.2014.12.020 [doi].

Osawa, Y, Oguma, Y (2013). Effects of resistance training with whole-body vibration on muscle fitness in untrained adults. *Scand J Med Sci Sports* **23**: 84-95, 10.1111/j.1600-0838.2011.01352.x [doi].

Pagano, AF, Py, G, Bernardi, H, Candau, RB & Sanchez, AM (2014). Autophagy and protein turnover signaling in slow-twitch muscle during exercise. *Med Sci Sports Exerc* **46**: 1314-25, 10.1249/MSS.0000000000000237 [doi].

Pankiv, S, Clausen, TH, Lamark, T, Brech, A, Bruun, JA, Outzen, H, *et al.* (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* **282**: 24131-45, M702824200 [pii].

Papackova, Z, Cahova, M (2014). Important role of autophagy in regulation of metabolic processes in health, disease and aging. *Physiol Res* **63**: 409-20, 932684 [pii].

Pawelec, G, Koch, S, Franceschi, C & Wikby, A (2006). Human immunosenescence: does it have an infectious component? *Ann N Y Acad Sci* **1067**: 56-65, 1067/1/56 [pii].

Peng, C, Wang, X, Chen, J, Jiao, R, Wang, L, Li, YM, *et al.* (2014). Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *Biomed Res Int* **2014**: 831841, 10.1155/2014/831841 [doi].

Plociennikowska, A, Hromada-Judycka, A, Borzecka, K & Kwiatkowska, K (2015). Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci* **72**: 557-81, 10.1007/s00018-014-1762-5 [doi].

Prelog, M (2006). Aging of the immune system: a risk factor for autoimmunity? *Autoimmun Rev* **5**: 136-9, S1568-9972(05)00151-5 [pii].

Pyo, JO, Yoo, SM & Jung, YK (2013). The Interplay between Autophagy and Aging. *Diabetes Metab J* **37**: 333-9, 10.4093/dmj.2013.37.5.333 [doi].

Rauch, F, Sievanen, H, Boonen, S, Cardinale, M, Degens, H, Felsenberg, D, *et al.* (2010). Reporting whole-body vibration intervention studies: recommendations of the International Society of Musculoskeletal and Neuronal Interactions. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **10**: 193-8.

Reyna, SM, Tantiwong, P, Cersosimo, E, Defronzo, RA, Sriwijitkamol, A & Musi, N (2013). Short-term exercise training improves insulin sensitivity but does not inhibit inflammatory

pathways in immune cells from insulin-resistant subjects. *J Diabetes Res* **2013**: 107805, 10.1155/2013/107805 [doi].

Rittweger, J (2010). Vibration as an exercise modality: how it may work, and what its potential might be. *Eur J Appl Physiol* **108**: 877-904, 10.1007/s00421-009-1303-3 [doi].

Roberts, SB, Rosenberg, I (2006). Nutrition and aging: changes in the regulation of energy metabolism with aging. *Physiol Rev* **86**: 651-67, 86/2/651 [pii].

Rodriguez-Miguel, P, Fernandez-Gonzalo, R, Almar, M, Mejias, Y, Rivas, A, de Paz, JA, *et al.* (2014). Role of Toll-like receptor 2 and 4 signaling pathways on the inflammatory response to resistance training in elderly subjects. *Age (Dordr)* **36**: 9734,014-9734-0. Epub 2014 Nov 27, 10.1007/s11357-014-9734-0 [doi].

Rodriguez-Miguel, P, Fernandez-Gonzalo, R, Collado, PS, Almar, M, Martinez-Florez, S, de Paz, JA, *et al.* (2015). Whole-body vibration improves the anti-inflammatory status in elderly subjects through toll-like receptor 2 and 4 signaling pathways. *Mech Ageing Dev* **150**: 12-9, 10.1016/j.mad.2015.08.002 [doi].

Sallis, R, Franklin, B, Joy, L, Ross, R, Sabgir, D & Stone, J (2015). Strategies for promoting physical activity in clinical practice. *Prog Cardiovasc Dis* **57**: 375-86, 10.1016/j.pcad.2014.10.003 [doi].

Sanchez, AM, Bernardi, H, Py, G & Candau, RB (2014). Autophagy is essential to support skeletal muscle plasticity in response to endurance exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **307**: R956-69, 10.1152/ajpregu.00187.2014 [doi].

Santoro, N (2005). The menopausal transition. *Am J Med* **118 Suppl 12B**: 8-13, S0002-9343(05)00803-X [pii].

Schiavi, A, Ventura, N (2014). The interplay between mitochondria and autophagy and its role in the aging process. *Exp Gerontol* **56**: 147-53, 10.1016/j.exger.2014.02.015 [doi].

Schwalm, C, Jamart, C, Benoit, N, Naslain, D, Premont, C, Prevet, J, *et al.* (2015). Activation of autophagy in human skeletal muscle is dependent on exercise intensity and AMPK activation. *FASEB J* **29**: 3515-26, 10.1096/fj.14-267187 [doi].

Sebastian, C, Espia, M, Serra, M, Celada, A & Lloberas, J (2005). MacrophAging: a cellular and molecular review. *Immunobiology* **210**: 121-6, S0171-2985(05)00078-1 [pii].

Simpson, RJ, Lowder, TW, Spielmann, G, Bigley, AB, LaVoy, EC & Kunz, H (2012). Exercise and the aging immune system. *Ageing Res Rev* **11**: 404-20, 10.1016/j.arr.2012.03.003 [doi].

Siomek, A (2012). NF-kappaB signaling pathway and free radical impact. *Acta Biochim Pol* **59**: 323-31, 2012_284 [pii].

Slade, JM, Miszko, TA, Laity, JH, Agrawal, SK & Cress, ME (2002). Anaerobic power and physical function in strength-trained and non-strength-trained older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **57**: M168-72.

Stewart, LK, Flynn, MG, Campbell, WW, Craig, BA, Robinson, JP, McFarlin, BK, Timmerman, KL, Coen, PM, Felker, J and Talbert, E (2005). Influence of exercise training and age on CD14+ cell-surface expression of toll-like receptor 2 and 4. *Brain Behav Immun* **19**: 389- 397.

Strasser, B (2013). Physical activity in obesity and metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* **1281**: 141-59, 10.1111/j.1749-6632.2012.06785.x [doi].

Strasser, B, Arvandi, M & Siebert, U (2012). Resistance training, visceral obesity and inflammatory response: a review of the evidence. *Obes Rev* **13**: 578-91, 10.1111/j.1467-789X.2012.00988.x [doi].

Strasser, B, Steindorf, K, Wiskemann, J & Ulrich, CM (2013). Impact of resistance training in cancer survivors: a meta-analysis. *Med Sci Sports Exerc* **45**: 2080-90, 10.1249/MSS.0b013e31829a3b63 [doi].

Svihálková, L. & Vasíček, O. (2012). Metodiky Detekce A Zobrazování Odpovědi Buněk Na Struktury Asociované S Patogeny. 2015.

Syed, FA, Ng, AC (2010). The pathophysiology of the aging skeleton. *Curr Osteoporos Rep* **8**: 235-40, 10.1007/s11914-010-0035-y [doi].

Takeda, K, Akira, S (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**: 1-14, 17/1/1 [pii].

Takeuchi, O, Akira, S (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**: 805-20, 10.1016/j.cell.2010.01.022 [doi].

Tam, BT, Pei, XM, Yu, AP, Sin, TK, Leung, KK, Au, KK, *et al.* (2015). Autophagic adaptation is associated with exercise-induced fibre-type shifting in skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)* **214**: 221-36, 10.1111/apha.12503 [doi].

Tan, CC, Yu, JT, Tan, MS, Jiang, T, Zhu, XC & Tan, L (2014). Autophagy in aging and neurodegenerative diseases: implications for pathogenesis and therapy. *Neurobiol Aging* **35**: 941-57, 10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.019 [doi].

Tsuji, T, Kitano, N, Tsunoda, K, Himori, E, Okura, T & Tanaka, K (2014). Short-term effects of whole-body vibration on functional mobility and flexibility in healthy, older adults: a randomized crossover study. *J Geriatr Phys Ther* **37**: 58-64, 10.1519/JPT.0b013e318295dacd [doi].

Vainshtein, A, Grumati, P, Sandri, M & Bonaldo, P (2014). Skeletal muscle, autophagy, and physical activity: the menage a trois of metabolic regulation in health and disease. *J Mol Med (Berl)* **92**: 127-37, 10.1007/s00109-013-1096-z [doi].

Walczak, M, Martens, S (2013). Dissecting the role of the Atg12-Atg5-Atg16 complex during autophagosome formation. *Autophagy* **9**: 424-5, 10.4161/auto.22931 [doi].

Warburton, DE, Gledhill, N, Jamnik, VK, Bredin, SS, McKenzie, DC, Stone, J, *et al.* (2011). Evidence-based risk assessment and recommendations for physical activity clearance:

Consensus Document 2011. *Appl Physiol Nutr Metab* **36 Suppl 1**: S266-98, 10.1139/h11-062 [doi].

Weng, TP, Huang, SC, Chuang, YF & Wang, JS (2013). Effects of interval and continuous exercise training on CD4 lymphocyte apoptotic and autophagic responses to hypoxic stress in sedentary men. *PLoS One* **8**: e80248, 10.1371/journal.pone.0080248 [doi].

Wohlgemuth, SE, Lees, HA, Marzetti, E, Manini, TM, Aranda, JM, Daniels, MJ, *et al.* (2011). An exploratory analysis of the effects of a weight loss plus exercise program on cellular quality control mechanisms in older overweight women. *Rejuvenation Res* **14**: 315-24, 10.1089/rej.2010.1132 [doi].

Wohlgemuth, SE, Seo, AY, Marzetti, E, Lees, HA & Leeuwenburgh, C (2010). Skeletal muscle autophagy and apoptosis during aging: effects of calorie restriction and life-long exercise. *Exp Gerontol* **45**: 138-48, 10.1016/j.exger.2009.11.002 [doi].

World Medical Association General Assembly (2001). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects (revised October 7, 2000). *HIV Clin Trials* **2**: 92-5, 10.1310/GTFR-2DRX-M6YE-ELXR [doi].

Zbinden-Foncea, H, Raymackers, JM, Deldicque, L, Renard, P & Francaux, M (2012). TLR2 and TLR4 activate p38 MAPK and JNK during endurance exercise in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* **44**: 1463-72, 10.1249/MSS.0b013e31824e0d5d [doi].

Zhang, J (2015). Teaching the basics of autophagy and mitophagy to redox biologists--mechanisms and experimental approaches. *Redox Biol* **4**: 242-59, 10.1016/j.redox.2015.01.003 [doi].

Zhao, J, Brault, JJ, Schild, A, Cao, P, Sandri, M, Schiaffino, S, *et al.* (2007). FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab* **6**: 472-83, S1550-4131(07)00339-7 [pii].