



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**EFEECTO DEL EJERCICIO DE
VIBRACIÓN SOBRE LAS FUNCIONES
MITOCONDRIALES IMPLICADAS EN
EL ENVEJECIMIENTO**

**EFFECT OF VIBRATION EXERCISE ON
MITOCHONDRIAL FUNCTIONS
INVOLVED IN AGING**

Autor: Alex González Duque

Tutor: María José Cuevas González y Brisamar

Estébanez González

GRADO EN BIOLOGÍA

Julio, 2022

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Envejecimiento	1
1.2 Funciones mitocondriales	2
1.2.1 Biogénesis y dinámica mitocondrial	3
1.2.2 Mecanismos de mitofagia	4
1.2.3 Alteraciones de las funciones mitocondriales con el envejecimiento	6
1.3 Ejercicio físico	7
1.3.1 Ejercicio y envejecimiento	7
1.3.2. Ejercicio y procesos celulares	8
2. Objetivos	10
3. Materiales y métodos	10
3.1. Diseño experimental y protocolo de entrenamiento	10
3.2. Obtención de muestras sanguíneas y aislamiento de las PBMC	11
3.3. Cuantificación proteica	12
3.4. Western blot	13
3.5. Análisis estadístico	14
4. Resultados	14
4.1. Efectos del entrenamiento de vibración de cuerpo completo sobre la biogénesis y la dinámica mitocondrial en las PBMC de ancianos	15
4.2. Efectos del entrenamiento de vibración de cuerpo completo sobre la mitofagia en las PBMC de ancianos	16
5. Discusión	17
6. Conclusiones	21
7. Limitaciones	22
8. Referencias	23

Resumen

El envejecimiento es un proceso inevitable y natural que se caracteriza por un declive progresivo tanto mentalmente como físicamente. En este proceso natural ocurre el deterioro de numerosas funciones mitocondriales. Sin embargo, para hacer frente al envejecimiento se ha propuesto el ejercicio físico como una medicina de bajo coste. El objetivo del presente estudio se basó en evaluar la capacidad de un programa de entrenamiento de vibración para mejorar las funciones mitocondriales y evitar los problemas producidos por el envejecimiento en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de ancianos. En el estudio participaron 59 ancianos sanos de entre 65 y 87 años. Los participantes fueron distribuidos aleatoriamente entre el grupo control (n = 4), el cual continuó con sus rutinas diarias, y el grupo entrenado (n = 8), donde los ancianos completaron 16 sesiones de entrenamiento de vibración cuerpo completo a lo largo de 8 semanas. Además, se extrajeron muestras de sangre antes y después del periodo de entrenamiento. Se analizó la expresión proteica mediante *Western blot* de las proteínas Mfn1 relacionada con la dinámica mitocondrial, PGC-1 α clave en la biogénesis y PINK1, Parkin, VDAC1, Bnip3 relacionadas con la mitofagia. Se observó un aumento significativamente después del entrenamiento en Mfn1, PGC-1 α y Parkin. Además, Mfn1 y VDAC1 presentan un aumento significativo en los individuos entrenados del grupo entrenado frente a los del grupo control. Estos resultados evidencian la capacidad inductora del ejercicio físico para evitar la disfunción mitocondrial y hacer frente al envejecimiento.

Palabras clave: ancianos, ejercicio físico, envejecimiento, disfunción mitocondrial, funciones mitocondriales, PBMC.

Abstract

Aging is an inevitable and natural process characterized by a progressive decline both mentally and physically. In this natural process, the deterioration of numerous mitochondrial functions occurs. However, to deal with aging, physical exercise has been proposed as a low-cost medicine. The objective of the present study was based on evaluating the capacity of a vibration training program to improve mitochondrial functions and prevent problems caused by aging in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of the elderly. The study involved 59 healthy elderly between 65 and 87 years. Participants were randomly distributed between the control group (n = 4), which continued with their daily routines, and the disorder group (n = 8), where the elderly completed 16 sessions of whole-body vibration training over time. of 8 weeks. In addition, blood samples were drawn before and after the training period. Protein expression was analyzed by *Western blot* of the proteins Mfn1 related to mitochondrial dynamics, PGC-1 α key in biogenesis and PINK1, Parkin, VDAC1, Bnip3 related to mitophagy. A significant increase after training in Mfn1, PGC-1 α and Parkin was observed. In addition, Mfn1 and VDAC1 show a significant increase in disorders in the disorder group compared to those in the control group. These results show the inducing capacity of physical exercise to prevent mitochondrial dysfunction and deal with aging.

Keywords: elderly, physical exercise, aging, mitochondrial dysfunction, mitochondrial functions, PBMCs.

1. Introducción

El envejecimiento es un proceso natural e inevitable caracterizado por un declive progresivo de los individuos tanto física como mentalmente (Moreira *et al.*, 2017). En este proceso de envejecimiento se ven afectadas las mitocondrias, alterándose las funciones mitocondriales y la mitofagia, una forma selectiva de autofagia. Como consecuencia se ocasionan enfermedades en los individuos. Por otro lado, el ejercicio físico podría tener un impacto positivo sobre el envejecimiento. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la actividad física es cualquier movimiento corporal producido por los músculos esqueléticos, con el consiguiente consumo de energía. No obstante, la actividad física y el ejercicio físico no significan lo mismo, ya que este último pertenece a una subcategoría de actividad física que está estructurada, es repetitiva y tiene como objetivo mejorar o mantener uno o más componentes del estado físico (OMS, 2020).

1.1 Envejecimiento

En las últimas décadas, la población mundial ha elevado considerablemente la esperanza de vida, de manera que ha incrementado drásticamente la población mayor de 60 años, según el Informe Mundial sobre el Envejecimiento y la Salud de la Organización Mundial de la Salud del 2015 (OMS, 2015). De hecho, se estima que para el año 2050, en los países occidentales como Europa y en EE.UU., la población mayor de 60 años representará un 40% de su población (Booth *et al.*, 2012). Actualmente, en España la población mayor de 65 años representa el 19,77% (Instituto Nacional de Estadística, INE, 2021). Esta situación supone un problema adicional cuando va acompañada de enfermedades asociadas al envejecimiento como cáncer, Alzheimer, ictus, etc., las cuales generan un gran gasto económico para hacerles frente (Arora, 2015).

A pesar de los muchos estudios realizados, no es posible establecer las causas del envejecimiento en base a una única teoría. Entre todas las teorías propuestas hasta el momento destacan las siguientes: 1/ teoría mitocondrial, 2/ teoría de la mutación o inestabilidad genómica, 3/ teoría del estrés oxidativo o de los radicales libres, 4/ teoría de la diferenciación o epigenética, 5/ teoría de la catástrofe de errores, también conocida como error primario de Orgel o acumulación de errores en el ADN genómico, 6/ teoría de la proteína dañada, y 7/ teoría de la hiperfunción o de reducción de la actividad de la diana de rapamicina (TOR) (Mori y Mook-jung, 2015). No obstante, el paradigma de los cuatro niveles del envejecimiento ha ganado

fuerza en el mundo científico recientemente. Este paradigma plantea el envejecimiento sobre la base de cuatro niveles interconectados, de manera que su alteración da lugar al fenotipo de envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad. Estos cuatro niveles van de lo microscópico a lo macroscópico como sigue: 1/ el fallo en el mantenimiento de las biomoléculas, 2/ la alteración de la función celular, debido a la aparición con la edad de cuatro procesos alterados: incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), aumento del número de células senescentes, pérdida de la capacidad de respuesta del retículo endoplásmico (ER) a proteínas mal plegadas (UPRer) y reducción de la capacidad de degradar moléculas específicas en los sistemas autofagolisosoma y ubiquitina-proteasoma, 3/ disfunción de los sistemas involucrados en la regulación de la fisiología del cuerpo, los sistemas metabólico, inmune y endocrino, y 4/ el deterioro físico general del organismo (Zhang *et al.*, 2015).

Además, cabe mencionar que el envejecimiento afecta a las células T, por la pérdida de la regulación inmune, como resultado de la involución tímica, lo que genera que las células T sean menos funcionales (responde a la agresión con una disminución de su eficacia) y flexibles, generando enfermedades inflamatorias autoinmunes y crónicas (Booth *et al.*, 2012). Por otro lado, los mecanismos que dan lugar al envejecimiento, como bien pueden ser daños, estrés metabólico, muerte celular necrótica o la alteración en la proteostasis favorecen la manifestación de la inflamación crónica (Wu *et al.*, 2015). Esta inflamación, a su vez es la causante de la pérdida de la función biológica que tiene lugar en bastantes órganos a medida que envejecemos (Youm *et al.*, 2013).

Por último, la inmunosenescencia presenta varias manifestaciones fisiológicas, como son la reducción de la función y número de las células troncales hematopoyéticas, de las células T *naïve* circulantes y el aumento de frecuencia de las células de memoria CD28, estas últimas presentan una capacidad de proliferación limitada (Zhang *et al.*, 2016). El sistema inmune adaptativo experimenta estos síntomas y activa el sistema inmune innato, que promueve un estado tisular proinflamatorio de bajo grado, denominado *inflammaging* (Booth *et al.*, 2012).

1.2 Funciones mitocondriales

Las mitocondrias son orgánulos que presentan una membrana doble y se encuentran estrechamente relacionadas con la homeostasis celular. Además, estas derivan de la transformación de las alpha-proteobacterias, que se integraron en una célula huésped relacionada con Asgard Archaea mediante una endosimbiosis (Roger *et al.*, 2017). La gran

importancia de las mitocondrias radica en la gran cantidad de ATP celular que forman, por eso son consideradas como las centrales energéticas de la célula. No obstante, también participan en el metabolismo del calcio y en la formación de ROS intracelulares, actúan en diferentes tejidos como importantes orgánulos de señalización y presentan una gran implicación en el inicio de la apoptosis (Sanz, 2016). Además, la mitofagia sería un mecanismo de control, para la eliminación de mitocondrias aberrantes. Por otro lado, el tamaño y el número de mitocondrias varía según el estado de diferenciación, las necesidades metabólicas y las diferentes condiciones fisiológicas de la célula (Novak, 2012). Sin embargo, la edad también afecta negativamente a las mitocondrias, ya que disminuye tanto la actividad de las funciones mitocondriales (la dinámica mitocondrial, biogénesis y mitofagia) como el número de mitocondrias, generando alteraciones en la morfología de las mitocondrias (Yen *et al.*, 1989; Shigenaga *et al.*, 1994).

1.2.1 Biogénesis y dinámica mitocondrial

Las mitocondrias son capaces de modular su morfología para crear una red tubular coordinada por eventos de fisión y fusión. Así, el equilibrio entre estos dos procesos regula el número, tamaño y posicionamiento de las mitocondrias dentro del citoplasma y se le denomina dinámica mitocondrial (Liesa *et al.*, 2009). La fusión mitocondrial es el proceso por el cual dos mitocondrias se unen para dar lugar a una mitocondria. Sin embargo, la fisión mitocondrial es el proceso contrario, ya que se basa en la división de una mitocondria para dar lugar a dos (Tilokani *et al.*, 2018). El mantenimiento del equilibrio entre estos dos procesos es necesario para garantizar la función mitocondrial y responder a las necesidades celulares, mediante la adaptación de la red al estado metabólico de la célula y a la disponibilidad de nutrientes (Wai y Langer, 2016). Sin embargo, como se observa en la figura 1, los procesos de fusión actúan en la membrana mitocondrial externa (OMM, del inglés *outer mitochondrial membrane*), mediados por mitofusina 1 (Mfn1) y mitofusina 2 (Mfn2), e interna (IMM, del inglés *inner mitochondrial membrane*), mediados por la proteína de la atrofia óptica 1 (OPA1).

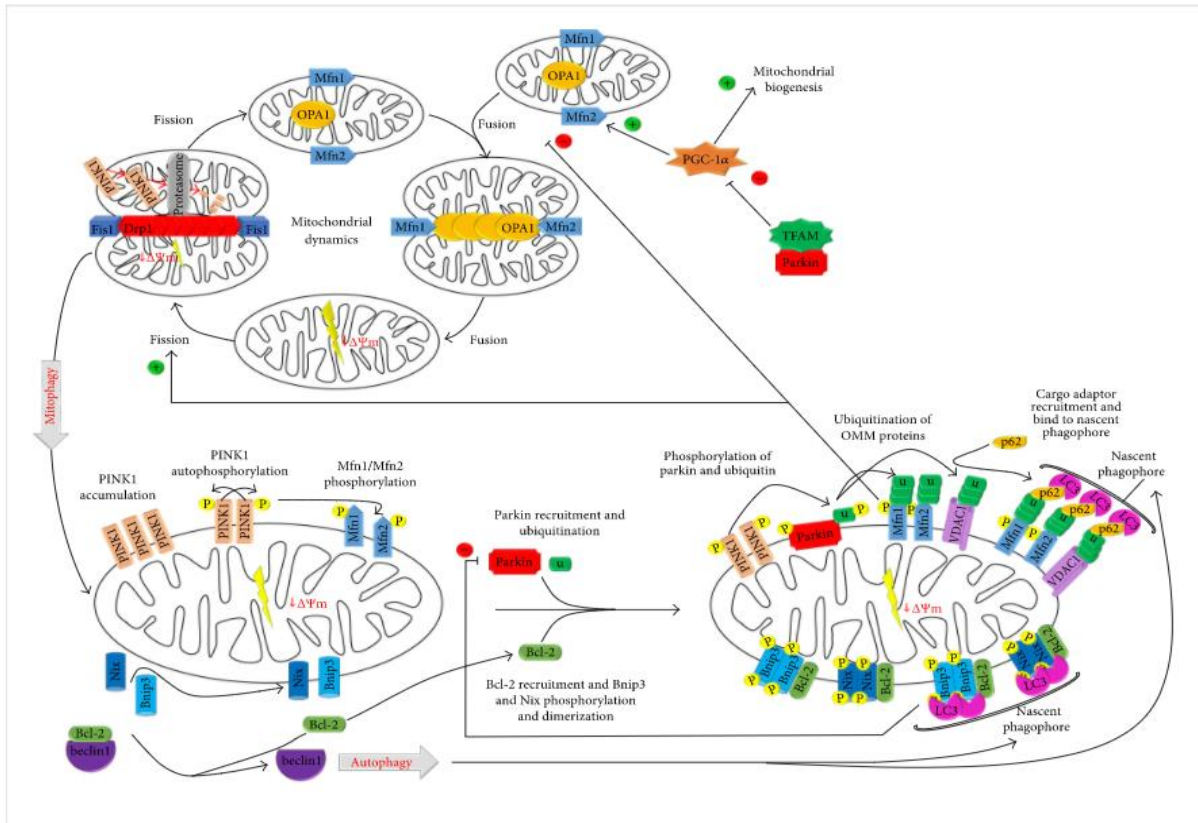


Figura 1. Función de las proteínas: OPA1, Mfn1, Mfn2, Drp1, Fis1, PGC-1 α , PINK1, Nix, Bnip3, TFAM, Bcl-2, beclin1, LC3 y VDAC1 en la biogénesis mitocondrial, dinámica y mitofagia. Tomada de Moreira *et al.*, 2021.

Por otro lado, la biogénesis es el proceso por el cual se aumenta el número de mitocondrias, influenciado por condiciones fisiológicas cambiantes y energéticas. Más concretamente, la biogénesis es dependiente de la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, la presencia o ausencia de ciertas hormonas, el ejercicio, el estrés, la hipoxia y el envejecimiento (López-Lluch *et al.*, 2008). Las mitocondrias regulan su biogénesis, es decir es la regulación coordinada entre la expresión génica nuclear, la importación de proteínas y la transcripción del ADN mitocondrial (ADNmt), y participan en varios comportamientos dinámicos, como son la biogénesis y la dinámica mitocondrial, para mantener un estado saludable (Carter *et al.*, 2015). No obstante, atendiendo a la figura 1, la mitofagia se puede inhibir mediante la biogénesis mitocondrial, así como por la activación del proceso de fusión mediado por el coactivador gamma del receptor activado por el proliferador de peroxisomas 1-alfa (PGC-1 α), que estimula la expresión de Mfn2. A su vez, la biogénesis mitocondrial se puede inhibir mediante mitofagia mediada por la asociación de la proteína Parkin con el factor A de transcripción mitocondrial (TFAM) inhibiendo a PGC-1 α (Moreira *et al.*, 2017).

1.2.2 Mecanismos de mitofagia

La autofagia es un mecanismo catabólico, el cual degrada los componentes celulares y moleculares dañados mediante la formación de una estructura de doble membrana, el

autofagosoma, que a su vez se fusiona con el lisosoma y forma el autofagolisosoma, rodeando las estructuras que serán degradadas (Moreira *et al.*, 2017). Además, encontramos tres tipos de autofagia: 1/ autofagia mediada por chaperonas, 2/ microautofagia y 3/ macroautofagia, en este último se centra el trabajo, debido a que es el principal sistema de degradación de orgánulos intracelulares. La macroautofagia se induce por hipoxia, deficiencia de nutrientes y estrés oxidativo (Bednarczyk *et al.*, 2018). Por otro lado, la autofagia se clasifica según el orgánulo sobre el que actúe, por lo que en el caso de la mitocondria se denomina mitofagia (Schiavi y Ventura, 2014).

Atendiendo a la eliminación de mitocondrias disfuncionales y sus procesos, la mitofagia se puede diferenciar en dos vías principales: la mitofagia inducida por daños y la mitofagia inducida por el desarrollo (Novak, 2012). La mitofagia inducida por daños, es la encargada de la eliminación de las mitocondrias dañadas o defectuosas. La proteína quinasa 1 inducida por PTEN (PINK1) actúa de diferente manera dependiendo del estado de polarización de la mitocondria. Así si la mitocondria está polarizada, PINK1 es transportada a IMM y se degrada por el proteasoma. Sin embargo, si está despolarizada, PINK1 se acumula en la OMM, donde fosforila Mfn1 y Mfn2 y recluta a la proteína ligasa de ubiquitina E3 (Parkin) del citosol, generando la fosforilación de la ubiquitina y del dominio de Parkin similar a la ubiquitina. Parkin a su vez ubiquitina a proteínas OMM, como a la proteína del canal 1 selectivo de aniones dependiente de voltaje (VDAC1) generando el reclutamiento del adaptador de carga de autofagia p62/SQSTM1. Este receptor se une a la cadena ligera 3 (LC3) que se encuentra en el fagóforo naciente generando la degradación de las mitocondrias por los autofagolisosomas (Ding y Yin, 2012; Cuervo y Macian, 2014; Schiavi y Ventura, 2014; Springer y Macleod, 2016; Moreira *et al.*, 2017).

Por otro lado, la mitofagia inducida por el desarrollo se encarga de eliminar el exceso de mitocondrias (Novak, 2012). En esta vía participan la proteína X similar a Nip3 (Nix) y la proteína 3 que interactúa con Bcl-2 (Bnip3). Esta última proteína es capaz de realizar la mitofagia por diferentes mecanismos: apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP), despolarización mitocondrial e interferencia en la maquinaria de fisión-fusión (Gottlieb y Carreira, 2010). Por otro lado, Nix es necesaria para la mitofagia programada durante la maduración de los reticulocitos. En este caso el contenido de la vacuola autofágica no se recicla, por lo que es eliminado por exocitosis. Este proceso de mitofagia se lleva a cabo por la interacción de Nix con LC3, generando la asociación de LC3 con la proteína asociada al receptor de ácido gamma-aminobutírico (GABARAP) formando el complejo LC3/GABARAP.

La formación del complejo media la movilización del autofagosoma a las mitocondrias para su eliminación (Gomes y Scorrano, 2013; Hamacher-Brady y Brady, 2016). Además, Nix es capaz de interactuar con beclin1/Bcl-2 generando la liberación de beclin1 que inducirá la mitofagia. Por otro lado, el enlace LC3 es el desencadenante de la autofagia mitocondrial mediante la unión de Bnip3 y Nix a las proteínas de la familia del linfoma B2 (Bcl-2), generando la rotura de la interacción de la proteína codificada por el gen BECN1 (beclin1) y Bcl-2, liberando a beclin1 que induce la autofagia. No obstante, la fosforilación de Bnip3 y Nix generan homodímeros, que se integran en OMM y se unen a LC3 desencadenando también autofagia. El conjunto de los procesos es el que permite mantener a las mitocondrias en un estado óptimo de salud (Moreira *et al.*, 2017).

Como se indica en la figura 1, el inicio de la mitofagia se puede regular por la maquinaria responsable de la dinámica mitocondrial. De esta manera, los procesos de fusión, mediados por Mfn1, Mfn2 y OPA, inhiben la mitofagia, mientras que los procesos de fisión, mediados por la proteína 1 relacionada con la dinámica GTPasa (Drp1) y que dan lugar a mitocondrias polarizadas y despolarizadas, promueven la mitofagia (Hamacher-Brady y Brady, 2016).

1.2.3 Alteraciones de las funciones mitocondriales con el envejecimiento

El envejecimiento afecta al funcionamiento de la autofagia en órganos y tejidos (Cuervo y Macian, 2014), ya que se dificulta la eliminación de las mitocondrias dañadas o disfuncionales, debido a la alteración de la biogénesis mitocondrial y una disminución de proteínas encargadas de estos procesos como beclin1, generando una acumulación progresiva de mitocondrias (Palikaras *et al.*, 2015; Moreira *et al.*, 2017). Además, se ve afectado también por la edad la homeostasis mitocondrial (Palikaras y Tavernarakis, 2012) y el potencial de membrana, ocasionando la apertura de poros en la membrana mitocondrial que desembocan en una despolarización de las mitocondrias (Elmore *et al.*, 2001; Parihar y Brewer, 2007). Asimismo, estos procesos desembocan en un deterioro de la función celular (Palikaras *et al.*, 2015). Por lo cual, la edad ocasiona el deterioro de las funciones mitocondriales y la disminución de la actividad mitofágica (Moreira *et al.*, 2017), por los procesos explicados anteriormente. Múltiples estudios han demostrado que el envejecimiento puede ser promovido por el deterioro de la función mitocondrial (Schrepfer y Scorrano, 2016; Kauppila *et al.*, 2017). Además, el envejecimiento también está asociado a la disminución del rendimiento mitocondrial, por el papel que desempeñan las mitocondrias en la función celular y en el metabolismo. Por todo ello, se formuló la teoría del estrés oxidativo, basada en las ROS mitocondriales (mtROS), las cuales al acumularse favorecen el envejecimiento mediante el

daño oxidativo (Hekimi *et al.*, 2016). Además, el control de las proteínas es un proceso clave ya que con la edad aumentan el número de proteínas mal plegadas y desplegadas. En respuesta a esta situación se activa una respuesta transcripcional conocida como respuesta proteica desplegada mitocondrial (mtUPR) para promover la supervivencia celular (Jensen y Jasper, 2014). No obstante, si la célula no es capaz de mantener el potencial de la membrana mitocondrial por la respuesta mtURP, esta se despolariza y se elimina por mitofagia. Por último, la densidad mitocondrial y la capacidad funcional mitocondrial disminuyen con la edad (Conley *et al.*, 2000; Johannsen *et al.*, 2012; Larsen *et al.*, 2012). Sin embargo, estas disminuciones no están claro si son una consecuencia directa del envejecimiento o pueden ser debidas a la inactividad física, ya que diversas proteínas aumentan su expresión y la función mitocondrial cuando se ha sometido a los individuos a entrenamiento (Moreira *et al.*, 2017).

1.3 Ejercicio físico

Se ha demostrado que el ejercicio o la actividad física realizada con regularidad provoca beneficios para la salud (Teixeira *et al.*, 2012). La actividad física es considerada como una medicina de bajo coste de prevención primaria y secundaria contra muchas enfermedades como la diabetes tipo 2, enfermedades mentales o enfermedades cardiovasculares (Morgan *et al.*, 2016). No obstante, se calcula que al año hay 5,3 millones de muertes en el mundo debido a la inactividad física (Dunlop *et al.*, 2015), debido a que la mayor parte de la población adulta carece de la motivación para realizar los 150 minutos/semana de ejercicio necesario para presentar una buena salud (Teixeira *et al.*, 2012).

Hoy en día el ejercicio de vibración de cuerpo completo ha ganado especial atención por su seguridad y la capacidad que presenta para combatir diversos deterioros asociados con la edad (Mikhael *et al.*, 2010). La vibración es definida como cualquier movimiento que se repite después de un periodo dado de tiempo (Cochrane, 2011). En la mayoría de los casos se practica de pie en plataformas oscilantes. Asimismo, la energía se puede generar por tres formas: transmisión electromagnética, transmisión mecánica y masa-resorte oscilante, esta última que produce oscilaciones sinusoidales periódicas, donde la energía se transfiere de la máquina vibratoria al cuerpo humano es la más usada en las plataformas de vibración (Rittweger, 2010).

1.3.1 Ejercicio y envejecimiento

Se ha comprobado que la realización de la actividad física varía en función de diversos factores, como son la edad, el sexo, la motivación, los ingresos, así como por el entorno físico

y social (Bauman *et al.*, 2012). Por ejemplo, se ha puesto de manifiesto que las mujeres son menos activas que los hombres y que los jóvenes realizan más actividad que los adultos mayores. Sin embargo, en los países que presentan ingresos mayores entre la población, aunque ha disminuido la actividad física durante el trabajo, se ha aumentado en forma de ocio (Hallal *et al.*, 2012).

Con el aumento de la esperanza de vida también se incrementan los trastornos crónicos relacionados con el envejecimiento. No obstante, se ha demostrado que el ejercicio físico mejora la calidad de vida durante la vejez, debido a que las adaptaciones producidas por el ejercicio son opuestas a las ocasionadas por la edad. Como indica el informe del Comité Asesor de las Directrices de Actividad Física del departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., las personas que se muestran físicamente activas presentan una mejor forma muscular y cardiorrespiratoria. Además, atendiendo a diversos biomarcadores responsables de prevenir enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2, en general presentan un mejor estado de salud ("*Physical Activity Guidelines Advisory Committee*", 2008) entendiendo como salud el estado completo de bienestar físico, social y mental (Coppelstone, 1991).

Se ha comprobado que la realización de actividades físicas se ve reducida con la edad (Sparling *et al.*, 2015). No obstante, existe variación entre los rangos de edades y las regiones. Por ejemplo, las personas mayores de 60 años de Asia son más activas que los jóvenes de 15 a 29 años de Europa, América, el Mediterráneo Oriental y el Pacífico Occidental (Hallal *et al.*, 2012). En general, las personas mayores gastan de media dos tercios de su vida, en estado de vigilia, de manera sedentaria (Dunlop *et al.*, 2015). Además, un 30% de ellos presentan un sedentarismo completo (Allen y Morelli, 2011). El sedentarismo acarrea importantes problemas a la salud, ya que se estima que aumentan aproximadamente en un 50% las probabilidades de discapacidad por cada hora de sedentarismo adicional al día (Dunlop *et al.*, 2015).

Por todo ello, la realización de programas de actividad física, tanto intensa como moderada, se ha propuesto como una medida de bajo coste para mejorar la salud y reducir la discapacidad en personas mayores (Dunlop *et al.*, 2015).

1.3.2. Ejercicio y procesos celulares

El ejercicio físico presenta efectos antiinflamatorios. Por lo tanto, genera protección frente al desarrollo de enfermedades crónicas. Los efectos antiinflamatorios pueden ocasionarse por tres posibles mecanismos: 1/ disminución de la expresión de receptores, como pueden ser los de tipo Toll (TLR) en macrófagos y monocitos o receptores de dominio de oligomerización

de nucleótidos NLR (nod), 2/ disminución de la grasa visceral y 3/ liberación de citoquinas antiinflamatorias procedentes del músculo esquelético en contracción (Gleeson *et al.*, 2011).

Por otro lado, el ejercicio aumenta la actividad autofágica mediante diversos mecanismos: estrés energético, daño proteico y/o mitocondrial, altas concentraciones de ROS, presencia de algunas citoquinas, respiración mitocondrial elevada y algunos elementos de la respuesta inmune (Tam *et al.*, 2015; Vainshtein y Hood, 2016; Escobar *et al.*, 2019). No obstante, en el caso de las mitocondrias tiene lugar la mitofagia, que también es inducida con el ejercicio como se muestra en la siguiente figura 2 y, al eliminar las regiones alteradas, a largo plazo el entrenamiento físico mejora la calidad de las mitocondrias (Guan *et al.*, 2019). Además, la actividad física regular es beneficiosa para la salud y también es un inductor de la mitofagia *in vivo* (Schiavi y Ventura, 2014).

Como se muestra en la figura 2, la inactividad física o el sedentarismo da lugar a mitocondrias disfuncionales o dañadas. Sin embargo, cuando se somete a los individuos a programas de entrenamiento se comprueba que las mitocondrias presentan un estado saludable. No obstante, si los individuos son sometidos a programas de actividad y recuperación las mitocondrias presentan un estado estresado. El estado estresado de las mitocondrias comienza con la formación de AMPK inducido por el ejercicio, generando a su vez ULK1 que activa el fagóforo en las mitocondrias dañadas o disfuncionales. Posteriormente, se une el fagóforo a los lisosomas formando un autofagolisosoma que degrada a las mitocondrias defectuosas, obteniendo las mitocondrias con un estado estresado.

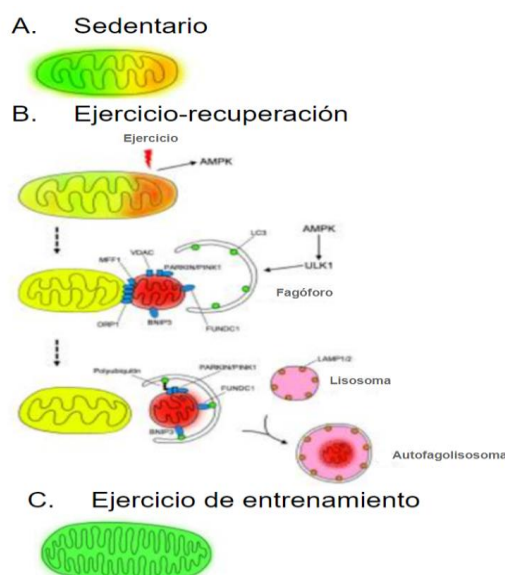


Figura 2. Esquema que representa la mitofagia inducida por el ejercicio y la importancia de esta en el control de

calidad mitocondrial mediante el ejercicio físico. El color verde representa mitocondrias saludables, el amarillo estresadas y el rojo disfuncionales y/o dañadas. Tomada de Guan *et al.*, 2019.

Por último, cabe destacar que la apoptosis está estrechamente relacionada con la autofagia y ambos procesos se autorregulan, tanto es así que la autofagia puede promover la muerte celular, o puede llegar a ser un mecanismo de muerte celular (Gump y Thorburn, 2011). La alteración de la autofagia estimula la apoptosis y la inflamación, estos procesos se ven agudizados con la edad por los fallos en las funciones específicas de las células y tejidos, como pueden ser la activación de la respuesta inflamatoria, la acumulación de mitocondrias disfuncionales o el estrés oxidativo (Gonzalez-Freire *et al.*, 2015).

2. Objetivos

El envejecimiento lleva asociadas numerosas enfermedades crónicas. Este hecho, unido al aumento del número de personas de edad avanzada y de la esperanza de vida, se ha convertido en un problema para la salud pública. Por ello, el principal objetivo del trabajo se basó en estudiar el efecto del ejercicio físico de vibración de cuerpo completo sobre los mecanismos moleculares involucrados en la biología mitocondrial, más concretamente sobre la mitofagia, dinámica mitocondrial y biogénesis, debido a que el ejercicio físico puede ser una medicina de bajo costo frente al envejecimiento.

Principalmente, el trabajo se centra en el estudio de los beneficios que puede generar el ejercicio físico en las funciones mitocondriales y la mitofagia, en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de ancianos.

3. Materiales y métodos

3.1. Diseño experimental y protocolo de entrenamiento

El estudio tuvo una duración de 10 semanas, correspondiendo la primera y última semanas a la toma de datos y recogida de muestras y las ocho intermedias al periodo de entrenamiento. En el estudio participaron 12 ancianos sanos de entre 65 y 87 años. Los criterios de inclusión se basaron en la ausencia de ingestión de medicación hormonal o antiinflamatorios durante el mes anterior al estudio, así como no presentar contraindicaciones médicas para realizar ejercicio, la ausencia de enfermedades o afecciones y no haber realizado en el último año ningún entrenamiento. Por otro lado, se informó detalladamente a los participantes tanto de los propósitos como de los posibles beneficios y/o riesgos asociados a la participación en el estudio, y se solicitó su consentimiento por escrito. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de León y fue realizado conforme a las normas éticas derivadas de la

Declaración de Helsinki sobre ensayos clínicos en humanos.

Los participantes fueron distribuidos aleatoriamente entre el grupo control ($n = 4$), el cual continuó con sus rutinas diarias, y el grupo entrenado ($n = 8$), donde los ancianos completaron 16 sesiones de entrenamiento de vibración de todo el cuerpo. El entrenamiento de vibración de todo el cuerpo se realizó en una plataforma de vibración (Fitvibe, Gymna Uniphy NV, Bilzen, Bélgica) durante 8 semanas. Las sesiones constaron de 10 minutos de calentamiento. Los ejercicios realizados variaron entre la realización de media sentadilla, sentadilla completa, sentadilla amplia en cuclillas o el entrenamiento de gemelos, como se refleja en la tabla 1, adaptada de (Machado *et al.*, 2010). Las repeticiones y el tiempo dedicado a los ejercicios fueron aumentando progresivamente a lo largo de las semanas.

Tabla 1. Protocolo de entrenamiento de vibración utilizado en los diferentes ejercicios: media sentadilla (A), sentadilla completa (B), sentadilla amplia en cuclillas (C) y el entrenamiento de gemelos (D).

Semana	Repeticiones por serie				Duración del ejercicio	Descanso entre ejercicios	Descanso entre series	Amplitud	Frecuencia	Modalidad
	A	B	C	D	Segundos	Minuto	Minuto	mm	Hz	
1	1	1	1	-	30	3	5	4	20	Estático
2	1	1	1	1	30	3	5	4	25	Estático
3	2	2	1	1	30	3	5	4	30	Estático
4	1	1	2	2	30	3	5	4	30	Dinámico
5	2	2	1	1	45	2,5	5	4	35	Dinámico
6	1	1	2	2	45	2,5	5	4	35	Dinámico
7	2	1	2	2	60	2,5	5	4	35	Dinámico
8	1	2	2	2	60	2,5	5	4	35	Dinámico

3.2. Obtención de muestras sanguíneas y aislamiento de las PBMC

Las muestras sanguíneas se obtuvieron en los 5-6 días anteriores y posteriores del periodo de entrenamiento. Para ello, los sujetos acudieron siempre a la misma hora de la mañana

en ayuno de 8 horas. La extracción de sangre (30 ml) se realizó mediante una punción en la vena braquiocefálica mediante el sistema Vacutainer™ (Franklin Lakes, EE. UU), usando ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante.

Como se muestra en la figura 3, La sangre obtenida se centrifugó a 1500 xg (3000 rpm) durante 10 minutos a 4°C para separar el plasma. Seguidamente, se resuspendió el resto de la muestra con tampón fosfato salino (PBS) en un volumen igual al volumen de plasma retirado, al que adicionalmente se añadió PBS en el mismo volumen obtenido. A continuación, se realizó un gradiente de densidad con solución separadora Ficoll (Biochrom AG, Berlín, Alemania) (Cuevas *et al.*, 2005). Seguidamente, se realizó una centrifugación a 890 xg (1200 rpm) durante 40 minutos a temperatura ambiente. Una vez obtenidas las células de la interfase se mezclaron con PBS hasta un volumen de 10 ml y se realizó una centrifugación a 2630 xg (2300 rpm) durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Por último, el sobrenadante se decantó y el pellet obtenido se resuspendió en 0,5 ml de PBS para realizar una última centrifugación a 2630 xg (2300 rpm) durante 5 minutos, a temperatura ambiente. Una vez retirado el sobrenadante, las PBMC fueron almacenadas a -80°C.

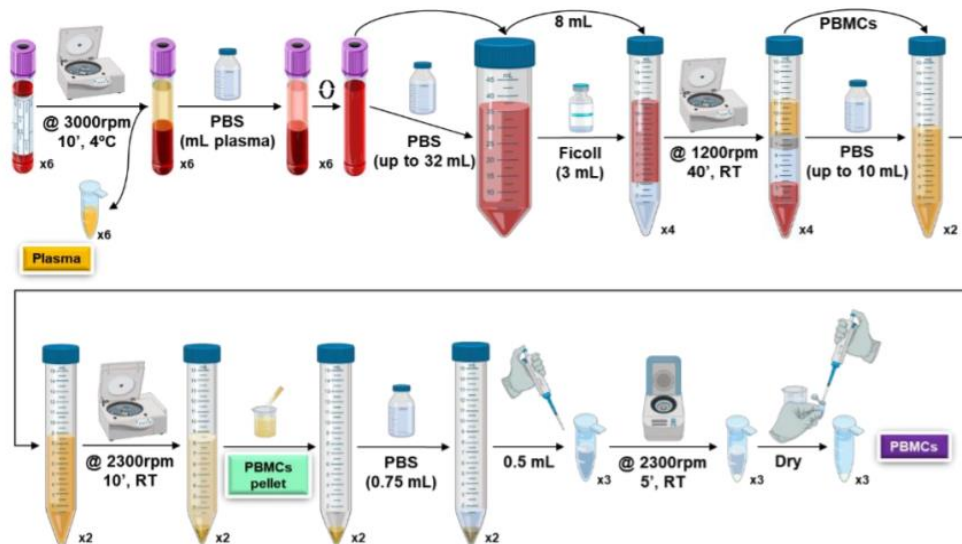


Figura 3. Proceso de extracción de las PBMC. Tomada de Estébanez (2021).

3.3. Cuantificación proteica

La cuantificación proteica se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Primeramente, se realizó una recta patrón de albúmina sérica bovina (BSA), partiendo de 0,5 mg/ml de *BSA Standard Solution*. Posteriormente, en placas de 96 pocillos, se cargaron 160 µl de cada punto de la recta o 160 µl de cada muestra (en una dilución 1:318), a los que se les

añadió 40 µl del reactivo de Bradford (*Coomassie brilliant blue solution* Bradford. Ref: 500-0006 Bio-Rad). Por último, se midió la absorbancia a 595 nm y se analizaron los resultados en el programa de software de hojas de cálculo Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, EE. UU.), interpolando las concentraciones proteicas desconocidas, es decir las muestras problema.

3.4. *Western blot*

El envejecimiento puede tener efectos negativos en los individuos, para ello se estudiaron los procesos mitofágicos y las funciones mitocondriales en ancianos que habían sido sometidos a entrenamientos frente a un grupo control que no había sido entrenado. Los efectos se estudiaron mediante las proteínas que se nombran a continuación: Mfn1, Parkin, VDAC1, Bnip3, PINK1 y PGC-1 α , mediante la técnica de *Western blot*.

Para llevar a cabo las electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide*), en primer lugar, se elaboraron los geles de poliacrilamida (Bio Rad, Hercules, CA, EE.UU.) con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), cuya concentración varió entre 9% y 12%, dependió del mayor o menor tamaño, respectivamente, de las proteínas a evaluar. Para las proteínas Mfn1, Parkin, VDAC1, Bnip3 y PGC-1 α se utilizaron geles de 9%, a su vez, para la proteína PINK1 se utilizaron geles de 12%. Para ello se elaboró una primera fase, el gel separador (*running gel*), situado en la parte inferior y encargado de separar las proteínas en función de su peso molecular, debido al porcentaje de acrilamida que presenten los geles, y una segunda fase, el gel concentrador (*stacking gel*), el cual se sitúa encima del anterior y desempeña la función de permitir la llegada de las muestras de forma uniforme al gel separador. Seguidamente, se realizó la electroforesis, cargando 40 µg de proteína en un volumen final de 20 µl, junto con los marcadores de pesos moleculares. La electroforesis se inició a 80 V y, una vez que las muestras pasaron del gel concentrador al separador, se aumentó a 120 V hasta su finalización.

A continuación, las membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) *immobilon-P* (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) fueron activadas en metanol durante 15 segundos y se transfirieron las proteínas desde los geles mediante el sistema Trans Blot Turbo Transfer (Biorad, Hercules, CA, EE.UU.). Posteriormente, las membranas se bloquearon en leche al 5% PBS-Tween (PBS-T) durante 30 minutos a 37 °C. Inmediatamente, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios, a las concentraciones indicadas en la tabla 2, hasta el día siguiente (*overnight*) a 4 °C.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en la detección y cuantificación, mediante la técnica *Western blot*, de proteínas.

Los anticuerpos presentan sus respectivas concentraciones, peso molecular en kilodalton (kDa), referencia y casa comercial. Santa Cruz Biotechnology® (EE. UU.) y Abcam® (Reino Unido).

Proteína	Peso molecular (kDa)	Casa comercial	Referencia	Concentración
Mfn1	84	Abcam®	ab104274	1:1000
Parkin	50-58	Santa Cruz Biotechnology®	sc-32282	1:200
VDAC1	30-35	Santa Cruz Biotechnology®	sc-8828	1:100
Bnip3	22	Santa Cruz Biotechnology®	sc-56167	1:200
PINK1	66	Abcam®	ab174775	1:200
PGC-1 α	90	Santa Cruz Biotechnology®	sc-13067	1:100

Al día siguiente, se procedió al lavado de las membranas con PBS-T, tres veces durante 5 minutos. A continuación, se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario, adecuado al anticuerpo primario, conjugado con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) (Dako, Glostrup, Denmark), durante una hora a temperatura ambiente y se repitieron nuevamente los lavados. Adicionalmente, se obtuvo la proteína β -actina como control de carga. Por último, las membranas fueron incubadas en los reactivos del kit de aumento de quimioluminiscencia-HRP (ECL), *Pierce® ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific, EE. UU.), en oscuridad, durante 1 minuto. Por último, se expusieron las membranas a películas fotográficas (Amersham Hyperfilm ECL, Amersham, Little Chalfont, Reino Unido), para, finalmente, ser reveladas en los líquidos revelador y fijador. Las bandas obtenidas para cada proteína fueron cuantificadas mediante el programa image J (Bethesda, MD, EE.UU.) y se trataron los datos en Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, EE. UU.).

3.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS versión 21 (IBM, Armonk, NY, EE.UU.). Una vez comprobada la distribución normal de los datos con el test de Shapiro-Wilk, se realizó la prueba T-student para evaluar la existencia de diferencias entre los grupos en estado basal. Seguidamente, se analizaron los datos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas por grupo (GC y GE) y tiempo (antes y después del entrenamiento). Adicionalmente, se realizaron comparaciones múltiples *post hoc* mediante el análisis de Bonferroni. Se estableció el valor de $p < 0,05$ para la existencia de diferencias significativas. Los datos se presentan como media \pm error estándar de la media (EEM).

4. Resultados

Para estudiar los efectos del entrenamiento de vibración de 8 semanas de duración sobre

el envejecimiento en los ancianos, se evaluaron las siguientes proteínas: Mfn1, Parkin, VDAC1, Bnip3, PINK1 y PGC-1 α , implicadas en la biogénesis, dinámica mitocondrial y la mitofagia en las PBMC de los ancianos participantes.

4.1. Efectos del entrenamiento de vibración de cuerpo completo sobre la biogénesis y la dinámica mitocondrial en las PBMC de ancianos

En la figura 4, no se encontraron diferencias significativas entre el GC y el GE antes del periodo de entrenamiento en ninguna de las proteínas involucradas en la biogénesis y dinámica mitocondrial; (Mfn1, $p = 0,107$; PGC-1 α , $p = 0,572$).

Como se muestra en la figura 4A, los niveles de Mfn1 no variaron significativamente en el GC ($p = 0,305$), mientras que se observó un incremento significativo ($p = 0,011$) en el GE después del periodo de entrenamiento. Este incremento también se encontró significativo ($p = 0,033$) cuando se comparó con el GC. De la misma manera, los niveles de PGC-1 α (Figura 4B) no variaron significativamente en el GC ($p = 0,730$), pero aumentaron significativamente ($p = 0,035$) en el GE después del entrenamiento.

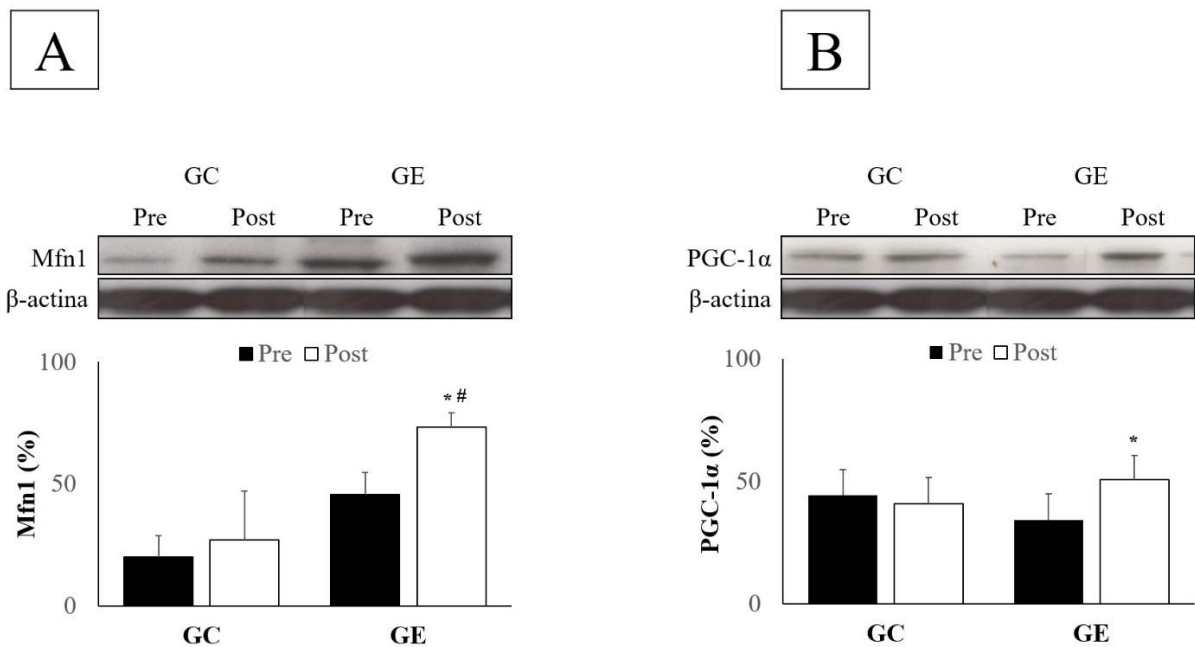
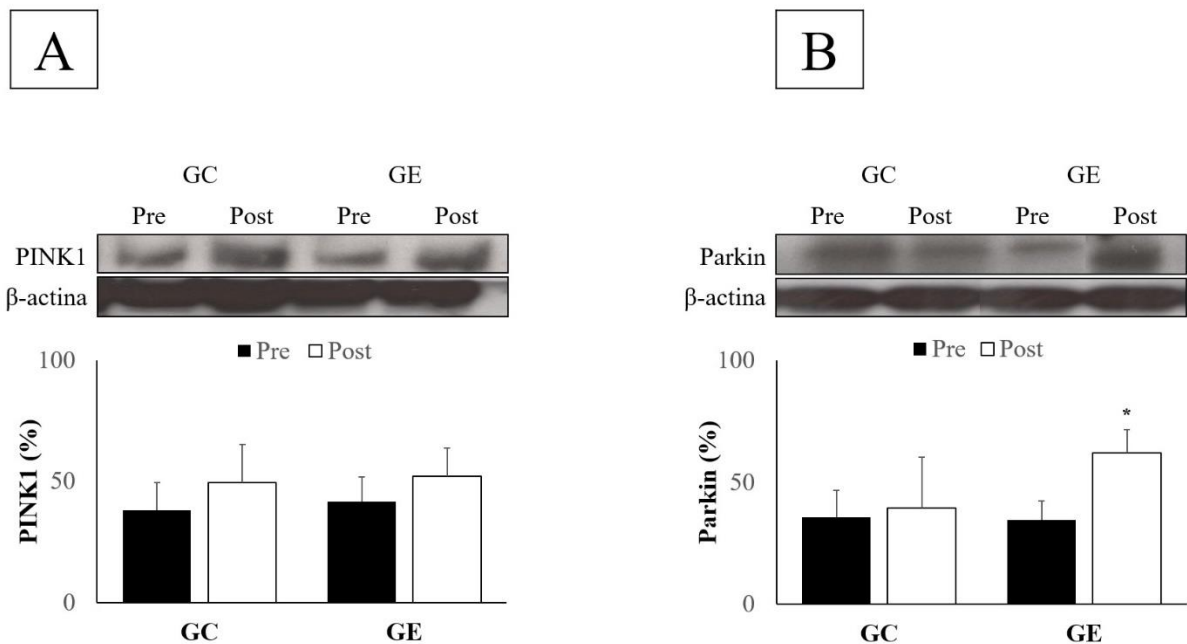


Figura 4. Cuantificación densitométrica y *Western Blot* representativos de Mfn1 (A) y PGC-1 α (B) en PBMC de ancianos, antes (pre) y después (post) de un programa de entrenamiento de vibración. Los valores se presentan como la media \pm EEM, y se dividen en dos grupos, el grupo control (GC) y el grupo entrenado (GE). *Diferencias significativas con respecto al valor pre (antes del entrenamiento) del mismo grupo ($p < 0.05$). #Diferencias significativas entre el valor post (después del entrenamiento) del grupo entrenado y el grupo control ($p < 0.05$).

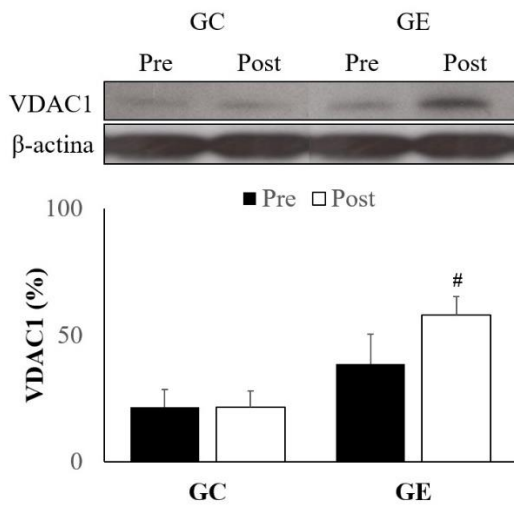
4.2. Efectos del entrenamiento de vibración de cuerpo completo sobre la mitofagia en las PBMC de ancianos

En la figura 5, no se encontraron diferencias significativas entre el GC y el GE antes del periodo de entrenamiento en ninguna de las proteínas involucradas en la mitofagia; (PINK1, $p = 0,837$; Parkin, $p = 0,928$; VDAC1, $p = 0,347$; Bnip3, $p = 0,242$).

Como se puede observar en las figuras 5A-D, los niveles de PINK1 (5A) no variaron significativamente en ninguno de los grupos (GC, $p = 0,467$; GE, $p = 0,340$). Por otro lado, la expresión de Parkin no varió significativamente en el GC ($p = 0,828$); sin embargo, aumentó significativamente ($p = 0,042$) en el GE después del entrenamiento. Además, los niveles de la proteína VDAC1 se encontraron estadísticamente no significativos en ambos grupos después del periodo de entrenamiento (GC, $p = 0,992$; GE, $p = 0,131$). Sin embargo, se observaron niveles elevados de VDAC1 en el GE cuando se compararon con el GC después del entrenamiento de vibración de cuerpo completo ($p = 0,010$). Por último, los valores de Bnip3 no variaron significativamente en ninguno de los grupos (GC, $p = 0,365$; GE, $p = 0,350$). Además, tampoco variaron significativamente los niveles entre el GC y el GE después de someterse a los entrenamientos ($p = 0,489$).



C



D

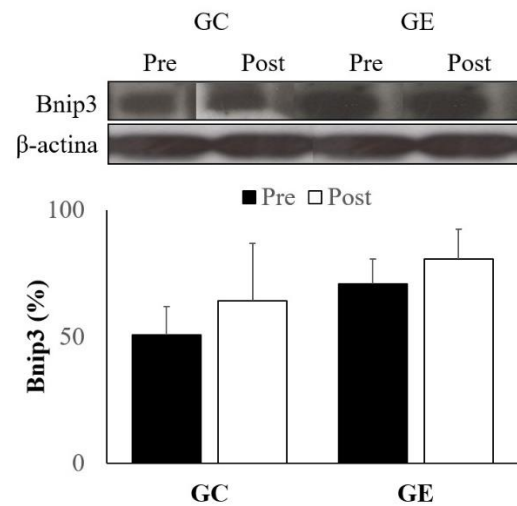


Figura 5. Cuantificación densitométrica y *Western Blot* representativos de PINK1 (A), Parkin (B), VDAC1 (C) y Bnip3 (D) en PBMC de ancianos, antes (pre) y después (post) de un programa de entrenamiento de vibración. Los valores se presentan como la media \pm EEM, y se dividen en dos grupos, el grupo control (GC) y el grupo entrenado (GE). *Diferencias significativas con respecto al valor pre (antes del entrenamiento) del mismo grupo ($p < 0.05$). #Diferencias significativas entre el valor post (después del entrenamiento) del grupo entrenado y el grupo control ($p < 0.05$).

5. Discusión

El presente trabajo tuvo como objetivo analizar los efectos de un programa de entrenamiento de vibración de cuerpo completo sobre las principales proteínas que participan en la biología mitocondrial en las PBMC de ancianos. Los resultados obtenidos mostraron un incremento en los niveles de expresión de las proteínas involucradas tanto en la biogénesis y la dinámica mitocondrial, concretamente del proceso de fusión, como en la vía mitofágica de PINK1/Parkin, pero no en la vía mitofágica de Bnip3/Nix, en el GE después del haber completado 8 semanas de entrenamiento.

Se ha comprobado que, a medida que se envejece, tiene lugar una desregulación de las funciones mitocondriales, conduciendo a una disminución en la densidad mitocondrial y de la capacidad oxidativa por volumen mitocondrial, disminuyendo la oxidación de sustratos y la obtención de energía en el ciclo de Krebs (Conley *et al.*, 2000; Gureev *et al.*, 2019).

PGC-1 α es una proteína clave en la biogénesis mitocondrial, con un papel primordial en el mantenimiento del estado funcional de las mitocondrias (Conley *et al.*, 2000; Gureev *et al.*,

2019). En el presente trabajo se observó un incremento de los niveles de PGC-1 α con el protocolo de vibración. Estos resultados concuerdan con los del estudio de Broskey *et al.* (2014), quienes observaron dicho incremento en las PBMC de ancianos tras 16 semanas de entrenamiento aeróbico (Broskey *et al.*, 2014), aunque son discrepantes con la disminución presentada por Derbré *et al.* (2012) en el músculo esquelético de ratas envejecidas después de 3 semanas de entrenamiento de resistencia aeróbica. Esta diferencia podría deberse a los variables niveles de ROS en los diferentes tejidos durante el envejecimiento, de manera que las vías de señalización celular sensibles a redox podrían dificultar la respuesta al ejercicio. En el presente estudio, la estimulación de la biogénesis mitocondrial mediada por el ejercicio físico podría generar un mejor rendimiento mitocondrial, un aumento del contenido mitocondrial, un mayor consumo de oxígeno, un aumento de la síntesis de ATP, una mayor capacidad de mitofagia y una menor producción de ROS (Broskey *et al.*, 2014). Además, una reciente revisión ha puesto de manifiesto que el aumento de los niveles de PGC-1 α es capaz de prevenir enfermedades y cambios relacionados con el envejecimiento (Lee *et al.*, 2019). Específicamente, estudios realizados *in vitro* e *in vivo* demostraron que la activación de PGC-1 α causada por fármacos o intervención genética protege frente al acortamiento telomérico. Además, también previno los cambios relacionados con el envejecimiento, como pueden ser la mayor susceptibilidad a lesiones y enfermedades o la disfunción de órganos, en el corazón, cerebro y músculo esquelético y fue capaz de prevenir enfermedades renales mediante la disminución de la disfunción renal (Lee *et al.*, 2019).

La Mfn1 es una proteína clave en la dinámica mitocondrial, concretamente en el proceso de fusión, que se encuentra ubicada en las OMM e IMM (Malka *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2020). En concordancia con los resultados presentados por Estébanez *et al.* (2019) en respuesta a un entrenamiento de fuerza de 8 semanas, en el presente trabajo se observó un incremento de la expresión de la Mfn1 en las PBMC de los ancianos entrenados. Los estudios llevados a cabo en *C.elegans* y *D.melanogaster* han dilucidado que una mayor fusión mitocondrial se asocia con un aumento de la longevidad (Chaudhari y Kipreos, 2017; Rana *et al.*, 2017). Además, la sobreexpresión de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en las células endoteliales humanas promovió la fusión mitocondrial, al disminuir el nivel de la proteína de fisión Drp1 (Wang *et al.*, 2017). Por ello, el ejercicio podría ser capaz de retrasar el envejecimiento mediante el aumento de la fusión mitocondrial, generado por una mayor expresión de Mfn1.

Se ha demostrado, mediante diversos estudios, que la maquinaria autofágica disminuye

su intensidad en diversos órganos y tejidos como pueden ser la médula espinal, el hígado, el cerebro, el corazón, los pulmones, los riñones e incluso el timo (Liu *et al.*, 2018; Fang *et al.*, 2019), así como en las PBMC a medida que se envejece (Huang *et al.*, 2012; Mejías-Peña *et al.*, 2016). Por otro lado, el ejercicio físico actúa como inductor de la autofagia *in vivo*, pudiendo generar un retraso en el envejecimiento (He *et al.*, 2012). Como se indicó en la introducción, la mitofagia es un tipo de autofagia selectiva por el cual se degradan las mitocondrias, pudiendo ser mediada por las vías de PINK1/Parkin y de Bnip3/Nix, principalmente (Schiavi y Ventura, 2014). En el presente estudio, los valores de PINK1 no sufrieron variaciones significativas con el ejercicio, concordando con los resultados presentados por Estébanez *et al.* (2019) en respuesta a un entrenamiento de fuerza de 8 semanas. Sin embargo, la expresión de Parkin aumentó significativamente en respuesta al entrenamiento de vibración cuerpo completo, como también observaron O'Leary *et al.* (2013) en músculo esquelético de ratas después de realizar ejercicio y Scarffe *et al.* (2014) mediante la acumulación de Parkin para intentar controlar la calidad y cantidad mitocondrial. Además, aunque el estudio de Fealy *et al.* (2014) no mostró cambios en la expresión del ARNm de Parkin y PINK1 en el músculo humano de ancianos obesos sometidos a un entrenamiento aeróbico de 12 semanas, ni diferencias en los niveles del ARNm de PINK1 entre ancianos activos o sedentarios (Drummond *et al.*, 2014), si encontraron elevados los niveles del ARNm de Parkin en los ancianos activos (Drummond *et al.*, 2014).

Se ha observado que las mutaciones en las proteínas Parkin y PINK1 pueden generar Parkinson autosómico recesivo de inicio temprano (Valente *et al.*, 2004; Miller y Muqit, 2019), enfermedad estrechamente relacionada con el envejecimiento. Además, se ha observado una expresión de PINK1 disminuida en tejido hepático y hepatocitos en ratones de más de 18 meses de vida (Niemann *et al.*, 2017); aunque en muestras de músculos de ratas y humanos no se han encontrado cambios significativos en los niveles de PINK1 asociados al envejecimiento (Ogborn *et al.*, 2015; Capitanio *et al.*, 2016b). Por otro lado, sustancias como el resveratrol, un antioxidante natural polifenólico presente en el vino tinto y las uvas (Baolin *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2015), tienen la capacidad de retrasar el envejecimiento mediante la activación de sirtuina 1 (Sirt1), lo cual conlleva una disminución del estrés oxidativo, promoviendo la respuesta de señalización mitocondrial inicial, generando la activación de PINK1, promoviendo así la mitofagia (Kitagishi *et al.*, 2017). Dado que en el presente estudio solo se encontraron elevados los niveles de Parkin después del entrenamiento, se hace necesario dilucidar si el ejercicio podría estar incrementando la biodisponibilidad de esta proteína en un intento de controlar la calidad mitocondrial mediante la mitofagia (Scarffe *et al.*, 2014) o si el incremento de Parkin

en respuesta al entrenamiento juega un papel central en la biogénesis mitocondrial, regulando tanto la transcripción como la replicación del ADN mitocondrial (Kuroda *et al.*, 2006), de manera que, en cualquier caso, disminuya la disfunción mitocondrial asociada al envejecimiento (Drummond *et al.*, 2014).

La proteína VDAC1 se encarga de realizar varias funciones en la célula, entre ellas: 1/ crecimiento celular, 2/ mantenimiento de la supervivencia celular, 3/ regular el transporte de calcio, 4/ mantenimiento de la plasticidad sináptica mediante la permeabilidad sináptica en el poro de transición, 5/ regular el transporte de ATP, 6/ regular los cambios estructurales, 7/ regular la forma mitocondrial, 8/ regular la señalización de la apoptosis, y 9/ regular las interacciones de la hexoquinasa con las mitocondrias (Shimizu *et al.*, 1999; Krauskopf *et al.*, 2006; Raghavan *et al.*, 2012).

En el presente trabajo, se observó un incremento significativo de VDAC1 en el GE frente al GC después del periodo de entrenamiento. No obstante, no se encontraron cambios en los niveles de VDAC1 en las PBMC de los ancianos entrenados *vs.* su estado basal, concordando con los estudios en músculo esquelético de jóvenes y ancianos de Gram *et al.* (2014) y Ogborn *et al.* (2015). Asimismo, en el caso de los humanos, algunos estudios observaron que el envejecimiento no disminuyó los niveles de VDAC1 en el músculo esquelético cuando se compararon jóvenes y ancianos (Gram *et al.*, 2014; Ogborn *et al.*, 2015). En diversos estudios llevados a cabo en ratas, se evidenció que el nivel de VDAC1 disminuye en las mitocondrias aisladas del cerebro y en el músculo tríceps de ratas viejas (Krestinina *et al.*, 2015; Capitanio *et al.*, 2016b). Estos hallazgos podrían indicar que los niveles de VDAC1 varían en función del tejido analizado o del modelo animal empleado. Aunque en el presente estudio no se pudo evaluar los niveles de VDAC1 en ancianos respecto a jóvenes, si se observó que el GE presentó niveles elevados no significativos respecto al GC en estado basal. Esto podría difuminar el efecto del entrenamiento realizado sobre los niveles de VDAC1, ya que el incremento estimulado por el ejercicio si fue significativo respecto al GC.

Por último, Bnip3 es una proteína iniciadora de la mitofagia que se encuentra regulada por la hipoxia (Bruick, 2000; Ney, 2015). Bnip3 actúa junto con Nix en la autofagia mediante varios mecanismos: 1/ la competencia de Bnip3 o Nix por unirse a Bcl-2, que ocasiona la liberación de Beclin1 (Maiuri *et al.*, 2007; Bellot *et al.*, 2009), 2/ generando disfunción mitocondrial, mediante el aumento de la producción de ROS causada por Bnip3 o Nix (Scherz-Shouval y Elazar, 2011), o 3/ mediante la unión de Bnip3 al homólogo de Ras enriquecido en

el cerebro (Rheb), un activador aguas arriba de la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR), de manera que Bnip3 reprime a mTOR y activa la autofagia (Li *et al.*, 2007).

En el presente trabajo, no se encontraron cambios significativos en la expresión de la proteína Bnip3 en las PBMC de ancianos después del protocolo de entrenamiento. Estos resultados concordaron con los de Estébanez *et al.* (2019) en respuesta a 8 semanas de entrenamiento de fuerza, sugiriendo que esta vía mitofágica podría no ser estimuladas por el entrenamiento de vibración o que posiblemente la activación de la respuesta de proteínas desplegadas (UPR) podría inhibir la activación. No obstante, serían necesarios más estudios para confirmar estas hipótesis. Sin embargo, para diversos autores la respuesta de Bnip3 al ejercicio no está clara, como se refleja en dos estudios llevados a cabo en el músculo esquelético de ancianos activos, en comparación con sedentarios, en los cuales se observaron tanto niveles disminuidos como elevados (Drummond *et al.*, 2014; Zampieri *et al.*, 2015). Asimismo, tampoco se encontraron variaciones en el ARNm de Bnip3 después de una sola sesión de entrenamiento de fuerza en el músculo esquelético de varones adultos (Ogborn *et al.*, 2015), o después de 24 semanas de ejercicio combinado aeróbico y de fuerza en el músculo esquelético de mujeres con sobrepeso (Wohlgemuth *et al.*, 2011). Sin embargo, algunos estudios han encontrado un incremento de los niveles de Bnip3 en ancianos sedentarios (Zampieri *et al.*, 2015; Sebastián *et al.*, 2016), probablemente como un intento de minimizar el daño mitocondrial mediante el aumento de los niveles de Bnip3 para compensar la pérdida de mitofagia (Sebastián *et al.*, 2016).

La deficiencia de Bnip3 está asociada con la acumulación en el hígado de mitocondrias disfuncionales (Ney, 2015), mientras que una sobreexpresión de Bnip3 conduce a la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial en los cardiomiocitos y a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, generando la muerte de las células cardíacas y disfunción mitocondrial (Dhingra *et al.*, 2017). Sin embargo, no está completamente dilucidado el efecto que el envejecimiento ejerce sobre esta vía mitofágica, ya que mientras que se encontraron niveles disminuidos en el corazón de ratas envejecidas (Capitanio *et al.*, 2016a), en los músculos de ancianos los niveles no variaron (Ogborn *et al.*, 2015; Distefano *et al.*, 2017).

6. Conclusiones

El protocolo de entrenamiento de vibración de cuerpo completo de 8 semanas al que fueron sometidos los ancianos participantes demostró la capacidad que tiene este tipo de ejercicio como regulador de la biología mitocondrial, evitando la disfunción mitocondrial

progresiva causada por el envejecimiento y pudiendo presentarse como una intervención de bajo coste frente al envejecimiento.

El ejercicio de vibración aumentó significativamente los niveles de PGC-1 α y Mfn1. El aumento del número de mitocondrias saludables junto con la estimulación de la fusión mitocondrial podría diluir en la red mitocondrial el daño ocasionado por el envejecimiento. Además, aunque el protocolo de entrenamiento utilizado en el presente trabajo no modificó los niveles de PINK1, el ejercicio incrementó los niveles de Parkin y VDAC1, lo cual podría indicar un aumento de la mitofagia mediante la activación de la vía mitofágica inducida por daños como control frente a la acumulación de mitocondrias disfuncionales durante el envejecimiento. Sin embargo, la ausencia de resultados significativos en las variaciones de PINK1 no permiten obtener conclusiones claras acerca de capacidad inductora del ejercicio de vibración sobre la mitofagia causada por daños. Por otra parte, el ejercicio de vibración no ejerció cambios significativos en Bnip3, sugiriendo que la mitofagia inducida por el desarrollo no es activada por el ejercicio o que las respuestas generadas a nivel de la biogénesis y dinámica mitocondrial, así como la mitofagia mediada por Parkin, son suficientes para resolver el daño mitocondrial ocasionado por el envejecimiento.

7. Limitaciones

El presente estudio cuenta con diversas limitaciones que se exponen a continuación:

- El número de individuos control del que se dispuso fue bajo. Por lo tanto, sería necesario aumentar la cantidad de estos sujetos para obtener unos resultados más representativos.

- El rango de edades oscila entre los 65 y 87 años, lo cual puede ser un factor determinante a la hora de que existan variaciones significativas o no. Debido a que las funciones mitocondriales empeoran a medida que se envejece, a los 87 años hay más probabilidades de sufrir una mayor disfunción mitocondrial que a los 65 años. De igual manera, aunque el ejercicio físico que realizaron los individuos puede reducir la disfunción mitocondrial causada por el envejecimiento, la respuesta al entrenamiento puede ser diferente en función de la edad de los mismos.

- No fue posible analizar todas las proteínas principales involucradas en los diferentes procesos mitocondriales, como las proteínas involucradas en la biogénesis (TFAM), fusión

(Mfn2 y OPA1), fisión (Drp1 y Fis1), y en la mitofagia (Nix, Bcl-2, LC3 o p62). La evaluación de estas proteínas proporcionaría una visión más completa de las modificaciones mitocondriales en respuesta al entrenamiento en las PBMC de ancianos.

- La expresión de algunas de las proteínas involucradas en la biología mitocondrial únicamente se ha evaluado mediante el método de *Western blot*. Para ratificar los resultados obtenidos, sería de gran interés utilizar ensayos adicionales, como puede ser el análisis de la expresión génica por RT-PCR, la evaluación de la fosforilación o ubiquitinación de proteínas de la OMM, o la interacción de Parkin/TFAM (Kuroda *et al.*, 2006), Bcl-2/Beclin 1 o LC3/p62 mediante co-inmunoprecipitación o ensayos de proximidad como el Duolink® Proximity Ligation Assay (PLA).

- Finalmente, es importante destacar la escasa bibliografía sobre el estudio de la mitofagia y el entrenamiento de vibración existente en la actualidad.

8. Referencias

- Allen, J. y Morelli, V. (2011) "Aging and exercise", *Clinics in Geriatric Medicine*, 27(4), pp. 661-671.
- Arora, S. (2015) "The Transitions of Aging", en Powell, J.L. y Chen, S. (eds.) *International Perspectives on Aging*. Suiza: Springer, pp. 183-214.
- Baolin, L., Inami, Y., Tanaka, H., Inagaki, N. *et al.* (2004) "Resveratrol inhibits the release of mediators from bone marrow-derived mouse mast cells in vitro", *Planta Medica*, 70(4), pp. 305-309.
- Bauman, A. E., Reis, R. S., Sallis, J. F., Wells, J. C. *et al.* (2012) "Correlates of physical activity: why are some people physically active and others not?", *The Lancet*, 380(9838), pp. 258-271.
- Bednarczyk, M., Zmarzły, N., Grabarek, B., Mazurek, U. *et al.* (2018) "Genes involved in the regulation of different types of autophagy and their participation in cancer pathogenesis", *Oncotarget*, 9(76), pp. 34413-34428.
- Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J. *et al.* (2009) "Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains", *Molecular and Cellular Biology*, 29(10), pp. 2570-2581.
- Booth, N.J., Akbar, A.N. y Vukmanovic-Stejic, M. (2012) "Regulation of Adaptive Immunity in the Elderly", en Thiel, A. (eds.) *Immunosenescence*. Basilea: Springer Basel AG, pp. 1-23.
- Bradford, M. M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248-254.

- Broskey, N. T., Greggio, C., Boss, A., Boutant, M. *et al.* (2014) “Skeletal muscle mitochondria in the elderly: effects of physical fitness and exercise training”, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(5), pp. 1852-1861.
- Bruick, R. K. (2000) “Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), pp. 9082-9087.
- Capitanio, D., Leone, R., Fania, C., Torretta, E. *et al.* (2016a) “Sprague Dawley rats: A model of successful heart aging”, *EuPA Open Proteomics*, 12, pp. 22-30.
- Capitanio, D., Vasso, M., De Palma, S., Fania, C. *et al.* (2016b). “Specific protein changes contribute to the differential muscle mass loss during ageing”, *Proteomics*, 16(4), pp. 645-656.
- Carter, H. N., Chen, C. C. y Hood, D. A. (2015) “Mitochondria, muscle health, and exercise with advancing age”, *Physiology*, 30(3), pp. 208-223.
- Chan, M. (2015) *Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud*. Organización Mundial de la Salud (OMS). Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/186466/9789240694873_spa.pdf (Accedido: 22 de marzo de 2022).
- Chaudhari, S. N. y Kipreos, E. T. (2017) “Increased mitochondrial fusion allows the survival of older animals in diverse *C. elegans* longevity pathways”, *Nature Communications*, 8(1), pp. 182.
- Cochrane, D. J. (2011) “Vibration exercise: the potential benefits”, *International Journal of Sports Medicine*, 32(02), pp. 75-99.
- Conley, K. E., Jubrias, S. A. y Esselman, P. C. (2000) “Oxidative Capacity and Ageing in Human Muscle”, the *Journal of Physiology*, 526(1), pp. 203-210.
- Copplestone, J. F. (1991) “What is health?”, *World Health Forum*, 12(4), pp. 440-442.
- Cuervo, A. M. y Macian, F. (2014) “Autophagy and the immune function in aging”, *Current Opinion in Immunology*, 29, pp. 97-104.
- Cuevas, M. J., Almar, M., García-Glez, J. C., García-López, D. *et al.* (2005) “Changes in oxidative stress markers and NF-kappaB activation induced by sprint exercise”, *Free Radical Research*, 39(4), pp. 431-439.
- Deng, Z. Y., Hu, M. M., Xin, Y. F. y Gang, C. (2015) “Resveratrol alleviates vascular inflammatory injury by inhibiting inflammasome activation in rats with hypercholesterolemia and vitamin D2 treatment”, *Inflammation Research*, 64(5), pp. 321-332.
- Derbré, F., Gomez-Cabrera, M. C., Nascimento, A. L., Sanchis-Gomar, F. *et al.* (2012) “Age associated low mitochondrial biogenesis may be explained by lack of response of PGC-1 α to exercise training”, *Age*, 34(3), pp. 669-679.
- Dhingra, A., Jayas, R., Afshar, P., Guberman, M. *et al.* (2017) “Ellagic acid antagonizes Bnip3-mediated mitochondrial injury and necrotic cell death of cardiac myocytes”, *Free Radical Biology and Medicine*, 112, pp. 411-422.
- Ding, W. X. y Yin, X. M. (2012) “Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis”, *Biological Chemistry*, 393(7), pp. 547-564.

- Distefano, G., Standley, R. A., Dubé, J. J., Carnero, E. A. *et al.* (2017) “Chronological Age Does not Influence Ex-vivo Mitochondrial Respiration and Quality Control in Skeletal Muscle”, *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 72(4), pp. 535-542.
- Drummond, M. J., Addison, O., Brunker, L., Hopkins, P. N. *et al.* (2014) “Downregulation of E3 ubiquitin ligases and mitophagy-related genes in skeletal muscle of physically inactive, frail older women: a cross-sectional comparison”, *The Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 69(8), pp. 1040-1048.
- Dunlop, D. D., Song, J., Arnston, E. K., Semanik, P. A. *et al.* (2015) “Sedentary time in US older adults associated with disability in activities of daily living independent of physical activity”, *Journal of Physical Activity and Health*, 12(1), pp. 93-101.
- Elmore, S. P., Qian, T., Grissom, S. F. y Lemasters, J. J. (2001) “The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes”, *The FASEB Journal*, 15(12), pp. 2286-2287.
- Escobar, K. A., Cole, N. H., Mermier, C. M. y VanDusseldorp, T. A. (2019) “Autophagy and aging: Maintaining the proteome through exercise and caloric restriction”, *Aging Cell*, 18(1), pp. e12876.
- Estébanez, B. (2021) *Study of molecular and cellular responses in healthy elderly subjects performing a resistance training program*. Tesis doctoral. Universidad de León.
- Fang, Y., Zhu, L., An, N., Jiang, G. *et al.* (2019) “Blood autophagy defect causes accelerated non-hematopoietic organ aging”, *Aging (Albany NY)*, 11(14), pp. 4910-4922.
- Fealy, C. E., Mulya, A., Lai, N. y Kirwan, J. P. (2014) “Exercise training decreases activation of the mitochondrial fission protein dynamin-related protein-1 in insulin-resistant human skeletal muscle”, *Journal of Applied Physiology*, 117(3), pp. 239-245.
- Gleeson, M., Bishop, N. C., Stensel, D. J., Lindley, M. R. *et al.* (2011) “The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease”, *Nature Reviews Immunology*, 11(9), pp. 607-615.
- Gomes, L. C. y Scorrano, L. (2013) “Mitochondrial morphology in mitophagy and macroautophagy”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(1), pp. 205-212.
- Gonzalez-Freire, M., De Cabo, R., Bernier, M., Sollott, S. J. *et al.* (2015) “Reconsidering the role of mitochondria in aging”, *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 70(11), pp. 1334-1342.
- Gottlieb, R. A. y Carreira, R. S. (2010) “Autophagy in health and disease. 5. Mitophagy as a way of life”, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 299(2), pp. C203-C210.
- Gram, M., Vigelsø, A., Yokota, T., Hansen, C. N. *et al.* (2014) “Two weeks of one-leg immobilization decreases skeletal muscle respiratory capacity equally in young and elderly men”, *Experimental Gerontology*, 58, pp. 269-278.
- Guan, Y., Drake, J. C. y Yan, Z. (2019) “Exercise-Induced Mitophagy in Skeletal Muscle and Heart”, *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 47(3), pp. 151-156.

- Gump, J. M. y Thorburn, A. (2011) “Autophagy and apoptosis: what is the connection?”, *Trends in Cell Biology*, 21(7), pp. 387-392.
- Gureev, A. P., Shaforostova, E. A. y Popov, V. N. (2019) “Regulation of Mitochondrial Biogenesis as a Way for Active Longevity: Interaction Between the Nrf2 and PGC-1 α Signaling Pathways”, *Frontiers in Genetics*, 10, pp. 435.
- Hallal, P. C., Andersen, L. B., Bull, F. C., Guthold, R. *et al.* (2012) “Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects”, *The Lancet*, 380(9838), pp. 247-257.
- Hamacher-Brady, A. y Brady, N. R. (2016) “Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(4), pp. 775-795.
- He, C., Bassik, M. C., Moresi, V., Sun, K. *et al.* (2012) “Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis”, *Nature*, 481(7382), pp. 511-515.
- Hekimi, S., Wang, Y. y Noë, A. (2016) “Mitochondrial ROS and the Effectors of the Intrinsic Apoptotic Pathway in Aging Cells: The Discerning Killers!”, *Frontiers in Genetics*, 7, pp. 161.
- Huang, J., Xu, J., Pang, S., Bai, B. *et al.* (2012) “Age-related decrease of the LAMP-2 gene expression in human leukocytes”, *Clinical Biochemistry*, 45(15), pp. 1229-1232.
- Jensen, M. B. y Jasper, H. (2014) “Mitochondrial proteostasis in the control of aging and longevity”, *Cell Metabolism*, 20(2), pp. 214-225.
- Johannsen, D. L., Conley, K. E., Bajpeyi, S., Punyanitya, M. *et al.* (2012) “Ectopic lipid accumulation and reduced glucose tolerance in elderly adults are accompanied by altered skeletal muscle mitochondrial activity”, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(1), pp. 242-250.
- Kauppila, T. E. S., Kauppila, J. H. K. y Larsson, N. G. (2017) “Mammalian Mitochondria and Aging: An Update”, *Cell Metabolism*, 25(1), pp. 57-71.
- Kitagishi, Y., Nakano, N., Ogino, M., Ichimura, M. *et al.* (2017) “PINK1 signaling in mitochondrial homeostasis and in aging (Review)”, *International Journal of Molecular Medicine*, 39(1), pp. 3-8.
- Krauskopf, A., Eriksson, O., Craigen, W. J., Forte, M. A. *et al.* (2006) “Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1757(5-6), pp. 590-595.
- Krestinina, O., Azarashvili, T., Baburina, Y., Galvita, A. *et al.* (2015) “In aging, the vulnerability of rat brain mitochondria is enhanced due to reduced level of 2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase (CNP) and subsequently increased permeability transition in brain mitochondria in old animals”, *Neurochemistry International*, 80, pp. 41-50.
- Kuroda, Y., Mitsui, T., Kunishige, M., Shono, M. *et al.* (2006) “Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells”, *Human Molecular Genetics*, 15(6), pp. 883-895.
- Larsen, S., Hey-Mogensen, M., Rabøl, R., Stride, N. *et al.* (2012) “The influence of age and aerobic fitness: effects on mitochondrial respiration in skeletal muscle”, *Acta Physiologica*, 205(3), pp. 423-432.

- Lee, G., Uddin, M. J., Kim, Y., Ko, M. *et al.* (2019) “PGC-1 α , a potential therapeutic target against kidney aging”, *Aging Cell*, 18(5), pp. e12994.
- Li, Y., Wang, Y., Kim, E., Beemiller, P. *et al.* (2007) “Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mammalian target of rapamycin by interacting with Rheb”, *Journal of Biological Chemistry*, 282(49), pp. 35803-35813.
- Liesa, M., Palacín, M. y Zorzano, A. (2009) “Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease”, *Physiological Reviews*, 89(3), pp. 799-845.
- Liu, A., Guo, E., Yang, J., Yang, Y. *et al.* (2018) “Young plasma reverses age-dependent alterations in hepatic function through the restoration of autophagy”, *Aging Cell*, 17(1), pp. e12708.
- Liu, Y. J., McIntyre, R. L., Janssens, G. E. y Houtkooper, R. H. (2020) “Mitochondrial fission and fusion: A dynamic role in aging and potential target for age-related disease”, *Mechanisms of Ageing and Development*, 186, pp. 111212.
- López-Lluch, G., Irusta, P. M., Navas, P. y de Cabo, R. (2008) “Mitochondrial biogenesis and healthy aging”, *Experimental Gerontology*, 43(9), pp. 813-819.
- Machado, A., García-López, D., González-Gallego, J. y Garatachea, N. (2010) “Whole-body vibration training increases muscle strength and mass in older women: a randomized-controlled trial”, *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 20(2), pp. 200-207.
- Maiuri, M. C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J. C. *et al.* (2007) “Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1”, *The EMBO Journal*, 26(10), pp. 2527-2539.
- Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Diaz, C., Guillou, E. *et al.* (2005) “Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes”, *EMBO Reports*, 6(9), pp. 853-859.
- Mejías-Peña, Y., Rodríguez-Miguel, P., Fernández-Gonzalo, R., Martínez-Flórez, S. *et al.* (2016) “Effects of aerobic training on markers of autophagy in the elderly”, *Age*, 38(2), pp. 33.
- Mikhael, M., Orr, R. y Singh, M. A. F (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(2), pp. 150-157.
- Miller, S. y Muqit, M. M. K. (2019) “Therapeutic approaches to enhance PINK1/Parkin mediated mitophagy for the treatment of Parkinson's disease”, *Neuroscience Letters*, 705, pp. 7-13.
- Moreira, O. C., Estébanez, B., Martínez-Florez, S., de Paz, J. A. *et al.* (2017) “Mitochondrial Function and Mitophagy in the Elderly: Effects of Exercise”, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, pp. 2012798.
- Morgan, P. J., Young, M. D., Smith, J. J. y Lubans, D. R. (2016) “Targeted Health Behavior Interventions Promoting Physical Activity: A Conceptual Model”, *Exercise and Sport Sciences Review*, 44(2), pp. 71-80.
- Mori, N. y Mook-Jung, I. (2015) *Aging Mechanisms: Longevity, Metabolism, and Brain Aging*. Japón: Springer.

- Ney, P. A. (2015) “Mitochondrial autophagy: Origins, significance, and role of BNIP3 and NIX”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1853(10), pp. 2775-2783.
- Niemann, J., Johne, C., Schröder, S., Koch, F. *et al.* (2017) “An mtDNA mutation accelerates liver aging by interfering with the ROS response and mitochondrial life cycle”, *Free Radical Biology and Medicine*, 102, pp. 174-187.
- Novak, I. (2012) “Mitophagy: a complex mechanism of mitochondrial removal”, *Antioxidants and Redox Signaling*, 17(5), pp. 794-802.
- Ogborn, D. I., McKay, B. R., Crane, J. D., Safdar, A. *et al.* (2015) “Effects of age and unaccustomed resistance exercise on mitochondrial transcript and protein abundance in skeletal muscle of men”, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 308(8), pp. R734-R741.
- O'Leary, M. F., Vainshtein, A., Iqbal, S., Ostojic, O. *et al.* (2013) “Adaptive plasticity of autophagic proteins to denervation in aging skeletal muscle”, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 304(5), pp. C422-C430.
- Organización mundial de la salud (2020) *Actividad física*. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/physical-activity> (Accedido: 5 de marzo de 2022).
- Palikaras, K., Lionaki, E. y Tavernarakis, N. (2015) “Coupling mitogenesis and mitophagy for longevity”, *Autophagy*, 11(8), pp. 1428-1430.
- Palikaras, K. y Tavernarakis, N. (2012) “Mitophagy in neurodegeneration and aging”, *Frontiers in genetics*, 3, pp. 297.
- Parihar, M. S. y Brewer, G. J. (2007) “Simultaneous age-related depolarization of mitochondrial membrane potential and increased mitochondrial reactive oxygen species production correlate with age-related glutamate excitotoxicity in rat hippocampal neurons”, *Journal of neuroscience research*, 85(5), pp. 1018-1032.
- Physical Activity Guidelines Advisory Committee. (2008) “In Physical Activity Guidelines Advisory Committee Report, 2008”, Department of Health and Human Services. *Nutrition Reviews*, 67, pp. 114-120.
- Raghavan, A., Sheiko, T., Graham, B. H. y Craigen, W. J. (2012) “Voltage-dependant anion channels: novel insights into isoform function through genetic models”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1818(6), pp. 1477-1485.
- Rana, A., Oliveira, M. P., Khamoui, A. V., Aparicio, R. *et al.* (2017) “Promoting Drp1-mediated mitochondrial fission in midlife prolongs healthy lifespan of *Drosophila melanogaster*”, *Nature Communications*, 8(1), pp. 448.
- Rittweger, J. (2010) “Vibration as an exercise modality: how it may work, and what its potential might be”, *European Journal of Applied Physiology*, 108(5), pp. 877-904.
- Roger, A. J., Muñoz-Gómez, S. A. y Kamikawa, R. (2017) “The Origin and Diversification of Mitochondria”, *Current Biology*, 27(21), pp. R1177-R1192.

- Sanz, A. (2016) "Mitochondrial reactive oxygen species: Do they extend or shorten animal lifespan?", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1857(8), pp. 1116-1126.
- Scarffe, L. A., Stevens, D. A., Dawson, V. L. y Dawson, T. M. (2014) "Parkin and PINK1: much more than mitophagy", *Trends in Neurosciences*, 37(6), pp. 315-324.
- Scherz-Shouval, R. y Elazar, Z. (2011) "Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology", *Trends in Biochemical Sciences*, 36(1), pp. 30-38.
- Schiavi, A. y Ventura, N. (2014) "The interplay between mitochondria and autophagy and its role in the aging process", *Experimental Gerontology*, 56, pp. 147-153.
- Schrepfer, E. y Scorrano, L. (2016) "Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism", *Molecular Cell*, 61(5), pp. 683-694.
- Sebastián, D., Sorianoello, E., Segalés, J., Irazoki, A. *et al.* (2016) "Mfn2 deficiency links age-related sarcopenia and impaired autophagy to activation of an adaptive mitophagy pathway", *The EMBO Journal*, 35(15), pp. 1677-1693.
- Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. y Ames, B. N. (1994) "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(23), pp. 10771-10778.
- Shimizu, S., Narita, M. y Tsujimoto, Y. (1999) "Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC", *Nature*, 399(6735), pp. 483-487.
- Song, Z., Ghochani, M., McCaffery, J. M., Frey, T. G. *et al.* (2009) "Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion", *Molecular Biology of the Cell*, 20(15), pp. 3525-3532.
- Sparling, P. B., Howard, B. J., Dunstan, D. W. y Owen, N. (2015) "Recommendations for physical activity in older adults", *British Medical Journal*, 350, pp. h100.
- Springer, M. Z. y Macleod, K. F. (2016) "In Brief: Mitophagy: mechanisms and role in human disease", *The Journal of Pathology*, 240(3), pp. 253-255.
- Tam, B. T., Pei, X. M., Yu, A. P., Sin, T. K. *et al.* (2015) "Autophagic adaptation is associated with exercise-induced fibre-type shifting in skeletal muscle", *Acta Physiologica*, 214(2), pp. 221-236.
- Teixeira, P. J., Carraça, E. V., Markland, D., Silva, M. N. *et al.* (2012) "Exercise, physical activity, and self-determination theory: a systematic review", *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*, 9, pp. 78.
- Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V. y Prudent, J. (2018) "Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms", *Essays in Biochemistry*, 62(3), pp. 341-360.
- Vainshtein, A. y Hood, D. A. (2016) "The regulation of autophagy during exercise in skeletal muscle", *Journal of Applied Physiology*, 120(6), pp. 664-673.
- Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M. *et al.* (2004) "Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1", *Science*, 304(5674), pp. 1158-1160.

- Wai, T. y Langer, T. (2016) “Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation”, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 27(2), pp. 105-117.
- Wang, Q., Zhang, M., Torres, G., Wu, S. *et al.* (2017) “Metformin Suppresses Diabetes-Accelerated Atherosclerosis via the Inhibition of Drp1-Mediated Mitochondrial Fission”, *Diabetes*, 66(1), pp. 193-205.
- Wohlgemuth, S. E., Lees, H. A., Marzetti, E., Manini, T. M. *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 Research*, 14(3), pp. 315-324.
- Wu, X., Hakimi, M., Wortmann, M., Zhang, J. *et al.* (2015) “Gene expression of inflammasome components in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of vascular patients increases with age”, *Immunity and Ageing*, 12(1), pp. 15.
- Yen, T. C., Chen, Y. S., King, K. L., Yeh, S. H. *et al.* (1989) “Liver mitochondrial respiratory functions decline with age”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 165(3), pp. 944-1003.
- Youm, Y. H., Grant, R. W., McCabe, L. R., Albarado, D. C. *et al.* (2013) “Canonical Nlrp3 inflammasome links systemic low-grade inflammation to functional decline in aging”, *Cell Metabolism*, 18(4), pp. 519-532.
- Zampieri, S., Pietrangelo, L., Loeffler, S., Fruhmann, H. *et al.* (2015) “Lifelong physical exercise delays age-associated skeletal muscle decline”, *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 70(2), pp. 163-173.
- Zhang, J., Rane, G., Dai, X., Shanmugam, M. K. *et al.* (2016) “Ageing and the telomere connection: An intimate relationship with inflammation”, *Ageing Research Reviews*, 25, pp. 55-69.
- Zhang, R., Chen, H. Z. y Liu, D. P. (2015) “The Four Layers of Aging”, *Cell Systems*, 1(3), pp. 180-186.