

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**“Envejecimiento y morfología mitocondrial en fibras  
musculares esqueléticas”**

**IGNACIO ALEJANDRO CONTRERAS HERNÁNDEZ**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN FISIOLOGÍA**

**Directores de Tesis: Dr. Enrique Jaimovich P.  
Dra. Andrea del Campo S.**

**2016**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER**

**Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magíster presentada por el candidato**

**IGNACIO ALEJANDRO CONTRERAS HERNÁNDEZ**

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Fisiología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 9 de Noviembre de 2016.**

**Prof. Dr. Enrique Jaimovich P.  
Director de Tesis**

**Prof. Dr. Andrea del Campo S  
Directora de Tesis**

**COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS**

**Prof. Dr. Jorge Bevilacqua R.**

**Prof. Dr. Jorge Ferreira P.**

**Prof. Dr. Julio César Cárdenas M.  
Presidente Comisión**

***A mi familia***

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer al profesor Dr. Enrique Jaimovich por haberme recibido en su laboratorio y por ayudarme durante todo este proceso. Siempre tuvo tiempo para discutir resultados y aconsejarme. También quiero agradecer a la Dra. Andrea del Campo por todo el tiempo dedicado. Siempre estuviste presente y me ayudaste en cada paso para lograr este objetivo.

Además, quiero agradecer profundamente a cada uno de los integrantes del Laboratorio de Fisiología Muscular. En cada momento me hicieron sentir apoyado y querido.

Por último, quiero agradecer a mis padres, a mi amor Catalina y a mis amigos por el apoyo incondicional durante estos años.



# ÍNDICE

ÍNDICE .....	I
ABREVIATURAS.....	IV
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT .....	VIII
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Definición de envejecimiento.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Descripción del músculo esquelético.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3. Efectos del envejecimiento en el músculo esquelético.....</b>	<b>3</b>
<b>1.4. Descripción general de las mitocondrias.....</b>	<b>4</b>
<b>1.4.1. Cambios mitocondriales durante el envejecimiento muscular.....</b>	<b>5</b>
<b>1.5. Dinámica mitocondrial.....</b>	<b>7</b>
<b>1.5.1. Fusión mitocondrial.....</b>	<b>8</b>
<b>1.5.2. Fisión mitocondrial.....</b>	<b>11</b>
<b>1.5.3. Funciones fisiológicas de la fusión y fisión mitocondrial.....</b>	<b>13</b>
<b>1.6. Morfología mitocondrial en el músculo-esquelético.....</b>	<b>17</b>
<b>1.6.1. Cambios en la morfología mitocondrial durante el envejecimiento en el músculo-esquelético.....</b>	<b>20</b>
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1. Medición de parámetros físicos y pruebas funcionales.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.1. Medición del peso corporal, peso del complejo gastrocnemio-sóleo y peso de la grasa epididimal.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.2. Pruebas de tiempo de prensión y de tiempo de nado.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.3. Pruebas de velocidad máxima en treadmill y de duración al 80% de la velocidad máxima en treadmill.....</b>	<b>25</b>

<b>3.2. Aislamiento de fibras musculares de los diferentes grupos etarios.....</b>	<b>26</b>
<b>3.3. Determinación de los cambios en la expresión génica .....</b>	<b>27</b>
3.3.1. <i>Extracción y cuantificación del RNA total .....</i>	27
3.3.2. <i>Transcripción reversa .....</i>	28
3.3.3. <i>PCR en tiempo real.....</i>	29
<b>3.4. Inmunodeterminación de las proteínas de interés.....</b>	<b>31</b>
3.4.1. <i>Obtención de extractos proteicos.....</i>	31
3.4.2. <i>Western Blot.....</i>	31
<b>3.5. Preparación del DNA plasmidial .....</b>	<b>33</b>
<b>3.6. Amplificación de plasmidios .....</b>	<b>33</b>
<b>3.7. Purificación del DNA plasmidial.....</b>	<b>34</b>
<b>3.8. Electroporación in vivo del músculo FDB .....</b>	<b>34</b>
<b>3.9. Microscopia confocal .....</b>	<b>35</b>
<b>3.10. Análisis digital de las imágenes.....</b>	<b>36</b>
3.10.1. <i>Cuantificación del volumen y el número .....</i>	36
3.10.2. <i>Determinación de la orientación.....</i>	36
<b>3.11. Consideraciones Bioéticas y de Bioseguridad .....</b>	<b>38</b>
<b>3.12. Análisis Estadístico .....</b>	<b>38</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1. Caracterización de los grupos etarios.....</b>	<b>39</b>
4.1.1. <i>Cambios en el peso corporal, el peso del complejo gastrocnemio-sóleo y la grasa epididimal. ....</i>	39
4.1.2. <i>Diferencias en el tiempo de prensión, tiempo de nado, velocidad máxima en treadmill y duración al 80% de la velocidad máxima en treadmill.....</i>	41
<b>4.2. Caracterización en la morfología mitocondrial .....</b>	<b>44</b>
4.2.1. <i>Diferencias en el volumen y en el número de objetos.....</i>	44
4.2.2. <i>Cambios en la orientación de las poblaciones mitocondriales.....</i>	47

4.3.	Cambios en los niveles de mRNA de Mfn-1, Mfn-2, Opa-1, Drp-1 y Fis-1. ....	50
4.4.	Diferencias en los niveles de las proteínas Mfn-1, Mfn-2, Opa-1, Drp-1 y Fis-1. ....	52
5.	DISCUSIÓN.....	55
6.	CONCLUSIÓN.....	66
7.	PROYECCIONES.....	688
8.	REFERENCIAS.....	69



## ABREVIATURAS

**ADOA:** Autosomal Dominant Optic Atrophy

**ATP:** Adenosine Triphosphate

**Bcl-2:** B-cell lymphoma 2

**Bak:** Bcl-2 homologous antagonist/killer Protein

**Bax:** Bcl-2 associated X Protein

**DNA:** Deoxyribonucleic Acid

**Drp-1:** Dynamin-related 1 Protein

**EDL:** Extensor digitorum longus

**FDB:** Flexor digitorum brevis

**Fis-1:** Mitochondrial fission 1 Protein

**GTP:** Guanosine Triphosphate

**GTPasas:** Hydrolase enzymes of Guanosine Triphosphate

**IMM:** Inner Mitochondrial Membrane

**Mff:** Mitochondrial Fission Factor

**Mfn-1:** Mitofusin-1 Protein

**Mfn-2:** Mitofusin-2 Protein

**MiD49:** Mitochondrial dynamics 49 kDa Protein

**MiD51:** Mitochondrial dynamics 51 kDa Protein

**MtDNA:** Mitochondrial DNA

**OMM:** Outer Mitochondrial Membrane

**Opa-1:** Optic Atrophy 1 Protein

**Oxphos:** Oxidative Phosphorylation

**Parkin:** E3 Ubiquitin Ligase Protein

**PCG-1** : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator

**PINK-1:** PTEN-induced putative kinase 1 Protein

**mRNA:** Messenger Ribonucleic Acid

**STOML2:** Stomatin-like 2 Protein

**SIMH:** Stress Induced Mitochondrial Hyperfusion

**VO<sub>2</sub>:** Oxygen Consumption

**VO<sub>2</sub>máx:** Maximal Oxygen Consumption

## RESUMEN

**Introducción:** Uno de los cambios que ocurren durante el envejecimiento es la pérdida de la masa muscular, proceso denominado sarcopenia. Esta disminución genera en el individuo una alteración en sus capacidades físicas, lo que finalmente va a afectar su calidad de vida. A nivel celular, algunos de los cambios que ocurren en el músculo esquelético durante el proceso de envejecimiento incluyen acumulación de lípidos, plegamiento inadecuado de proteínas estructurales y contráctiles, y una disfunción mitocondrial. Dentro de este contexto, si bien se ha descrito el rol del metabolismo mitocondrial en la función muscular y en el desarrollo de varias enfermedades, el papel de la morfología mitocondrial en el proceso de envejecimiento muscular ha sido escasamente estudiado.

**Materiales y métodos:** Se realizó una caracterización en términos de algunos parámetros físicos y pruebas funcionales a ratones machos C57BL/6 de 2-3 meses, 6-9 meses, 10-14 meses y de más de 16 meses. Luego se transfectó el músculo FDB (Flexor digitorum brevis) con el plasmidio Mt-DsRed en los distintos grupos etarios. Después se aislaron las fibras musculares del FDB y se obtuvieron las imágenes a través de microscopía confocal. Posteriormente se realizó el análisis de determinación de la morfología y de la orientación de la red mitocondrial utilizando el programa Image J. Finalmente, se realizó la medición de mRNA de Mfn-1, Mfn-2, Opa-1, Drp-1 y Fis-1 a través de PCR en tiempo real y se determinaron los niveles de estas proteínas a través de Western Blot.

**Resultados:** Durante el envejecimiento de estos animales observamos un aumento en el peso corporal y en la grasa epididimal. Sin embargo, sólo observamos un

aumento en la masa muscular en el grupo de 6-9 meses. Por otro lado, determinamos que la disminución en la fuerza muscular comienza en el grupo de 10-14 meses, de igual manera, observamos que la disminución en la resistencia física de los animales inicia en el mismo grupo etario. Por otra parte, determinamos que la morfología de la red mitocondrial se modifica constantemente durante el envejecimiento pasando de un estado más fragmentado en el grupo de 6-9 meses, hacia un estado más interconectado en el grupo de 10-14 meses y finalmente hacia un estado más fragmentado en el grupo de más de 16 meses. Además, observamos que esta red mitocondrial más interconectada se relaciona con un cambio en la orientación de la red mitocondrial. Es así como todos estos cambios se relacionaron con los niveles de mRNA de Mfn-1, mientras que sólo se relacionaron parcialmente con los niveles de mRNA de Mfn-2, Opa-1, Fis-1 y Drp-1. Finalmente, no se observaron diferencias durante el envejecimiento en los niveles de las proteínas Mfn-2, Opa-1 y Fis-1, sin embargo, los cambios observados en cuanto a la morfología de la red mitocondrial si se relacionaron con los niveles de Drp-1 tanto en el grupo de 6-9 meses como en el grupo de 10-14 meses.

**Conclusión:** Estos resultados indican que los cambios en la morfología de la red mitocondrial en el músculo esquelético durante el envejecimiento no son un proceso lineal como ha sido planteado por algunos autores sino que van a depender específicamente de la edad de los animales que se están evaluando. Además, observamos que los cambios en la morfología de la red mitocondrial hacia un estado más interconectado podrían estar relacionados con un cambio en la orientación de la red mitocondrial.

## ABSTRACT

**Introduction:** One of the changes that occur during aging is loss of muscle mass, a process called sarcopenia. This decrease generates an alteration in the physical capacities of the individual, which ultimately will affect their quality of life. At the cellular level, some of the changes that occur in skeletal muscle during the aging process include lipid accumulation, misfolding of structural and contractile proteins, and mitochondrial dysfunction. In this context, although the role of mitochondrial metabolism in muscle function and development of various diseases has been described, the role of mitochondrial morphology in muscle aging process has been little studied.

**Materials and Methods:** We characterize the physical parameters and performed muscle function tests to male C57BL/6 mice of 2-3 months, 6-9 months, 10-14 months and over 16 months old. FDB muscle of mice in the different groups were then electroporated with Mt-DsRed plasmid. After, the FDB muscle fibers were isolated and live-cell images were obtained by confocal microscopy. Thereafter analysis determining the morphology and the orientation of the mitochondrial network was performed using the NIH Image J. software. Finally, mRNA levels of Mfn-1, Mfn-2, Opa-1, Drp-1 and Fis -1 were measured by real-time PCR and levels of these proteins were determined by Western blotting.

**Results:** During aging an increase in body weight and epididymal fat of these animals were observed. However, a significant increase in muscle mass is only observed in the group of 6-9 months. On the other hand, we determined that there is a decrease in muscle strength that starts in the group of 10-14 months, similarly, the decrease in physical endurance of animals begins in the same group. Furthermore, we determined that the morphology of the mitochondrial network is constantly changing during aging going from a more fragmented in the group of 6-9 months state, towards a more interconnected state in the group of 10-14 months and finally to a fragmented phenotype in the group of more than 16 months. Moreover, we note that this interconnected mitochondrial network is related to a change in the orientation of the mitochondrial network. Thus, all this changes were related to levels of mRNA Mfn-1, while only partially related to levels of mRNA Mfn-2, Opa-1, Fis-1 and Drp-1. Finally, no differences were observed during aging at levels of Mfn-2, Opa-1 and Fis-1 proteins, however, the changes observed in the morphology of the mitochondrial network if they were related to levels Drp -1 in both the 6-9 months in the group of 10-14 months.

**Conclusion:** These results indicate that changes in the morphology of the mitochondrial network in skeletal muscle during aging are not a linear process as has been proposed by some authors but will depend specifically on the age of the animals being tested. Moreover, we note that changes in the morphology of the mitochondrial network to a more interconnected state could be related to a change in the orientation of the mitochondrial network.



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Definición de envejecimiento

El envejecimiento se define como una disminución irreversible en las funciones del cuerpo, progresiva y dependiente del tiempo, como resultado de la interacción entre factores genéticos y estocásticos. Estos llevan a una disminución en la capacidad del organismo para soportar tanto estímulos internos como externos, lo que se traduce en un aumento en la susceptibilidad a desarrollar enfermedades y un aumento en el riesgo de muerte (Lenaz y cols, 2000) (Adhietty and Hood, 2003). Actualmente, según datos de las Naciones Unidas, se estima que en el mundo existen 901 millones de personas con 60 años o más, lo que representa un 12% de la población global. Adicionalmente, se ha observado que la tasa de crecimiento anual de la población mundial durante la última década ha disminuido de un 1.24% a 1.18%, mientras que la tasa de crecimiento anual de la población adulta mayor ha aumentado a un 3.26%. A partir de estos datos se estima que para el año 2050, en la mayor parte del mundo con excepción del continente africano, las personas con 60 años o más van a representar un 25% o más de la población global (Naciones Unidas, 2015).



## **1.2. Descripción del músculo esquelético**

En la mayoría de los mamíferos el músculo esquelético comprende cerca del 55% de la masa corporal del individuo (Blaauw y cols, 2013); está compuesto de miofibras heterogéneas y especializadas que son capaces de mantener la postura corporal y realizar una amplia variedad de movimientos. Es esta diversidad de miofibras que permite que diferentes grupos de músculos cumplan distintas funciones no sólo ligadas a la motilidad, sino que también al control del metabolismo general (Schiaffino y cols 2010) (Blaauw y cols, 2013). Aunque histológicamente el músculo esquelético parece uniforme, está compuesto de distintas clases de fibras que se diferencian en su tamaño, metabolismo y función contráctil. Sobre la base de la expresión de las isoformas de la cadena pesada de la miosina, las miofibras pueden ser clasificadas como: Tipo I; Tipo IIa; Tipo IIx y Tipo IIb (Blaauw y cols, 2013) (Bottinelli y cols, 2006). Los diferentes tipos de fibras que existen en el músculo adulto, varían en la velocidad y fuerza de la contracción que realizan y en la resistencia a la fatiga que desarrollan. Cada tipo de fibra expresa una serie de proteínas y enzimas metabólicas características que les confieren propiedades macroscópicas específicas, de acuerdo al papel que estas desarrollan en los movimientos corporales (Bottinelli y cols, 2010). Los músculos que mantienen la postura corporal, sujetos a estímulos motores de baja frecuencia y contracciones repetidas, están compuestos principalmente por fibras de tipo I o lentas oxidativas, mientras que aquellos músculos involucrados en movimientos rápidos y poco frecuentes están principalmente compuestos por fibras de tipo IIb o rápidas glicolíticas (Bassel-Duby y Olson,2006) (Bottinelli y cols, 2006).

### **1.3. Efectos del envejecimiento en el músculo esquelético**

El envejecimiento en el músculo esquelético se caracteriza por una progresiva pérdida tanto de la masa como de la función muscular, proceso denominado sarcopenia (Rosenberg, 2011). Estudios demuestran que después de los 25 años, la masa muscular comienza a disminuir en humanos entre un 3% a un 10% por década (Rogers y cols, 1990) (Short y cols, 2005) siendo esta disminución más acelerada en edades más avanzadas (Hughes y cols, 2001). A pesar de esta evidente pérdida de masa muscular, una preocupación mayor se centra en que a medida que el individuo envejece, los cambios en la masa muscular y en la fuerza parecen dissociarse. Esta disociación es respaldada por los datos del Estudio Longitudinal de Envejecimiento de Baltimore (Metter y cols, 1999) y el estudio de Salud ABC (Goodpaster y cols, 2006) que mostraron que la fuerza muscular se redujo tres veces más rápido que la masa muscular, sugiriendo una disminución no sólo en la masa muscular sino en la calidad de la fibra muscular. Algunos de los cambios, a nivel celular, que se observan en la fibra muscular durante el envejecimiento incluyen la acumulación de lípidos intra o extracelulares, el plegamiento inadecuado de proteínas estructurales y contráctiles, y una disfunción mitocondrial (Cree y cols, 2004) (Johannsen y cols, 2012). Es así como la evidencia actual sugiere que la disminución en el contenido y en la función mitocondrial son factores fundamentales en el proceso de envejecimiento muscular (Johnson y cols, 2013).

#### **1.4. Descripción general de las mitocondrias**

Las mitocondrias son organelos de doble membrana altamente especializados en diferentes procesos biológicos en los eucariontes. Además de su rol canónico en la generación de ATP (Adenosine Triphosphate) (Brookes y cols, 2004) (Wallace, 2005) las mitocondrias participan en una serie de vías metabólicas, que incluyen la oxidación de los ácidos grasos, la biogénesis de “clusters” de hierro-azufre y el metabolismo del oxígeno. Adicionalmente, se ha descrito un papel protagónico de las mitocondrias en una serie de vías regulatorias, incluyendo la muerte celular inducida por estrés y la muerte celular programada (Goyal y cols, 2007) (Jagasia y cols, 2005), y procesos de señalización y tamponamiento de  $Ca^{2+}$  (Brookes y cols, 2004). Esta amplia variedad de funciones está facilitada por la alta compartimentalización de este organelo. Es así como las mitocondrias tienen dos sistemas de membranas que separan la matriz del citosol. La IMM (Inner Mitochondrial Membrane) es un sitio con una alta presencia de proteínas de la fosforilación oxidativa (OXPHOS), y en donde ocurren una serie de procesos que incluyen la importación de proteínas, el intercambio de metabolitos y el mantenimiento mtDNA (Mitochondrial DNA) (Wallace, 2005). Además, la IMM presenta invaginaciones llamadas crestas mitocondriales y forman otro sub-compartimento especializado de la IMM (Zick y cols, 2008). Por otra parte, la OMM (Outer Mitochondrial Membrane) es importante en eventos relacionados con la generación de ATP, incluyendo la regulación del transporte de metabolitos. Además, la OMM sirve como una plataforma para coordinar la función mitocondrial con la señalización extra mitocondrial participando en la regulación de la

homeostasis mitocondrial. En este contexto, el papel descrito de la OMM es de sensor y transductor de los estímulos apoptóticos, tanto en células sometidas a estrés como durante el desarrollo. Es así como la asociación de la OMM con varios factores apoptóticos, que incluyen proteínas de la familia de las Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), hacen de este compartimiento mitocondrial el sitio más importante para la transducción de la cascada de señales apoptóticas (Suen y cols, 2008) (Cheng y cols, 2008) (Chipuk y cols, 2006).

#### **1.4.1. Cambios mitocondriales durante el envejecimiento muscular**

Durante el envejecimiento en el músculo-esquelético se ha observado que el contenido mitocondrial disminuye, esto se ha evaluado a través de microscopia electrónica, de la determinación del número de copias del mtDNA, de proteómica y de la actividad de algunas enzimas importantes en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos como la citrato sintasa (Rogers y cols, 1990) (Short y cols, 2005) (Rooyackers y cols 1996) (Conley y cols, 2000). Además, se ha determinado en algunos estudios que existe una disminución en la producción máxima de ATP y en la producción de ATP basal de individuos de mayor edad, aunque todavía existe controversia en la literatura con respecto a esto (Short y cols, 2004).

Por otro lado, se ha determinado que al comparar individuos jóvenes, de mediana edad y viejos existe una disminución del 40% en la tasa de síntesis de proteínas mitocondriales (Rooyackers y cols, 1996). Además, se ha observado que durante el envejecimiento existe una disminución en las vías de proteólisis (Wohlgemuth y cols, 2010). Esta disminución es relevante porque se ha determinado en modelos

transgénicos de envejecimiento que al aumentar las proteínas relacionadas con la autofagia existe una mejora en la función mitocondrial (Johnson y cols, 2013).

Por otra parte, se ha comprobado en el músculo esquelético que al aumentar la edad existe una disminución en los niveles de PCG-1 (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator), uno de los principales coactivadores transcripcionales involucrados en la biogénesis mitocondrial, tanto en fibras rápidas como en fibras lentas (Chabi y cols, 2008) (Conley y cols, 2007) (Ghosh y cols, 2011) (Koltai y cols, 2012) (Short y cols, 2005). Estudios anteriores han observado que al sobreexpresar PCG-1 en el músculo esquelético de ratones de 22 meses de edad se produce una atenuación de la disfunción mitocondrial (Wenz y cols, 2009). De esta manera se ha vinculado directamente el envejecimiento del músculo esquelético con alteraciones en la biogénesis mitocondrial.

Conjuntamente se ha determinado que en el músculo esquelético existe una fuerte correlación positiva entre la edad y el daño oxidativo, este último medido a través de la peroxidación de lípidos, el contenido de grupos carbonilos en las proteínas y la cuantificación de la oxidación del DNA (Capel y cols 2005) (Fanó y cols, 2001). Actualmente se cree que el mtDNA es sensible al daño oxidativo debido a la carencia de histonas y a la proximidad que tiene respecto de las especies reactivas de oxígeno generadas por la cadena transportadora de electrones. De hecho, se ha observado que las anomalías en el mtDNA aumentan con la edad y estarían asociadas con el fenómeno de sarcopenia (Aiken y cols, 2002) (Bua y cols, 2002) (Bua y cols, 2006) (Wanagat y cols, 2001).

## 1.5. Dinámica mitocondrial

En los años cincuenta, estudios de microscopía electrónica revelaron la estructura de la mitocondria como un organelo individual y de doble membrana que presentaba en su membrana interna pliegues inusuales, los que se denominaron crestas mitocondriales. Si bien esta estructura es actualmente aceptada y ha sido comprobada, estudios recientes muestran que las mitocondrias no son organelos independientes uno de otro, sino que conforman una red interconectada y altamente dinámica que posee diferente morfología, dependiendo del tipo celular en estudio (Detmer y Chan, 2007). El número de túbulos, sus conexiones, la completa morfología del organelo así como su distribución subcelular está, por lo tanto, dinámicamente controlada y equilibrada según las necesidades de cada tipo celular (Zorzano y cols, 2004). El término dinámica mitocondrial se utiliza para referirse al menos a 3 fenómenos distintos que le ocurren a la red mitocondrial. Estos 3 procesos implican, el remodelado del retículo mitocondrial mediante procesos de fisión y fusión, el cual se encuentra estrechamente relacionado con el metabolismo celular y es controlado por la actividad de un grupo de enzimas hidrolasas de GTP (GTPasas) relacionadas con la familia de las dinaminas (Kuzmicic, 2011); la motilidad mitocondrial subcelular, particularmente importante en células polarizadas y que corresponde al desplazamiento de las mitocondrias dependiente de los motores de kinesina 1 y 3, y de los adaptadores Milton y Miro (Hirokawa y Takemura, 2005), lo que asegura el suministro local de ATP en procesos biológicos con elevados requerimientos energéticos y el uso de estos organelos como tampones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hollenbeck y Saxton, 2005), y el remodelado de la ultraestructura

mitocondrial y la condensación de su matriz, procesos considerados clásicamente como un reflejo del estado metabólico mitocondrial (Scalettar y cols, 1991). Actualmente, diversos estudios han propuesto que la capacidad de la red mitocondrial para llevar a cabo eficazmente sus funciones está probablemente determinada por su comportamiento dinámico y que el equilibrio funcional está regulado por la dinámica de fisión, fusión y la motilidad de estos organelos (Cereghetti y cols, 2008). Es por esta razón que se ha relacionado a la dinámica mitocondrial con el metabolismo, apoptosis y autofagia, entre otros (Kuzmicic y cols, 2011). De hecho hay evidencias que muestran que la modificación del estado metabólico celular determina de alguna forma la estructura de la red mitocondrial, lo que sugiere que cada evento metabólico podría estar asociado a una morfología mitocondrial propia (Taguchi y cols, 2007). Estudios han documentado, una disminución en las proteínas vinculadas a la dinámica mitocondrial conforme aumenta la edad, relacionando de esta forma, la morfología mitocondrial con el envejecimiento (Ibejunjo y cols, 2013).

### **1.5.1. Fusión mitocondrial**

Estudios de imágenes en células vivas han mostrado que las mitocondrias están en constante movimiento, y experimentan cambios estructurales, dependientes del estado energético celular (Bereiter-Hahn y cols, 2008). Es así como la red mitocondrial se desplaza hacia lugares de mayor requerimiento energético a lo largo del citoesqueleto, permitiendo que durante este trayecto mitocondrias individuales puedan fusionarse con la red mitocondrial tanto en sus membranas externas como

internas (Bernard y Rossignol, 2008). El hecho de que la fusión mitocondrial comprenda a ambas membranas, lo hace un evento mecanísticamente complejo y que requiere de la utilización de GTP (Guanosine Triphosphate) y la mantención de un adecuado potencial mitocondrial. La fusión de las membranas mitocondriales externas e internas, constituyen entonces dos etapas de un mismo proceso, pero muy disímiles e independientes; mientras que la fusión de la membrana externa requiere bajos niveles de hidrólisis de GTP, la fusión de la membrana interna requiere altos niveles de hidrólisis de GTP, así como la presencia de un potencial de membrana mitocondrial intacto y, por lo tanto, de una alta síntesis de ATP (Benard y cols, 2010; Detmer y Chan, 2007; de Brito y Scorrano, 2008). De esta manera se ha identificado que los principales reguladores de este complejo proceso en los mamíferos son las proteínas Mfn-1 (Mitofusin-1 Protein), Mfn-2 (Mitofusion-2 Protein) y Opa-1 (Optic Atrophy 1 Protein). Mfn-1 y Mfn-2 son GTPasas localizadas en la OMM (Chen y cols, 2003; Rojo y cols, 2002; Santel y Fuller 2001) y su papel esencial en la fusión mitocondrial se ha establecido a través de la generación de ratones con mutaciones dirigidas (Chen y cols, 2003). Es así como las células que carecen de Mfn-1 o Mfn-2 tienen una disminución importante en los niveles de fusión mitocondrial (Chen y cols, 2005; Chen y cols, 2003) y, por lo tanto, presentan una población mitocondrial altamente fragmentada. Además, se ha descrito que en ausencia de Mfn-1 y Mfn-2, no ocurren los procesos de fusión mitocondrial, lo que resulta en una pérdida total de los túbulos mitocondriales y en una función mitocondrial muy disminuida (Chen y cols, 2005). Al parecer Mfn-1 y Mfn-2 juegan roles similares en la fusión mitocondrial, ya que las células que carecen de una a



través de la sobreexpresión de la otra pueden ser rescatadas. Estos resultados indican que ambas proteínas homólogas tendrían actividades bioquímicas similares. Por otra parte, estudios de los últimos años han encontrado que, a pesar de su similitud, ambas mitofusinas poseerían funciones diferentes ajenas al proceso de fusión de la membrana mitocondrial externa. En este contexto, estudios han identificado que la función de Opa-1 depende de Mfn-1 pero no de Mfn-2 (Cipolat y cols, 2004) y que Mfn-1 muestra mayor actividad en el anclaje requerido para el proceso de fusión (Ishihara y cols, 2004). Por otro lado, Opa-1 es una GTPasa de la familia de las dinaminas que se encuentra localizada en el espacio intermembrana y está asociadas a la IMM (Griparic y cols, 2004; Herlan y cols, 2003; Olichon y cols, 2002; Satoh y cols, 2003; Wong y cols, 2000). Estas proteínas tienen una secuencia de destinación mitocondrial en el dominio amino-terminal, un dominio transmembrana, un dominio central GTPásico y un dominio C-terminal helicoidal (Bossy-Wetzel y cols, 2003; Jaroszewski y cols, 2009). El gen de Opa-1 produce múltiples isoformas de la proteína, debido a los cortes y empalmes alternativos que pueden dar origen a 8 isoformas de mRNA (Delettre y cols, 2001). Además, por analogía con su homólogo en levaduras Mgm1p, Opa-1 podría sufrir modificaciones postraduccionales que producirían isoformas adicionales. Al igual que Mfn1/2 se ha demostrado que Opa-1 es esencial para el proceso de fusión mitocondrial. Knockdown de Opa-1, por la presencia de un RNA interferente para la proteína, muestran un fenotipo de fragmentación mitocondrial consecuencia de una pérdida de la fusión mitocondrial (Chen y cols, 2005; Cipolat y cols, 2004; Griparic y cols, 2004). Además en estos knockdown de Opa-1 se producen aberraciones en la

estructura de las crestas mitocondriales (Griparic y cols, 2004; Olichon y cols, 2003). A pesar del gran número de estudios que muestran la participación de Opa-1 en el proceso de fusión, la función de esta proteína aún es controversial. Otros estudios han demostrado que al sobreexpresar Opa-1 se puede producir tanto fragmentación mitocondrial como alargamiento, lo que va a depender del sistema experimental utilizado (Chen y cols, 2005; Cipolat y cols, 2004; Griparic y cols, 2004; Olichon y cols, 2003).

### **1.5.2. Fisión mitocondrial**

La fisión mitocondrial es un proceso compuesto de varias etapas iniciado por el aumento en el reclutamiento de una proteína citoplasmática hacia la membrana externa de la mitocondria, seguido de su multimerización para formar un anillo alrededor de la superficie mitocondrial y la posterior fisión del organelo (Santel y Frank, 2008). Este mecanismo de fisión de la red mitocondrial ocurre en los mamíferos gracias a la interacción de dos proteínas: Drp-1 (Dynamin-related 1 Protein) y Fis-1 (Mitochondrial Fission 1 Protein) (Hom y Sheu, 2009). La proteína Drp-1 se encuentra principalmente en el citosol, pero un subgrupo de estas se localizan en los túbulos mitocondriales donde una parte va a marcar futuros sitios de fisión (Smirnova y cols, 2001). Drp-1 contiene varios dominios característicos de la familia de las dinaminas GTPasa que incluyen un dominio GTPasa, un dominio central y un dominio GTPasa efector. La inhibición de Drp-1 por la expresión de un mutante dominante negativo o mediante RNA interferencial genera un aumento en la longitud e interconectividad de los túbulos mitocondriales, lo que es consecuencia

de la inhibición del proceso de fisión (Lee y cols, 2004; Smirnova y cols, 2001). Por otro lado, Fis-1 es una proteína pequeña que se ubica de manera uniforme en el lado externo de la OMM a través de un único dominio transmembrana C-terminal. El dominio citosólico de Fis-1 consta de 6 hélices antiparalelas que forman un paquete helicoidal (Dohm y cols, 2004; Suzuki y cols, 2003; Suzuki y cols, 2005). Las cuatro hélices centrales se componen de dos tandem de repeticiones de tetratricopéptidos. Una de las superficies del paquete es cóncava y se cree que actúa como un sitio de unión para un pequeño ligando peptídico. Es así como se ha visto que la sobreexpresión de Fis-1 genera fragmentación mitocondrial de una manera dependiente de Drp-1 (James y cols, 2003; Yoon y cols, 2003). En este contexto, se ha publicado que los knockdown de Fis-1 producen elongación de los túbulos mitocondriales (Lee y cols, 2004).

Por otra parte, es importante mencionar que estudios recientes han observado que también otras proteínas participan del proceso de fisión mitocondrial. Una de ellas es el Mff (Mitochondrial Fission Factor) que tiene una participación fundamental en el reclutamiento de Drp-1 y, por lo tanto, en la regulación de la morfología mitocondrial en diferentes tipos de células (Otera y cols, 2010) (Losón y cols, 2013). Además, se ha observado que las proteínas de la dinámica mitocondrial de 49 kDa (MiD49) y de 51 kDa (MiD51) también regulan el reclutamiento de Drp-1, sin embargo, parecen inducir la fisión mitocondrial sólo bajo algunos contextos específicos (Losón y cols, 2014).

### **1.5.3. Funciones fisiológicas de la fusión y fisión mitocondrial**

Una de las primeras funciones que se le atribuyó al balance entre los procesos de fusión y fisión fue la de mantener las características morfológicas de las mitocondrias en determinados tipos celulares (Bleazard y cols, 1999; Chen y cols, 2003; Sesaki y Jensen, 1999). Es así como se ha visto que estos procesos opuestos trabajan en conjunto para mantener la forma, el tamaño y el número de mitocondrias. Sin embargo, durante la última década, se ha vuelto evidente que las funciones de la fusión y la fisión mitocondrial van mucho más allá que la apariencia de la mitocondria y que de hecho tienen importantes consecuencias fisiológicas (Chan, 2012).

De esta manera, se ha descrito que una de las consecuencias más importantes de la fusión mitocondrial es el intercambio del contenido entre las mitocondrias. Después de que dos mitocondrias se fusionan, hay una mezcla de la OMM, de la IMM y del contenido de la matriz. Sin embargo, a partir del análisis comparativo de células que no expresan Mfn 1/2 u Opa-1, parece ser que la fusión de la IMM y, por lo tanto, del contenido de la matriz mitocondrial serían los procesos más importantes (Song y cols, 2009). Por otro lado, en ensayos de fusión mitocondrial en donde se han utilizado proteínas fluorescentes verdes foto-activables se ha visto que cuando las mitocondrias se intersectan, se produce a menudo un intercambio del contenido sin que ocurra una fusión completa de los organelos (Liu y cols, 2009). Este tipo de fusión no cambia la morfología de la mitocondria involucrada y ha sido denominado como un fenómeno de “kiss-and-run”. La alta frecuencia de los eventos en que hay un intercambio del contenido mitocondrial hace pensar que estos procesos son

funcionalmente importantes. Las mitocondrias son organelos complejos con una huella genética dual. De aproximadamente las 1000 proteínas presentes en el proteoma mitocondrial, 13 cadenas de polipéptidos son codificados por el genoma mitocondrial y el resto son codificados por el genoma nuclear. Es así como durante la biogénesis mitocondrial los niveles de estos dos grupos de proteínas tienen que estar coordinadamente regulados. Si la fusión mitocondrial no existiera, cada una de las cientos de mitocondrias presentes en una célula común, actuarían en forma autónoma, lo que generaría una divergencia en sus perfiles funcionales y bioquímicos. De hecho, se ha observado que en células que no expresan Mfn 1/2 u Opa-1 existe un aumento en la heterogenicidad de las poblaciones mitocondriales (Chen y cols, 2005). De esta forma, con la fusión mitocondrial, el contenido de los organelos es intercambiado intermitentemente y, por lo tanto, la población mitocondrial es más homogénea. A la inversa, cuando la fusión mitocondrial se encuentra alterada, se produce una pérdida del intercambio del contenido mitocondrial y esto se ha relacionado con alteraciones funcionales como la inestabilidad del mtDNA o una capacidad respiratoria disminuida (Chan, 2012).

Por otro lado, se ha observado que la fusión mitocondrial tiene un papel importante en la regulación de la población mitocondrial. Esto se explica ya que la fusión es un proceso altamente dependiente del potencial de membrana mitocondrial; cuando la mitocondria se divide, la mitocondria “hija” se despolariza y pierde la capacidad de volver a fusionarse con la población mitocondrial (Chan, 2012). Estas observaciones han llevado a la conclusión de que las mitocondrias que pierden su potencial de membrana son separadas del resto de la población mitocondrial para ser

posteriormente degradadas mediante autofagia (Twig y cols, 2008). De esta misma forma, las mitocondrias que son moderadamente disfuncionales pueden ser rescatadas por la fusión mitocondrial, mientras que aquellas que son altamente disfuncionales pueden ser separadas y degradadas (Chan, 2012).

Respecto a la fisión mitocondrial se ha descrito que una de sus funciones más importante sería la de facilitar el proceso de apoptosis (Chan, 2012). La vía intrínseca de la apoptosis depende en forma crítica de la liberación del citocromo c y de otras moléculas pro-apoptóticas desde la IMM hacia el citosol (Tait y cols, 2010). La liberación del citocromo c ocurre cuando se permeabiliza la membrana mitocondrial externa y esto a su vez, depende de la acción de Bax (Bcl-2 associated X Protein) y Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer Protein) miembros de la familia de proteínas pro-apoptóticas Bcl-2. Es así como se ha observado en modelos de apoptosis, que las mitocondrias se fisianan cercano al momento de la liberación del citocromo c. Conjuntamente, se observó que la inhibición de Drp-1 puede prevenir la fisión de la mitocondria, reducir la liberación del citocromo c y disminuir los niveles de muerte celular (Frank y cols, 2001). La participación de Drp-1 en la apoptosis ha sido confirmada en varios estudios (Cassidy y cols, 2008; Germain y cols, 2005; Lee y cols, 2004), generando la idea de que Drp-1 podría trabajar junto a Bax y Bak para permeabilizar la membrana mitocondrial externa (Suen y cols, 2008). Sin embargo, aún la importancia de la fisión mitocondrial en la permeabilización de la membrana mitocondrial externa permanece en constante debate (Martinou y Youle, 2011; Sherian y Martin, 2010).

Por último, estudios recientes indican que los cambios en la dinámica mitocondrial pueden permitirle a la célula adaptarse a diferentes tipos de estrés. Muchas líneas celulares muestran mitocondrias elongadas en respuesta a irradiación de la luz ultravioleta, a una inhibición general en la transcripción del RNA y la escasez de nutrientes (Chan, 2012). Esta respuesta se le conoce como SIMH (Stress Induced Mitochondrial Hyperfusion) (Tondera y cols, 2009) y depende de Mfn-1, Opa-1 y de STOML2 (Stomatin-like 2 Protein). La SIMH resulta en un aumento en la producción de ATP y se piensa que es una respuesta de supervivencia al estrés. Es así como las células mutadas que son incapaces de generar esta respuesta muestran mayor vulnerabilidad frente al estrés y mayor probabilidad de apoptosis. Por otro lado, se ha observado que la fisión también tiene una participación en la adaptación de diferentes líneas celulares a la escasez de aminoácidos y suero (Gomez y cols, 2011; Griffin y cols, 2005). Cuando existe escases de nutrientes se activa la vía autofágica, la cual degrada componentes celulares para su reciclaje, pero las mitocondrias sufren procesos de fusión y, por tanto, el aumento de tamaño no les permite ser degradadas. Este proceso a diferencia de lo que ocurre en la SIMH, que es producida por el aumento en la fusión, ocurre por una inhibición de la fisión mitocondrial. De hecho se ha observado que durante este proceso hay una menor localización de Drp-1 en la mitocondria. También se ha observado que durante la escasez de nutrientes las células mutadas que son incapaces de generar esta elongación en las mitocondrias muestran un aumento de la mitofagia. La mitofagia es un proceso de control de calidad en donde las mitocondrias disfuncionales son selectivamente degradadas por la vía autofágica (Kim y cols, 2007). Es así como

se ha implicado a PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1 Protein) y a Parkin (E3 Ubiquitin Ligase Protein) en la vía de degradación de las mitocondrias disfuncionales (Narendra y cols, 2008; Youle y Narendra, 2011).

### **1.6. Morfología mitocondrial en el músculo-esquelético**

Uno de los aspectos que hay que tener presente al momento de analizar la morfología mitocondrial es que en el músculo esquelético existen dos poblaciones de mitocondrias, las subsarcolemales, que se localizan debajo de la membrana plasmática y que dan cuenta de aproximadamente un 20% de la masa mitocondrial total, y las mitocondrias intermiofibrilares, que se encuentran entre las miofibrillas y que dan cuenta del 80% restante (Hoppeler, 1986). Estas dos subpoblaciones poseen propiedades bioquímicas y funcionales específicas y exhiben un comportamiento diferente durante el envejecimiento (Koves y cols, 2005) (Ferreira y cols, 2010).

Durante el desarrollo del músculo esquelético las mitocondrias alcanzan diferentes niveles de organización. Es así como se ha demostrado en líneas celulares que derivan del músculo (H9c2) que las mitocondrias de los mioblastos, que se caracterizan por tener una forma alargada y por estar altamente interconectadas, durante el proceso de diferenciación a miotubos van cambiando su fenotipo hacia mitocondrias más fragmentadas y densas (Yi y cols, 2012). De la misma forma, se ha visto que los músculo FDB de ratones de 0.5 a 1 mes de edad tienen mitocondrias más alargadas y menos organizadas que las fibras musculares de los



ratones adultos, donde la mayoría de las mitocondrias intermiofibrilares globulares están posicionadas en la banda I, en proximidad al retículo sarcoplásmico y al túbulo T donde forman triadas (Boncompagni y cols, 2009). Respaldando esta idea, se ha observado que durante las etapas tempranas de la diferenciación del músculo existe una inhibición de Drp-1 (De Palma y cols, 2010).

En lo que respecta a fibras musculares esqueléticas completamente diferenciadas, se ha visto que los eventos de fusión se vuelven menos frecuentes, pero que generalmente resultan en una complementación de los dominios de la matriz más especializada y duradera (Eisner y cols, 2014). Estos cambios pueden ser atribuidos, al menos en parte, a la arquitectura altamente organizada de la fibra muscular, que ofrece pocas oportunidades para el movimiento de la mitocondria para unirse y separarse de otra mitocondria individual (Liu y cols, 2009; Twig y cols, 2010). De hecho se ha observado que la movilidad mitocondrial, que es un componente importante de la dinámica mitocondrial, es más bien escasa en las fibras musculares adultas y no tiene un papel significativo en los eventos de fusión, que ocurren en su mayoría con las mitocondrias vecinas (Eisner y cols, 2014).

Por otra parte, en el músculo-esquelético, se ha observado un nivel bajo de mRNA para Mfn-1 (Santel y cols, 2003). Sin embargo, se ha visto en músculos FDB de ratones, que al silenciar Mfn-1 y no Mfn-2 se produce una importante disminución en la conectividad mitocondrial y en la actividad de fusión, lo que indicaría un rol importante para Mfn-1. Además, en este mismo estudio se observó en los músculos que tienen una mutación de Opa-1 asociada a la atrofia óptica autosómica-dominante (ADOA), un compromiso de la dinámica de fusión mitocondrial, lo que

entrega algunas pistas respecto a cómo las mutaciones de Opa-1 pueden afectar la función muscular a través de la inhibición de la dinámica mitocondrial (Eisner y cols, 2014).

En lo que respecta a estudios en humanos, se ha observado que en el vasto lateral un 98% de las fibras tipo I y un 90% de las fibras tipo II tienen redes mitocondriales tubulares altamente interconectadas, que están estructuralmente organizadas para ocupar el espacio entre las miofibrillas y que se interconectan al nivel banda I. La red mitocondrial en las fibras tipo I es más gruesa y está organizada principalmente como cuadrados abiertos interconectados. En cambio, la red mitocondrial en las fibras tipo II consiste en mitocondrias tubulares más delgadas y largas. Además, se observó en un 2% de las fibras tipo I y en un 5% de las fibras tipo II mitocondrias fragmentadas profusión. En este mismo estudio, se observó que las fibras musculares de los pacientes que tenían dos semanas con la pierna inmovilizada, tenían un estado de transición entre profusión y profisión, mientras que los pacientes diabéticos no mostraron cambios en la distribución y en la organización de la red mitocondrial (Dahl y cols, 2015).

### **1.6.1. Cambios en la morfología mitocondrial durante el envejecimiento en el músculo-esquelético**

Estudios anteriores han descrito que durante el envejecimiento en el músculo esquelético es frecuente encontrar mitocondrias gigantes y disfuncionales, que se caracterizan por tener una red altamente interconectada y por presentar anomalías en su ultraestructura (Beregi y Regius, 1987). Estas observaciones han generado la idea de que durante el envejecimiento existiría un desbalance en la dinámica mitocondrial hacia la fusión. Al parecer, la hiperfusión mitocondrial podría representar un intento de hacer frente al aumento en los niveles de mtDNA mutado a través de la dilución del genoma mutante a lo largo de la red (Sato y cols, 2006). Respaldando esta hipótesis, encontramos un estudio realizado en ratones en donde la depleción específica en el músculo esquelético de Mfn1/2, altera la integridad del mtDNA y la capacidad metabólica (Chen y cols, 2010). En otro estudio se encontró que el músculo esquelético de ratones envejecidos, presentaba mitocondrias subsarcolemales más alargadas y menos circulares; y mitocondrias intermiofibrilares más largas y ramificadas, sin embargo, no se encontraron diferencias en el contenido de las proteínas Opa-1, Mfn-1, Mfn-2 y Drp-1 respecto a los ratones jóvenes, pero si se observó un aumento en la razón entre Mfn-2 y Drp-1, lo que sugiere un desbalance en los procesos de fusión/fisión en favor de la fusión mitocondrial durante el envejecimiento (Leduc-Gaudet y cols, 2015).

En contraste con la hipótesis de la hiperfusión mitocondrial, hallazgos recientes muestran que la fisión podría estar aumentada en ratas envejecidas, evidenciado por el aumento en la expresión de Fis-1 y Drp-1 respecto a las ratas jóvenes

(Marzetti y cols, 2013). Además, se observó una disminución de Mfn-2, lo que podría reflejar una disminución de la fusión (Iqbal y cols, 2013). Sin embargo, en otro estudio realizado en músculo esquelético de ratas envejecidas se encontró un aumento en las proteínas tanto de la fusión como de la fisión (O'Leary y cols, 2013). Otros estudios han encontrado que una excesiva activación de los procesos de fisión mitocondrial pueden inducir una disfunción mitocondrial y posterior atrofia muscular, al menos bajo ciertos paradigmas experimentales (Marzetti y cols, 2013). Esto se ha evidenciado usando un modelo de ratones transgénicos en donde se observó que la expresión de la maquinaria de fisión fue suficiente para inducir una disfunción mitocondrial, remodelación de la red mitocondrial, degradación de proteínas y atrofia de la fibra muscular (Romanello y cols, 2010).

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **HIPÓTESIS**

Durante el proceso de envejecimiento la morfología de la red mitocondrial se va modificando progresivamente hacia un estado más fusionado y esto se asocia a un aumento en la expresión de genes y proteínas relacionadas con la fusión mitocondrial.

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar las diferencias en la morfología de la red mitocondrial y en la expresión de genes y proteínas relacionados con los procesos de fusión y fisión mitocondriales, en fibras musculares esqueléticas de ratones de 2-3 meses, de 6-9 meses, de 10-14 meses y de más de 16 meses.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Objetivo 1. Medición del peso corporal, peso del complejo gastrocnemio-sóleo, peso de la grasa epididimal, tiempo de prensión, tiempo de nado, velocidad máxima en treadmill y resistencia al 80% de la velocidad máxima en treadmill en ratones de 2-3 meses, de 6-9 meses, de 10-14 meses y de más de 16 meses.

Objetivo 2. Determinar las diferencias en el volumen, número y orientación de las mitocondrias en fibras musculares esqueléticas aisladas de ratones de 2-3 meses, de 6-9 meses, de 10-14 meses y de más de 16 meses.

Objetivo 3. Cuantificar los cambios en el mRNA de Mfn-1, Mfn-2, Opa-1, Fis-1 y Drp-1 en fibras musculares esqueléticas aisladas de ratones de 2-3 meses, de 6-9 meses, de 10-14 meses y de más de 16 meses.

Objetivo 4. Establecer las diferencias en los niveles de las proteínas Mfn-1, Mfn-2, Opa-1, Fis-1 y Drp-1 en fibras musculares esqueléticas aisladas de ratones de 2-3 meses, de 6-9 meses, de 10-14 meses y de más de 16 meses.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Fisiología Celular del Músculo, Centro de Estudios Moleculares de la Célula (CEMC), Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

#### 3.1. Medición de parámetros físicos y pruebas funcionales.

##### 3.1.1. *Medición del peso corporal, peso del complejo gastrocnemio-sóleo y peso de la grasa epididimal.*

Primero se midió el peso corporal del animal con una pesa (Radwag, Polonia). Luego el animal se sacrificó por dislocación cervical y se extrajo el complejo gastrocnemio-sóleo para su posterior pesaje. Finalmente se abrió la pared abdominal del animal y se extrajo con mucho cuidado la grasa que se ubicaba en relación a los testículos (grasa epididimal) y se pesó.

##### 3.1.2. *Pruebas de tiempo de prensión y de tiempo de nado.*

Para la prueba de tiempo de prensión se construyó una estructura cuadrada de madera de 60 x 60 cm con una rejilla fijada en cada uno de sus lados. La prueba se iniciaba colocando el animal sobre la estructura durante un minuto para que se acostumbrara y luego se volteaba la estructura con cuidado quedando el animal sujeto de sus patas a la rejilla. Posteriormente se registraba el tiempo de prensión del animal con un cronómetro. Esta prueba se repetía 3 veces dándole un tiempo de descanso de 5 minutos al animal entre cada intento. Al otro día se realizaba la prueba de tiempo de nado. Para esta prueba se utilizaron dos baldes transparentes que eran llenados con agua tibia. Luego a los animales se les colocaba un peso

amarrado a la cola correspondiente al 10% de su peso corporal. Posteriormente se colocaba al animal en el balde con agua y este comenzaba a nadar instintivamente. La prueba se detenía cuando el animal se sumergía durante más de 5 segundos en el fondo del balde. El tiempo de nado se registró con un cronómetro.

### *3.1.3. Pruebas de velocidad máxima en treadmill y de duración al 80% de la velocidad máxima en treadmill*

Primero se realizó un acondicionamiento de los animales, este consistía en colocar a correr los animales en un treadmill diseñado para esta medición a una intensidad de 0.5 km/h durante 5 minutos tres días consecutivos. Luego se realizó la prueba de velocidad máxima en donde se colocó al animal en el treadmill a una velocidad de 0.5 km/h durante 3 minutos y se aumentó la velocidad 0.2 km/h cada dos minutos, estos tiempos fueron medidos con cronómetro. La prueba se detuvo cuando el animal no podía mantener la velocidad durante un período de 10 segundos. Al otro día, se realizó la prueba de duración al 80% de la velocidad máxima, para esto se calculó el 80% de la velocidad máxima alcanzada por cada animal y el protocolo que se utilizó fue colocar al animal durante 3 minutos a una velocidad de 0.5 km/h y luego se aumentó la velocidad hasta el 80% de la velocidad máxima. La prueba se detuvo cuando el animal no podía mantener la velocidad durante un período de 10 segundos y el tiempo fue registrado con cronómetro.



### **3.2. Aislamiento de fibras musculares de los diferentes grupos etarios**

Se utilizaron ratones C57BL/6 de 2-3 meses (como grupo control joven), 6-9 meses, 10-14 meses y de más 16 meses para la extracción de las fibras musculares adultas.

El animal fue sacrificado mediante dislocación cervical y posteriormente se realizó la extracción del músculo FDB de ambas extremidades. La extracción de fibras musculares del músculo FDB se realizó a través de digestión enzimática del músculo completo con colagenasa tipo IV (Worthington Biochemical Corporation, USA) (1mg/ml) por una hora y cuarenta minutos en medio DMEM (Thermo Fischer Scientific, USA) en agitación (170 rpm) y a 37°C. Posteriormente, el músculo fue disgregado mecánicamente utilizando pipetas de Pasteur de diferente diámetro, empezando desde la más ancha y hasta la más delgada. Este proceso se realizó en medio DMEM suplementado con 10% de suero de caballo y finaliza cuando no se observan acúmulos de fibras musculares y se puede distinguir fibras disgregadas macroscópicamente. Posterior a la disgregación, se sembraron las células en placas pretratadas previamente con Matriz Extracelular ECM (ECM Gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma, Sigma, USA), y se mantuvieron durante 10 minutos para permitir una mayor adhesión y estabilización de las fibras musculares, antes de adicionar el medio de cultivo (DMEM + 10% SC). Finalmente este cultivo primario se utilizó antes de 24 horas de realizada la extracción.

### **3.3. Determinación de los cambios en la expresión génica**

#### *3.3.1. Extracción y cuantificación del RNA total*

El RNA total de las fibras aisladas se obtuvo con el reactivo Trizol (Ambion, Life Technologies, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A cada placa de fibras se le adicionó 1 mL de Trizol y se homogenizó mecánicamente con pipeta. Posteriormente, se extrajeron las células de la placa en Trizol, y se almacenaron en tubos eppendorf de 1.5 ml a -20°C durante 24 horas. Al día siguiente se le adicionó a los tubos 200 µL de cloroformo, se les aplicó vórtex vigorosamente durante 10 segundos, se dejaron reposar las muestras durante 3 minutos y después se centrifugaron a 12500 rpm durante 15 minutos a 4°C. Luego se extrajo el sobrenadante cuidadosamente y precipitó con 500 µL de isopropanol y 4 µL de glycoblu (Ambion, Thermo Fischer Scientific, USA), para después guardar las muestras durante 24 horas a -20°C. A continuación se centrifugaron las muestras a 12300 rpm durante 15 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante obteniendo un precipitado que fue lavado con 1 ml de etanol al 70% y centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos a 4°C. Posteriormente se eliminó el etanol, se secaron los tubos y se dejaron decantar por aproximadamente 10 minutos. Finalmente se re-suspendió el precipitado en 10 µL de agua sin nucleasas (Winkler, Chile) y se determinó la concentración de RNA total con un espectrofotómetro (BioPhotometer Plus, Eppendorf, Alemania) a través de la medición de la absorbancia a 260 nm. La pureza de la extracción se determinó por la relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm y la integridad mediante geles de agarosa al 0.7%. Las muestras se guardaron a -80° para su posterior uso.

### 3.3.2. *Transcripción reversa*

A partir de los valores de concentración obtenidos en el espectrofotómetro se calcularon los valores necesarios de RNA total y agua sin nucleasas para obtener una concentración de 1 µg/ml de cDNA.

Luego se realizó una solución (Mix 1) que contiene 1 µL de dNTP (para las cuatro bases nitrogenadas) (Invitrogen, thermo Fisher scientific, USA) y 1 µL de PolyDT (Integrated DNA Technologies, Inc., Iowa, USA) por cada muestra del experimento más, el control –RT (sin transcriptasa reversa), el blanco y el error aleatorio. Una vez realizado esto se agregaron 2 µL de Mix 1 a cada tubo y se colocaron en el termociclador Mastercycle (Eppendorf, Alemania) programa SSII según el protocolo del fabricante. Mientras tanto se realizó otra solución (Mix 2) que contiene 3,5 µL de agua sin nucleasas, 4 µL de Buffer 5X (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, USA), 0,25 µL de RNAsin (Promega, USA), 0,25 µL de SSII (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, USA) y 2 µL de DTT 0,1 M (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, USA) por cada muestra del experimento más, el blanco y el error aleatorio. Además se realizó una tercera solución (Mix 3) que contiene 3,5 µL de agua sin nucleasas, 4 µL de Buffer 5X, 0,25 µL de RNAsin y 2 µL de DTT 0,1 M, que se utilizó sólo para el control-RT. Una vez terminada la primera etapa en el termociclador se agregaron 10 µL de Mix 2 a los tubos de las muestras y del blanco, y 10 µL de Mix 3 al tubo del control –RT. Luego se introdujeron nuevamente los tubos en el termociclador para una segunda etapa según el protocolo del fabricante. Finalmente las muestras de cDNA se guardaron a -20° para su posterior uso.

### 3.3.3. PCR en tiempo real

Para la determinación de los cambios en el mRNA de Opa-1, Mfn-1, Mfn-2, Fis-1 y Drp-1 se utilizó PCR en tiempo real utilizando el equipo Mx3000P (Agilent Technologies, USA) y el kit qPCR Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, USA). El Master Mix contiene las concentraciones adecuadas de tampón PCR, Taq DNA polimerasa, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs y SYBR Green. Se utilizaron 10 µL de Master Mix, 1 µL de cDNA, 1 µL de partidor sentido 10 pmol/µL y 1 µL de partidor antisentido 10 pmol/µL. El volumen final de la mezcla se ajustó a 20 µL con la adición de agua sin nucleasas. Además se realizaron las reacciones sin cDNA templado para corroborar la amplificación específica de la reacción de PCR. Para la amplificación de todos los genes estudiados se utilizó el siguiente protocolo de temperatura: 95°C por 5 minutos, y luego 40 ciclos a 90°C durante 15 segundos, 60°C por 15 segundos y 72°C por 15 segundos. Los valores fueron normalizados a la expresión del gen constitutivo b-actina y se reportaron mediante el método de  $2^{-C}$  (Livak and Schmittgen, 2001). Los productos de la PCR fueron verificados por análisis de las curvas de disociación. Los niveles de Mfn-1, Mfn-2, Opa-1, Drp-1, Fis-1 y B-actina fueron cuantificados utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias publicadas en NCBI GenBank con el programa PerlPrimer (Marshall, 2004).

<b>Nombre Partidor</b>	<b>Secuencia</b>
Beta actina forward	5'-TCTACAATGAGCTGCGTGTG-3'
Beta actina reverse	5'-TACATGGCTGGGGTGTGAA-3'
Mfn-1 forward	5'-ATTGGGGAGGTGCTGTCTC-3'
Mfn-1 reverse	5'-TTCGGTCATAAGGTAGGCTTT-3'
Mfn-2 forward	5'-ATGTTACCACGGAGCTGGAC-3'
Mfn-2 reverse	5'-ACCTGCTTCTCCGTCTGCAT-3'
Opa-1 forward	5'-GATGACACGCTCTCCAGTGAAG-3'
Opa-1 reverse	5'-CTCGGGGCTAACAGTACAACC-3'
Drp-1 forward	5'-GTTCCACGCCAACAGAATAC-3'
Drp-1 reverse	5'-CCTAACCCCCTGAATGAAGT-3'
Fis-1 forward	5'-AAGTATGTGCGAGGGCTGT-3'
Fis-1 reverse	5'-TGCCTACCAGTCCATCTTTC-3'

**Tabla 1. Secuencias de partidores utilizados.**

### **3.4. Inmunodeterminación de las proteínas de interés**

#### *3.4.1. Obtención de extractos proteicos*

Se sacrificó al animal por dislocación cervical, se extrajo el músculo FDB completo y se colocaron en tubos Eppendorf de 2 ml. Luego se agregó a los tubos 100 µL de buffer de lisis (Tris-HCl pH 7,5 (20 mM), Triton X-100 (1%), EDTA pH 8 (1 mM), EGTA pH 8 (1 mM), NaF (20 mM), Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (1 mM), Glicerol (10%), NaCl (140 mM), Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (10 mM), PMSF (1 mM) y mezcla de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Merck, USA)). Una vez con tampón de lisis se procedió a utilizar un homogenizador de tejidos (Biospec) hasta que no se apreciaran fragmentos del músculo. Los lisados se centrifugaron a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se extrajo el sobrenadante y se almacenó en alícuotas de 50 ul a -80 °C. Una de éstas alícuotas se utilizó para la cuantificación de proteínas totales y para el ensayo de western blot.

#### *3.4.2. Western Blot*

El lisado celular, correspondiente a la extracción de las proteínas totales, se cuantificó a través de la absorbancia a 600 nm utilizando el kit BCA (Thermo Scientific, USA). Posteriormente, el valor de cada muestra fue interpolado en una curva que utiliza BSA (albúmina de suero bovina) como estándar. Inmediatamente, las proteínas fueron suspendidas en una solución buffer denaturante que contiene: Tris-HCl pH 6,8 (62.6 mM), SDS (sodio dodecil sulfato) (2%), azul de bromofenol (0.01%), glicerol (10%) y DTT (100 mM) para posteriormente ser denaturados a

100°C por 2 minutos. Luego se cargaron 30 ug de proteínas, las que se separaron mediante electroforesis en geles de SDS-PAGE (TGXTM FastCastTM Acrylamide Kit 7.5, 10 y 12 %, BioRad, USA) a voltaje constante (100 V) por 2,5 horas. Después, las proteínas se electrotransfirieron a membranas de PVDF (Merck Millipore, USA). La transferencia se realizó por 90 minutos a amperaje constante (400 mA). Las membranas se bloquearon con solución de bloqueo, correspondiente a leche al 5% en TBS-tween20 0,1%, por 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se diluyeron en solución de bloqueo (1:1000) y las membranas se incubaron con anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces por 10 minutos en TBST y fueron incubadas con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (Donkey anti-Mouse IgG-HRP and anti-Rabbit IgG-HRP, Thermo Fischer Scientific, USA) (1:5000) por 1 hora a temperatura ambiente.

La visualización de la marca quimioluminiscente se realizó con un kit quimioluminiscente ECL Supernova (Cyanagen, Bologna, Italia) y la detección digital se realizó mediante el equipo Chemidoc (Bio-Rad, USA). Las imágenes digitalizadas de los Western Blot se utilizaron para las mediciones densitométricas con el software ImageJ.

### **3.5. Preparación del DNA plasmidial**

Transformación de bacterias: Bacterias *E. coli* cepa DH5 quimiocompetentes (25 uL D.O. 0,6-0,8 nm) se transformaron en presencia de 0,1 ug del plásmido de interés. A esta mezcla se le agregó 1 mL de medio de transformación SOC, Triptona 20%, extracto de levaduras 5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, Mg 2 M, Glucosa 2 M y se incubaron a 4° C por 30 minutos, seguido de un golpe térmico a 42°C por 45 segundos. Luego se incubaron por 45 minutos a 37°C. Posteriormente 100 uL de la suspensión de bacterias se sembraron y aislaron sobre una placa con agar al 1,5% de medio SOB, Triptona 20%, Extracto de levadura 5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, que contenía ampicilina (United State Biological, USA) 50 ug/mL, como antibiótico de selección, toda la noche a 37° C. Después, se seleccionaron las bacterias que completaron exitosamente la transformación y que formaron colonias aisladas, y se expandieron en medio antes descrito suplementado con ampicilina para luego ser congeladas a -80° C en DMSO 7%.

### **3.6. Amplificación de plasmidios**

La amplificación de plasmidios se realizó en 100 mL de medio SOB con ampicilina (50 ug/ mL) se inocularon con bacterias almacenadas en DMSO y se incubaron durante toda la noche a 37° C en agitación (180 rpm). Posteriormente las bacterias se centrifugaron a 5000 rpm por 15 minutos a 4° C.



### **3.7. Purificación del DNA plasmidial**

La purificación del DNA plasmidial se llevó a cabo mediante el kit QIAfilter Plasmid Maxi Kit, (Qiagen, Dinamarca). La determinación de la concentración de cada plasmidio se realizó a través de la determinación de su absorbancia 260/280 nm. La calidad del DNA plasmidial se evaluó en un gel de agarosa al 1% en presencia de bromuro de etidio y se comparó con el estándar 1 Kb DNA Mass Ladder.

### **3.8. Electroporación in vivo del músculo FDB**

La electroporación del plasmidio mt-DsRed (Clontech Laboratories Inc, Takara Bio Company, USA) en los músculos FDB de los ratones adultos se realizó como se ha descrito previamente (DiFranco y cols, 2009). Brevemente, los animales fueron anestesiados usando isofluorano (Baxter, USA) al 5% para poder inyectar la planta de la pata de los ratones con 2 mg/ml de hialuronidasa tipo IV (Sigma-Aldrich), y una hora después, 20 ug de cDNA fueron inyectados en el mismo lugar. Posteriormente se realizó la electroporación con agujas de acupuntura como electrodos aplicando 20 pulsos de 100 V y 20 ms de duración a 1 Hz utilizando un estimulador de pulsos GRASS S48 (GRASS, USA). Una vez transcurridos entre 7 a 10 días después de la electroporación los animales fueron sacrificados y se extrajeron los músculos FDB de ambas patas según protocolo presentado anteriormente.

### **3.9. Microscopia confocal**

Los cubreobjetos conteniendo las células que fueron electroporadas con el plasmidio mt-DsRed se lavaron con 1 ml de solución Krebs y se montaron en una cámara de perfusión de 1 mL de capacidad, con 500  $\mu$ L de solución y posteriormente se visualizaron en un microscopio confocal C2 Plus Espectral, tras ser excitadas con un láser de argón a una longitud de onda de 543 nm. Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron como secuencias de profundidad en el eje Z cada 1  $\mu$ m, siendo cada secuencia de 40-50 imágenes. Se utilizó el lente objetivo de 63X el cual posee una apertura numérica de 1,2. Las dimensiones de las imágenes obtenidas fueron de 1024 x 1024 pixeles (Parra y cols, 2008).

### **3.10. Análisis digital de las imágenes**

#### *3.10.1. Cuantificación del volumen y el número*

A las secuencias de imágenes (stacks) obtenidas con el plasmidio mt-DsRed se les aplicó un modelo teórico de algoritmo de deconvolución de Landweber y la PSF (Point Spread Function) correspondiente a las condiciones experimentales. En detalle a las imágenes se les fijó manualmente un umbral (threshold), con el cual se realizó la segmentación de la imagen entre vóxeles (voxels) correspondientes a la red mitocondrial y vóxeles correspondientes a ruido de fondo. El número de vóxeles mitocondriales multiplicado por el volumen de cada vóxel da como resultado el volumen mitocondrial total. Posteriormente, el algoritmo agrupa los vóxeles que son contiguos entre si. Cada grupo de vóxeles contiguos es reconocido como una mitocondria individual. De esta forma, el número de grupos corresponde al número de mitocondrias en la célula, y el volumen total dividido por el número de mitocondrias corresponde al tamaño promedio de las mitocondrias (Parra y cols, 2008).

#### *3.10.2. Determinación de la orientación*

Se realizó una segmentación semi-automática a las imágenes obtenidas anteriormente. Primero se aplicó un grupo de filtros de Gabor (Grigorescu y cols, 2002) usando 6 orientaciones ( $\theta = 0^\circ, 30^\circ, 60^\circ, 90^\circ, 120^\circ, 150^\circ$ ), 6 escalas ( $\sigma_x = 0.1, 1.1, 2.1, 3.1, 4.1, 5.1$ ;  $\sigma_y = \sigma_x / \gamma$ ), y los parámetros  $\gamma = 0.5$ , y  $\lambda = 4$  fueron aplicados al conjunto de imágenes, obteniendo 36 imágenes filtradas.

Luego en cada ubicación de pixel se seleccionó la máxima intensidad de las 36 imágenes. Posteriormente, sobre la imagen de máxima intensidad se aplicó un umbral manual por un biólogo experto para la segmentación de las fibras. Usando la información de cuál de las 36 imágenes tenía el valor máximo asociado a cada pixel se determinó la asociación con una de las 6 posibles orientaciones. Después se estimó la distribución de la orientación de cada pixel de la fibra respecto del eje principal de esta. La orientación relativa fue obtenida primero segmentando toda la célula para obtener el eje principal de la fibra (Castañeda y cols, 2014) y luego, sustrayendo la orientación de la célula a cada orientación de pixel. Para comparar la distribución de la orientación de los pixeles de todas las fibras se realizaron histogramas divididos en 3 o en 8 bins, donde 0 representa el número total de pixeles asociados a la misma orientación de la fibra. El número de bins fue seleccionado para evitar los bins vacíos.

### **3.11. Consideraciones Bioéticas y de Bioseguridad**

Los animales se utilizaron de acuerdo al Protocolo de Uso y Cuidado de Animales aprobado por la Comisión de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La Tesis cumplió con los requerimientos básicos de Bioseguridad para ser desarrollado, además se adecua a las exigencias establecidas por los manuales: CONICYT Bioseguridad primera edición, 1994, Manual de Normas de Bioseguridad, segunda edición 2008, Centro de Control y Prevención de Enfermedades, CDC, cuarta edición y el Manual de Bioseguridad en Laboratorios, Organización Mundial de la Salud OMS, Ginebra 2005.

### **3.12. Análisis Estadístico**

Los resultados se expresaron como el valor promedio  $\pm$  error estándar (SEM) de a lo menos tres experimentos desarrollados en forma independiente. Se realizó el análisis estadístico de múltiple varianza (ANOVA paramétrico) con un nivel de confianza aceptado inferior al 5% ( $p < 0,05$ ). El test de Tuckey se utilizó como post-test estadístico.

## 4. RESULTADOS

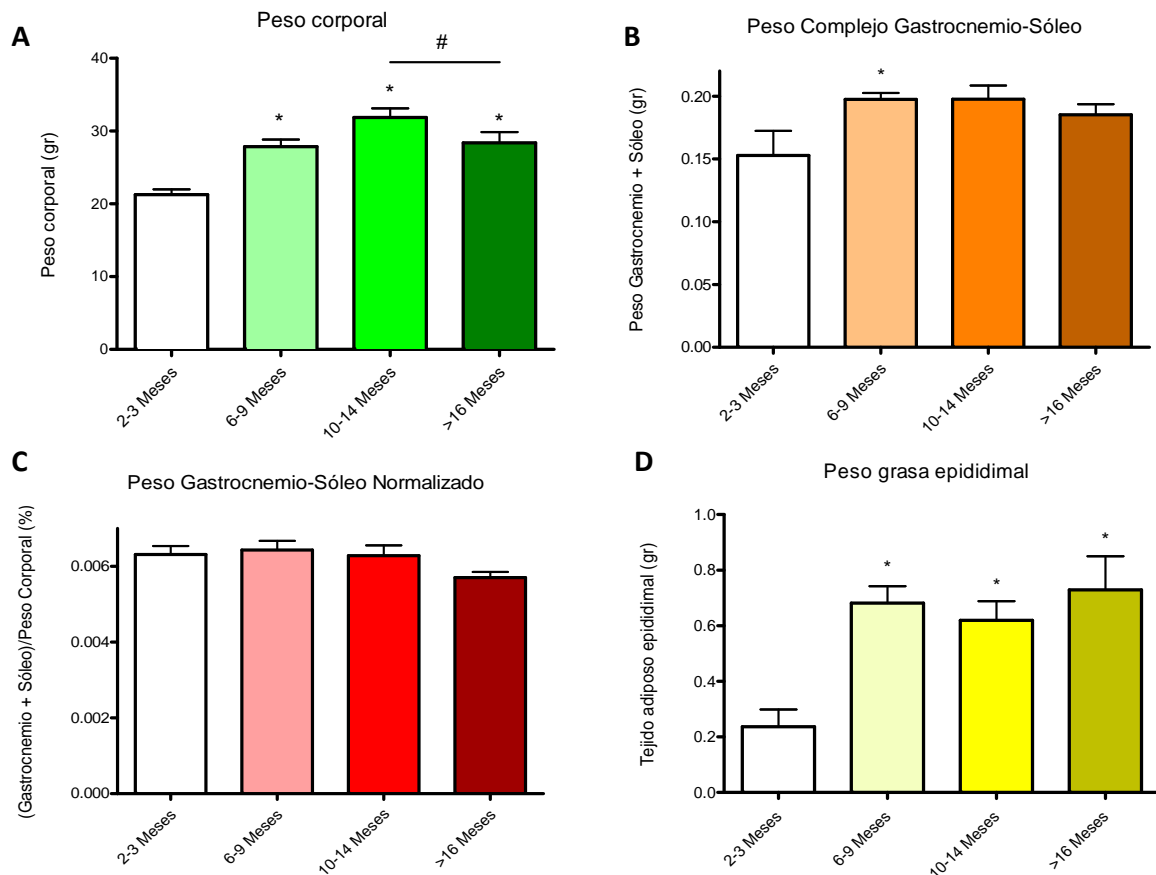
### 4.1. Caracterización de los grupos etarios.

#### 4.1.1. Cambios en el peso corporal, el peso del complejo gastrocnemio-sóleo y la grasa epididimal.

En la caracterización de los parámetros físicos de los diferentes grupos etarios podemos observar un aumento en el peso corporal de los animales de los grupos de 6-9 meses, 10-14 meses y más de 16 meses, respecto del grupo joven, además se determinó que existe una disminución en el peso corporal en el grupo de más de 16 meses respecto del grupo de 10-14 meses (Figura 1A). Esto indicaría que el peso corporal de los animales aumenta progresivamente hasta alcanzar un valor máximo en etapas tempranas del envejecimiento para posteriormente disminuir en etapas más avanzadas.

Para determinar la influencia de la masa muscular y del tejido adiposo en el peso corporal se midió el peso del complejo gastrocnemio-sóleo y el peso de la grasa epididimal. Es así como se encontró un aumento en el peso del complejo gastrocnemio-sóleo en el grupo de 6-9 meses respecto del grupo joven (Figura 1B), sin embargo, este aumento significativo no se observó en los grupos de 10-14 meses ni de más de 16 meses. Esto demostraría que la masa muscular alcanza su valor máximo en los animales en edad adulta para posteriormente disminuir durante el envejecimiento. No obstante, al normalizar el peso del complejo gastrocnemio-sóleo por el peso corporal del animal no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 1C).

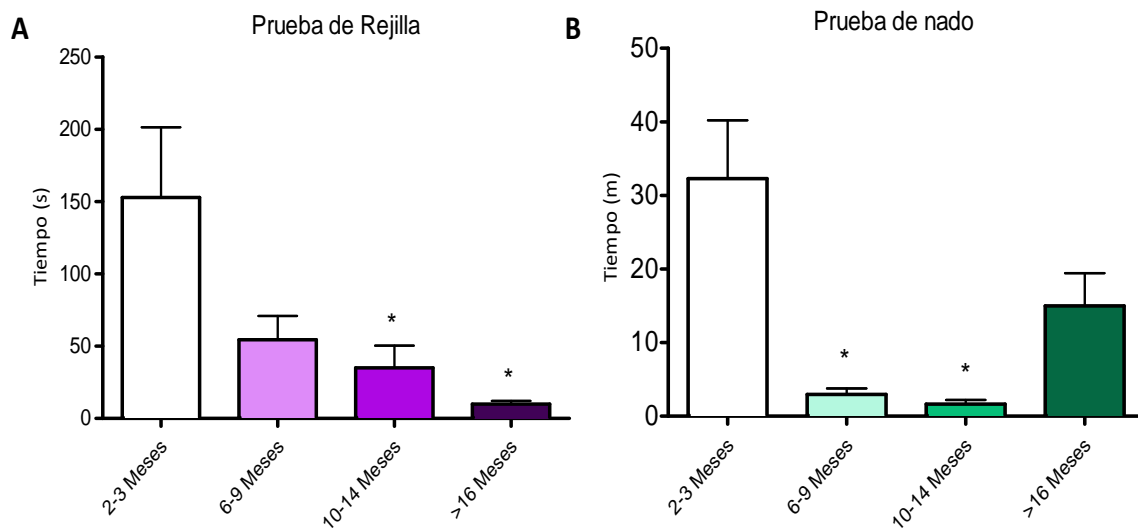
En cuanto a la medición del tejido adiposo epididimal, se observó un aumento en el grupo de 6-9 meses, de 10-14 meses y de más de 16 meses respecto del grupo joven (Figura 1D). Esto indicaría que el aumento en el tejido adiposo de los animales ocurre una vez que han alcanzado la edad adulta y este aumento es mantenido durante el envejecimiento.



**Figura 1.** Caracterización de los grupos de estudio en términos del peso corporal (A), peso del complejo gastrocnemio-sóleo (B), peso del complejo gastrocnemio-sóleo/ peso corporal (C), y peso de la grasa epididimal. Resultados entregados como promedio +/- desviación estándar. N= 5-7 ratones por grupo. \*p<0.05 vs grupo. #p>0,05 vs grupo de 10-14 meses.

4.1.2. Diferencias en el tiempo de prensión, tiempo de nado, velocidad máxima en treadmill y duración al 80% de la velocidad máxima en treadmill.

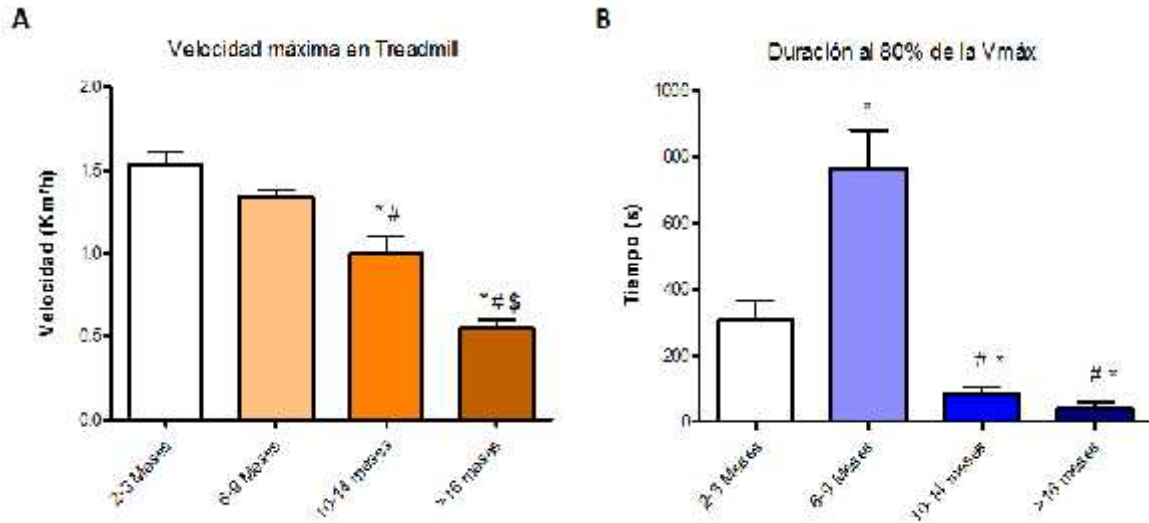
Para determinar la capacidad física de los animales, específicamente la fuerza muscular, se realizó una prueba de tiempo de prensión en rejilla, donde los resultados muestran que el tiempo de prensión disminuyó en los grupos de 10-14 meses y de más de 16 meses, respecto del grupo joven (Figura 2A). Estos resultados indicarían que la fuerza muscular de los animales disminuye en forma progresiva durante el envejecimiento. Posteriormente para determinar la resistencia física de los animales se realizó una prueba de tiempo de nado, donde se observó una disminución en los grupos de 6-9 meses y 10-14 meses respecto del grupo joven, pero no así en el de más de 16 meses (Figura 2B).



**Figura 2.** Prueba de rejilla (A) y prueba de nado (B) en diferentes grupos etarios. Resultados entregados como promedio +/- desviación estándar. N= 5-7 ratones por grupo. \* $p < 0.05$  vs grupo joven.



Para una mejor caracterización de las capacidades físicas de los animales, se realizó una prueba de velocidad máxima en treadmill donde se observó una disminución en la velocidad máxima alcanzada en los grupos de 10-14 meses y de más de 16 meses respecto del grupo joven, una disminución en el grupo de 10-14 meses respecto del grupo de 6-9 meses y una disminución en el grupo de más de 16 meses respecto del grupo de 10-14 meses (Figura 3A). Estos resultados demuestran que durante el envejecimiento de estos animales existe una disminución progresiva en la capacidad de tolerar esfuerzos físicos máximos. Además, para la determinación de la resistencia física, se realizó una prueba de duración al 80% de la velocidad máxima en treadmill y se observó un aumento en el tiempo de duración en el grupo de 6-9 meses respecto del grupo joven, y una disminución en los grupos de 10-14 meses y de más de 16 meses respecto del grupo joven y de 6-9 meses (Figura 3B). Esto indica que la resistencia física de éstos animales alcanza su valor máximo durante la adultez, para posteriormente disminuir en edades más avanzadas.



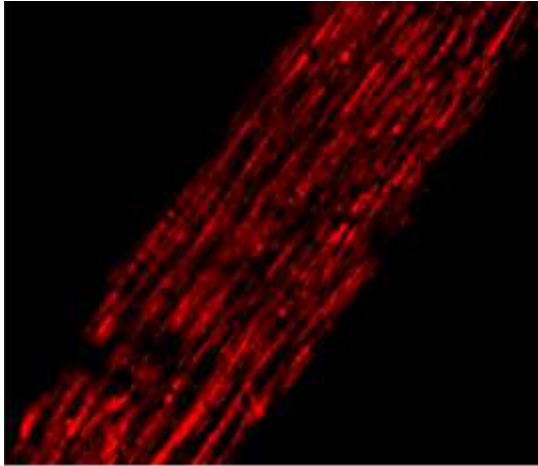
**Figura 3.** Prueba de velocidad máxima en Treadmill (A) y prueba de resistencia al 80% de la velocidad máxima en Treadmill (B) en diferentes grupos etáreos. Resultados entregados como promedio +/- desviación estándar. N= 4 ratones por grupo. \*p<0.05 vs grupo joven. # p<0.05 vs grupo de 6-9 meses. \$ p<0.05 vs grupo de 10-14 meses.

## **4.2. Caracterización en la morfología mitocondrial**

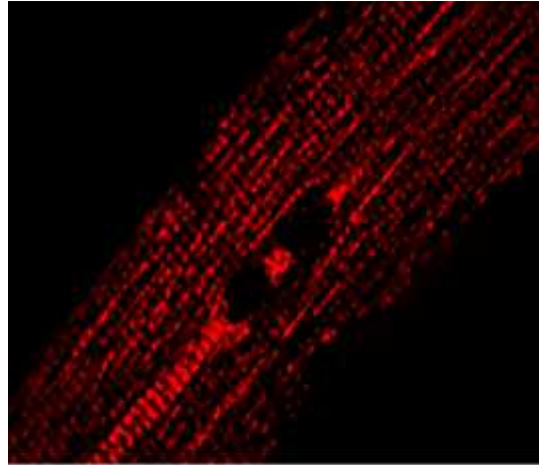
### **4.2.1. Diferencias en el volumen y en el número de objetos.**

Los resultados de la determinación de la morfología mitocondrial a través de microscopia confocal de fibras aisladas de FDB electroporadas con el plasmidio Mt-DsRed (Figura 4), evidencian un aumento en el volumen de los objetos en el grupo de 10-14 meses respecto del grupo joven, y una disminución en el volumen de los objetos tanto en el grupo de 6-9 meses como en el de más de 16 meses respecto del grupo 10-14 meses (Figura 5A). En cuanto al número de objetos nuestros resultados muestran un aumento en el grupo de 6-9 meses como en el grupo de más de 16 meses respecto tanto del grupo joven como de 10-14 meses (Figura 5B). Estos resultados sugieren que los cambios en la morfología mitocondrial durante el envejecimiento no son un proceso lineal, sino que van a depender de la edad del grupo que se está evaluando. Esto indicaría una morfología de la red mitocondrial más fragmentada en el grupo de 6-9 meses, luego más interconectada en el de 10-14 meses y nuevamente más fragmentada en el de más de 16 meses.

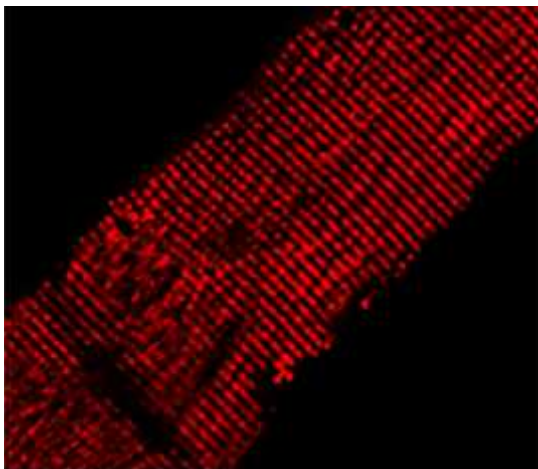
2-3 meses Mt-DsRed



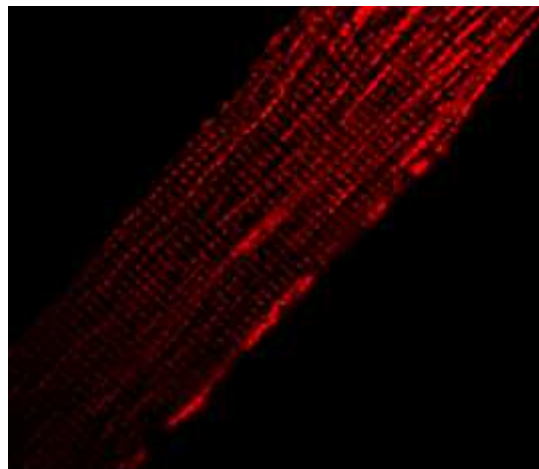
6-9 meses Mt-DsRed



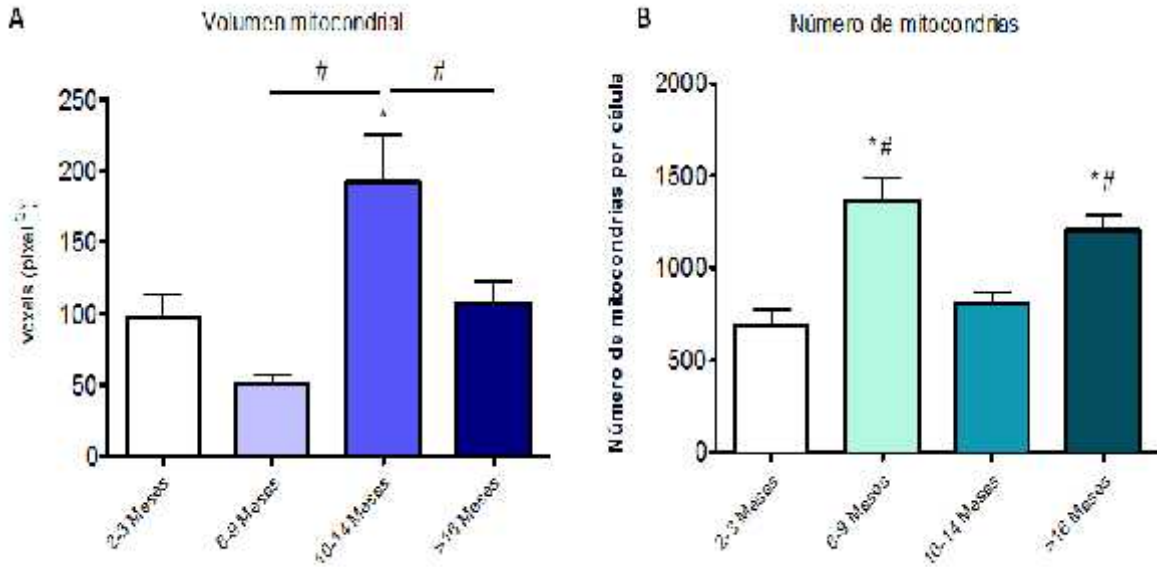
10-14 meses Mt-DsRed



Más de 16 meses Mt-DsRed



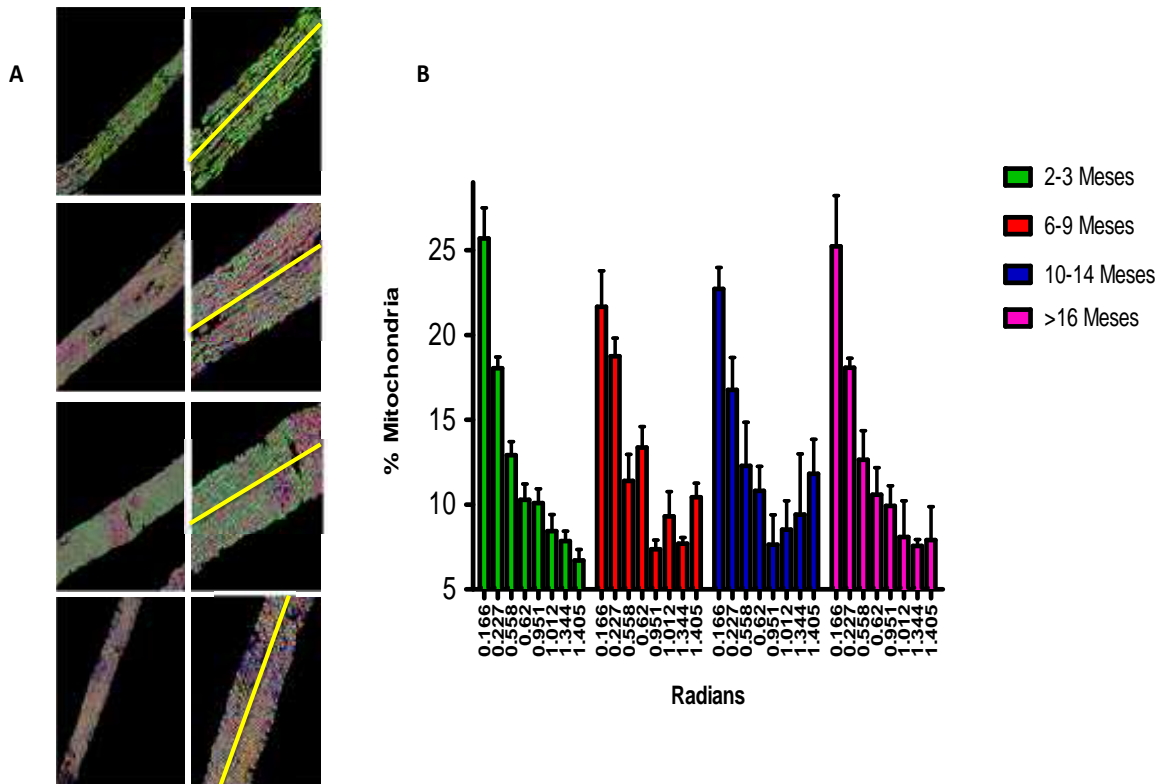
**Figura 4.** Microscopia confocal de fibras aisladas de FDB electroporadas con el plasmidio Mt-DsRed en los diferentes grupos de estudio.



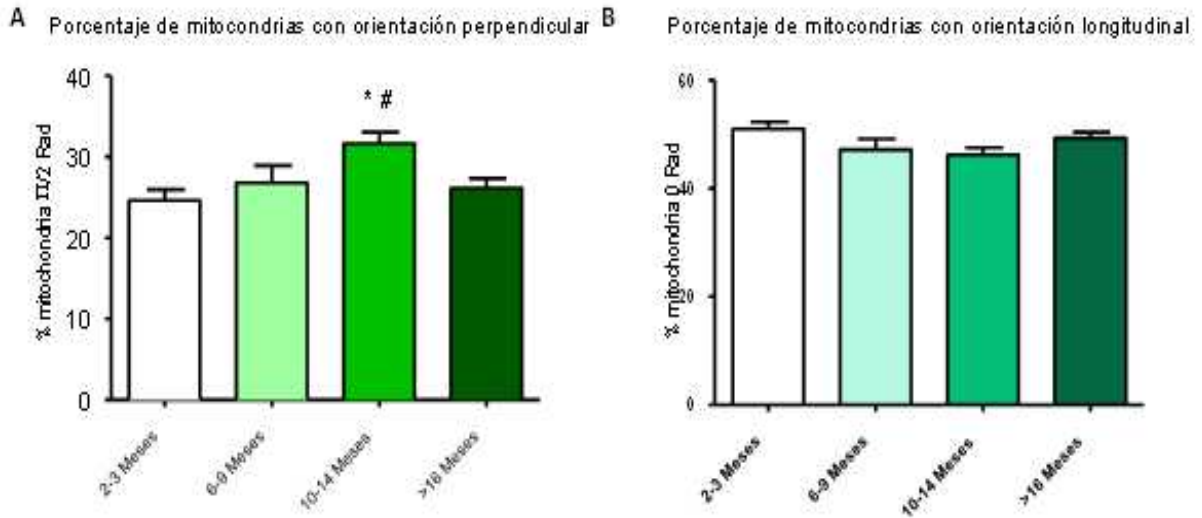
**Figura 5.** Efecto del envejecimiento en el volumen mitocondrial (A) y en el número de mitocondrias (B). Resultados entregados como promedio +/- desviación estándar. N= 4-5 ratones por grupo. \* $p < 0.05$  vs grupo joven. # $p > 0,05$  vs grupo de 10-14 meses.

#### 4.2.2. Cambios en la orientación de las poblaciones mitocondriales.

A las imágenes de las fibras musculares utilizadas anteriormente se les aplicó una segmentación semiautomática para determinar la distribución de la red mitocondrial. Es así como se determinó que existen diferencias en la orientación de los objetos respecto al eje longitudinal de la fibra muscular en los diferentes grupos etarios (Figura 6). Para cuantificar éstas diferencias, se agruparon las distintas orientaciones en dos grupos, un grupo con una orientación paralela al eje longitudinal de la fibra muscular y un grupo con una orientación perpendicular al eje longitudinal de la fibra muscular. A partir de estos análisis, se observó en el grupo de 10-14 meses un aumento en el número de objetos con una orientación perpendicular al eje longitudinal de la fibra muscular respecto del grupo joven. Además se observó en el grupo de más de 16 meses una disminución en el número de objetos con una orientación perpendicular al eje longitudinal de la fibra muscular respecto del grupo de 10-14 meses (Figura 7A). En cuanto a los objetos con una orientación paralela al eje longitudinal de la fibra muscular, no se evidenciaron cambios en los diferentes grupos (Figura 7B). Estos resultados indican que los cambios en la morfología mitocondrial hacia un estado más interconectado en el grupo de 10-14 meses se relacionan con un cambio en la orientación de la red mitocondrial.



**Figura 6.** Imágenes representativas del análisis de orientación de la red mitocondrial en los diferentes grupos etarios (A). Histograma que representa la orientación de la red mitocondrial durante el envejecimiento (B). Resultados entregados como promedio +/- desviación estándar. N= 4-5 ratones por grupo. \*p<0.05 vs grupo joven.

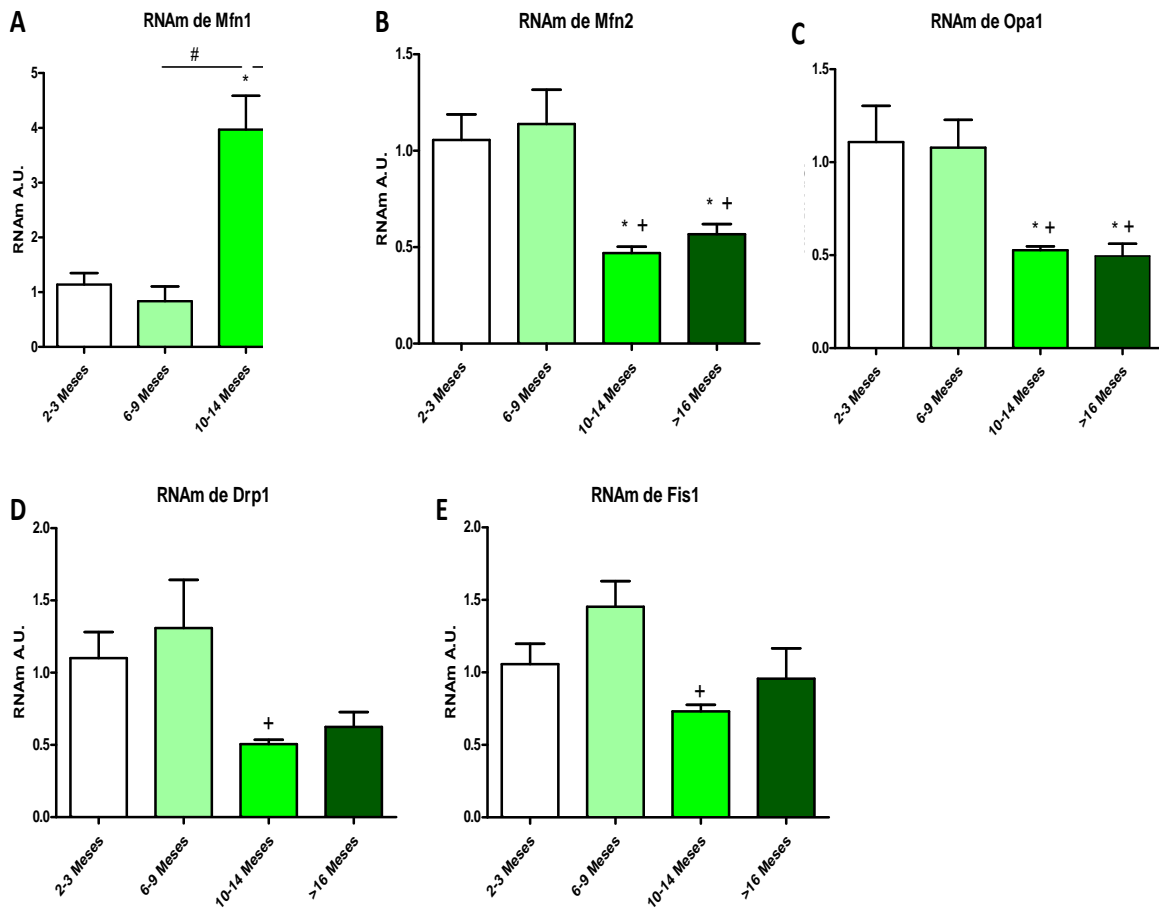


**Figura 7.** Efecto del envejecimiento en el porcentaje de mitocondrias con una orientación perpendicular al eje longitudinal de la fibra muscular (A) y en el porcentaje de mitocondrias con una orientación paralela al eje longitudinal de la fibra muscular (B). Resultados entregados como promedio  $\pm$  desviación estándar. N= 4-5 ratones por grupo. \* $p < 0.05$  vs grupo joven. # $p > 0,05$  vs grupo de más de 16 meses.



### **4.3. Cambios en los niveles de mRNA de Mfn-1, Mfn-2, Opa-1, Drp-1 y Fis-1.**

Para cuantificar los cambios en el mRNA de las principales proteínas involucradas en la fusión y fisión mitocondriales se utilizó PCR en tiempo real. Es así como se encontró un aumento en los niveles de mRNA de Mfn-1 en el grupo de 10-14 meses respecto del grupo joven, el de 6-9 meses y el de más de 16 meses (Figura 8A). Este resultado sugiere que el aumento del mRNA de Mfn-1 podría producir un aumento en los niveles de Mfn-1 y así dar cuenta del aumento del volumen mitocondrial observado previamente en el grupo de 10-14 meses. Además, se observó una disminución en los niveles de mRNA de Mfn-2 y Opa-1 en el grupo de 10-14 meses y de más de 16 meses respecto del grupo joven y el de 6-9 meses (Figura 8 B y C). Si bien, estos cambios en el mRNA de Mfn-2 y Opa-1 no eran los esperados en el grupo de 10-14 meses podrían ser explicados porque actualmente se conoce que tanto Mfn-2 y Opa-1 tienen otras funciones que también estarían alteradas durante el envejecimiento. En cuanto a los niveles de mRNA de Drp-1 y Fis-1 se encontró una disminución en el grupo de 10-14 meses respecto del grupo de 6-9 meses (Figura 8 D y E). Estos datos sugieren que la disminución en el mRNA de Drp-1 y Fis-1 podría producir una disminución en los niveles de Drp-1 y Fis-1 en el grupo de 10-14 meses y así dar cuenta del aumento del volumen mitocondrial observado anteriormente en este grupo.

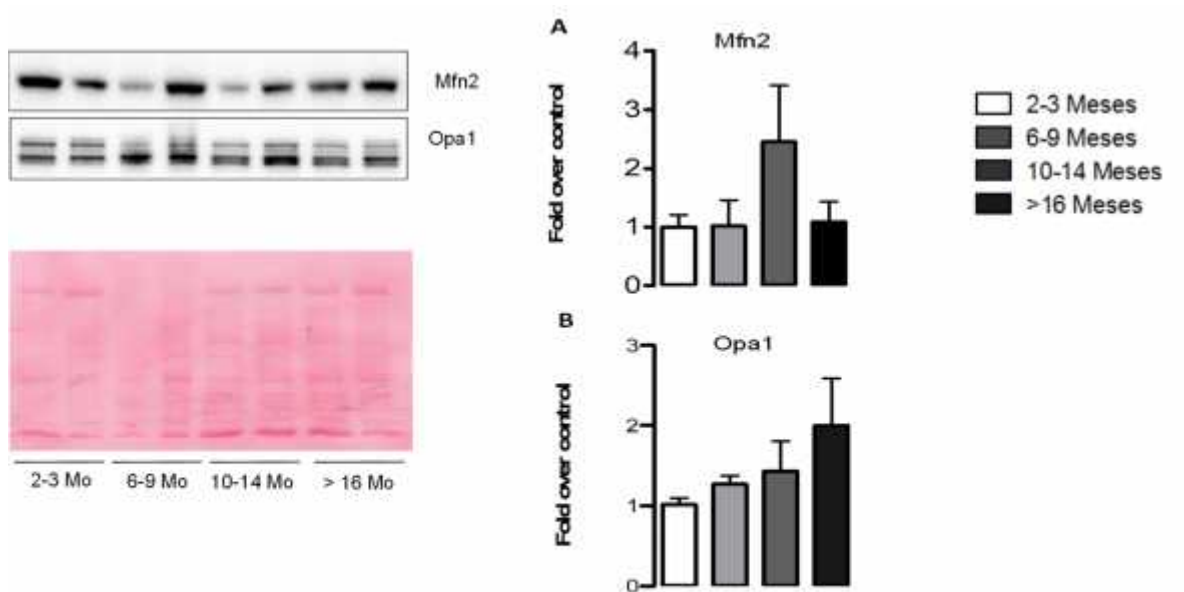


**Figura 8.** Niveles de mRNA de Mfn-1 (A), Mfn-2 (B), Opa-1 (C), Drp-1 (D) y Fis-1 (E) en los distintos grupos etarios. N= 4-5 ratones por grupo. \* $p < 0.05$  vs grupo joven. +  $p < 0.05$  vs grupo 6-9 meses. #  $p < 0.05$  vs grupo 10-14 meses.

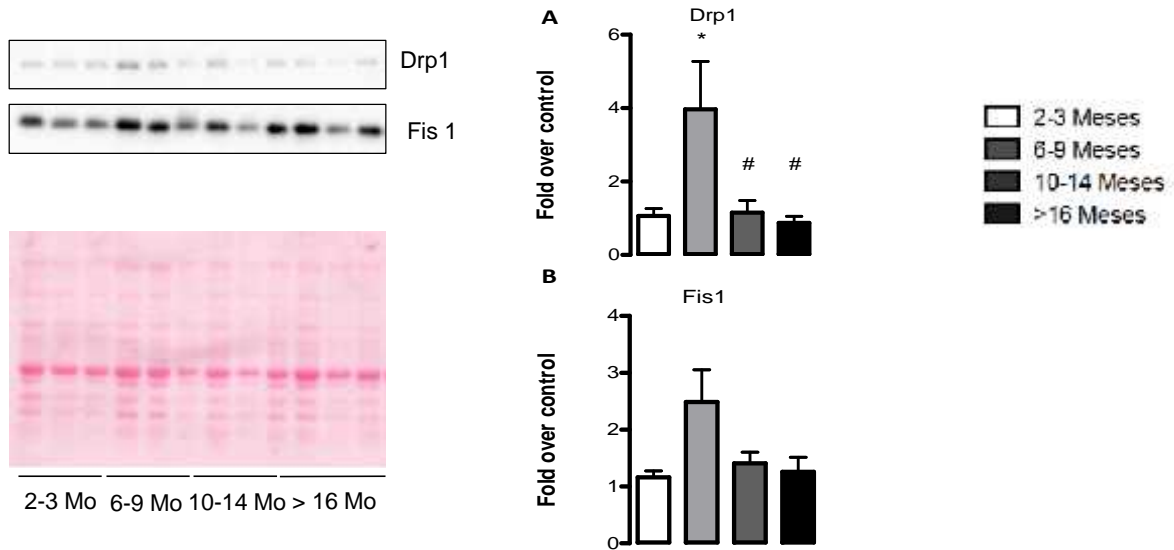
#### **4.4. Diferencias en los niveles de las proteínas Mfn-1, Mfn-2, Opa-1, Drp-1 y Fis-1.**

Para cuantificar las diferencias en los niveles de las principales proteínas involucradas en los procesos de fusión y fisión mitocondrial se utilizó la técnica de Western Blot. En cuanto a los niveles de Mfn-2, Opa-1 (Figura 9 A y B) y Fis-1 (Figura 10 B) no observamos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Esto coincide con lo descrito por algunos autores donde no se han observado cambios en los niveles de éstas proteínas en el músculo esquelético durante el proceso de envejecimiento. Sin embargo, respecto a Drp-1 se determinó un aumento en el grupo de 6-9 meses respecto del grupo joven (Figura 10 A). Además se observó una disminución de Drp-1 en los grupos de 10-14 meses y de más de 16 meses respecto del grupo de 6-9 meses. Estos resultados indican que el aumento de Drp-1 en el grupo de 6-9 meses podría producir un aumento en la fisión mitocondrial y así explicar el aumento en el número de mitocondrias observado anteriormente en este grupo etario. Igualmente la disminución de Drp-1 en el grupo de 10-14 meses podría producir indirectamente un aumento en la fusión mitocondrial y así dar cuenta del aumento en el volumen mitocondrial observado previamente en este grupo.

Para los Western Blot de Mfn-1 se utilizaron dos anticuerpos distintos y también se intentaron modificaciones del protocolo, sin embargo, sólo se obtuvieron marcas inespecíficas en las membranas lo que impidió el análisis posterior.



**Figura 9.** Diferencias en los niveles de las proteínas Mfn-2 (A) y Opa-1 (B) en los distintos grupos etarios. Todos los valores fueron normalizados utilizando rojo Ponceau. N= 4-5 ratones por grupo. \* $p < 0.05$  vs grupo joven. #  $p < 0.05$  vs grupo 6-9 meses



**Figura 10.** Diferencias en los niveles de las proteínas Drp-1 (A) y Fis-1 (B) en los distintos grupos etarios. Todos los valores fueron normalizados utilizando rojo Ponceau. N= 4-5 ratones por grupo. \* $p < 0.05$  vs grupo joven. #  $p < 0.05$  vs grupo 6-9 meses.

## 5. DISCUSIÓN

El envejecimiento se asocia a cambios profundos en la composición corporal, siendo uno de los más significativos la disminución en la masa muscular, proceso conocido como sarcopenia. Desde un punto de vista fisiológico, la sarcopenia puede ser causada por una disminución en los elementos contráctiles (Young y cols, 1984), disminución en el número total de fibras, disminución en el tamaño de las fibras musculares tipo II y por una pérdida de unidades motoras (Stolberg y cols, 1982). Sin embargo, los mecanismos que explicarían estos fenómenos aún no son completamente comprendidos. Dentro de este contexto, el objetivo principal de nuestra investigación fue determinar los cambios en la morfología de la red mitocondrial en el músculo esquelético durante el envejecimiento y si estos cambios se relacionaban con diferencias en los niveles de mRNA y de proteínas relacionadas con los procesos de fusión y fisión mitocondrial. Es así como uno de los resultados más importantes de nuestra investigación es que se determinó que durante el envejecimiento la morfología mitocondrial en el músculo esquelético no se modifica en forma lineal hacia un estado más fragmentado o más interconectado como ha sido planteado por algunos autores, sino que las características morfológicas de la red van a depender específicamente de la edad de los animales que se está evaluando. Nuestros resultados evidencian que durante el proceso de crecimiento de los animales desde los 2-3 meses hasta los 6-9 meses existe un aumento en el número de mitocondrias no relacionado con una disminución en el volumen mitocondrial lo que podría indicar un aumento en la biogénesis mitocondrial.

Además, en etapas tempranas del envejecimiento observamos un aumento en el volumen mitocondrial relacionado con una disminución en el número de mitocondrias lo que indicaría una morfología de la red mitocondrial hacia un estado más interconectado. Estos resultados se relacionan con un estudio reciente en donde se ha observado en el músculo gastrocnemio de ratones de 12 meses un aumento en el tamaño de las mitocondrias intermiofibrilares (Sayed y cols, 2016). Finalmente, observamos en etapas más avanzadas del envejecimiento un aumento en el número de mitocondrias relacionado con una disminución del volumen mitocondrial lo que indicaría una morfología de la red mitocondrial más fragmentada. Estos datos son concordantes con estudios previos que han observado en el músculo EDL (Extensor digitorum longus) de ratas de 35 meses respecto jóvenes de 5 meses una disminución en el tamaño de las mitocondrias (Ljubicic y cols, 2009) (Iqbal y cols, 2013). Sin embargo, existe controversia en el literatura respecto a esto, ya que se ha observado en el músculo gastrocnemio de ratones de 22-24 meses respecto de jóvenes de 3 meses mitocondrias subsarcolemas más alargadas y menos circulares, y mitocondrias intermiofibrilares más alargadas y ramificadas (Leduc-Gaudet y cols, 2015). Estas discrepancias en los resultados podrían ser explicadas por las diferencias en los rangos etarios utilizados y resalta la importancia de realizar curvas temporales de los animales al momento de investigar cualquier fenómeno relacionado con el envejecimiento.

Conjuntamente con los cambios en la morfología de la red mitocondrial observamos que también se modificaba la orientación de esta. Es así como en una colaboración con otro laboratorio se creó un software capaz de determinar la orientación de la red

mitocondrial en fibras musculares esqueléticas. A partir de esto, nuestros resultados indican que en etapas tempranas del envejecimiento existe un aumento en la orientación de la red mitocondrial en sentido perpendicular respecto al eje longitudinal de la fibra muscular. Estos datos son significativos ya que estos cambios coinciden con lo descrito previamente en donde se observó una morfología mitocondrial más interconectada en el mismo grupo etario. Esto podría indicar que la modificación de la red mitocondrial hacia un estado más interconectado se debe probablemente a un aumento en la ramificación de la red mitocondrial en sentido perpendicular al eje longitudinal de la fibra muscular. Además, observamos una disminución en edades más avanzadas del envejecimiento en la orientación de la red mitocondrial en sentido perpendicular respecto al eje longitudinal de la fibra muscular, lo que se podría relacionar con lo descrito por otros autores en donde se ha determinado a través de microscopía electrónica en el músculo EDL de ratones de más de 24 meses respecto de ratones de 3-12 meses que existe un aumento en las mitocondrias con una orientación paralela al eje longitudinal de la fibra muscular (Pietrangelo y cols, 2015). Por último, es importante destacar que estos resultados respaldan el uso de este nuevo software y que constituye una herramienta simple y económica para estudiar la orientación de la red mitocondrial.

Por otra parte, los resultados de la determinación de los niveles de mRNA muestran que los cambios observados en la morfología de la red mitocondrial hacia un estado más interconectado en etapas tempranas del envejecimiento se relacionan con un aumento en los niveles de mRNA de Mfn-1. Estos resultados son controversiales ya que se ha observado en el músculo gastrocnemio de ratas una disminución



progresiva del mRNA de Mfn-1 durante el envejecimiento (Ibejunjo y cols, 2013). Sin embargo, estas diferencias podrían ser explicadas por las distintas especies utilizadas y/o por las diferencias en los músculos analizados. En cuanto a los niveles de mRNA de Mfn-2 observamos una disminución en edades tempranas y más avanzadas del envejecimiento. Sin embargo, esta disminución sólo se relaciona en el grupo de edad más avanzada con los cambios observados en la morfología de la red mitocondrial. Esta situación ha sido descrita por algunos autores quienes han determinado en el músculo gastrocnemio de ratas de 25 meses respecto de jóvenes de 5 meses que existe una disminución en los niveles de mRNA de Mfn-2 (Zhao y cols, 2014). Asimismo, respecto de los niveles de mRNA de Opa-1 observamos una disminución en edades tempranas y más avanzadas del envejecimiento. De la misma forma, esta disminución sólo se relaciona en el grupo de edad más avanzada con los cambios determinados previamente en cuanto a la morfología de la red mitocondrial. Estos resultados concuerdan con lo descrito en la literatura en donde se ha determinado en el músculo gastrocnemio de ratas una disminución en los niveles de Opa-1 durante el envejecimiento (Ibejunjo y cols, 2013) (Zhao y cols, 2014). En cuanto a los niveles de mRNA de Fis-1 observamos una disminución en etapas tempranas del envejecimiento. De la misma manera, esta disminución sólo se relaciona con los cambios observados en la morfología de la red mitocondrial en este grupo etario. Estos datos respaldan estudios previos donde se ha observado en el músculo gastrocnemio de ratas una disminución en los niveles de mRNA de Fis-1 durante el envejecimiento (Ibejunjo y cols, 2013). Finalmente, respecto de los niveles de mRNA de Drp-1 observamos una disminución en edades tempranas del

envejecimiento. Nuevamente, esta disminución sólo se relaciona con los cambios en la morfología de la red mitocondrial en este grupo etario. Respaldando estos resultados otros autores han observado durante el envejecimiento en el músculo gastrocnemio de ratas una disminución en los niveles de mRNA de Drp-1 (Ibejunjo y cols, 2013).

Por otro lado, los resultados de la determinación de los niveles de las proteínas muestran que los niveles de Mfn-2 no se modifican durante el envejecimiento. Esto probablemente indicaría que los cambios observados respecto a la morfología de la red mitocondrial no se relacionan directamente con los niveles de Mfn-2. Respaldando esta idea se ha observado en el músculo FDB de ratones que al disminuir la expresión de Mfn-2 mediante RNA interferente, la continuidad de la red mitocondrial y los eventos de fusión no disminuyen (Eisner y cols, 2015). Es así como otros autores han observado en el músculo gastrocnemio de ratas de 25 meses respecto de ratas de 5 meses que los niveles de Mfn-2 no se modifican (Zhao y cols, 2014). Esto también ha sido observado en el músculo gastrocnemio de ratones de 22-24 meses respecto de ratones jóvenes de 3 meses en donde no se han determinado cambios en los niveles de Mfn-2 (Leduc-Gaudet, 2015). Al parecer durante el envejecimiento en el músculo esquelético Mfn-2 no estaría relacionada con los cambios en la morfología de la red mitocondrial, sino más bien en otros procesos en donde se ha descrito que tiene una participación como en la interacción retículo sarcoplásmico- mitocondria o en la regulación del metabolismo.

Respecto de los niveles de Opa-1 no observamos cambios en los diferentes grupos etarios. Estos resultados podrían indicar que los niveles de Opa-1 no se relacionan

con los cambios observados en la morfología de la red mitocondrial durante el envejecimiento, sin embargo, hay que tener presente que la determinación de los niveles de Opa-1 se realizó considerando todas las bandas presentes en las membranas, y actualmente se conoce que sólo algunas isoformas de Opa-1 estarían relacionadas con el proceso de fusión. De igual forma, otros estudios no han observado cambios en los niveles de Opa-1 en el músculo gastrocnemio de ratas de 25 meses respecto de ratas jóvenes de 5 meses (Zhao y cols, 2014), ni en ratones de 22-24 meses respecto de ratones jóvenes de 3 meses (Leduc-Gaudet y cols, 2015). Además, hay que tener presente que Opa-1 también participa de otros procesos como la mantención de la estructura de las crestas mitocondriales y el ensamblaje de los supercomplejos de la cadena respiratoria (Cogliati y cols, 2013), lo que hace aún más difícil determinar su participación real en los cambios en la morfología de la red mitocondrial.

En cuanto a los niveles de Fis-1 no observamos cambios en los diferentes grupos etarios. Esto indicaría que las diferencias en la morfología de la red mitocondrial durante el envejecimiento no se relacionan con los niveles de Fis-1. De la misma forma, otros autores no han observado cambios en los niveles de Fis-1 en el músculo gastrocnemio de ratas y ratones durante el envejecimiento (Zhao y cols, 2014) (Leduc-Gaudet y cols, 2014). Estos resultados podrían ser explicados por estudios recientes en donde se ha observado que Fis-1 tendría una función más importante en la mitofagia, situación por la cual, aún existe controversia respecto a su participación en la fisión mitocondrial (Osellame y cols, 2016).

Por último, respecto de los niveles Drp-1 nosotros observamos un aumento cuando el animal alcanza la edad adulta, para posteriormente disminuir en etapas tempranas del envejecimiento. Estos resultados se relacionan con los cambios observados en la morfología de la red mitocondrial primero hacia un estado más fragmentado en la etapa adulta y luego hacia un estado más interconectado en etapas intermedias del envejecimiento. Sin embargo, en el grupo de edad más avanzada observamos una disminución en los niveles de Drp-1 que no se relaciona con lo descrito previamente en cuanto a la morfología de la red mitocondrial. Estos datos son distintos a los descritos por otros autores en donde no se han observado cambios en los niveles de Drp-1 en el músculo gastrocnemio de ratones durante el envejecimiento (Leduc-Gaudet y cols, 2015). Sin embargo, hay que tener presente que los niveles totales de Drp-1 pueden no ser representativos de la función de Drp-1, ya que se ha observado que Drp-1 sufre una serie de modificaciones postraduccionales que incluyen fosforilaciones, nitrosilaciones, sumoilaciones y acetilaciones que van a determinar su activación u inhibición (Mishra y Chan, 2016).

Por otro lado, respecto del peso corporal los animales mostraron un aumento progresivo durante el envejecimiento, para posteriormente evidenciar una disminución en el grupo de más edad. Esta situación ha sido descrita previamente por otros autores en donde se ha observado en ratones C57BL/6 un aumento progresivo en el peso corporal hasta los 18 meses de edad, para luego ir disminuyendo en edades más avanzadas (Hamrick y cols, 2006). Es así como se ha planteado que existe un aumento en el peso corporal de los ratones durante gran parte de su vida, hasta entrar en una etapa en donde se observa una disminución

en este y que corresponde aproximadamente al último tercio de su vida (Hamrick y cols, 2006) (Reynolds y cols, 2002) (Shavlakadze y cols, 2010).

Por otra parte, observamos que cuando los animales alcanzan la adultez existe un aumento en el peso del complejo gastrocnemio-sóleo. Esto se relaciona con resultados recientemente publicados en donde se ha determinado en hembras C57BL/6 de 12 meses un aumento en el peso del complejo gastrocnemio-sóleo asociado a un aumento en el área de sección transversal de las fibras musculares, una disminución en el número de fibras musculares, un aumento en la infiltración de tejido conectivo y una disminución en la densidad de los capilares (Sayed y cols, 2016). Si bien nosotros observamos un aumento en el peso del complejo gastrocnemio-sóleo en el grupo de 6-9 meses, éstas diferencias en los resultados podrían deberse al género de los animales, ya que en varios estudios se han observado diferencias significativas entre machos y hembras respecto a las características de la sarcopenia (Lionikas y cols, 2006) (Rowe, 1969). A partir de lo anterior, se cree que el aumento en el área de sección transversal de las fibras musculares podría representar un mecanismo compensatorio frente a la disminución en el número de fibras musculares, esto asociado al aumento en la infiltración de tejido conectivo y a la disminución en la densidad capilar hacen pensar que probablemente el fenómeno de sarcopenia tiene sus orígenes en etapas tempranas del envejecimiento. Otro aspecto importante en cuanto al peso del complejo gastrocnemio-sóleo es que esperábamos una disminución significativa en los grupos de más edad. Sin embargo, esto no fue así debido a que algunos autores han observado tanto en ratones como en ratas que la disminución más significativa

en el peso del músculo gastrocnemio ocurre en edades aún más avanzadas del envejecimiento (Gouspillou y cols, 2014) (Leduc-Gaudet y cols, 2015).

En cuanto al tejido adiposo epididimal nuestros resultados muestran que existe un aumento en la grasa corporal de los animales una vez que han alcanzado la edad adulta. Esto concuerda con lo descrito en la literatura en donde se ha observado en ratones machos C57BL/6 un aumento progresivo en el tejido adiposo corporal al realizar una curva temporal en animales de entre 2 meses y 12 meses (Palmer y cols, 2009). También determinamos que este aumento en la grasa epididimal era mantenido durante el proceso de envejecimiento. Esto también ha sido observado previamente en donde se ha determinado que existe un aumento en el tejido adiposo corporal de los ratones hasta alcanzar su valor máximo aproximadamente a los 18 meses de edad (Hamrick y cols, 2006). Además, es importante mencionar que se ha descrito que durante etapas más tardías del envejecimiento existiría una disminución en el tejido adiposo corporal de los animales, sin embargo, nosotros no observamos esta disminución, probablemente porque en estudios previos se ha determinado que la disminución en el tejido adiposo corporal de éstos animales ocurre a partir de los 24 meses de edad (Hamrick y cols, 2006).

Respecto a la función muscular, observamos que la fuerza muscular, medida a través del tiempo de prensión en rejilla, disminuyó en forma significativa en los dos grupos de más edad. Esto se relaciona con resultados que muestran en el músculo EDL de ratones jóvenes de 2-3 meses, adultos de 12-13 meses y viejos de 26-27 meses, una disminución progresiva en la capacidad para mantener en el tiempo una potencia muscular determinada (Brooks y Faulkner, 1991). Respaldando esta idea

se ha observado en el músculo EDL de ratones adultos de 5-7 meses, de 22-26 meses y de más de 28 meses, una disminución progresiva en la potencia muscular máxima (Graber y cols, 2015). Sin embargo, hay que tener presente que los cambios en la fuerza muscular, específicamente en la potencia muscular máxima, durante el envejecimiento van a depender de las características del músculo que se esté evaluando, ya que se ha observado por ejemplo que la disminución en la potencia muscular máxima ocurre en edades más tardías en el músculo sóleo que en el EDL (Glaber y cols, 2015). Al parecer los músculos con un mayor porcentaje de fibras tipo 2 evidencian una disminución significativa en la fuerza muscular en etapas tempranas del envejecimiento, mientras que los músculos con un mayor porcentaje de fibras tipo 1 presentan una disminución significativa de la fuerza muscular en edades más tardías.

Para la determinación de la resistencia física, se realizó una prueba de tiempo de nado hasta la fatiga, en donde se observó una disminución en los ratones adultos y en etapas tempranas del envejecimiento, pero no así en el grupo de más edad. Estos resultados son contradictorios respecto a otras investigaciones en donde se ha observado en ratones jóvenes de 3 meses y adultos de 12 meses, un aumento tanto en el consumo de oxígeno ( $VO_2$ ) como en el consumo máximo de oxígeno ( $VO_{2\text{máx}}$ ) durante el ejercicio (Schefer y Talan, 1996) (McNeil and Hoffman-Goetz, 1993). Sin embargo, es importante considerar que estas mediciones de  $VO_2$  y  $VO_{2\text{máx}}$  fueron realizadas en un protocolo de ejercicio en treadmill, lo que podría explicar las diferencias observadas. Al parecer la resistencia física de los animales durante el envejecimiento va a depender de las características de la prueba física a

la cual se les está sometiendo. Otro aspecto controversial es que nosotros esperábamos que en el grupo de más edad también hubiera una disminución en el tiempo de nado, sin embargo, esto no fue así. Una de las posibles explicaciones es que durante la realización de estos experimentos se observó que los animales del grupo de más edad tenían mayor facilidad para flotar lo que podría estar relacionado con procesos de aprendizaje en este grupo etario.

Para una mejor caracterización de las capacidades físicas de los animales se realizó una prueba de velocidad máxima en treadmill, en donde nuestros resultados indican que durante el envejecimiento hay una disminución progresiva en la velocidad máxima alcanzada. Si bien en la literatura no se encontraron estudios que realizaran esta prueba en los distintos grupos etarios si se ha descrito en ratones de 23 meses respecto de ratones jóvenes de 3 meses una disminución en el consumo máximo de oxígeno durante una prueba de velocidad máxima en treadmill (Houtkooper y cols, 2011). Además, se realizó una prueba de resistencia al 80% de la velocidad máxima en treadmill, en donde se observó un aumento en la resistencia cuando los animales alcanzaban la edad adulta, para posteriormente disminuir en los grupos de más edad. Respaldando éstos resultados se ha observado en ratones que el  $VO_{2max}$  en las pruebas de resistencia en treadmill alcanza sus valores máximos en la edad adulta de los animales, para posteriormente disminuir en etapas más tardías (Schefer y Talan, 1996) (McNeil and Hoffman-Goetz, 1993).



## 6. CONCLUSIÓN

Durante el envejecimiento existe un aumento en el peso y en la grasa corporal de los animales una vez que alcanzan la edad adulta y, este aumento se mantiene en etapas iniciales y más tardías del envejecimiento. Además, la masa muscular alcanza su valor máximo una vez que los animales han alcanzado la adultez, sin embargo, no disminuye en forma significativa hasta etapas muy avanzadas del envejecimiento.

La fuerza muscular disminuye en etapas tempranas del envejecimiento, mientras que la resistencia física alcanza un valor máximo durante la edad adulta de los animales para posteriormente disminuir desde etapas tempranas del envejecimiento.

La morfología de la red mitocondrial del músculo esquelético no se modifica en forma lineal hacia un estado más fragmentado o más interconectado, sino que sus características morfológicas van a depender específicamente de la edad de los animales que se están evaluando. Una vez alcanzada la edad adulta los animales evidenciaron tener una morfología de la red mitocondrial más fragmentada, luego en etapas tempranas del envejecimiento se observó un cambio en la morfología hacia un estado más interconectado y, finalmente, en edades más tardías se evidenció nuevamente una morfología más fragmentada. Estos cambios indicarían que en etapas tempranas del envejecimiento existe un aumento en la conectividad de la red mitocondrial probablemente como mecanismo compensatorio frente a la disfunción mitocondrial que se ha descrito en el músculo esquelético en este grupo

etario. Asimismo una morfología de la red mitocondrial más fragmentada en el grupo de más edad podría indicar una disminución de esta respuesta compensatoria lo que podría contribuir en etapas tardías del envejecimiento al fenómeno de sarcopenia.

La modificación de la morfología de la red mitocondrial hacia un estado más interconectado en edades tempranas del envejecimiento se relaciona con un aumento en la orientación perpendicular de la red mitocondrial respecto al eje longitudinal de la fibra muscular. Mientras que los cambios en la morfología de la red mitocondrial hacia un estado más fragmentado, observado en edades más avanzadas, se relacionan con una disminución en la orientación perpendicular de la red mitocondrial respecto al eje longitudinal de la fibra muscular.

Los diferentes cambios en la morfología de la red mitocondrial durante el envejecimiento se relacionaron con los niveles de mRNA de Mfn-1, mientras que sólo se relacionaron parcialmente con los niveles de mRNA de Mfn-2, Opa-1, Fis-1 y Drp-1. Por otro lado, respecto a los niveles de las proteínas, sólo se observó una relación entre los cambios en la morfología de la red mitocondrial y los niveles de Drp-1 en los diferentes grupos etarios.

## PROYECCIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis plantean nuevas preguntas respecto a los cambios en la morfología de la red mitocondrial durante el envejecimiento muscular. Una de ellas es si estos cambios observados se relacionan con los resultados de cuantificación de volumen y número de mitocondrias a través de microscopía electrónica. Igualmente, sería interesante conocer si esta técnica de determinación de la morfología de la red mitocondrial se relaciona con otras técnicas de cuantificación in vivo de los eventos de fusión mitocondrial. Además, es fundamental conocer que otras proteínas regulan los cambios en la morfología mitocondrial y como varían estas durante el envejecimiento. Otro aspecto importante de investigar sería si estos cambios se relacionan con diferencias en la biogénesis mitocondrial y en la mitofagia en las fibras musculares de estos grupos etarios Y finalmente, sería interesante saber si estos cambios se relacionan con el metabolismo de la fibra muscular durante el envejecimiento, ya que se ha descrito que existe una relación directa entre ambas.

## 7. REFERENCIAS

Adhihetty, P.; Hood D. Mechanisms of apoptosis in skeletal muscle. *Basic Appl. Myol.* 13: 171–179, 2003.

Aiken, J.; Bua, E.; Cao, Z.; Lopez, M.; et al. Mitochondrial DNA deletion mutations and sarcopenia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 959: 412-423, 2002.

Bassel-Duby, R.; Olson, E.N. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 19-37, 2006.

Benard, G.; Bellance, N.; Jose, C.; Melser, S.; et al. Multi-site control and regulation of mitochondrial energy production. *Biochim. Biophys. Acta* 1797: 698–709, 2010.

Benard, G.; Rossignol, R. Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antiox. Redox Signal* 10: 1313–1342, 2008.

Bereiter-Hahn, J.; Vöth, M.; Mai, S.; Jendrach, M. Structural implications of mitochondrial dynamics. *Biotechnol. J.* 3: 765–780, 2008.

Beregi, E.; Regius, O. Comparative morphological study of age related mitochondrial changes of the lymphocytes and skeletal muscle cells. *Acta. Morphol. Hung.* 35: 219-224, 1987.

Blaauw, B.; Schiaffino, S. Reggiani, C. Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. *Compr. Physiol.* 3: 1645-1687, 2013.

Bleazard, W.; McCaffery, J.M.; King, E.J.; Bale, S.; et al. The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell Biol.* 1: 298-304, 1999.

Boncompagni, S.; Rossi, A.E.; Micaroni, M.; Beznoussenko, R.S.; et al. Mitochondria are linked to calcium stores in striated muscle by developmentally regulated tethering structures. *Mol. Biol. Cell* 20: 1058-1067, 2009.

Bossy-Wetzell, E.; Barsoum, M.J.; Godzik, A.; Schwarzenbacher, R.; et al. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 706–716, 2003.

Bottinelli, R.; Reggiani, C. *Skeletal muscle plasticity in health and disease.* 1er edición, Dordrecht, Springer.

Brooks, S.V.; Faulkner, J.A. Maximum and sustained power of extensor digitorum longus muscles from young, adult, and old mice. *J. Gerontol.* 46: 28-33, 1991.

Bua, E.A.; McKiernan, S.H.; Wanagat, J.; McKenzie, D.; Aiken, J.M. Mitochondrial abnormalities are more frequent in muscles undergoing sarcopenia. *J. Appl. Physiol.* 92: 2617-2624, 2002.

Bua, E.; Johnson, J.; Herbst, A.; Delong, B.; et al. Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. *Am. J. Hum. Genet.* 79: 469-480, 2006.

Capel, F.; Rimbart, V.; Lioger, D.; Diot, A.; et al. Due to reverse electron transfer, mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release increases with age in human vastus lateralis muscle although oxidative capacity is preserved. *Mech, Ageing Dev.* 126: 505-511, 2005.

Cassidy-Stone, A.; Chipuk, J.E.; Ingerman, E.; Song, C.; Yoo, C.; et al. Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Dev. Cell* 14: 193-204, 2008.

Castañeda, V.; Cerda, M.; Santibañez, F.; Jara, J.; et al. Computational methods for analysis of dynamic events in cell migration. *Curr. Mol. Med.* 14: 291-307, 2014.

Cereghetti, G.M.; Stangherlin, A.; de Brito, O.M.; Chang, C.R.; et al. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 15803–15808, 2008.

Chabi, B.; Ljubcic, V.; Menzies, K.J.; Huang, J.H.; et al. Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. *Aging Cell.* 7: 2-12, 2008.

Chan, D.C. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22: 79-99, 2006.

Chan, D.C. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu. Rev. Genet.* 46: 265-287, 2012.

Chen, H.; Vermulst, M.; Wang, Y.E.; Chomyn, A.; et al. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* 141: 280-289, 2010.

Chen, H.; Detmer, S.A.; Ewald, A.J.; Griffin, E.E.; et al. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* 160: 189–200, 2003.

Chen, H.; Chomyn, A.; Chan, D.C. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J. Biol. Chem.* 280: 26185–26192, 2005.

Cheng, W.C.; Leach, K.M.; Hardwick, J.M. Mitochondrial death pathways in yeast and mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1783: 1272–1279, 2008.

Chipuk, J.E.; Bouchier-Hayes, L.; Green, D.R. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ.* 13: 1396–1402, 2006.

Cipolat, S.; Martins de Brito, O.; Dal Zilio, B.; Scorrano, L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 15927–15932, 2004.

Cogliati, S.; Frezza, M.E.; Soriano, T.; Varanita, R.; et al. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell.* 155: 160-171, 2013.

Conley, K.E.; Jubrias, S.A.; Esselman, P.C. Oxidative capacity and ageing in human muscle. *J. Physiol.* 526: 203–210, 2000.

Conley, K.E.; Marcinek, D.J.; Villarín, J. Mitochondrial dysfunction and age. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 10: 688-692, 2007.

Cree, M.G.; Newcomer, B.R.; Katsanos, C.S.; Sheffield-Moore, M.; et al. Intramuscular and liver triglycerides are increased in the elderly. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 3864–3871, 2004.

Dahl, R.; Larsen, S.; Dohmann, L.; Qvortrup, K.; et al. Three-dimensional reconstruction of the human skeletal muscle mitochondrial network as a tool to assess mitochondrial content and structural organization. *Acta Physiol.* 213: 145-155, 2015.

De Brito, O.M.; Scorrano, L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456: 605–610, 2008.

Delettre, C.; Griffoin, J.M.; Kaplan, J.; Dollfus, H.; et al. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum. Genet.* 109: 584–591, 2001.

De Palma, C.; Falcone, S.; Pisoni, S.; Cipolat, C.; et al. Nitric oxide inhibition of Drp1-mediated mitochondrial fission is critical for myogenic differentiation. *Cell Death Differ.* 17: 1684-1696, 2010.

Detmer, S.A.; Chan, D.C. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 870–879, 2007.

DiFranco, M.; Quinonez M.; Capote, J.; Vergara, J. DNA transfection of mammalian skeletal muscle using in vivo electroporation. *J. Vis. Exp.* 32: 1-7, 2009.

Dohm, J.A.; Lee, S.J.; Hardwick, J.M.; et al. Cytosolic domain of the human mitochondrial fission protein fis1 adopts a TPR fold. *Proteins* 54: 153–156, 2004.

Eisner, V.; Lenaers, G.; Hajnóczky, G. Mitochondrial fusion is frequent in skeletal muscle and supports excitation-contraction coupling. *J. Cell Biol.* 205: 179-195, 2014.

Fanó, G.; Mecoci, P.; Vecchiet, J.; Belia, S.; et al. Age and sex influence on oxidative damage and functional status in human skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 22: 345-351, 2001.

Ferreira, R.; Vitorino, R.; Alves, R.M.; Appell, H.J.; et al. Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria proteome differences disclose functional specializations in skeletal muscle. *Proteomics* 10: 3142-3154, 2010.

Frank, S.; Gaume, B.; Bergmann-Leitner, E.S.; Leitner, W.W.; Robert, E.G. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell* 1: 515-525, 2001.

Germain, M.; Mathai, J.P.; McBride, H.M.; Shore, G.C. Endoplasmic reticulum BIK initiates Drp1-regulated remodeling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J.* 24: 1546-1556, 2005.

Ghosh, S.; Letwattanak, R.; Lefort, N.; Molina-Carrion, M.; et al. Reduction in reactive oxygen species production by mitochondrial from elderly subjects with normal and impaired glucose tolerance. *Diabetes.* 60: 2051-2060, 2011.

Gomes, L.C.; Di Benedetto, G.; Scorrano, L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat. Cell Biol.* 13: 589-598, 2011.

Goodpaster, B.H.; Park, S.W.; Harris T.B.; Kritchevsky S.B.; et al. The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the Health, Aging and Body Composition Study. *Journals of Gerontology A.* 61: 1059–1064, 2006.

Gospillou, G.; Bourdel-Marchasson, I.; Rouland, R.; Calmettes, G.; et al. Mitochondrial energetics is impaired in vivo in aged skeletal muscle. *Aging Cell.* 13: 39-48, 2014.

Graber, T.G.; Kim, J.H.; Grange, R.W.; McLoon, L.K.; Thompson, L.D. C57BL/6 life span study: age-related declines in muscle power production and contractile velocity. *Age.* 37: 1-16, 2015.

Griffin, E.E.; Graumann, J.; Chan, D.C. The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J. Cell Biol.* 170: 237-248, 2005.

Grigorescu, S.E.; Petkov, N.; Kruijinga, P. Comparison of texture features based on Gabor filters. *IEEE Trans. Image Process.* 11: 1160-1167, 2002.

Griparic, L.; van der Wel, N.N.; Orozco, I.J.; Peters, P.J.; et al. Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279: 18792–18798, 2004.

Hamrick, M.W.; Ding, K.H.; Pennington, C.; Chao, Y.J.; et al. Age-related loss of muscle mass and bone strength in mice is associated with a decline in physical activity and serum leptin. *Bone.* 39: 845-853, 2006.

Herlan, M.; Vogeltang, F.; Bornhovd, C.; Neupert, W.; et al. Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.* 278: 27781–27788, 2003.

Hirokawa, N.; Takemura, R. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 6: 201–214, 2005.

Hom, J.; Sheu, S.S. Morphological dynamics of mitochondria - A special emphasis on cardiac muscle cells. *J. Mol. Cell Cardiol.* 46: 811–820, 2009.

Hollenbeck, P.J.; Saxton, W.M. The axonal transport of mitochondria. *J. Cell Sci.* 118: 5411–5419, 2005.

Hoppeler, H. Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Int. J. Sports Med.* 7: 187-204, 1986.

Houtkooper, R.H.; Argman, C.; Houston, S.M.; Cantó, C.; et al. The metabolic footprint of aging in mice. *Sci. Rep.* 134: 1-11, 2011.

Hughes, V.A.; Frontera W.R.; Wood, M.; Evans W.J.; et al. Longitudinal muscle strength changes in older adults: influence of muscle mass, physical activity, and health. *The Journals of Gerontology A.* 56: 209–217, 2001.

Ibejunjo, J.M.; Kendall, T.; Eash, J.K.; Li, C.; et al. Genomic and proteomic profiling reveals reduced mitochondrial function and disruption of the neuromuscular junction driving rat sarcopenia. *Mol. Cell Biol.* 33: 194-212, 2013.

Iqbal, S.; Ostojic, O.; Singh, K.; Joseph, A.M.; et al. Expression of mitochondrial fission and fusion regulatory proteins in skeletal muscle during chronic use and disuse. *Muscle Nerve.* 48: 963-970, 2013.

Ishihara, N.; Eura, Y.; Mihara, K. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J. Cell Sci.* 117: 6535–6546, 2004.



Jagasia, R.; Grote, P.; Westermann, B.; Conradt, B. DRP-1-mediated mitochondrial fragmentation during EGL-1-induced cell death in *C. elegans*. *Nature* 433: 754–760, 2005.

James, D.I.; Parone, P.A.; Mattenberger, Y.; Martinou, J.C. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J. Biol. Chem.* 278: 36373–36379, 2003.

Jaroszewski, L.; Li, W.; Godzik, A. In search for more accurate alignments in the twilight zone. *Protein Science*. 11: 1702–1713, 2009.

Johannsen, D.L.; Conley, K.E.; Baiphey, S.; Punyanitya, M.; et al. Ectopic lipid accumulation and reduced glucose tolerance in elderly adults are accompanied by altered skeletal muscle mitochondrial activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97: 242–250, 2012.

Kim, I.; Rodriguez-Enriquez, S.; Lemasters, J.J. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch. Biochem. Biophys.* 462: 245-253, 2007.

Koltai, E.; Hart, N.; Taylor, A.W.; Goto, S. Age-associated declines in mitochondrial biogenesis and protein quality control factors are minimized by exercise training. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 303: 127-134, 2012.

Koves, T.R.; Noland, R.C.; Bates, A.L.; Henes, S.T.; et al. Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria play distinct roles in regulating skeletal muscle fatty acid metabolism. *Am. J. Physiol.* 288: 1074-1082, 2005.

Kuzmich, J.; Del Campo, A.; López-Crisosto, C.; Morales, P.E. Mitochondrial dynamics: a potential new therapeutic target for heart failure. *Rev. Esp. Cardiol.* 64: 916–923, 2011.

Lanza, I.R.; Short, D.K.; Short, K.R.; Raghavakaimal, S.; et al. Endurance exercise as a countermeasure for aging. *Diabetes* 57: 2933-2942, 2008.

Lenaz, G.; D'Aurelio, M.; Merlo Pich, M.; Genova, M.L.; et al. Mitochondrial bioenergetics in aging. *Biochim Biophys Acta* 1459: 397-404, 2000.

Ljubcic, V.; Joseph, A.M.; Adhietty, P.J.; Huang, J.H.; et al. Molecular basis for an attenuated mitochondrial adaptive plasticity in aged skeletal muscle. *Aging*. 1: 818-830, 2009.

Losón, O.C.; Song, Z.; Chen, H.; Chan, D.C. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp-1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol. Biol. Cell.* 24: 659-667, 2013.

Macneil, B.; Hoffman-Goetz, L. Exercise training and tumor metastasis in mice: Influence of time of exercise onset. *Anticancer Res.* 13: 2085-2088, 1993.

Marshall, O.J. PerlPrimer: cross-platform graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 20: 2471-2472, 2004.

Martinou, J.C.; Youle, R.J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev. Cell* 21: 92-101, 2011.

Metter, E.L.; Lynch, N.; Conwit, R.; Lindle, R.; et al. Muscle quality and age: cross-sectional and longitudinal comparisons. *J Gerontol. A. Biol. Med. Sci.* 54: 207–218, 1999.

Mishra, P.; Chan, D.C. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J. Cell. Biol.* 212: 379-387, 2016.

Naciones Unidas. World population prospects. The 2015 Revision. Dept. of Economic and Social Affairs, United Nations, New York, 2015.

Narendra, D.; Tanaka, A.; Suen, D.F.; Youle, R.J. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* 183: 795-803, 2008.

Leduc-Gaudet, J.P.; Picard, M.; St-Jean Pelletier, F.; Sgarioto, N.; et al. Mitochondrial morphology is altered in atrophied skeletal muscle of aged mice. *Oncotarget.* 6, 17923-17937, 2015.

Lee, Y.J.; Jeong, S.Y.; Karbowski, M.; Smith, C.L.; et al. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol. Biol. Cell* 15: 5001–5011, 2004.

Lenaz, G.; D'Aurelio, M.; Merlo Pich. M.; Genova, M.L.; et al. Mitochondrial bioenergetics in aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1459: 397–404, 2000.

Lionikas, A.; Blizard D.A.; Vandenberg, D.J.; Stout, J.T.; et al. Genetic determinants of weight of fast- and slow-twitch skeletal muscles in old mice. *Mamm Genome.* 17: 615-628, 2006.

Liu, X.; Weaver, D.; Shirihai, O.; Hajnoczky, G. Mitochondrial “kiss-and-run”: interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics. *EMBO J.* 28: 3074-3089, 2009.

Livak, K.J.; y Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408, 2001.

O'Leary, M.F.; Vainshtein, A.; Iqbal, S.; Ostojic, O.; et al. Adaptive plasticity of autophagic proteins to denervation in aging skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 304: 422-430, 2013.

Olichon, A.; Baricault, L.; Gas, N.; Guillou, E.; et al. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278: 7743–7746, 2003.

Olichon, A.; Emorine, L.J.; Descoins, E.; Pelloquin, L.; et al. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the intermembrane space. *FEBS Lett.* 523: 171–176, 2002.

Osellame, L.D.; Singh, A.P.; Stroud, D.A.; Palmer, C.S.; et al. Cooperative and independent roles of the Drp1 adaptors Mmff, MiD49 and MiD51 in mitochondrial fission. *J. Cell Sci.* 129: 2170-2181, 2016.

Otera, H.; Wang, C.; Cleland, M.M.; Setoguchi, K.; et al. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell. Biol.* 191: 1141-1158, 2010.

Palmer, A.J.; Chung, M.Y.; List, E.O.; Walker, J.; et al. Age-related changes in body composition of bovine growth hormone transgenic mice. *Endocrinology.* 150: 1353-1360, 2009.

Parra, V.; Eisner, V.; Chiong, M.; Criollo, A.; et al. Changes in mitochondrial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis. *Cardiovasc. Res.* 77: 387–397, 2008.

Picard, M.; Gentil, B.J.; McManus, M.J.; White, K.; et al. Acute exercise remodels mitochondrial membrane interactions in mouse skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 115: 1562-1571, 2013.

Rattan, S.I. Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals. *Free Radic. Res.* 40: 1230–1238, 2006.

Reynolds, T.H.; Krajewski, K.M.; Larkin, L.M.; Reid, P.; et al. Effect of age on skeletal muscle proteolysis in extensor digitorum longus muscles of B6C3F1 mice. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 57: 198-201, 2002.

Rogers, M.A.; Hagberg J.M.; Martin W.H.; Ehsani A.A.; et al. Decline in VO<sub>2</sub>max with aging in master athletes and sedentary men. *J. Appl. Physiol.* 68: 2195–2199, 1990.

Rojo, M.; Legros, F.; Chateau, D.; Lombes, A. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J. Cell Sci.* 115: 1663–1674, 2002.

Romanello, V.; Guadagnin, E.; Gomes, L.; Roder, I.; et al. Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. *EMBO*. 29: 1774-1785, 2010.

Rooyackers, O.E.; Adey, D.B.; Ades, P.A.; Nair, K.S. Effect of age on in vivo rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 15364-15369, 1996.

Rosenberg, I.H. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *Clinics in geriatric medicine* 27: 337-339, 2011.

Rowe, R.W. The effect of senility on skeletal muscles in the mouse. *Exp. Gerontol.* 4: 119-126, 1969.

Sayed, R.; Chacin de Leonardis, E.; Ibtissem, J.; Doaa, M.; et al. Identification of morphological markers of sarcopenia at early stage of aging in skeletal muscle. *Exp. Gerontol.* 83: 22-30, 2016.

Santel, A.; Fuller, M.T. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell Sci.* 114: 867–874, 2001.

Santel, A.; Frank, S.; Gaume, B.; Herrler, M.; et al. Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J. Cell Sci.* 116: 2763-2774, 2003.

Santel, A.; Frank, S. Shaping mitochondria: The complex posttranslational regulation of the mitochondrial fission protein DRP1. *IUBMB Life* 60: 448–455, 2008.

Sato, A.; Nakada, K.; Hayashi, J. Mitochondrial interaction preventing individuals from expression of respiratory deficiency caused by mutant mtDNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1763: 473-481, 2006.

Satoh, M.; Hamamoto, T.; Seo, N.; Kagawa, Y.; et al. Differential sub-localization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300: 482–493, 2003.

Scalettar, B.A.; Abney, J.R.; Hackenbrock, C.R. Dynamics, structure, and function are coupled in the mitochondrial matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 8057–8061, 1991.

Schefer, V.; Talan, M.I. Oxygen consumption in adult and aged C57BL/6 J mice during acute treadmill exercise of different intensity. *Exp. Gerontol.* 31: 387-392, 1996.

Schiaffino, S. Fibre types in skeletal muscle: a personal account. *Acta Physiol.* 199: 451-463, 2010.

Sesaki, H.; Jensen, R.E. Division versus fusión: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J. Cell Biol.* 147: 699-706, 1999.

Shaylakadze, T.; McGeachie, J.; Grounds, M.D. Delayed but excellent myogenic stem cell response of regenerating geriatric skeletal muscles in mice. *Biogerontology.* 11: 363-376, 2010.

Sherian, C.; Martin, S.J. Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. *Mitochondrion* 10: 640-648, 2010.

Short, K.R.; Vittone, J.L.; Bigelow, M.L.; Proctor, D.N.; Nair, K.S. Age and aerobic exercise training effects on whole body and muscle protein metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286: 92-101, 2004.

Short, K.R.; Bigelow M.L.; Kahl, J.; Singh, R.; et al. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 10: 5618–5623, 2005.

Smirnova, E.; Griparic, L.; Shurland, D.L.; van Der Bliet, A.M. Dynamin-related protein drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 12: 2245–2256, 2001.

Song, Z.; Ghochani, M.; McCaffery, J.M.; Frey, T.G.; Chan, D.C. (2009). Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol. Biol. Cell* 20: 3525-3532, 2009.

Stolberg, E.; Fawcett, P. Macro EMG in healthy subjects of different ages. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 45: 870-878, 1982.

Suen, D.F.; Norris, K.L.; Youle, R.J. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev.* 22: 1577–1590, 2008.

Suzuki, M.; Neutzner, A.; Tjandra, N.; Youle, R.J. Novel structure of the N terminus in yeast Fis1 correlates with a specialized function in mitochondrial fission. *J. Biol. Chem.* 280: 21444–21452, 2005.

Suzuki, M.; Jeong, S.Y.; Karbowski, M.; Youle, R.J.; et al. The solution structure of human mitochondria fission protein Fis1 reveals a novel TPR-like helix bundle. *J. Mol. Biol.* 334: 445-458, 2003.

Taguchi, N.; Ishihara, N.; Jofuku, A.; Oka, T.; et al. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J. Biol. Chem.* 282: 11521–11529, 2007.

Tait, S.W.; Green, D.R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 621-632, 2010.

Tondera, D.; Grandemange, S.; Jourdain, A.; Karbowski, M.; Mattenberger, Y.; et al. SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J.* 28: 1589-1600, 2009.

Twig, G.; Liu, X.; Liesa, M.; Wikstrom, J.D.; et al. Biophysical properties of mitochondrial fusion events in pancreatic beta-cells and cardiac cells unravel potential control mechanisms of its selectivity. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 299: 477-487, 2010.

Twig, G.; Elorza, A.; Molina, A.J.; et al. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 27: 433-446, 2008.

Vogel, F.; Bornhoved, C.; Neupert, W.; Reichert, A.S. Dynamic sub-compartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* 175: 237-247, 2006.

Wallace, D.C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* 39: 359-407, 2005.

Wanagat, J. Mitochondrial DNA deletion mutations colocalize with segmental electron transport system abnormalities, muscle fiber atrophy, fiber splitting, and oxidative damage in sarcopenia. *FASEB J.* 15: 322-332, 2001.

Wenz, T.; Rossi, S.G.; Rotundo, R.L.; Spiegelman, B.M.; Moraes, C.T. Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 20405-20410, 2009.

Wohlgemuth, S.E.; Seo, A.Y.; Marzetti, E.; Lees, H.A.; Leeuwenburgh, C. Skeletal muscle autophagy and apoptosis during aging: effects of calorie restriction and life-long exercise. *Exp. Gerontol.* 45: 138-148, 2010.

Wong, E.D.; Wagner, J.A.; Gorsich, S.W.; McCaffery, J.M.; et al. The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J. Cell Biol.* 151: 341-352, 2000.

Yi, M.; Weaver, D.; Eisner, V.; Várnai, P.; et al. Switch from ER-mitochondrial to SR-mitochondrial calcium coupling during muscle differentiation. *Cell Calcium* 52: 355-365, 2012.

Yoon, Y.; Krueger, E.W.; Oswald, B.J.; McNiven, M.A. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin like protein DLP1. *Mol. Cell Biol.* 23: 5409–5420, 2003.

Yoon, Y.S.; Yoon, D.S.; Lim, I.K.; Yoon, S.H.; et al. Formation of elongated giant mitochondria in DFO-induced cellular senescence: involvement of enhanced fusion process through modulation of Fis1. *J. Cell. Physiol.* 209: 468-480, 2006.

Youle, R.J.; Narendra, D.P. Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 9-14, 2011.

Young, A.; Stokes, M.; Crowe, M. Size and strength of the quadriceps muscle of old and young women. *Eur. J. Clin. Invest.* 14: 282-287, 1984

Zhao, L.; Zou, X.; Feng, Z.; Luo, C.; et al. Evidence for association of mitochondrial metabolism alteration with lipid accumulation in aging rats. *Exp. Gerontol.* 56: 3-12, 2014.

Zick, M.; Rabl, R.; Reichert, A.S. Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1793: 5–19, 2008.

Zorzano, A.; Liesa, M.; Palacín, M. Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. *Intl. Biochem. Cell. Biol.* 41: 1846-1854, 2009.