

EVALUACIÓN DE LOS MECANISMOS DE SARCOPENIA EN EL MODELO DE RATÓN KNOCKOUT PARA *Bmal1* (*iMS-Bmal1^{-/-}*)



GRUPO DE INVESTIGACIÓN CTS-101: COMUNICACIÓN INTERCELULAR

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA (CIBM)

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

PARQUE TECNOLÓGICO DE CIENCIAS DE LA SALUD

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Programa de Doctorado en Biomedicina

Bajo la supervisión del Dr. DARÍO ACUÑA CASTROVIEJO

YOLANDA RAMÍREZ CASAS

2025

EVALUACIÓN DE LOS MECANISMOS DE SARCOPENIA EN EL MODELO DE RATÓN KNOCKOUT PARA *Bmal1* (*iMS-Bmal1^{-/-}*)

Memoria que presenta la graduada en Biología

D^a. Yolanda Ramírez Casas

como aspirante al grado de Doctor

Fdo.: Yolanda Ramírez Casas

V.º B.º del Director de la Tesis Doctoral

Fdo.: Dr. Darío Acuña Castroviejo

Doctor en Medicina

Catedrático Emérito de Fisiología

Universidad de Granada

2025

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Yolanda Ramírez Casas
ISBN: 978-84-1195-903-2
URI: <https://hdl.handle.net/10481/108568>

CERTIFICACIONES

Certificaciones

Este trabajo de Tesis Doctoral se ha realizado en el **Grupo de Investigación CTS-101:** "Comunicación Intercelular", en el Centro de Investigación Biomédica (CIBM) de la Universidad de Granada.

Durante la realización del siguiente trabajo, la graduada Yolanda Ramírez Casas recibió apoyo económico de las siguientes fuentes:

1. **Tipo de contrato/ayuda:** Contrato predoctoral de formación en investigación (FI20/00264), Instituto de Salud Carlos III. **Organismo:** Universidad de Granada.
Centro: Centro de Investigación Biomédica (CIBM) y Facultad de Medicina.
Departamento: Fisiología. **Duración:** Tiempo completo (01/01/2021-31/12/2024).
2. **Tipo de contrato/ayuda:** Convocatoria de movilidad internacional de estudiantes de doctorado. **Organismo:** Universidad de Padua, Italia. **Departamento:** Ciencias Biomédicas. **Duración:** Tiempo completo (03/04/2023 – 30/06/2023).

Certificaciones

Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral se han publicado en las siguientes revistas internacionales:

Ramírez-Casas Y, Fernández-Martínez J, Martín-Estebané M, Aranda-Martínez P, López-Rodríguez A, Esquivel-Ruiz S, Yang Y, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Melatonin and exercise restore myogenesis and mitochondrial dynamics deficits associated with sarcopenia in iMS-*Bmal1*^{-/-} mice. (Aceptado).

Fernández-Martínez J, Ramírez-Casas Y, Aranda-Martínez P, López-Rodríguez A, Sayed RKA, Escames G, Acuña-Castroviejo D. iMS-*Bmal1*^{-/-} mice show evident signs of sarcopenia that are counteracted by exercise and melatonin therapies. *J Pineal Res.* 2023. doi: 10.1111/jpi.12912.

Fernández-Martínez J, Ramírez-Casas Y, Yang Y, Aranda-Martínez P, Martínez-Ruiz L, Escames G, Acuña-Castroviejo D. From Chronodisruption to Sarcopenia: The Therapeutic Potential of Melatonin. *Biomolecules.* 2023. doi: 10.3390/biom13121779.

Otras publicaciones:

Aranda-Martínez P, Fernández-Martínez J, Ramírez-Casas Y, Martín-Estebané M, López-Rodríguez A, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Lack of asmt1 or asmt2 yields different phenotyping and mal-formations from embryos to adults zebrafish. *Zebrafish.* (En revisión).

Hurtado A, López-Soriano V, Lao M, Celis-Barroso M.A, Lazúen P, Chacón de Castro A, Ramírez-Casas Y, Alaminos M, Martin Collinson J, Burgos M, Jiménez R, Carmona F.D, Barrionuevo F.J. Sox9 prevents retinal degeneration and is required for limbal stem cell differentiation in the adult mouse eye. *eLife.* 2024. doi: 10.7554/eLife.102337.1.

Aranda-Martínez P, Sayed R.K.A., Fernández-Martínez J, Ramírez-Casas Y, Yang Y, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Zebrafish as a Human Muscle Model for Studying Age-Dependent Sarcopenia and Frailty. *Int J Mol Sci.* 2024. doi: 10.3390/ijms25116166.

Rodríguez-Santana C, López-Rodríguez A, Martínez-Ruiz L, Florido J, Cela O, Capitano N, Ramírez-Casas Y, Acuña-Castroviejo D, Escames G. The Relationship between Clock Genes, Sirtuin 1, and Mitochondrial Activity in Head and Neck Squamous Cell Cancer: Effects of Melatonin Treatment. *Int J Mol Sci.* 2023. doi: 10.3390/ijms241915030.

Aranda-Martínez P, Fernández-Martínez J, Ramírez-Casas Y, Rodríguez-Santana C, Rusanova I, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Chronodisruption and Loss of Melatonin Rhythm, Associated with Alterations in Daily Motor Activity and Mitochondrial Dynamics in Parkinsonian Zebrafish, are Corrected by Melatonin Treatment. *Antioxidants.* 2023. doi: 10.3390/antiox12040954.

Aranda-Martínez P, Fernández-Martínez J, Ramírez-Casas Y, Guerra-Librero A, Rodríguez-Santana C, Escames G, Acuña-Castroviejo C. The Zebrafish, an Outstanding Model for Biomedical Research in the Field of Melatonin and Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 2022. doi: 10.3390/ijms23137438.

Fernández-Ortiz M, Sayed RKA, Román-Montoya Y, Rol de Lama MA, Fernández-Martínez J, Ramírez-Casas Y, Florido-Ruiz J, Rusanova I, Escames G, Acuña-Castroviejo C. Age and Chronodisruption in Mouse Heart: Effect of the NLRP3 Inflammasome and Melatonin Therapy. *Int J Mol Sci.* 2022. doi: 10.3390/ijms23126846.

Certificaciones

Participación en proyectos de investigación:

Nombre del proyecto: The clock genes-melatonin-mitochondria connection in sarcopenia. **Referencia:** PI2019-01372. **Investigador principal:** Darío Acuña Castroviejo. **Agencia:** FIS, Instituto de Salud Carlos III. **Fecha:** 01/01/2020 - 31/12/2023. **Fondos:** 196.020,00 €.

Contribuciones orales en congresos relacionados con la presente Tesis Doctoral:

XV Jornadas de Formación CIBERES 2022. Characterization of the skeletal muscle-specific and inducible *Bmal1* knockout mouse (iMS-*Bmal1*^{-/-}) as a model for the study of sarcopenia and evaluation of a treatment with exercise and/or melatonin. 2022. Madrid (España). Fernández-Martínez J, **Ramírez-Casas Y**, Aranda-Martínez P, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

II Congreso de Investigadores del PTS. Caracterización del ratón knockout para *Bmal1* inducible y específico de músculo esquelético (iMS-*Bmal1*^{-/-}) como modelo para el estudio de la sarcopenia. 2022. Granada (España). **Ramírez-Casas Y**, Fernández-Martínez J, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

Contribuciones formato póster en congresos relacionados con la presente Tesis Doctoral:

V Simposio de Medicina de Precisión. Mecanismos moleculares de la sarcopenia: Efecto protector del ejercicio y la melatonina en el ratón iMS-*Bmal1*^{-/-} 2024. Granada (España). **Ramírez-Casas Y**, Fernández-Martínez J, Aranda-Martínez P, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

Certificaciones

I International Workshop on Biotechnology for Applied Life Sciences – BALS 2024.

Therapeutic capacity of exercise and melatonin against inflammation and mitochondrial dysfunction in the iMS-*Bmal1*^{-/-} model of sarcopenia. 2024. Granada (España). **Ramírez-Casas Y**, Fernández-Martínez J, Aranda-Martínez P, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

11th IBRO World Congress of Neuroscience - IBRO 2023. Zebrafish parkinsonism affects clock genes expression, causing chronodisruption-related loss of locomotor activity, melatonin rhythm, and mitochondrial dynamics shift, which are restored by melatonin treatment. 2023. Granada (España). Aranda-Martínez P, Fernández-Martínez J, **Ramírez-Casas Y**, Guerra-Librero A, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

11th International Meeting on Mitochondrial Pathology - EUROMIT 2023. Exercise and melatonin counteract *Bmal1* loss-dependent sarcopenia in mouse skeletal muscle by improving mitochondrial ultrastructure and function. 2023. Bolonia (Italia). Fernández-Martínez J, **Ramírez-Casas Y**, Aranda-Martínez P, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

11th International Meeting on Mitochondrial Pathology - EUROMIT 2023. Therapeutic capacity of exercise and melatonin against inflammation and mitochondrial dysfunction in the iMS-*Bmal1*^{-/-} model of sarcopenia. 2023. Bolonia (Italia). **Ramírez-Casas Y**, Fernández-Martínez J, Aranda-Martínez P, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

11th International Meeting on Mitochondrial Pathology - EUROMIT 2023. MPTP-induced parkinsonism in zebrafish provokes chronodisruption-related loss of daily melatonin and locomotor activity rhythms and mitochondrial dynamics shift, which are restored by melatonin treatment. 2023. Bolonia (Italia). Aranda-Martínez P, Fernández-Martínez J, **Ramírez-Casas Y**, Guerra-Librero A, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

Certificaciones

Mitochondrial Medicine Meeting – mitoNice 2022. Evaluation of mitochondrial dysfunction and the therapeutic capacity of exercise and melatonin in the iMS-*Bmal1*^{-/-} murine model of sarcopenia. 2022. Niza (Francia). **Ramírez-Casas Y**, Fernández-Martínez J, Aranda-Martínez P, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

Mitochondrial Medicine Meeting – mitoNice 2022. Melatonin restores normal mitochondrial function and chronodisruption in a zebrafish model of Parkinson's disease. 2022. Niza (Francia). Aranda-Martínez P, Fernández-Martínez J, **Ramírez-Casas Y**, Guerra-Librero A, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

7th International Congress of Myology – MYOLOGY 2022. Characterization of the skeletal muscle-specific and inducible *Bmal1* knockout mouse (iMS-*Bmal1*^{-/-}) as a model for the study of sarcopenia and evaluation of a treatment with exercise and/or melatonin. 2022. Niza (Francia). Fernández-Martínez J, **Ramírez-Casas Y**, Aranda-Martínez P, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

7th International Congress of Myology – MYOLOGY 2022. Zebrafish as a model to study skeletal muscle aging. 2022. Niza (Francia). Aranda-Martínez P, **Ramírez-Casas Y**, Fernández-Martínez J, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

International Neuroscience Conference – FENS Forum 2022. Relationship between clock genes and Parkinson's pathophysiology in zebrafish. 2022. París (Francia). Aranda-Martínez P, Fernández-Martínez J, **Ramírez-Casas Y**, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

Si vuelvo la vista atrás aún recuerdo el día que pisé por primera vez el laboratorio 142 del CIBM. Se vienen a mi memoria recuerdos de cómo aguardaba expectante a que el Profesor Acuña me hiciera la entrevista, cómo se fue presentando la gente que formaba el grupo haciéndome preguntas de todo tipo, aunque yo era incapaz de recordar tantos nombres nuevos... pero sobre todo recuerdo la alegría e ilusión por comenzar una nueva etapa en mi camino que, aunque sabía que no sería fácil, iba a ser una de las mejores de mi vida. La verdad es que no me equivocaba.

Por todo esto son muchas a las personas que tengo que agradecer su apoyo y ayuda en este camino, porque sin ellos a mi lado no hubiera sido posible recorrerlo y alcanzar la ansiada meta de esta etapa.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi director y tutor de tesis Darío, no solo por darme esta gran oportunidad en su equipo, sino por confiar desde el primer momento en mí y por enseñarme a hacer ciencia de esa manera tan brillante que logra la excelencia.

A Germaine, la directora del grupo CTS-101, por ser un ejemplo a seguir como científica, pero además por todos tus consejos personales y por su alegría que traspasa las paredes del laboratorio.

Agradecer también a Luis Carlos, por no sólo ser un jefe dentro del laboratorio sino también por ser compañeros del torneo de pádel, congresos y alguna que otra cerveza.

A Iryna, por enseñarme desde primera hora cómo se debe estar en el laboratorio y por esos buenos momentos bailando salsa en las comidas de Navidad y en el Corpus.

Agradecimientos

A Jose, la otra mitad de SarcoTeam, porque sin tu ayuda no habría llegado hasta aquí hoy. Para mi eres y serás el mejor compañero que podría tener en el laboratorio, además de un gran amigo fuera. Muchas gracias por estar aquí siempre, por tu paciencia y tu forma de ser. Juntos lo hemos conseguido.

Tengo la gran suerte de formar parte de un grupo que está formado por muchas personas unidas por la pasión de la ciencia, pero que no dejan de ser unos magníficos compañeros y mejores personas. Es por esto por lo que tengo que agradecer mucho a todos con los que empecé, y a los que se fueron uniendo después a esta aventura en especial a Paula, María, Alba, Laura, Javi F, Julia, Sergio, Pilar, Ana, Agustín, Eliana, Elena, Laura J, Pablo, Carmen, Javi, Sergio, Yaco y Enrica por acogerme así de bien tanto en el laboratorio como fuera de este. Para nosotros se quedan, no solo los días trabajando codo a codo en la poyata, sino los buenos momentos que hemos vivido como cumpleaños, ferias, comidas de Navidad y alguna que otra fiesta, casas rurales, rutas de senderismo, viajes y congresos, pero sobre todo muchas risas que hacen que recuerde este camino de forma muy bonita y rodeada de verdaderos amigos.

Tampoco me olvido de dar las gracias a Paola, Sara, Juanma, Marisol, Inma, Luis, Julio, Macarena y Ramy, que han pasado una gran parte de este camino conmigo ayudándome en todo lo que han podido y a los que me llevo con mucho cariño.

También me gustaría agradecer a todos los estudiantes de TFG, TFM, prácticas de FP, así como los que han venido de otros países para hacer sus estancias a nuestro grupo de investigación en concreto a Bota, Arailym, Kimberly, Víctor, Juan, Aya, Armi, Lucía, y María, por aportar su granito de arena y sus ganas de aprender.

Agradecimientos

Las redes que se establecen mientras se hace la tesis son tan fuertes que van más allá de las puertas del laboratorio y me han permitido conocer muchas personas maravillosas tanto dentro como fuera del CIBM. Muchas gracias al Lab. 202 (aunque por aquí todo el mundo lo conoce como el de los “Chufísticos”) y en especial a Chufi, Teresa, M^a Jesús, Antoñito, Laura y Patri. Aparte de ser un reservorio de conocimientos y recursos de Western Blot, siempre han estado dispuestos a ayudar en lo que fuera y a animarse en más de una fiesta. Además, tengo que agradecer a David, Miguel, Miriam, Sara, Andrea, Alicia, Sara, Pilar, Alex, Lara, Elena, Paco y Rafa de los Labs. 105 y 127, porque desde que me acogieron en el TFM han seguido preocupándose por mí y manteniendo un estrecho vínculo que aprecio mucho. También me gustaría dar las gracias a Isabel y a Raquel, con las que compartí docencia estos años en el Departamento de Fisiología, que me han enseñado a dar lo mejor como docente, y ayudado en todo lo que ha estado en su mano. No me olvido de la gente que he conocido gracias al grupo y en la estancia que realicé en Padova, como son Tamara, Fati, Dani D, Josua, Araceli, Alexia y Alex que se han quedado formando parte de los recuerdos de esta etapa y de más que están por venir.

Los amigos son la familia que se escoge libremente y tengo mucha suerte de contar con gente a mi lado que sé que va a estar conmigo pase lo que pase. La verdad que muchos de vosotros ya sabéis lo que os quiero, pero me gustaría nombrar especialmente a Andrea, Vero, Nevi, Inma, David, Mónica, Laura, Luci, Eudald, Larios, Pérez, Peppe, Álvaro, Juanpe, Juan, Gonzalo, Amelia, Jesús, Jose, Javi y Pablo. Muchas gracias por formar parte de mi vida, por escucharme cuando necesito consejo y por ser como sois.

Agradecimientos

A Alex, mi compañero de aventuras. No hay suficiente espacio en la tesis para decirte lo que siento por ti, pero creo que después de tanto tiempo juntos sobran las palabras. Muchas gracias por tu cariño, por tu apoyo incondicional y por seguir viajando en este camino conmigo siempre juntos y de la mano. También quiero agradecer a sus padres Ana y Blas, y demás familia porque siempre me han tratado como una hija y me han ayudado en todo lo que han podido.

Por último, y para mí lo más importante agradecer a mi familia, tanto a la que está y a la que, aunque no esté, siempre tengo en mi corazón y vienen conmigo allá donde vaya. Muchas gracias, papá, mamá, hermana y abuela, sois para mí lo más importante y lo que más quiero en la vida, porque hacéis que todo el esfuerzo merezca la pena y por enseñarme a seguir luchando y nunca rendirme siguiendo el curso de este camino, aunque vengan curvas. Os quiero.

ABREVIATURAS

Abreviaturas

AADC: L-aminoácido aromático
descarboxilasa

AANAT: arilalquilamina N-acetiltransferasa

ACTA1: actina alfa 1 de músculo
esquelético humana

ADP: adenosín difosfato

AFMK: N1-acetil-N2-formil-5-metoxi-
cinuramina

AMK: N1-acetil-5-metoxi-cinuramina

aMT: melatonina o N-acetil-5-
metoxitriptamina

ASMT: N-acetilserotonina O-
metiltransferasa

ATP: adenosín trifosfato

AWGS: grupo de trabajo asiático sobre
sarcopenia

BSA: albúmina sérica bovina

CaMKII: proteína quinasa Ca^{2+} /calmodulina
II

CAT: catalasa

CI: complejo I

CII: complejo II

CK1ε: caseína quinasa 1ε

COX-2: ciclooxygenasa-2

CSA: área de sección transversal

DXA: absorciometría de rayos X de energía
dual

E: ejercicio

ECM: matriz extracelular

EGF: factor de crecimiento epidérmico

ETC: cadena de transporte de electrones

EWGSOP: grupo de trabajo europeo sobre
sarcopenia en personas mayores

F1/2: primera/segunda generación filial

FCCP: carbonilcianuro-p-
trifluorometoxifenilhidrazona

FGF21: factor de crecimiento de
fibroblastos 21

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos

FI: índice de fragilidad

G6PD: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GABA: ácido γ-aminobutírico

GM: músculo gastrocnemio

Abreviaturas

GPx: glutatión peroxidasa

GRd: glutatión reductasa

GSK-3 β : glucógeno sintasa quinasa 3 β

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HGF: factor de crecimiento hepatocitario

i.p.: intraperitoneal

IFM: mitocondria intermiofibrilar

IGF-1/2: factores de crecimiento similares a la insulina

IMC: índice de masa corporal

iNOS: óxido nítrico sintasa

ipRGC: células ganglionares intrínsecamente fotosensibles

LOO[•]: radical peroxilo

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos

MER: receptor del estrógeno mutado

miRNAs: microRNAs

MPTP: poro de transición de permeabilidad mitocondrial

Mstn: miostatina

MRFs: factores reguladores de la miogénesis

mtDNA: ADN mitocondrial

MuSCs: células madre musculares

Myog: miogenina

MyHC: cadena pesada de miosina

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleótido (en forma oxidada)

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido (en forma reducida)

NAMPT: nicotinamida fosforribosiltransferasa

NF- κ B: factor nuclear κ B

NO: óxido nítrico

NSQ: núcleos supraquiasmáticos

O₂^{-•}: radical superóxido

OCR: tasa de consumo de oxígeno

OH[•]: radical hidroxilo

ONOO⁻: peroxinitrito

OXPHOS: fosforilación oxidativa

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

Abreviaturas

PDGF-BB: factor de crecimiento derivado
de plaquetas-BB

Pro-IL-1 β : pro-interleuquina-1 β

PVDF: fluoruro de polivinilideno

RMA: resonancia magnética nuclear animal

RM: resonancia magnética

RMN: resonancia magnética nuclear

RNS: especies reactivas del nitrógeno

ROS: especies reactivas del oxígeno

SD: desviación estándar

SDH: succinato deshidrogenasa

SDS-PAGE: electroforesis en gel de
poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SEM: error estándar de la media

SIRT1/3: sirtuina 1/3

SOD: superóxido dismutasa

SPF: libre de patógenos específicos

SSM: mitocondria subsarcolemal

TC: tomografía computarizada

TEM: microscopía electrónica de
transmisión

TMX: tamoxifeno

TNf- α : factor de necrosis tumoral- α

TPH: triptófano hidroxilasa

γ -GCS: γ -glutamilcisteína sintasa

“La verdadera belleza se encuentra en las sombras, en lo
desconocido y en lo inexplorado”

H.P. Lovecraft

A mi familia

RESUMEN

Resumen

El envejecimiento conlleva un deterioro progresivo en la funcionalidad de los organismos, aumentando el riesgo de enfermedades crónicas. En este contexto, la sarcopenia es una enfermedad asociada al envejecimiento que se caracteriza por la pérdida gradual de masa muscular, fuerza y función, lo que compromete la movilidad, la salud general y la esperanza de vida. Aunque sus mecanismos subyacentes no están completamente esclarecidos, se han identificado varios factores implicados en su desarrollo, como la inflamación crónica, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la apoptosis y cambios hormonales y microvasculares, todos los cuales afectan la homeostasis del músculo esquelético.

Cada vez hay más pruebas que vinculan la cronodisrupción con el envejecimiento, lo que sugiere que las alteraciones en los ritmos circadianos podrían contribuir al desarrollo de la sarcopenia. Los genes y proteínas del reloj circadiano se expresan en el músculo esquelético, y entre ellos destaca *Bmal1*, un gen clave que vincula el reloj biológico con el sistema inmunitario y desempeña funciones esenciales en la salud muscular. *Bmal1* regula procesos fundamentales como la reparación muscular y la función mitocondrial. Dado que su expresión disminuye con la edad, la alteración del reloj circadiano en el músculo esquelético podría estar estrechamente relacionada con la sarcopenia. Para investigar esta hipótesis, desarrollamos un modelo de ratón deficiente para *Bmal1* inducible y específico de músculo esquelético (iMS-*Bmal1*^{-/-}), con el objetivo de evaluar si la pérdida de este gen contribuye a los cambios que conducen a la sarcopenia. Los ratones iMS-*Bmal1*^{-/-} mostraron una disminución en la actividad locomotora y alteraciones en los ritmos circadianos, junto con una reducción de la masa muscular y un aumento en la fragilidad. Además, se observó atrofia, fibrosis

Resumen

y una conversión hacia fibras musculares más oxidativas. Estos cambios se acompañaron de una disminución en la capacidad oxidativa mitocondrial, lo que sugería una adaptación compensatoria en el metabolismo de las fibras musculares. También se observaron alteraciones en la ultraestructura muscular, con mayor daño mitocondrial y reducción en el número de mitocondrias. Para contrarrestar estos efectos, evaluamos el impacto terapéutico del ejercicio físico y la melatonina. Ambos tratamientos mitigaron las consecuencias negativas de la pérdida de *Bmal1*, destacando la importancia de este gen en la salud muscular, y demostraron que tanto el ejercicio como la melatonina son estrategias efectivas contra la sarcopenia, incluso en ausencia de *Bmal1*.

Basándonos en estos hallazgos, el presente estudio profundiza en los mecanismos moleculares que subyacen a estos cambios y en las vías a través de las cuales la melatonina y el ejercicio ejercen sus efectos beneficiosos. Para ello, analizamos la expresión de marcadores de células madre musculares (MuSC) y de factores reguladores de la miogénesis muscular (MRFs), así como alteraciones en la morfología muscular mediante resonancia magnética nuclear (RMN). Para conocer el estado mitocondrial en el modelo experimental, se evaluó la tasa de consumo de oxígeno (OCR), fuga de protones y producción de ATP, mediante experimentos con mitocondrias aisladas en Seahorse. Adicionalmente, se analizaron proteínas y genes relacionados con la dinámica mitocondrial en los procesos de fusión, fisión, biogénesis mitocondrial y mitofagia, así como cambios en la vía NAMPT-NAD⁺-SIRT6 y otros marcadores asociados a la inflamación y la señalización Klotho-FGF21, mediante técnicas de Western blot y

Resumen

qRT-PCR. Finalmente, se midió el cociente NAD^+/NADH en los distintos grupos, incluyendo los animales control y los tratados con ejercicio y/o melatonina.

Los resultados indican que los ratones *iMS-Bmal1^{-/-}* presentan una menor expresión en los marcadores de MuSC y MRFs, lo que sugiere una regeneración muscular alterada en los animales con deficiencia en *Bmal1*, que fue restaurada con los tratamientos de ejercicio y/o melatonina. Aunque la respiración mitocondrial no mostró cambios significativos, el ejercicio produjo una disminución en el valor de OCR, que la melatonina no logró contrarrestar. Al contrario, la inhibición del complejo I (CI) con rotenona disminuyó la OCR, lo que podría indicar una alteración a nivel del complejo II (CII) en este modelo de ratón. Además, se observaron mejoras en la fuga de protones y la producción de ATP en los grupos con tratamientos compensando la deficiencia mitocondrial. También se observaron alteraciones en la dinámica mitocondrial que afectaron la integridad de las mitocondrias en el músculo esquelético, dando explicación a los cambios en la morfología que se produce con la falta de *Bmal1*. Además, estos ratones mostraron alteraciones en el metabolismo energético, una respuesta antioxidante deteriorada y un perfil inflamatorio alterado. De manera destacable, tanto el ejercicio como la melatonina lograron revertir estos déficits, restaurando la salud muscular en ausencia de *Bmal1* y dando explicación de los cambios que observamos que desencadenan sarcopenia.

Estos hallazgos refuerzan la importancia del reloj circadiano en la homeostasis del músculo esquelético y posicionan al ejercicio y la melatonina como estrategias terapéuticas prometedoras contra la sarcopenia. Además, resaltan la necesidad de profundizar en las vías moleculares responsables de sus efectos protectores, lo que

Resumen

podría abrir nuevas oportunidades para el desarrollo de intervenciones dirigidas a mitigar el impacto del envejecimiento en la musculatura esquelética.

SUMMARY

Summary

Aging entails a progressive deterioration in the functionality of organisms, increasing the risk of chronic diseases. In this context, sarcopenia is an aging-associated disease characterized by the gradual loss of muscle mass, strength, and function, which affects mobility, overall health, and life expectancy. Although its underlying mechanisms are not fully elucidated, several factors involved in its development have been identified, such as chronic inflammation, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, apoptosis, and hormonal and microvascular changes, all of which affect skeletal muscle homeostasis. There is increasing evidence supporting the relationship between chronodisruption and aging, suggesting that alterations in circadian rhythms could contribute to the development of sarcopenia. Circadian clock genes and proteins are expressed in skeletal muscle, among which *Bmal1* stands out as a key gene that links the biological clock with the immune system and plays essential roles in muscle health. *Bmal1* regulates fundamental processes such as muscle repair and mitochondrial function. Since its expression decreases with age, circadian clock disruption in skeletal muscle could be closely related to sarcopenia.

To investigate this hypothesis, we developed an inducible and muscle-specific *Bmal1* knockout mouse model (iMS-*Bmal1*^{-/-}) to determine whether the loss of this gene could be a key factor in the changes leading to sarcopenia. iMS-*Bmal1*^{-/-} mice showed a decrease in locomotor activity and alterations in circadian rhythms. Additionally, they exhibited a reduction in muscle mass and an increase in frailty. Structurally, muscle atrophy, fibrosis, and a shift toward more oxidative muscle fibers were observed. These changes were accompanied by a decrease in mitochondrial oxidative capacity, suggesting a compensatory adaptation in muscle fiber metabolism. Alterations in muscle ultrastructure were also evident, with increased mitochondrial

Summary

damage and a reduction in the number of mitochondria. To counteract these effects, we evaluated the therapeutic impact of physical exercise and melatonin. Both treatments mitigated the negative consequences of *Bmal1* loss, highlighting the importance of this gene in muscle health, and demonstrated that both exercise and melatonin are effective strategies against sarcopenia, even in the absence of *Bmal1*.

Based on these findings, the present study delves into the molecular mechanisms underlying these changes and the pathways through which melatonin and exercise exert their beneficial effects. For this purpose, we analyzed the expression of muscle stem cell (MuSC) markers and myogenic regulatory factors (MRFs) as well as alterations in muscle morphology using nuclear magnetic resonance (RMN). To determine the mitochondrial state in the experimental model, we assessed oxygen consumption rate (OCR), proton leak, and ATP production using isolated mitochondria in Seahorse assays across different experimental groups. Additionally, proteins and genes related to mitochondrial dynamics in the processes of fusion, fission, mitochondrial biogenesis, and mitophagy were analyzed, along with changes in the NAMPT-NAD⁺-SIRT6 pathway and other markers associated with inflammation and Klotho-FGF21 signaling using Western blot and qRT-PCR techniques. Finally, the NAD⁺/NADH ratio was measured in the different groups, including control animals and those treated with exercise and/or melatonin.

The results indicate that iMS-*Bmal1*^{-/-} mice showed lower expression of MuSC and MRF markers, suggesting impaired muscle regeneration in *Bmal1*-deficient animals, which was restored with exercise and/or melatonin treatments. Although mitochondrial respiration did not show significant changes, exercise led to a decrease

Summary

in OCR, which melatonin failed to counteract. On the contrary, complex I (CI) inhibition with rotenone decreased OCR, which could indicate an alteration at the complex II (CII) level in this mouse model. Additionally, improvements in proton leak and ATP production were observed in the treatment groups, compensating for mitochondrial deficiency. Alterations in mitochondrial dynamics were also evident, affecting mitochondrial integrity in skeletal muscle and explaining the morphological changes caused by *Bmal1* deficiency. Furthermore, these mice exhibited alterations in energy metabolism, a deteriorated antioxidant response, and an altered inflammatory profile. Notably, both exercise and melatonin successfully reversed these deficits, restoring muscle health in the absence of *Bmal1* and providing an explanation for the changes that trigger sarcopenia.

These findings reinforce the importance of the circadian clock in skeletal muscle homeostasis and position exercise and melatonin as promising therapeutic strategies against sarcopenia. Moreover, they highlight the need to further investigate the molecular pathways responsible for their protective effects, which could open new opportunities for developing interventions aimed at mitigating the impact of aging on skeletal muscle.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Sarcopenia en el envejecimiento: implicaciones en la salud y funcionalidad muscular	3
1.1 Envejecimiento.....	3
1.2 Sarcopenia.....	7
1.2.1 Definición y clasificación de la sarcopenia	7
1.2.2 Causas, manifestaciones clínicas y diagnóstico	8
1.2.3 Estructura muscular y fisiopatología de la sarcopenia	12
1.2.4 Interacción entre inflamación, estrés oxidativo, mitocondria y apoptosis en el envejecimiento	15
1.2.5 Disfunción mitocondrial en el envejecimiento	18
1.2.6 Miogénesis muscular y envejecimiento.....	21
1.2.7 Tratamientos de la sarcopenia.....	24
2. Implicación de los genes reloj en el músculo esquelético.....	26
2.1 El reloj biológico	26
2.2 Cronodisrupción, genes reloj y su impacto en el músculo esquelético	30
3. La melatonina en el tratamiento de la sarcopenia	34
3.1 Melatonina	34
3.1.1 Síntesis, metabolismo y dianas de la melatonina	34
3.1.2 Funciones de la melatonina pineal y extrapineal	38
3.2 Estudios previos de la melatonina en el envejecimiento y sarcopenia	42
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	46
1. Hipótesis	48
2. Objetivos	49
2.1 Objetivo general.....	49
2.2 Objetivos específicos.....	49
MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
1. Animales, tratamientos y diseño experimental.....	52
1.1 Generación del modelo de ratón deficiente para <i>Bmal1</i> inducible y específico de músculo esquelético.....	52
1.2 Diseño experimental y tratamientos	56
2. Resonancia Magnética Nuclear	58
3. Análisis de la expresión génica	59
3.1 Preparación del tejido	59
3.2 Extracción de ARN	59
3.3 Reacción de transcripción inversa	60
3.4 qRT-PCR Cuantitativa	60
4. Análisis de la respiración mitocondrial	61
5. Determinación de la concentración de proteínas y western blot	63

6. Medida del nivel de NAD ⁺ /NADH.....	66
7. Análisis estadístico	66
RESULTADOS.....	67
1. Los ratones iMS- <i>Bmal1</i> ^{-/-} <i>presentan una miogénesis reducida, que se restaura con ejercicio y con melatonina</i>	70
2. Los ratones iMS- <i>Bmal1</i> ^{-/-} presentan alteraciones morfológicas en el GM, que se restauran con ejercicio y con melatonina.....	72
3. Los ratones iMS- <i>Bmal1</i> ^{-/-} no muestran una respiración mitocondrial afectada, pero se deteriora con el ejercicio y la inhibición del CI, mientras que la melatonina mejora la respiración a través del CI.	74
4. Los ratones iMS- <i>Bmal1</i> ^{-/-} muestran una dinámica mitocondrial alterada, la cual fue normalizada por el ejercicio y el tratamiento con melatonina.....	77
5. Los ratones iMS- <i>Bmal1</i> ^{-/-} presentan cambios en el eje NAMPT-NAD ⁺ -SIRT6	79
6. Los ratones iMS- <i>Bmal1</i> ^{-/-} presentan alteraciones en la defensa antioxidante, la respuesta inflamatoria y la vía FGF21-Klotho	82
DISCUSIÓN.....	84
CONCLUSIONES.....	95
CONCLUSIONS.....	99
BIBLIOGRAFÍA	103

INTRODUCCIÓN

1. Sarcopenia en el envejecimiento: implicaciones en la salud y funcionalidad muscular

1.1. Envejecimiento

El envejecimiento se define como un proceso progresivo de deterioro funcional que afecta a los seres vivos, caracterizado por la pérdida gradual de la integridad fisiológica. A medida que este proceso avanza se incrementa la susceptibilidad a enfermedades asociadas con la edad, lo que resulta en una reducción de la esperanza de vida en condiciones óptimas de salud (López-Otín et al., 2023).

El envejecimiento puede clasificarse en dos categorías según su origen: fisiológico y patológico (Figura 1). El envejecimiento fisiológico se refiere a los cambios graduales que ocurren de manera intrínseca en el organismo y que contribuyen al deterioro funcional general. Entre estos cambios se incluyen, entre otros, el acortamiento de los telómeros, el daño en el ADN, la disfunción mitocondrial, la disminución en los niveles de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), alteraciones en los procesos de autofagia, la pérdida de la capacidad regenerativa de las células madre, la inflamación crónica de bajo grado (*inflammaging*), el desequilibrio proteico, las alteraciones en la detección de nutrientes, la disbiosis y los fallos en la comunicación intercelular, así como la disminución progresiva de la producción hormonal. Como un proceso que subyace a todo lo demás, la disminución de las señales que desde la retina llegan al reloj biológico central durante el envejecimiento, condiciona un deterioro funcional y progresivo de

aquél que afecta a toda la homeostasis del organismo. Todos estos factores interactúan para contribuir al declive funcional progresivo del organismo, definiendo el envejecimiento fisiológico como un proceso complejo y multifactorial.

Por otro lado, el envejecimiento patológico está asociado a alteraciones específicas provocadas por factores externos y está relacionado con diversas patologías que deterioran significativamente la calidad de vida de los pacientes. Entre estas se incluyen la diabetes, el Parkinson, el Alzheimer, el cáncer, así como enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, además de la degeneración de órganos esenciales para el adecuado funcionamiento del organismo (Li et al., 2024).

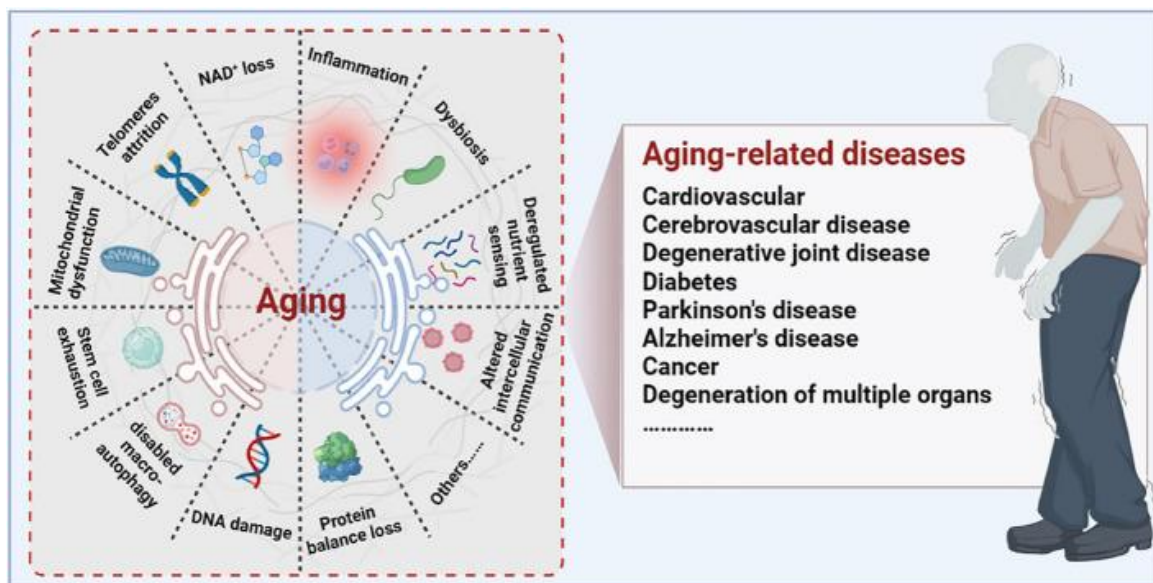


Figura 1. Factores y enfermedades asociadas al envejecimiento. La figura destaca los factores que impulsan el envejecimiento, como la disminución de NAD⁺, el acortamiento de telómeros, el daño en el ADN, la disfunción mitocondrial, la reducción de células madre, la inhibición de la macroautofagia, el desequilibrio proteico, la inflamación, la desregulación en la detección de nutrientes, la disbiosis y las alteraciones en la comunicación celular. Al alcanzar un umbral crítico, estos factores contribuyen al aumento de enfermedades relacionadas con la edad, como patologías cardiovasculares, diabetes, Parkinson, Alzheimer y cáncer, entre otras (Li et al., 2024).

El envejecimiento poblacional se ha convertido en una preocupación global de creciente relevancia, requiriendo la implementación de estrategias innovadoras para abordar los desafíos que presenta en el ámbito social y en los sistemas de salud. De acuerdo con estimaciones de Naciones Unidas de 2024, se proyecta que la proporción de personas de 65 años o más experimente un crecimiento acelerado, prácticamente duplicándose entre 2024 y 2054, al pasar del 17 % al 33 % de la población mundial (Figura 2). Para el año 2070, este grupo demográfico alcanzará un total de 2.2 billones de personas, con una estimación de que representen entre el 33 % y el 49 % de la población global hacia el año 2100.

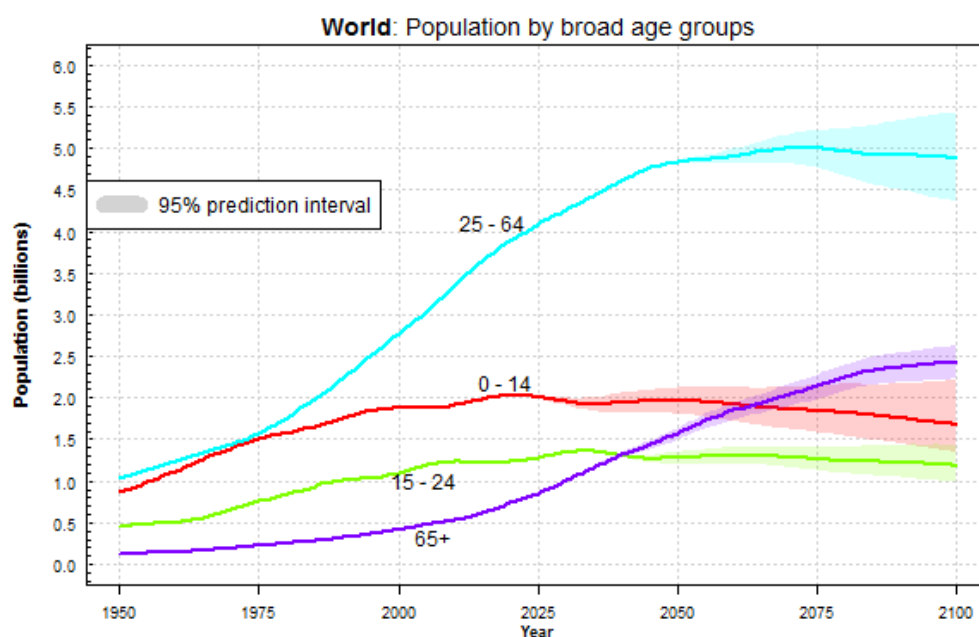


Figura 2. Estimación de la población mundial por grupos de edad, entre 1950 y 2100. (United Nations - Department of Economic and Social Affairs (DESA), Population Division. World Population Prospects 2024. <https://population.un.org/wpp>).

Este fenómeno será particularmente evidente en regiones desarrolladas, como Europa, América del Norte, Asia Oriental y Sudoriental, así como Australia, mientras que, en otras regiones, la población de adultos mayores de 65 años podría duplicarse para mediados de siglo (Figura 3). Este cambio demográfico está intrínsecamente vinculado al envejecimiento epidemiológico, ya que el incremento en la esperanza de vida conlleva una mayor prevalencia de fragilidad y enfermedades asociadas al envejecimiento, siendo la sarcopenia una de las condiciones más destacadas (Angulo et al., 2016). En este contexto, la investigación de los mecanismos subyacentes al envejecimiento, el desarrollo de intervenciones efectivas y el fomento de una vida saludable en la población emergen como estrategias fundamentales para mitigar la carga económica global y promover un envejecimiento saludable.

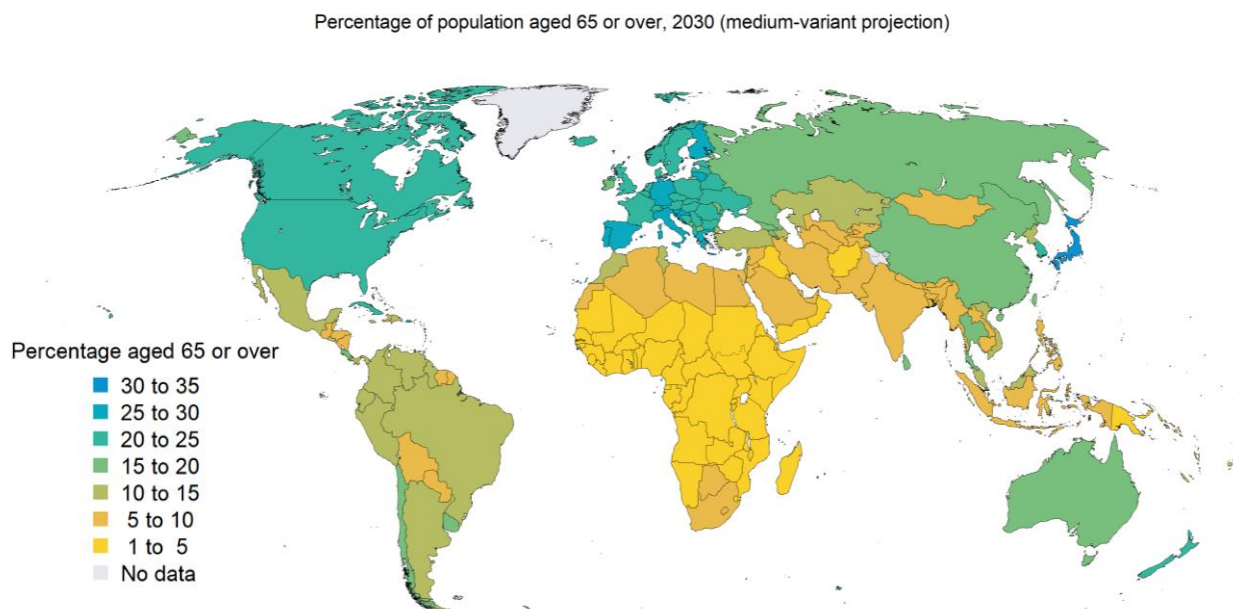


Figura 3. Estimación del porcentaje de personas de 65 años o más en diferentes regiones en 2030 (United Nations - Department of Economic and Social Affairs (DESA), Population Division. World Population Prospects, 2019 <https://population.un.org/wpp2019/Maps/>).

1.2. Sarcopenia

1.2.1. Definición y clasificación de la sarcopenia

El término sarcopenia, derivado del griego *sarx* ("carne") y *penia* ("escasez"), fue introducido hace varias décadas para describir una condición clínica caracterizada por la pérdida de masa muscular esquelética asociada al proceso de envejecimiento (Rosenberg, 1997). Con el tiempo, esta definición ha sido revisada y formalizada por el Grupo de Trabajo Europeo sobre Sarcopenia en Personas Mayores (EWGSOP) y el Grupo de Trabajo Asiático para la Sarcopenia (AWGS), y actualizada en 2019 por el EWGSOP2. En esta versión más reciente, la sarcopenia se clasifica como un trastorno caracterizado por la pérdida progresiva y generalizada de masa y fuerza muscular esquelética, asociado a un mayor riesgo de consecuencias adversas, como discapacidad física, fragilidad, deterioro en la calidad de vida y un incremento en la mortalidad (Cruz-Jentoft et al., 2019).

Si bien la sarcopenia se presenta principalmente en el envejecimiento, también puede manifestarse en adultos jóvenes. En este contexto, se clasifica como "primaria" cuando su origen está relacionado exclusivamente con el envejecimiento, o como "secundaria" cuando se debe a factores adicionales, tales como inactividad física, enfermedades crónicas o malnutrición (Cruz-Jentoft et al., 2010). Este trastorno también presenta diferentes estadios, los cuales varían según la gravedad de la afección en cada paciente. En el estadio de sarcopenia leve o pre-sarcopenia, se observa una reducción

de la masa muscular, sin comprometer la fuerza ni el rendimiento físico. Por otro lado, el estadio de sarcopenia moderada combina la pérdida de masa muscular con una disminución en la fuerza o el rendimiento físico. Finalmente, la sarcopenia grave se diagnostica cuando se cumplen los tres criterios anteriores (Cruz-Jentoft et al., 2010; Sanchez-Tocino et al., 2024). Adicionalmente, el EWGSOP2 ha introducido las subcategorías de sarcopenia aguda, definida como aquella cuya duración es inferior a 6 meses, y sarcopenia crónica, caracterizada por una duración igual o superior a este período (Cruz-Jentoft et al., 2019). Por lo tanto, resulta esencial identificar esta enfermedad de manera precisa, con el objetivo de desarrollar estrategias terapéuticas eficaces y definir planes de recuperación personalizados que respondan a las necesidades específicas de cada paciente.

1.2.2. Causas, manifestaciones clínicas y diagnóstico

Aunque la sarcopenia se presenta con mayor frecuencia como un proceso asociado al envejecimiento, su etiología es compleja y puede manifestarse también en aquellos de mediana edad, lo que ha suscitado un creciente interés por parte de diversas especialidades médicas y quirúrgicas. Si bien el envejecimiento representa el principal factor desencadenante, existen múltiples causas subyacentes que contribuyen a su desarrollo. Entre estas se encuentran las deficiencias nutricionales, como la ingesta insuficiente de energía y/o proteínas, la malabsorción, trastornos gastrointestinales o la anorexia; inactividad física o un estilo de vida sedentario; la presencia de patologías

crónicas, incluidas enfermedades osteoarticulares, trastornos cardiorrespiratorios, neurológicos, metabólicos y cáncer entre otras; así como factores iatrogénicos, tales como hospitalizaciones prolongadas y efectos adversos por el uso de fármacos. Es por ello que la etiología de la sarcopenia es multifactorial, lo que lleva a que se reconozca como un síndrome geriátrico multifacético (Cruz-Jentoft & Sayer, 2019).

La masa y la fuerza muscular son parámetros que varían a lo largo de la vida. Estos valores aumentan progresivamente durante la juventud, pero disminuyen gradualmente con el envejecimiento. Según estudios, a los 75 años, la pérdida de masa muscular se presenta a una tasa anual de 0,64–0,70% en mujeres y 0,80–0,98% en hombres. Sin embargo, la pérdida de fuerza es más rápida, ocurriendo a una tasa de 3–4% en hombres y 2,5–3% en mujeres (Mitchell et al., 2012). Dada esta progresión, es crucial fomentar el desarrollo de fuerza muscular durante la juventud y la adultez temprana, mantener niveles adecuados en la mediana edad y minimizar la pérdida de masa muscular en la vejez (Figura 4) (Cruz-Jentoft et al., 2019).

En la práctica clínica, la sarcopenia se identifica comúnmente en pacientes que presentan síntomas como caídas recurrentes, debilidad, lentitud en la movilidad, dificultad para realizar actividades cotidianas o pérdida significativa de peso acompañada de atrofia muscular (Morley et al., 2011). Sin embargo, su diagnóstico puede resultar complejo, ya que comparte características con otros síndromes relacionados con pérdida de masa muscular, generando confusión diagnóstica. Este es

el caso de la desnutrición, que se asocia con una disminución de la masa muscular debido a la ingesta insuficiente de nutrientes. Otro caso es la caquexia, un síndrome metabólico complejo vinculado a enfermedades graves subyacentes, caracterizado por una pérdida simultánea de peso y masa muscular (Evans et al., 2008). Aunque estas condiciones pueden coexistir con la sarcopenia, esta última se distingue porque implica no solo una reducción de la masa muscular, sino también de la fuerza y la función. Asimismo, la sarcopenia comparte similitudes con la fragilidad, un síndrome geriátrico caracterizado por un deterioro acumulativo del organismo. La fragilidad se manifiesta mediante signos como pérdida involuntaria de peso, agotamiento físico, debilidad en la fuerza de agarre, lentitud al caminar y bajos niveles de actividad física (Fried et al., 2001).

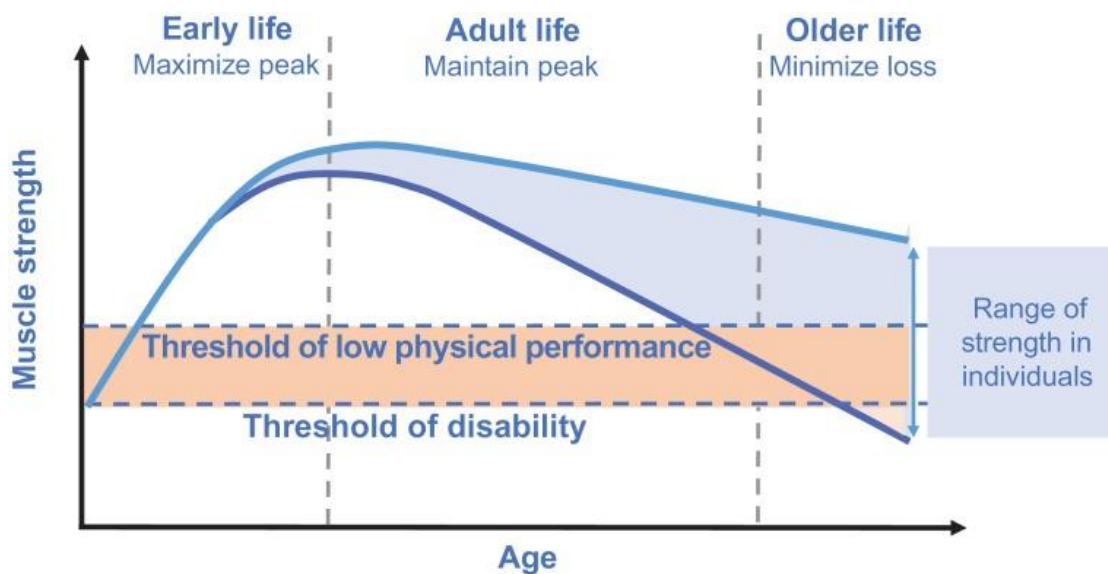


Figura 4. Fuerza muscular en las diferentes etapas de la vida y rango de pérdida en el envejecimiento (Cruz-Jentoft et al., 2019).

A pesar de las similitudes con estas afecciones, la sarcopenia cuenta con criterios clínicos específicos que permiten realizar un diagnóstico diferencial adecuado. Para facilitar su identificación, se utiliza el cuestionario SARC-F, desarrollado por el EWGSOP2. Este cuestionario evalúa aspectos clave de las limitaciones funcionales del paciente, como la fuerza, la capacidad para caminar, levantarse de una silla, subir escaleras y el historial reciente de caídas. La simplicidad y eficacia del SARC-F lo convierten en una herramienta útil para identificar a individuos en riesgo de sarcopenia, permitiendo intervenciones tempranas y dirigidas (Cruz-Jentoft et al., 2019). En casos sospechosos de sarcopenia, se deben medir parámetros relacionados con la fuerza y masa muscular, y el rendimiento físico. La fuerza muscular suele evaluarse mediante una prueba de fuerza de agarre utilizando un dinamómetro, mientras que el rendimiento físico puede determinarse a través de diversas pruebas, destacando la medición de la velocidad de marcha (Beudart et al., 2019). En la medición de la masa muscular se usan técnicas no invasivas como la resonancia magnética (RM), la tomografía computarizada (TC) o la absorciometría de rayos X de energía dual (DXA). Los resultados obtenidos de estas pruebas suelen ajustarse de acuerdo con la altura o el índice de masa corporal (IMC) del paciente para garantizar mayor precisión (Cruz-Jentoft et al., 2019). Aunque se han propuesto varios biomarcadores sanguíneos para el diagnóstico de sarcopenia, hasta el momento ninguno ha demostrado ser lo suficientemente confiable como herramienta diagnóstica principal (Calvani et al., 2017). Por lo tanto, el enfoque actual se centra en

una combinación de evaluaciones clínicas y pruebas de imagen para establecer un diagnóstico preciso y promover un tratamiento adecuado.

1.2.3. Estructura muscular y fisiopatología de la sarcopenia

El músculo esquelético está compuesto por células musculares voluntarias altamente inervadas y con grandes demandas energéticas, lo que lo convierte en un tejido con numerosas funciones corporales. Desde un punto de vista mecánico, su principal función es transformar la energía química en energía mecánica, permitiendo la generación de fuerza y potencia, el mantenimiento de la postura y la facilitación del movimiento, elementos fundamentales para la actividad física. Además de estas funciones mecánicas, desempeña un papel crucial en el metabolismo energético basal, actuando como depósito de sustratos, y contribuyendo a la producción de calor necesaria para mantener la temperatura corporal. Es por ello por lo que, el músculo esquelético es un componente esencial en la prevención de diversas enfermedades y en el mantenimiento de la homeostasis del organismo (Frontera & Ochala, 2015).

Anatómicamente, este tejido es heterogéneo y está compuesto por paquetes de fibras musculares de forma cilíndrica y multinucleadas rodeadas por una capa de tejido conectivo denominada perimisio. Cada fibra muscular se subdivide en miofibrillas, las cuales contienen miofilamentos gruesos y delgados responsables de la contracción muscular. Alrededor de las miofibrillas se encuentran diversos elementos, como el

sistema tubular transverso (Túbulos T), el retículo sarcoplásmico y una red de mitocondrias (Figura 5) (Frontera & Ochala, 2015), en la que se distinguen dos subpoblaciones mitocondriales; las subsarcolemales (SSM), que constituyen aproximadamente el 20% del total y se localizan bajo la membrana plasmática, y las mitocondrias intermiofibrilares (IFM), que se encuentran entre las miofibrillas y representan el 80% del volumen mitocondrial en la fibra muscular (Hoppeler, 1986). Estas subpoblaciones presentan diferencias en sus propiedades bioquímicas y funcionales, lo que sugiere una participación diferenciada en la patogénesis de la sarcopenia.

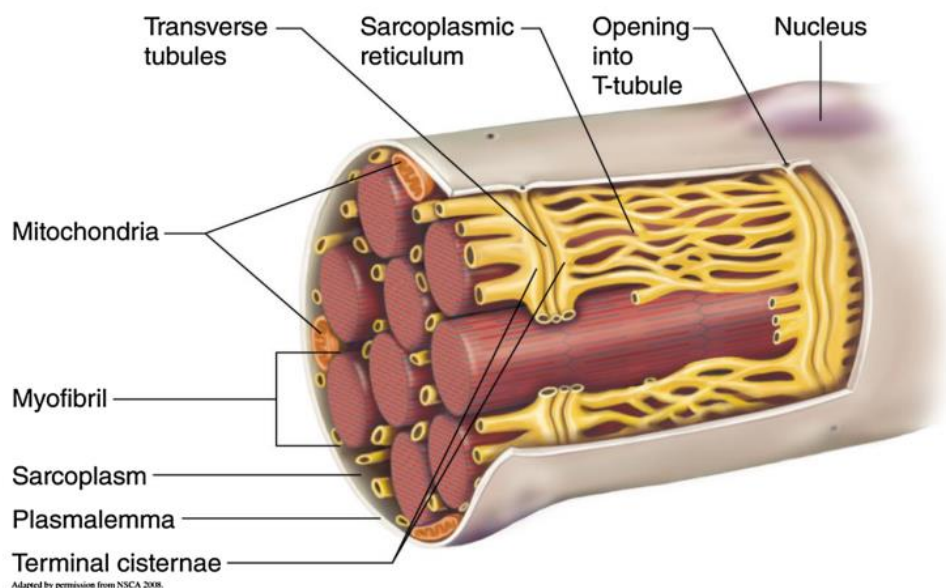


Figura 5. Estructura anatómica de una fibra de músculo esquelético y de sus elementos celulares (Frontera & Ochala, 2015).

Las fibras del músculo esquelético pueden clasificarse en distintos tipos según las isoformas de la cadena pesada de miosina (MyHC), las cuales desempeñan un papel

fundamental en la determinación de las propiedades contráctiles y metabólicas del músculo. Las fibras tipo I se caracterizan por una contracción lenta y un metabolismo predominantemente oxidativo, lo que les confiere una alta resistencia a la fatiga. Por otro lado, las fibras tipo II se caracterizan por su rápida contracción y dependen de vías glucolíticas. Dentro de estas, las fibras tipo IIA, de carácter oxidativo, y las IIB y IIX, ambas glucolíticas. No obstante, en humanos solo están presentes las fibras tipo I, IIA y IIX. Adicionalmente, tanto en humanos como en otras especies se observan fibras híbridas, las cuales surgen de combinaciones entre distintos tipos de fibras (Schiaffino & Reggiani, 2011).

La fisiopatología de la sarcopenia está estrechamente relacionada con el proceso de envejecimiento, dado que este genera un desequilibrio entre las vías anabólicas y catabólicas de las proteínas musculares, lo que conlleva una pérdida progresiva de la masa muscular a través de mecanismos y procesos complejos que aún no han sido completamente dilucidados (Cruz-Jentoft & Sayer, 2019). A nivel celular, la sarcopenia se caracteriza por una reducción tanto en el tamaño como en el número de fibras musculares, acompañada de alteraciones en sus propiedades funcionales. Entre estas modificaciones se incluyen la atrofia, la disminución de la contractilidad, la distribución irregular de las fibras y un aumento en la proporción de fibras híbridas, así como una reducción en el número de núcleos y su desplazamiento a una ubicación central. Asimismo, se observa un incremento en la denervación, una menor síntesis de proteínas, una reducción en la cantidad de células madre musculares (MuSCs) y una disminución

de su capacidad proliferativa y regenerativa (Deschenes, 2004). A estos cambios estructurales y funcionales se suman los procesos de aumento de tejido conectivo (fibrosis) y una mayor infiltración de tejido adiposo (miosteatosi), además de alteraciones en los niveles hormonales, así como en factores de crecimiento y en la microvasculatura del tejido muscular (Damluji et al., 2023; Deschenes, 2004). Estas modificaciones afectan especialmente a las fibras musculares de tipo II, cuya cantidad disminuye progresivamente con el envejecimiento. En contraste, las fibras de tipo I aumentan en número como un mecanismo compensatorio, lo que genera un desequilibrio en la estructura y función del músculo esquelético (Ogawa et al., 2016).

Por último, el envejecimiento se vincula con otros factores que contribuyen en el deterioro, como son la inflamación crónica de bajo grado (*inflammaging*), el estrés oxidativo, la reducción de la capacidad respiratoria y disfunción mitocondrial, y la apoptosis celular (Angulo et al., 2016).

1.2.4. Interacción entre inflamación, estrés oxidativo, mitocondria y apoptosis en el envejecimiento

Con el avance de la edad, el organismo entra en un estado de inflamación crónica de bajo grado, conocido como *inflammaging*, el cual representa un factor de riesgo para la morbilidad y mortalidad asociadas a enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Franceschi et al., 2000). Tal estado contribuye al deterioro de la integridad tisular y al desarrollo de diversas patologías vinculadas con la edad, incluida

la sarcopenia (Xu & Wen, 2023). Durante este proceso, se produce un incremento en la activación de la vía inflamatoria del factor nuclear κ B (NF- κ B), impulsada por el incremento del estrés oxidativo. Este aumento puede deberse a una sobreproducción de radicales libres, como las especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS), y/o a una reducción en la capacidad antioxidante. La acumulación de radicales libres favorece la translocación de NF- κ B al núcleo, donde regula la expresión de genes implicados en la producción de proteínas y citoquinas proinflamatorias, como la pro-interleucina-1 β (pro-IL-1 β). Esta respuesta inflamatoria genera un ambiente prooxidante que daña la mitocondria, exacerbando la producción de radicales libres. Como consecuencia, el estrés oxidativo mitocondrial induce la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP), facilitando la liberación de estos radicales y el ADN mitocondrial al citosol. Estas moléculas activan el inflamasoma NLRP3, que a su vez estimula la pro-caspasa-1, promoviendo la maduración de la IL-1 β y otras citoquinas, amplificando así la respuesta inflamatoria. Sin embargo, NF- κ B también desempeña un papel protector al evitar la activación excesiva del inflamasoma NLRP3. Esto lo logra mediante la inducción de la expresión de p62, una proteína clave en la mitofagia, que facilita la eliminación de mitocondrias dañadas. No obstante, se ha sugerido que este mecanismo puede estar comprometido con el envejecimiento, lo que contribuiría a la progresión del daño mitocondrial y la inflamación crónica (Acuña-Castroviejo et al., 2017; Fernández-Martínez et al., 2023; Nakahira et al., 2011; Zhong et al., 2016).

Por último, la apoptosis es otro proceso que se intensifica con el envejecimiento, desempeñando un papel fundamental en la sarcopenia, particularmente a través de las vías mediadas por el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y por las mitocondrias (Figura 6) (Fernández-Martínez et al., 2023). Estas últimas son el principal centro de integración de señales apoptóticas y su disfunción se asocia no solo con un estado inflamatorio y un aumento del estrés oxidativo, sino también con alteraciones bioenergéticas, desequilibrios en la proteostasis, y desequilibrios en la dinámica mitocondrial, mitofagia y biogénesis mitocondrial (Marzetti et al., 2013; Marzetti et al., 2010; Xu & Wen, 2023).

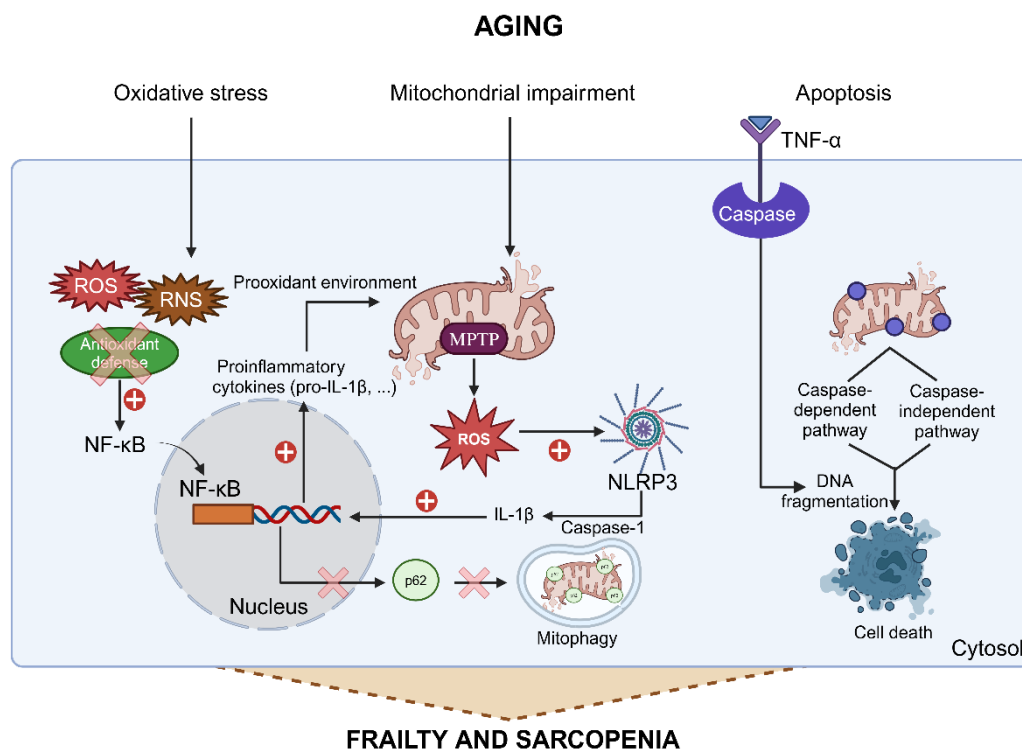


Figura 6. Interacción entre inflamación, estrés oxidativo, mitocondria y apoptosis en el envejecimiento. El proceso de *inflammaging* en el envejecimiento, se caracteriza por un aumento del estrés oxidativo, daño mitocondrial y activación apoptótica. La acumulación de radicales libres activa la vía de NF- κ B, lo que induce la liberación de citoquinas proinflamatorias, agrava el daño mitocondrial y activa el inflamasoma NLRP3, intensificando la inflamación. Estos procesos favorecen fragilidad y sarcopenia en edad avanzada (Fernández-Martínez et al., 2023).

1.2.5. Disfunción mitocondrial en el envejecimiento

La disfunción mitocondrial es un factor clave en el envejecimiento del músculo esquelético y desempeña un papel central en la patogénesis de la sarcopenia (Xu & Wen, 2023). A medida que avanza la edad, la función mitocondrial se ve afectada por una serie de mecanismos interconectados, entre los que destacan el aumento del estrés oxidativo, la acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial (mtDNA), y la desestabilización de la cadena de transporte de electrones (ETC). De manera simultánea, se observa una reducción en la biogénesis mitocondrial y en la mitofagia, junto con alteraciones en la dinámica mitocondrial, lo que afecta la homeostasis celular y contribuye al deterioro progresivo del tejido muscular (López-Otín et al., 2023).

Las mitocondrias, orgánulos esenciales para la producción de adenosín trifosfato (ATP) mediante la fosforilación oxidativa (OXPHOS), experimentan un declive funcional asociado con el envejecimiento. Este deterioro se traduce en alteraciones metabólicas significativas, incluyendo una disminución en la actividad de los complejos de la ETC y una menor eficiencia en la síntesis de ATP (Acuña-Castroviejo et al., 2012; Escames et al., 2007). La sarcopenia se ha vinculado con una disfunción bioenergética mitocondrial caracterizada por una regulación deficiente de la vía PGC-1 α /ERR α y una menor expresión de genes relacionados con OXPHOS y la proteostasis mitocondrial. Como consecuencia, se observa una reducción en el número de mitocondrias, una menor actividad de los complejos respiratorios y un descenso en los niveles de NAD⁺,

exacerbando la disfunción mitocondrial en el músculo envejecido (Migliavacca et al., 2019).

Este deterioro no solo afecta la disponibilidad energética del músculo, sino que también altera el equilibrio de la dinámica mitocondrial favoreciendo la acumulación de mitocondrias dañadas (Lei et al., 2024). En condiciones fisiológicas, la homeostasis mitocondrial se mantiene gracias a un equilibrio dinámico entre los procesos de fusión y fisión de la membrana mitocondrial externa (OMM) e interna (IMM). La fusión mitocondrial, que permite la integración de dos mitocondrias en una sola, ocurre en dos etapas: la fusión de la OMM, mediada por las mitofusinas Mfn1 y Mfn2, y la fusión de la IMM, regulada por la proteína Opa1. En contraste, la fisión mitocondrial, encargada de fragmentar una mitocondria en dos, está dirigida por la proteína Drp1, con la participación de otras proteínas como Fis1. Además de estos procesos, la renovación mitocondrial incluye la eliminación de mitocondrias disfuncionales mediante la mitofagia y la generación de nuevas mitocondrias a través de la biogénesis mitocondrial. La mitofagia es un proceso de degradación que permite la eliminación selectiva de mitocondrias dañadas a través del sistema autofagia-lisosoma, con la participación de proteínas clave como Bnip3, Pink1 y Parkin (Guo et al., 2023; Leduc-Gaudet et al., 2021; Marzetti et al., 2013). Por otro lado, la biogénesis mitocondrial está regulada principalmente por PGC-1 α , que activa los factores de transcripción Nrf1/2 y ERR α , los cuales controlan la expresión de Tfam y promueven la formación de nuevas mitocondrias (Scarpulla, 2011; Wu et al., 1999).

Durante el envejecimiento, la activación de la familia de proteínas FoxO3 a través de la vía AMPK induce la expresión de MuRF1 y Atrogin-1, promoviendo la degradación muscular y afectando la homeostasis mitocondrial (Sandri et al., 2004). Como resultado, se produce una sobreexpresión de Drp1 y Fis1, lo que lleva a una fragmentación mitocondrial excesiva y al inicio de una mitofagia adaptativa para eliminar las mitocondrias disfuncionales (Romanello et al., 2010). En contraste, una reducción en la fisión mitocondrial o un exceso de fusión pueden promover la biogénesis mitocondrial, pero también conllevan la acumulación de subproductos tóxicos (Figura 7) (Guo et al., 2023). En conjunto, estos hallazgos resaltan la estrecha relación entre la dinámica mitocondrial y la atrofia muscular, evidenciando que cualquier desequilibrio en estos procesos puede desencadenar disfunciones mitocondriales que afectan la viabilidad celular y la bioenergética del músculo esquelético.

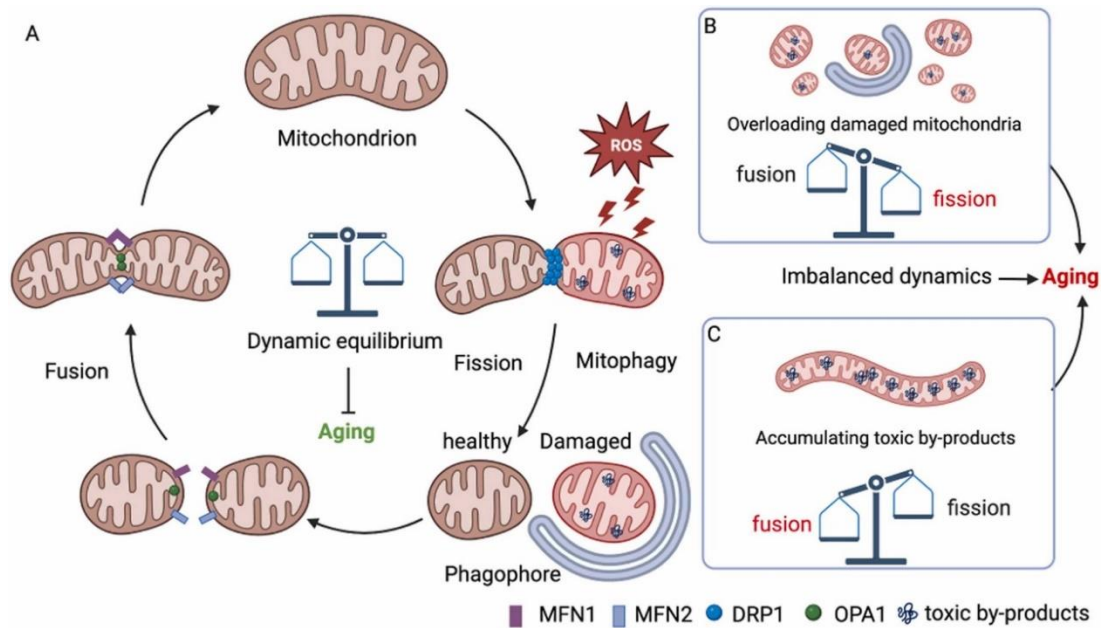


Figura 7. Dinámica mitocondrial en el envejecimiento. (A) La homeostasis en la red mitocondrial está ligada a un equilibrio dinámico. La fusión, mediada por Mfn1, Mfn2 y Opa1, integra mitocondrias, mientras que la fisión, regulada por Drp1 y Fis1, las fragmenta. Además, las mitocondrias se renuevan mediante la eliminación de mitocondrias dañadas y la biogénesis de nuevas mitocondrias; (B) una reducción en la fusión o un aumento en la fisión provocan la fragmentación de las mitocondrias, activando procesos de mitofagia selectivos que alteran el equilibrio, y ; (C) la reducción de la fisión o el exceso de fusión generan una red interconectada y expandida, favoreciendo la biogénesis mitocondrial pero también la acumulación de subproductos tóxicos que aceleran el envejecimiento (Guo et al., 2023).

1.2.6. Miogénesis muscular y envejecimiento

Existe una correlación entre la disminución de la capacidad regenerativa muscular y la edad, un efecto que se manifiesta en la sarcopenia (Angulo et al., 2016). La miogénesis es el proceso mediante el cual se forma y se desarrolla el tejido muscular a partir de células indiferenciadas. Este mecanismo ocurre tanto durante la embriogénesis como en etapas postnatales y está regulado por los MRFs (Figura 8) (Alheib et al., 2023). En respuesta a estímulos externos o lesiones en el tejido, las MuSCs

se activan para llevar a cabo la reparación y regeneración del músculo esquelético. La activación de estas células es promovida por la liberación de diversos factores de crecimiento, secretados por distintos tipos celulares y almacenados en la matriz extracelular (ECM) unidos a proteoglicanos. Entre los factores de crecimiento más relevantes en este proceso se encuentran el factor de crecimiento hepatocitario (HGF), los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-1/2), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB) (Brzoska et al., 2011; Ciemerych et al., 2011). Una vez activadas, las MuCSs reingresan al ciclo celular, iniciando un proceso altamente regulado de diferenciación miogénica que culmina en la formación de fibras musculares maduras. Este proceso es regulado por los MRFs, un grupo de factores de transcripción que incluyen Myf5, MyoD, miogenina (Myog) y MRF4, así como otros reguladores clave como Paired Box 7 (Pax7). Pax7 desempeña un papel esencial en la regulación de la miogénesis, expresándose tanto en MuSCs en estado quiescente como en células activadas, donde controla la expresión de MyoD y Myf5. Myf5, presente en las MuSCs en reposo, promueve la posterior expresión de MyoD, lo que da lugar a la proliferación y diferenciación en mioblastos. MyoD, a su vez, estimula la expresión de Myog y MRF4, promoviendo la fusión de mioblastos en miotubos, los cuales madurarán hasta convertirse en fibras musculares funcionales. Cabe destacar que no todas las células activadas siguen la vía de diferenciación; un subconjunto de estas mantiene la expresión

de Pax7 y suprime MyoD, permitiendo la autorrenovación de las MuSCs asegurando la homeostasis del tejido muscular a lo largo del tiempo (Jiang et al., 2024; Zammit, 2017).

Durante el envejecimiento, la cantidad de MuSCs disminuye progresivamente, lo que compromete su capacidad de autorrenovación y regeneración (Angulo et al., 2016). Este deterioro se atribuye a desequilibrios en su división celular, una reducción en su diferenciación y un incremento en la fibrosis, factores que afectan la regeneración muscular. Diversas vías de señalización están implicadas en este proceso, entre las que destacan la vía JAK-STAT, cuya actividad aumenta con la edad, interfiere con la división simétrica de las MuSCs, reduciendo su número y afectando su capacidad regenerativa, lo que contribuye a la atrofia muscular (Price et al., 2014). Por otra parte, la vía Notch, esencial para la activación y proliferación de las MuSCs, disminuye su actividad con la edad, lo que provoca una menor proliferación celular y una regeneración muscular deficiente (Yartseva et al., 2020). Asimismo, la sobreactivación de la vía Wnt en el músculo envejecido altera la diferenciación miogénica de las MuSCs, favoreciendo una diferenciación fibrogénica que conduce a un aumento de la fibrosis (Brack et al., 2007). Además, es fundamental el equilibrio entre estas vías, ya que, en las primeras etapas de activación de las MuSCs, la señalización Wnt es baja y la vía Notch está activa. Sin embargo, al finalizar este proceso, la actividad de Wnt aumenta mientras que la de Notch disminuye (Figura 8) (Brack et al., 2008).

En conjunto, estas vías de señalización intercelular desempeñan un papel clave en la regeneración muscular y en el mantenimiento de la homeostasis del músculo esquelético, tanto durante el envejecimiento como en diversas enfermedades.

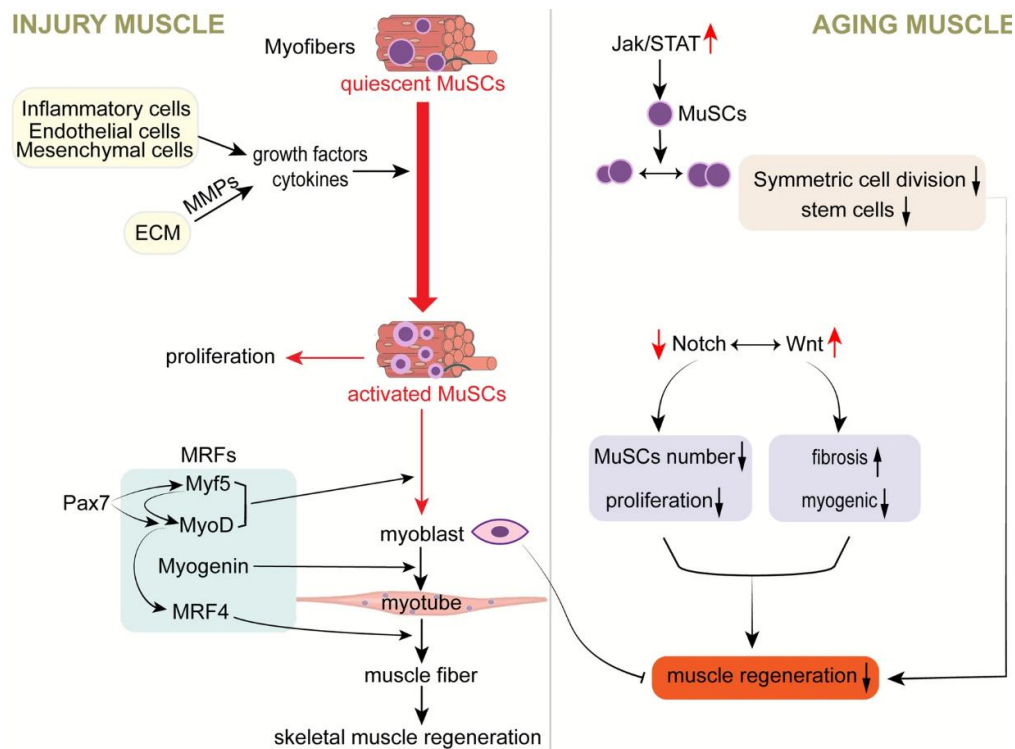


Figura 8. Proceso de miogénesis es una la lesión y en el envejecimiento del músculo esquelético. Tras una lesión muscular, los factores de crecimiento secretados desencadenan la activación de las MuSCs. Posteriormente, los MRFs controlan la diferenciación promoviendo la regeneración muscular. Con el envejecimiento, la activación de las vías JAK-STAT y WNT, y la disminución en la vía Notch, reducen la cantidad de MuSCs y favorecen la atrofia y fibrosis muscular (Jiang et al., 2024).

1.2.7. Tratamientos de la sarcopenia

El tratamiento de la sarcopenia se basa en la comprensión de su fisiopatología e incluye tanto enfoques farmacológicos como no farmacológicos. Dentro de los últimos,

el ejercicio y una alimentación adecuada juegan un papel fundamental en la preservación de la masa muscular y la mejora de la función física (Cho et al., 2022).

En particular, el entrenamiento, especialmente el de resistencia, contribuye significativamente al aumento de la masa, la fuerza, el rendimiento físico y la salud en general (Argyropoulou et al., 2022; Cho et al., 2022; Steffl et al., 2017). Por ello, se recomienda un programa de rehabilitación con una duración mínima de 8 semanas para pacientes con sarcopenia, independientemente de otras variables de entrenamiento (Silva et al., 2014). Además, han surgido nuevas estrategias, como el entrenamiento con vibración de cuerpo entero y la restricción del flujo sanguíneo, que han mostrado beneficios, especialmente en personas con movilidad reducida (de Paula et al., 2021; Zhang et al., 2022). Junto con el ejercicio, la nutrición desempeña un papel clave en la prevención y el manejo de esta condición. Se ha observado que la combinación de ejercicio con una ingesta proteica de 1-1.5 g/kg/día ayuda a reducir la degradación muscular (Bauer et al., 2019). Asimismo, se recomienda una dieta equilibrada complementada con leucina, vitamina D y omega-3, ya que estos nutrientes podrían prevenir la sarcopenia. Sin embargo, aún no se han establecido con precisión la dosis óptima ni el tipo específico de suplementos más adecuados (Hu et al., 2024).

En cuanto a las terapias farmacológicas, hasta la fecha no existe un tratamiento aprobado de manera universal para la sarcopenia. No obstante, la investigación en este campo sigue en desarrollo. Diversos estudios han evaluado el uso

de agentes con potenciales beneficios sobre la masa y la fuerza muscular, como la hormona de crecimiento, la testosterona, moduladores selectivos de los receptores androgénicos, agentes anabólicos de proteínas, grelina, inhibidores de la miostatina (msnt), bloqueadores de los receptores β e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, así como activadores de los receptores II y de la troponina (Cho et al., 2022). Sin embargo, la eficacia de estos tratamientos varía y algunos pueden producir efectos adversos.

Dado que estas estrategias podrían no ser suficientes para prevenir o revertir la sarcopenia, especialmente debido a la complejidad de sus mecanismos fisiopatológicos, es fundamental seguir explorando enfoques complementarios para su prevención y tratamiento.

2. Implicación de los genes reloj en el músculo esquelético

2.1. El reloj biológico

El "reloj biológico" es un mecanismo interno presente en todos los organismos vivos, incluidos los mamíferos, que regula múltiples procesos fisiológicos. Su función principal es adaptativa y predictiva, anticipando los diferentes procesos fisiológicos a las fases del día. Para ello, sincroniza los ritmos circadianos del comportamiento, el metabolismo, la secreción hormonal, y la división celular para preservar la homeostasis

del organismo. El fotoperíodo actúa como una señal externa o *Zeitgeber* que ajusta el reloj biológico al ciclo de luz y oscuridad. Esta regulación depende exclusivamente de la expresión rítmica de genes en un grupo de neuronas ubicadas en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) del hipotálamo (Buhr & Takahashi, 2013; Lowrey & Takahashi, 2004), que constituyen el reloj biológico central. Además de la luz, este reloj responde a otras dos señales principales, la alimentación y la actividad física. Hoy en día sabemos que todas las células del organismo incluyendo las del músculo esquelético poseen sus propios relojes biológicos que no son sensibles a la luz.

El reloj central coordina estos relojes periféricos a través de la producción rítmica de melatonina, hormona clave en la sincronización circadiana. Sin embargo, los mecanismos precisos que regulan la comunicación entre ambos relojes aún no están completamente esclarecidos (Acuña-Castroviejo et al., 2017; Reiter, 1993). Este proceso se inicia en la retina, donde las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGC) detectan la luz mediante la melanopsina. La señal luminosa viaja a los NSQ a través del tracto retinohipotalámico, sincronizando el reloj circadiano con el ciclo luz-oscuridad. Las ipRGCs regulan estos ritmos mediante la liberación de glutamato, que estimula la expresión de genes reloj en las neuronas del NSQ. Además, existen otras vías secundarias, como el tracto geniculohipotalámico, que libera ácido γ -aminobutírico (GABA), y aferencias serotoninérgicas y noradrenérgicas, que modulan las señales excitatorias del tracto retinohipotalámico (Harrington, 1997; Hattar et al., 2002; Rosenwasser & Turek, 2015). El NSQ envía señales eferentes que actúan en dos niveles.

Por un lado, emite señales homeostáticas que regulan la actividad de los sistemas autónomo y neuroendocrino, y por otro lado, envía señales cronobióticas, que a través de una vía multisínaptica alcanzan la glándula pineal, regulando la producción de melatonina (Perreau-Lenz et al., 2004). De este modo, el reloj central sincroniza la fisiología circadiana y ajusta los relojes periféricos mediante la secreción diaria de melatonina, que a su vez modula la actividad del NSQ (Vriend & Reiter, 2015).

A nivel molecular, el reloj circadiano en mamíferos está controlado por los genes reloj, entre ellos *Clock* y *Bmal1*, que son activadores, y *Per1/2/3* y *Cry1/2*, que son represores. Su actividad está regulada por *Rora/β/γ* y *Rev-erba/β*, que modulan la transcripción de *Bmal1* de manera positiva y negativa, respectivamente (Takahashi, 2017). Estos genes funcionan mediante bucles de retroalimentación transcripcional y traduccional con un ciclo de 24 horas. Al inicio del ciclo, BMAL1 y CLOCK forman heterodímeros que regulan la expresión de alrededor de 3.000 genes, incluidos *Cry* y *Per*. A medida que las proteínas CRY y PER se acumulan, forman complejos en el citosol y migran al núcleo, donde alcanzan una concentración crítica durante la noche, suficiente para inhibir la actividad de BMAL1:CLOCK, reduciendo la transcripción de sus propios genes. Cuando los niveles de CRY y PER disminuyen, BMAL1:CLOCK retoma su actividad, reiniciando así el ciclo. Paralelamente, otros dos factores de transcripción, *Rora* y *Rev-erb*, modulan la transcripción de *Bmal1*, activándola y reprimiéndola, respectivamente (Figura 9). Además de la regulación transcripcional, la actividad del reloj molecular está modulada por modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación mediada por

caseína quinasa 1 ϵ (CK1 ϵ), proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β), así como por procesos de ubiquitinación, acetilación/desacetilación de histonas y proteínas reloj, y la regulación por microRNAs (miRNAs), que influyen en distintos aspectos de los ritmos circadianos, principalmente mediante la regulación de la concentración citosólica de *Per* (Anna & Kannan, 2021; Lefta et al., 2011). El conocimiento de la maquinaria molecular del reloj biológico la conocemos hoy gracias a los trabajos de Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash y Michael W. Young, por lo que recibieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2017.

Para un funcionamiento óptimo del reloj biológico, estas modificaciones deben mantenerse en equilibrio. Sin embargo, factores como el envejecimiento, la inflamación o diversas patologías pueden alterar su regulación y afectar la sincronización circadiana.

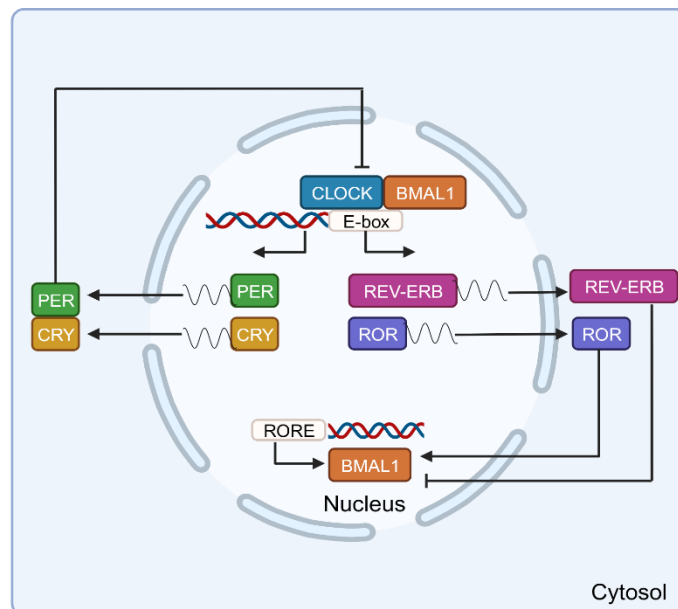


Figura 9. Mecanismo molecular de los genes del reloj. El reloj circadiano opera en ciclos de 24 horas mediante bucles de retroalimentación transcripcional/traducciona. BMAL1:CLOCK forman un heterodímero que promueve la transcripción de los genes *Cry*, *Per*, *Ror* y *Rev-Erb*. A medida

que las proteínas CRY y PER se acumulan, forman complejos que inhiben BMAL1:CLOCK, reduciendo así la expresión de estos genes. Por otro lado, los factores ROR y REV-ERB regulan la transcripción de *Bmal1*, con su función activadora e inhibidora (Fernández-Martínez et al., 2023).

2.2. Cronodisrupción, genes reloj y su impacto en el músculo esquelético

El reloj biológico es esencial para regular los ritmos del organismo, y su disfunción puede aumentar el riesgo de diversas enfermedades, como cardiovasculares, trastornos metabólicos (diabetes, obesidad), cáncer, enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer), así como acelerar el proceso de envejecimiento (Fishbein et al., 2021).

El término “cronodisrupción” se introdujo para describir la alteración en la organización del sistema circadiano, afectando los ritmos biológicos, la fisiología, el metabolismo y el comportamiento de los organismos vivos (Erren & Reiter, 2009; Erren et al., 2003). Los factores que pueden influir en el proceso incluyen factores externos, como la exposición a luz artificial nocturna, el trabajo rotativo, los patrones de sueño irregulares y los horarios de alimentación alterados, así como factores internos, como la presencia de enfermedades o predisposición genética (Valenzuela et al., 2016). Sin embargo, numerosos estudios han señalado que la cronodisrupción está asociada con el envejecimiento, ya que durante el envejecimiento se reduce la expresión rítmica de genes, se alteran componentes del reloj biológico y hay una disminución de producción de melatonina (Verma et al., 2023; Welz & Benitah, 2020; Wolff et al., 2023). Además,

el reloj biológico juega un papel crucial en la modulación de la inmunidad innata y los procesos inflamatorios, por lo que su alteración puede generar enfermedades inflamatorias, daño tisular y acelerar el deterioro celular (Curtis et al., 2014).

Entre los genes reloj, *Bmal1* desempeña un papel clave en la conexión entre el ritmo circadiano y el sistema inmunitario. En primer lugar, el complejo BMAL1:CLOCK, impide la acetilación de la subunidad p65 y la activación de NF- κ B por parte de CLOCK. Como resultado, se reduce la expresión de genes inflamatorios, incluyendo citoquinas y otros factores involucrados en la supervivencia y proliferación celular, lo que conlleva una menor respuesta inflamatoria (Spengler et al., 2012). Además, BMAL1 inhibe directamente la producción de la quimioquina CCL2, reduciendo así el reclutamiento de monocitos inflamatorios en la sangre y los tejidos afectados (Nguyen et al., 2013). También modula la producción circadiana de nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT), una enzima clave en la síntesis de NAD⁺, que actúa como cofactor de las sirtuinas SIRT1 y SIRT3, ambas con funciones cruciales en la regulación de la inflamación (Peek et al., 2013). En particular, SIRT1, mediante su unión a ROR α deaceta e inhibe la actividad transcripcional de NF- κ B, controlando la respuesta inmune, y modula la desacetilación y degradación de PER2 (Garcia et al., 2015). Asimismo, es fundamental para la transcripción de genes reloj, como *Bmal1*, *Rory*, *Per2* y *Cry1* (Asher et al., 2008; Nakahata et al., 2009). Por otro lado, SIRT3 mejora la función mitocondrial y reduce la producción de radicales libres, lo que contribuye a la disminución de la activación del inflamasoma NLRP3 (Liu et al., 2018).

Más allá de su papel en la inflamación, los genes reloj desempeñan un papel clave en la regulación de los ritmos circadianos que controlan el metabolismo, el crecimiento y la reparación de los tejidos periféricos, incluido el músculo esquelético. En este tejido, se han identificado aproximadamente 200 genes con expresión rítmica, entre ellos componentes del reloj central como *Bmal1*, *Per2* y *Cry1*, así como genes específicos de músculo esquelético como *Myod1*, *Ucp3*, *Fbxo32/Atrogin1* y *Myh1* (McCarthy et al., 2007; Miller et al., 2007). Entre estos, *Bmal1* ha sido uno de los más estudiados debido a su papel esencial en la función y regeneración muscular (Chatterjee et al., 2013; Chatterjee et al., 2015). Además de regular la homeostasis del músculo, *Bmal1* mejora la respiración mitocondrial al incrementar la capacidad oxidativa del tejido, lo que refuerza su importancia en el metabolismo energético y la bioenergética muscular (Mezhnina et al., 2022; Wada et al., 2018). Esto se debe principalmente porque participa en procesos de regulación de la dinámica mitocondrial y activa el metabolismo mitocondrial, mediado por SIRT1 y SIRT3 a través del control del nivel de NAD⁺. En este sentido, *Bmal1* modula rítmicamente el eje NAMPT-NAD⁺-SIRTs, facilitando la transición mitocondrial entre estados de baja y alta OXPHOS (Peek et al., 2013). Investigaciones recientes han mostrado que el reloj circadiano regula la morfología mitocondrial, incluyendo procesos de fusión, fisión y biogénesis, lo que resalta la influencia del reloj biológico en la capacidad oxidativa del músculo esquelético (de Goede et al., 2018; van Moorsel et al., 2016).

La importancia del reloj circadiano en la fisiología muscular se ha estudiado mediante modelos de ratón con pérdida de función del gen *Bmal1*, como los ratones *Bmal1* knockout generales y los ratones con eliminación específica de *Bmal1* en el músculo esquelético (iMS-*Bmal1*^{-/-}) (Schiaffino et al., 2016; Viggars et al., 2024). Los primeros presentan una patología más grave, sugiriendo que la ausencia total de *Bmal1* afecta múltiples funciones en el organismo. Entre las alteraciones observadas se incluyen una reducción en la esperanza de vida, sarcopenia prematura, cataratas, atrofia de órganos y otros signos de envejecimiento acelerado (Kondratov et al., 2006). Estos ratones también presentan pérdida de variación diurna en los niveles de glucosa y triglicéridos, junto con inhibición de la gluconeogénesis (Rudic et al., 2004), debilidad muscular, disfunción mitocondrial y desorganización de los miofilamentos, lo que impacta la función y estructura del músculo esquelético (Andrews et al., 2010). Por otro lado, los ratones iMS-*Bmal1*^{-/-} han permitido analizar el impacto de la deficiencia de *Bmal1* en el músculo esquelético. En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, observamos que estos ratones presentaban una alteración en el ritmo normal de actividad y descanso, una disminución en la función y masa muscular, así como un aumento en la fragilidad. Además, se detectó una reducción en el tamaño de las fibras musculares y un incremento en colágeno, acompañado de cambios en la morfología y daño en la mitocondria que redujo la capacidad oxidativa mitocondrial, produciendo un mecanismo de compensación hacia un perfil de fibras más oxidativo (Fernández-Martínez et al., 2024; P. Zhu et al., 2022).

En conjunto, estos hallazgos destacan la relación entre cronodisrupción, inflamación y disfunción muscular, subrayando el papel fundamental de *Bmal1* en la salud muscular. Por lo tanto, los genes del reloj biológico emergen como dianas terapéuticas clave para mitigar los efectos del envejecimiento y preservar la funcionalidad muscular a lo largo del tiempo (Y. Zhu et al., 2022).

3. La melatonina en el tratamiento de la sarcopenia

3.1. Melatonina

3.1.1. Síntesis, metabolismo y dianas de la melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una indolamina que deriva del triptófano, que se aisló por primera vez por Aaron Lerner, quien identificó posteriormente su estructura (Lerner et al., 1960). Esta molécula se encuentra conservada evolutivamente, y está presente tanto en organismos unicelulares, como en plantas y mamíferos (Kumar, 1996).

En un principio, se creía que la melatonina era exclusivamente sintetizada por la glándula pineal y que se liberaba a circulación sanguínea para llegar a todos los tejidos regulando los ritmos circadianos. Sin embargo, investigaciones más recientes han revelado que esta hormona también se produce en la mayoría de los tejidos y órganos del cuerpo mediante procesos muy similares a los de la glándula pineal, pero con

propiedades diferentes (Acuña-Castroviejo et al., 2014). En los vertebrados, la síntesis de melatonina pineal se lleva a cabo durante la noche, bajo el control del reloj central ubicado en los NSQ. Este proceso se inicia con la captación de triptófano desde el torrente sanguíneo hacia los pinealocitos, donde la enzima triptófano hidroxilasa (TPH) cataliza su conversión a 5-hidroxitriptófano. Luego, la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) convierte este intermediario en serotonina. Posteriormente, la serotonina es acetilada por la enzima arilalquilamina N-acetiltransferasa (AANAT) para formar N-acetilserotonina, que finalmente es metilada por la enzima acetilserotonina O-metiltransferasa (ASMT), produciendo melatonina (Figura 10) (Axelrod & Weissbach, 1960; Wurtman et al., 1963; Zhao et al., 2019)

Aunque tanto la AANAT como la ASMT son esenciales en este proceso, existe debate sobre cuál de ellas limita la producción de melatonina (Liu & Borjigin, 2005). Tras su síntesis pasa directamente al torrente sanguíneo donde tiene una vida media de aproximadamente 30 minutos. En sangre, 1/3 de esa melatonina viaja en forma libre y 2/3 conjugada a la albúmina principalmente (Rizzo et al., 2002); solamente la forma libre expresa un ritmo circadiano. La melatonina se metaboliza principalmente en hígado, dando lugar a 6-hidroximelatonina y, en menor medida, a N-acetilserotonina, que son metabolizadas por sulfotransferasas antes de ser excretadas en orina (Tian et al., 2015).

A diferencia de la melatonina pineal, la síntesis de melatonina extrapineal en los tejidos periféricos no sigue un patrón circadiano, sino que se produce según las necesidades específicas de la célula y permanece en el interior celular (Acuña-Castroviejo et al., 2014; Venegas et al., 2012). Además, la melatonina extrapineal puede ser degradada tanto por vías enzimáticas como no enzimáticas, generando metabolitos como la N1-acetil-N2-formil-5-metoxi-cinuramina (AFMK) y la N1-acetil-5-metoxi-cinuramina (AMK), que tienen funciones en la neutralización de radicales libres, contribuyendo a la protección celular (Tan et al., 2007).

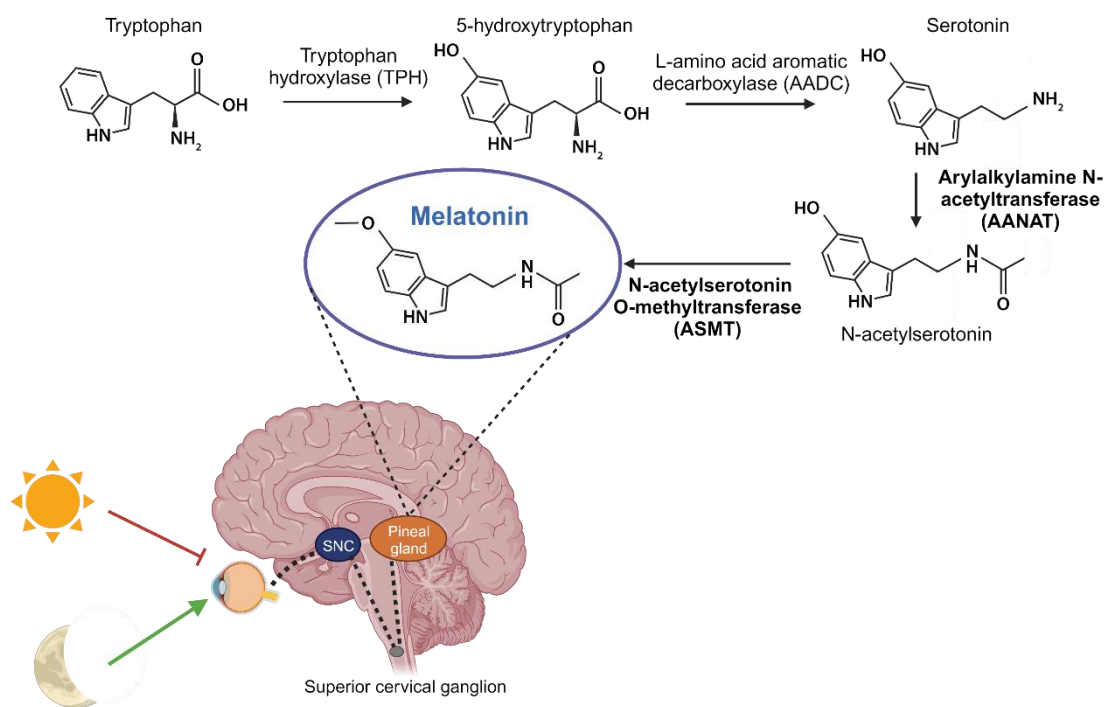


Figura 10. Síntesis de melatonina pineal. Este proceso ocurre durante la noche, bajo el control del reloj central ubicado en los NSQ, comenzando con la conversión del triptófano en 5-hidroxitriptófano mediante la TPH. La AADC lo descarboxila a serotonina, que se acetila mediante la AANAT, generando N-acetilserotonina, la cual es metilada por la ASMT para producir melatonina (Fernández-Martínez et al., 2023).

Para ejercer sus funciones, la melatonina interactúa con receptores específicos y proteínas intracelulares, o actúa de forma independiente. Se une a los receptores de membrana que están presentes en diversos tejidos, MT1 (Mel_{1a}) y MT2 (Mel_{1b}). Estos están acoplados a proteínas G_i y G_q, respectivamente, y la unión de melatonina a dichos receptores inhibe la producción de AMPc y GMPc, respectivamente. Otros efectos dependientes de la unión de melatonina a sus receptores de membrana incluyen la activación de enzimas como las fosfolipasas y la regulación de canales de calcio y potasio (Slominski et al., 2012). Además, la melatonina también interactúa con proteínas citosólicas como la calmodulina, la calreticulina, la tubulina y la proteína quinasa C, las cuales están involucradas en la regulación del calcio intracelular y la dinámica del citoesqueleto (Benítez-King & Antón-Tay, 1993; Benítez-King et al., 1996; Cardinali & Freire, 1975; Macías et al., 2003).

Entre las consecuencias de la unión de melatonina a sus receptores de membrana, incluye la regulación de la fosforilación nuclear de ROR α , permitiendo la unión de la propia melatonina a este receptor nuclear (Wiesenberg et al., 1995), induciendo o reprimiendo la expresión de diversos genes, siendo el de la 5-lipoxigenasa el primero identificado en linfocitos B humanos (Steinhilber et al., 1995). La identificación de la presencia de melatonina en el núcleo celular (Menendez-Pelaez et al., 1993) y su unión a su receptor nuclear ROR α , ha sido farmacológicamente caracterizada (Acuña-Castroviejo et al., 1993; Acuña-Castroviejo et al., 1994).

Finalmente, tanto la melatonina como sus metabolitos AFMK y AMK son capaces de reducir los niveles de ROS y RNS, reforzando su función como antioxidante y protector celular (Acuña Castroviejo et al., 2011).

3.1.2. Funciones de la melatonina pineal y extrapineal

Dependiendo del lugar donde se sintetice, la melatonina tiene diferentes funciones fisiológicas en el organismo. Cuando se produce en la glándula pineal, regula los relojes periféricos de los tejidos mediante la activación de rutas de señalización, lo que permite la modulación circadiana de todos los procesos biológicos del organismo, desde el ritmo de neurotransmisores cerebrales y las funciones cognitivas (Acuña-Castroviejo et al., 1986; Acuña Castroviejo et al., 1986), hasta los procesos endocrino metabólicos, mitocondriales, inmunitarios, reproductivos y estructurales (Acuña-Castroviejo et al., 2014; Benítez-King et al., 1996; Calvo & Maldonado, 2024; Charif & Dorfman, 2025; Li et al., 2025; Reiter, 1993).

La degradación de proteínas del reloj biológico, como BMAL1, PER, CRY y REV-ERB, parece estar medida por el sistema ubiquitina-proteasoma (Stojkovic et al., 2014). Se ha propuesto que la melatonina podría regular este proceso debido a su similitud estructural con inhibidores conocidos del proteasoma. Además, la capacidad de la melatonina para unirse a la Ca^{2+} /calmodulina y bloquear la actividad de la proteína quinasa Ca^{2+} /calmodulina II (CaMKII), involucrada en la fosforilación y regulación del

proteasoma, sugiere un mecanismo potencial mediante el cual la melatonina podría estabilizar los ritmos circadianos (Fukunaga et al., 2002; León et al., 2000; Vriend & Reiter, 2015). No obstante, todavía no se conoce si los genes reloj pueden influir en la producción de melatonina en tejidos extrapineales (Acuña-Castroviejo et al., 2014).

Por otro lado, la melatonina extrapineal se sintetiza en las mitocondrias (Ahluwalia et al., 2018; Suofu et al., 2017) y actúa directamente sobre ellas como una de sus principales dianas (Escames et al., 2003; Martín et al., 2000). Gracias a sus potentes efectos antioxidantes y antiinflamatorios, la melatonina extrapineal desempeña un papel crucial en tejidos con alta actividad metabólica y elevados requerimientos energéticos, como el músculo esquelético (Acuña-Castroviejo et al., 2014; Martín et al., 2000; Venegas et al., 2012). Este efecto se produce tanto por la melatonina como sus metabolitos (AFMK y AMK), que son capaces de neutralizar radicales libres, incluyendo el radical hidroxilo ($\text{OH}^\bullet$), el radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el óxido nítrico (NO), los peroxinitritos (ONOO^-) y los radicales peroxilo ($\text{LOO}^\bullet$) (Acuña-Castroviejo et al., 2001; Zhang et al., 1999). Además, también regula la expresión y actividad de enzimas antioxidantes, como la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GRd), la γ -glutamylcisteína sintasa (γ -GCS) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), protegiendo así el equilibrio redox celular (Escames et al., 2006; Pierrefiche & Laborit, 1995; Rodriguez et al., 2004; Urata et al., 1999). También potencia la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), protegiendo la mitocondria del daño oxidativo y preservando la integridad y funcionalidad de las

membranas mitocondriales, lo que aumenta la bioenergética celular (Acuna-Castroviejo et al., 2007; Acuña Castroviejo et al., 2011; López et al., 2009; Sharafati-Chaleshtori et al., 2017).

Además de su acción antioxidante, la melatonina ejerce efectos antiinflamatorios muy potentes a través de la modulación de las vías de inmunidad innata dependientes de NF- κ B y el inflamasoma NLRP3. Esta función la realiza mediante su unión al receptor ROR α , que activa SIRT1, lo que desacetila e inactiva NF- κ B, disminuyendo la expresión de la óxido nítrico sintasa (iNOS) y citoquinas proinflamatorias como TNF- α e interleuquina-6 (IL-6). Además, la melatonina reduce el daño oxidativo mitocondrial derivado de la activación inflamatoria de NF- κ B. Al reducir el daño, previene la apertura del poro de transición mitocondrial y la salida de ROS y ATP al citosol, que son señales para la activación del inflamasoma NLRP3 inactivo en el citosol. En consecuencia, el inflamasoma pertenece inactivo impidiendo la maduración de IL- β por parte de la caspasa dependiente de NLRP3 (Acuña-Castroviejo et al., 2017; Garcia et al., 2015). Es por esta doble acción que la melatonina tiene unas propiedades antiinflamatorias muy eficaces. Además, la melatonina puede inhibir la ciclooxigenasa-2 (COX-2), reduciendo así la producción de mediadores inflamatorios (Deng et al., 2006). En situaciones de estrés, incrementa la expresión de NRF2, un regulador clave de enzimas antioxidantes y del mantenimiento de la homeostasis mitocondrial (Dinkova-Kostova & Abramov, 2015; Rahim et al., 2021). También puede prevenir la apoptosis al equilibrar la relación BAX/BCL2 y disminuir la actividad de la caspasa-3 (Mehrzadi et al., 2021).

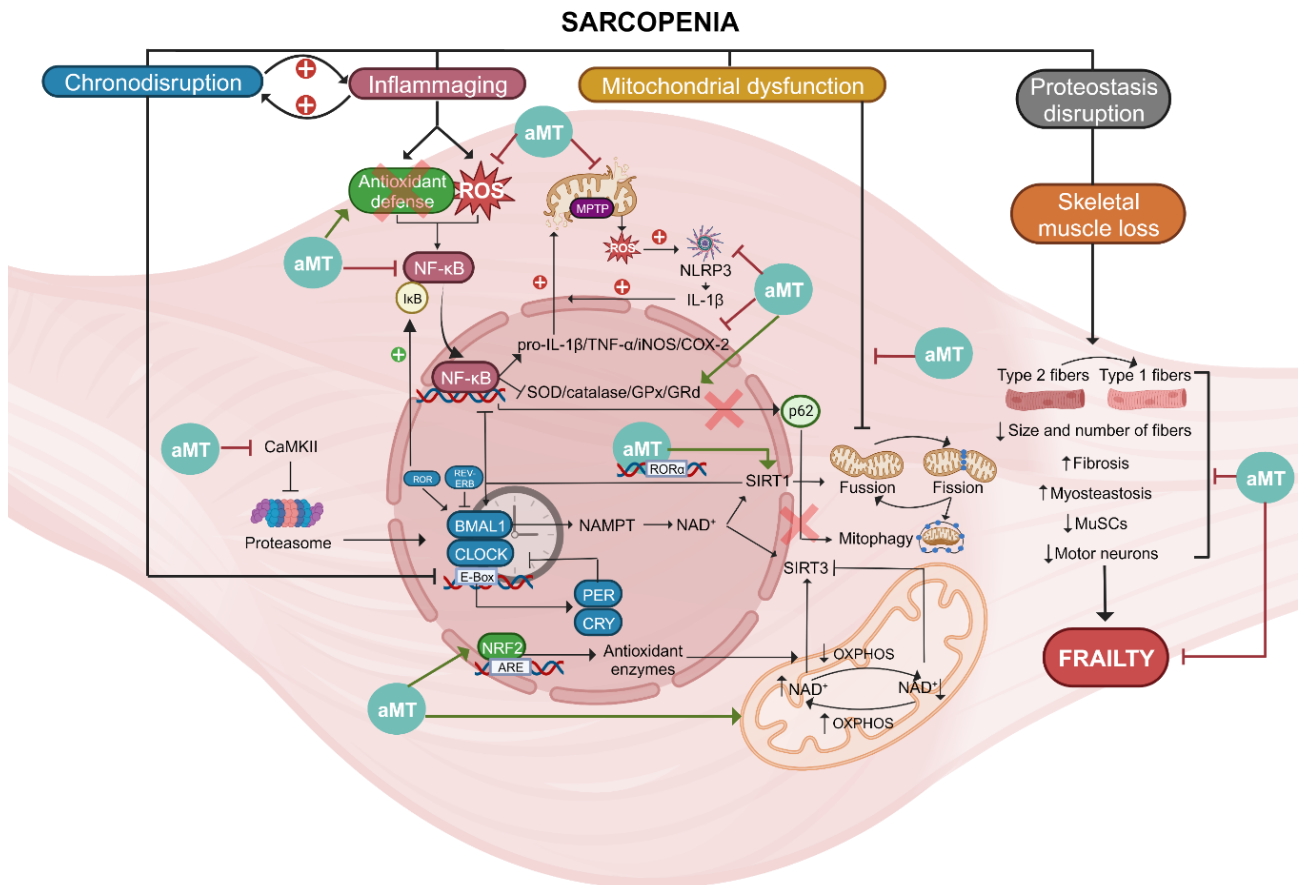


Figura 11. Vías moleculares implicadas en la sarcopenia y funciones de la melatonina.

La sarcopenia se asocia con cronodisrupción, inflamación crónica, disfunción mitocondrial, alteración de la proteostasis y pérdida de masa muscular. La cronodisrupción afecta genes y proteínas reloj como BMAL1, altera la regulación del NAD⁺ y SIRT1/3, lo que impacta negativamente en la señalización de NF-κB y la OXPHOS. La inflamación, causada por ROS y defensas antioxidantes disminuidas, incrementa las citoquinas proinflamatorias y daña las mitocondrias, activando NLRP3. Esto, junto con la alteración de la mitofagia, perpetúa la disfunción mitocondrial. Además, la pérdida de masa muscular se caracteriza por la disminución del tamaño y número de fibras musculares, reducción de células madre musculares y aumento de fibrosis y miosteatosis. La melatonina, gracias a sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios y reguladores del ritmo circadiano, contrarresta estos procesos patológicos, reduciendo el daño muscular y mitigando los efectos negativos de la sarcopenia (Fernández-Martínez et al., 2023).

Diversos datos apoyan la acción principal de la melatonina a nivel mitocondrial, siendo la mitocondria la diana principal de aquella. Además de sintetizarse en la mitocondria, la melatonina mantiene la eficiencia mitocondrial reduciendo el consumo de oxígeno al tiempo que aumenta el cociente ADP/O₂ (López et al., 2009). Además,

actúa como un desacoplante moderado, reduciendo el potencial de membrana y el escape de electrones. Con estos efectos, la melatonina reduce la generación de radicales libres y el daño mitocondrial durante OXPHOS. Asimismo, aumenta la actividad de los complejos respiratorios, lo que favorece el transporte de electrones y la producción de ATP (Acuña Castroviejo et al., 2011; López et al., 2006). En definitiva, la melatonina mantiene la homeostasis mitocondrial en todo momento (Escames et al., 2003; Martín et al., 2000).

Por todas estas razones, se considera a la melatonina una herramienta terapéutica prometedora para combatir enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como la sarcopenia, donde se observan alteraciones del reloj biológico, inflamación crónica, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial (Figura 11) (Fernández-Martínez et al., 2023).

3.2. Estudios previos de la melatonina en el envejecimiento y sarcopenia

Como se ha mencionado previamente, las mitocondrias son esenciales tanto para la síntesis de melatonina como para ser uno de sus principales objetivos funcionales (Acuña-Castroviejo et al., 2007; Venegas et al., 2012). Con el envejecimiento, los niveles de melatonina en los tejidos disminuyen, lo que parece estar relacionado con la disfunción mitocondrial asociada a este proceso. Además, la producción de melatonina en la glándula pineal también disminuye considerablemente con la edad, lo que podría

contribuir al proceso de cronodisrupción y al envejecimiento (Hardeland, 2012; Sanchez-Hidalgo et al., 2009). Diversos estudios, incluyendo los de nuestro grupo de investigación, han demostrado que, en contextos experimentales de inflamación o envejecimiento, el tratamiento con melatonina mejora la defensa antioxidante endógena, reduce la activación de la inmunidad innata y estimula la función mitocondrial en el modelo de ratón senescente SAMP8 (Acuña-Castroviejo et al., 2012; Acuña-Castroviejo et al., 2017; Escames et al., 2007; Escames et al., 2006; Fernández-Ortiz et al., 2020; Fernández-Ortiz et al., 2022; García et al., 2011; López et al., 2006; Rodríguez et al., 2007; Volt et al., 2016). Además, se ha observado que la melatonina es capaz de restaurar la expresión de los genes reloj alterados en estas condiciones, así como en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el cáncer (Aranda-Martínez et al., 2023; Rodríguez-Santana et al., 2023).

Específicamente, en el estudio de la sarcopenia en el músculo esquelético durante el envejecimiento, observamos que en ratones de 12 meses de edad se manifestaba una disminución en la actividad locomotora, la masa muscular y un aumento en el índice de fragilidad (FI). Además, se detectaron alteraciones estructurales tanto en el músculo como en las mitocondrias, cuyos efectos empeoraban con la edad. El tratamiento con melatonina mejoró la función y la estructura muscular, reduciendo el daño mitocondrial y la presencia de núcleos apoptóticos, sugiriendo su potencial como tratamiento para la sarcopenia (Sayed et al., 2016; Sayed et al., 2018). Dado que la sarcopenia está estrechamente asociada al

envejecimiento y a la inflamación, utilizamos un modelo de ratón sin el inflamasoma NLRP3 para evaluar su papel en el desarrollo de la sarcopenia. Encontramos que NLRP3 desempeña un papel crucial en la progresión de la sarcopenia, tanto en el músculo esquelético como en el cardíaco, y que este efecto se atenuaba con el tratamiento de melatonina (Fernández-Ortiz et al., 2020; Sayed et al., 2021; Sayed et al., 2019). Además, se observó que la melatonina restauraba la expresión y el ritmo circadiano de los genes del reloj alterados en estos ratones (Fernández-Ortiz et al., 2022).

A partir de estos estudios y considerando la relevancia *Bmal1* en el músculo, desarrollamos un modelo de ratón deficiente en *Bmal1* inducible y específico de músculo esquelético (iMS-*Bmal1*^{-/-}) con el fin de investigar si la pérdida de este gen, relacionada con el envejecimiento, podría ser una causa subyacente de los cambios que inducen la sarcopenia. Los resultados obtenidos mostraron que los ratones iMS-*Bmal1*^{-/-} presentaban una disminución en la actividad locomotora y alteraciones en la fase del ritmo circadiano. Además, estos animales experimentaron una reducción de la masa muscular y un aumento en el FI. La pérdida de *Bmal1* también provocó alteraciones estructurales en el músculo, incluyendo atrofia y fibrosis, así como una conversión hacia fibras musculares más oxidativas. Estos hallazgos coincidieron con una disminución de la capacidad oxidativa mitocondrial, sugiriendo la existencia de una adaptación compensatoria en el metabolismo de las fibras musculares. Finalmente, se observaron deterioros en la ultraestructura muscular, que aumentó el daño mitocondrial y redujo el número de mitocondrias en este modelo.

Para abordar estos efectos, investigamos la capacidad terapéutica de la melatonina y el ejercicio físico, encontrando que ambos tratamientos mitigaron los efectos negativos de la pérdida de *Bmal1*, aunque, el daño mitocondrial empeoró con el ejercicio. Estos resultados subrayan la importancia de *Bmal1* para la salud musculoesquelética, posicionando este modelo como una herramienta clave en el estudio de la sarcopenia. Además, ambas intervenciones terapéuticas demostraron ser efectivas contra la sarcopenia, independientemente de la presencia de *Bmal1* en el músculo esquelético, lo que resalta el potencial de los genes reloj como dianas terapéuticas en enfermedades asociadas con el envejecimiento (Fernández-Martínez et al., 2024).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

En una sociedad con una población cada vez más envejecida, las enfermedades asociadas al envejecimiento se han convertido en una preocupación global, lo que requiere la implementación de estrategias para afrontar los desafíos que esto supone en el ámbito social y en los sistemas de salud. En este contexto, preservar la fuerza, la masa y la función muscular en la población más vulnerable es clave para mejorar tanto la calidad de vida como la salud en general.

Diversos estudios, incluidos los de nuestro grupo de investigación, han vinculado la cronodisrupción con el envejecimiento, ya que durante este proceso se altera la expresión rítmica de genes, se modifican componentes del reloj biológico y disminuye la producción de melatonina, afectando múltiples tejidos, incluido el músculo esquelético. Con base en estos hallazgos, utilizamos un modelo de ratón deficiente y específico para *Bmal1* en músculo esquelético y comprobamos que la pérdida de este gen contribuye al desarrollo de sarcopenia. Además, evaluamos la eficacia del ejercicio y la melatonina como estrategias terapéuticas contra la sarcopenia, independientemente de la presencia de *Bmal1*.

En base a los resultados anteriores, nuestra hipótesis es que la falta de *Bmal1* va a contribuir a la sarcopenia afectando a los mecanismos de miogénesis y dinámica mitocondrial, entre otros mecanismos moleculares, ya que son dianas de los efectos beneficiosos de la melatonina y el ejercicio.

2. Objetivos

2.2 Objetivo general

Investigar los mecanismos moleculares mediante los cuales la pérdida de *Bmal1* en el músculo esquelético contribuye al desarrollo de sarcopenia y evaluar el efecto del ejercicio y la melatonina como posibles estrategias terapéuticas.

2.3 Objetivos específicos

Objetivo 1: Analizar los cambios en la expresión de genes relacionados en la miogénesis muscular de ratones iMS-*Bmal1*^{-/-} y sus controles.

Objetivo 2: Evaluar el impacto de la pérdida de *Bmal1* en la respiración mitocondrial de ratones iMS-*Bmal1*^{-/-} y sus controles.

Objetivo 3: Examinar los cambios en la dinámica mitocondrial, el metabolismo muscular y la inflamación en ratones iMS-*Bmal1*^{-/-} y sus controles.

Objetivo 4: Identificar las vías moleculares y celulares a través de las cuales el ejercicio y la melatonina pueden contrarrestar la sarcopenia en ausencia de *Bmal1*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales, tratamientos y diseño experimental

1.1. Generación del modelo de ratón deficiente para *Bmal1* inducible y específico de músculo esquelético

Para llevar a cabo este estudio, se estableció un modelo de ratón knockout inducible y específico de músculo esquelético para *Bmal1* (iMS-*Bmal1*^{-/-}) utilizando el método descrito previamente por otros autores (Hodge et al., 2015) y posteriormente actualizado por nosotros (Fernández-Martínez et al., 2024). En primer lugar, se cruzaron hembras homocigotas que expresaban el gen *Bmal1* entre dos sitios LoxP (*Bmal1*^{flox/flox}, B6.129S4(Cg)-Arntl^{tm1Weit}/J, The Jackson Laboratory) con machos heterocigotos que portaban la recombinasa Cre fusionada a un dominio del receptor de estrógeno mutado (MER) bajo el control del promotor de la actina alfa 1 de músculo esquelético humana (*ACTA1*) (*Cre*^{+/-}, B6.Cg-Tg(*ACTA1*-cre/*Esr1**)2Kesr/J, The Jackson Laboratory). Este cruce permitió obtener la primera generación filial (F1) de ratones doblemente heterocigotos para *Bmal1*^{flox/+} y *Cre*^{+/-}. Posteriormente, los machos de esta generación se cruzaron con las hembras *Bmal1*^{flox/flox}, dando lugar a la segunda generación filial (F2) de ratones *Bmal1*^{flox/flox} *Cre*^{+/-} que son los ratones control del estudio (iMS-*Bmal1*^{flox/flox}) (Figura 12).

Una vez obtenidos los ratones se procedió al genotipado de los mismos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando una muestra de la cola con la que se extraía el ADN genómico mediante el protocolo indicado por The Jackson Laboratory. Para ello, las muestras se digirieron individualmente con proteinasa K (PROK-50, Omega Bio-tek, Norcross, GA, EE. UU.) y el ADN se extrajo con isopropanol. La cuantificación se realizó mediante densitometría óptica a 260/280 nm usando un

NanoDrop (NanoDrop ND-1000 V3.5.2, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE. UU.). Los cebadores específicos para la detección de *Bmal1* flanqueado por sitios LoxP y del transgén Cre, junto con los posibles productos de ADN, se describen en la tabla 1. La separación de los productos de PCR se llevó a cabo en un gel de agarosa al 2% al que se añadió RedSafe (21141, iNtRON Biotechnology, Burlington, MA, EE. UU.) para visualizar los fragmentos de ADN.

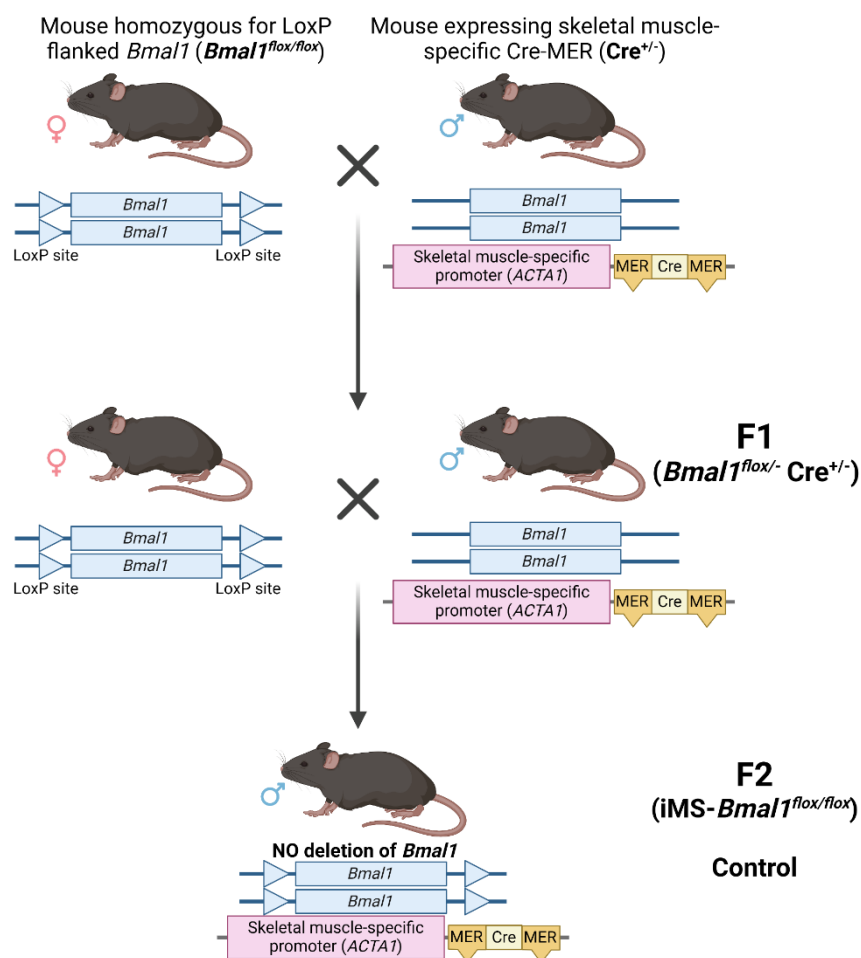


Figura 12. Cruzamientos realizados para la obtención del modelo de ratón iMS-*Bmal1*^{flox/flox}. Las hembras *Bmal1*^{flox/flox} se cruzaron con machos *Cre*^{+/-} que expresaban de manera inducible y específica en el músculo esquelético la recombinasa Cre fusionada en cada extremo a un dominio de MER bajo el control del promotor de la ACTA1, generando la F1 de ratones *Bmal1*^{flox/+} y *Cre*^{+/-}. Los machos de la F1 se cruzaron con hembras *Bmal1*^{flox/flox} para obtener la F2 de ratones iMS-*Bmal1*^{flox/flox}.

Tabla 1. Cebadores empleados para la identificación del gen *Bmal1* con sitios LoxP y el transgén Cre, así como los posibles productos de ADN obtenidos.

<i>Bmal1</i> ^{flox/flox}				Cre ^{+/-}	
<i>Directo (5' → 3')</i>	ACT GGA AGT AAC TTT ATC AAA CTG			AGG TGG ACC TGA TCA TGG AG	
<i>Reverso (5' → 3')</i>	CTG ACC AAC TTG CTA ACA ATT A			ATA CCG GAG ATC ATG CAA GC	
<i>Control positivo interno directo (5' → 3')</i>				CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	
<i>Control positivo interno reverso (5' → 3')</i>				GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C	
<i>Resultados esperados</i>	Mutante= 431 bp	Heterocigoto= 327 bp and 431 bp	Tipo salvaje = 327 bp	Transgene= 440 bp	Control positivo interno = 324 bp

A las 12 semanas de edad los ratones iMS-*Bmal1*^{flox/flox} se trataron con vehículo (15% de etanol en aceite de girasol) para generar el grupo control, o con tamoxifeno (TMX) (T5648, Sigma-Aldrich, Madrid, España) dando lugar al modelo iMS-*Bmal1*^{-/-}. La activación de la recombinación Cre/LoxP se indujo mediante inyecciones intraperitoneales (i.p.) de TMX a una dosis de 2 mg/día durante cinco días consecutivos.

A nivel molecular, la proteína Cre fusionada se localiza en el citoplasma de las células, donde se encuentra asociada a la proteína HSP90. Cuando se administra el TMX, esta interacción entre HSP90 y la recombinasa Cre se interrumpe, permitiendo que Cre se transloque al núcleo. Una vez allí, Cre se une a los sitios LoxP, promoviendo la escisión específica de *Bmal1* en el músculo esquelético del ratón (Figura 13). La confirmación de la especificidad de la recombinación se realizó previamente en el estudio de caracterización del modelo mediante una PCR y un western blot de los ratones control y

de los *iMS-Bmal1*^{-/-} a la semana 15 y 17 de edad en los que se usó hígado y músculo gastrocnemio (GM) para comprobar la presencia de *Bmal1*.

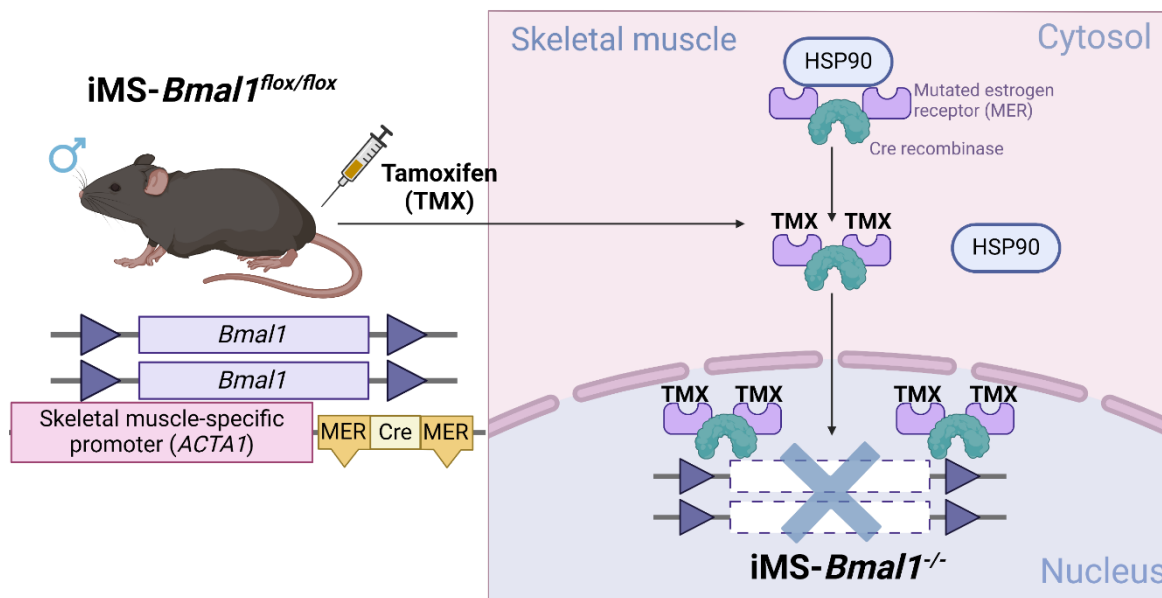


Figura 13. Generación del modelo de ratón *iMS-Bmal1*^{-/-} mediante el uso del sistema Cre/LoxP. Los ratones *iMS-Bmal1*^{flox/flox} fueron inducidos con TMX mediante i.p., a las 12 semanas de edad. Cre se encuentra asociada a la proteína HSP90 en el citoplasma. Cuando se administra el TMX, esta interacción se interrumpe, permitiendo que Cre se transloque al núcleo uniéndose a los sitios LoxP, y cortando específicamente *Bmal1* en el músculo esquelético del ratón.

Los ratones se mantuvieron en las instalaciones del animalario del Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada, a una temperatura ambiente controlada de 22 °C ± 1 °C, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (inicio de luz a las 08:00 h) y acceso ad libitum a agua y alimento, en un ambiente libre de patógenos específicos (SPF).

Todos los procedimientos se realizaron en conformidad con la Guía de los Institutos Nacionales de Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, el Convenio Europeo sobre la protección de los animales vertebrados utilizados para

experimentación y otros fines científicos (CETS #123) y la legislación española para experimentación animal (R.D. 53/2013). El protocolo fue aprobado por el Comité Ético de Andalucía (#29/05/2020/069).

1.2. Diseño experimental y tratamientos

En este estudio, se seleccionaron ratones macho (n=17 por grupo) para formar los siguientes grupos experimentales: (a) animales iMS-*Bmal1*^{flox/flox} tratados con vehículo (control), (b) iMS-*Bmal1*^{flox/flox} tratados con TMX para generar ratones iMS-*Bmal1*^{-/-}, (c) iMS-*Bmal1*^{-/-} tratados con ejercicio (TMX + E), (d) iMS-*Bmal1*^{-/-} tratados con melatonina (TMX + aMT), y (e) iMS-*Bmal1*^{-/-} tratados con ejercicio y melatonina (TMX + E + aMT) (Figura 14). El tratamiento con ejercicio comenzó a la semana 12 de edad y consistió en sesiones de entrenamiento en una cinta de correr horizontal durante 30 minutos, alcanzando una velocidad de hasta 30 cm/s. Este protocolo se mantuvo durante 2 semanas, con 2 días de descanso consecutivos para evitar estrés y fatiga en los animales (Xu et al., 2020). Por otro lado, la administración de melatonina se realizó a una dosis de 10 mg/kg/día en el pienso durante un periodo de 2 semanas, comenzando también a las 12 semanas de edad (Figura 14). Esta dosis es adecuada para mitigar los efectos de la sarcopenia relacionada con la edad, según estudios previos de nuestro laboratorio (Fernández-Martínez et al., 2024; Rodríguez et al., 2007; Sayed et al., 2019; Sayed et al., 2018). El pienso, preparado por la Unidad de Producción de Dietas de la Universidad de Granada, contenía 50 mg de melatonina por kilogramo, calculado con base en el consumo promedio diario de los ratones, su peso y edad, para garantizar la dosis de 10 mg/kg de peso corporal (Bachmanov et al., 2002). Numerosos estudios

realizados por nuestro laboratorio han comprobado que esta dosis aumentó el contenido de melatonina en todos los compartimentos subcelulares de manera dosis-dependiente en roedores. Además, se verificó la concentración de melatonina en el pienso se verificó mediante HPLC ($47,2 \pm 2,0$ mg/kg de alimento).

En la semana 15, se realizaron los análisis moleculares en cada grupo experimental, comenzando por la obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN), dado que es una prueba no invasiva. Posteriormente, los animales se sacrificaron para recolectar las muestras de tejido necesarias para los análisis posteriores. El inicio del diseño experimental se estableció a las 12 semanas de edad, con el propósito de evitar cualquier posible efecto de la deficiencia de *Bmal1* en el desarrollo del músculo esquelético, asegurando además que los ratones se encontraran en una etapa adulta. Asimismo, se evaluó la duración de la inactivación con TMX, y se confirmó que una administración de 5 días consecutivos era suficiente para suprimir *Bmal1* durante un mínimo de 5 semanas, tiempo adecuado para completar el diseño experimental. Los tratamientos comenzaron simultáneamente a la inducción con TMX, manteniéndose durante 2 semanas. Esta duración se definió en estudios previos de caracterización del modelo iMS-*Bmal1*^{-/-}, en los cuales ambos tratamientos demostraron proteger el músculo y contrarrestar la sarcopenia, justificando así su inclusión en el protocolo (Fernández-Martínez et al., 2024). La semana 15 fue seleccionada para realizar los análisis moleculares (3 semanas tras la inducción con TMX) con el objetivo de evaluar las alteraciones específicas producidas por la deficiencia de *Bmal1* en el músculo

esquelético y de analizar el impacto de los diferentes tratamientos sobre estas rutas afectadas (Figura 14).

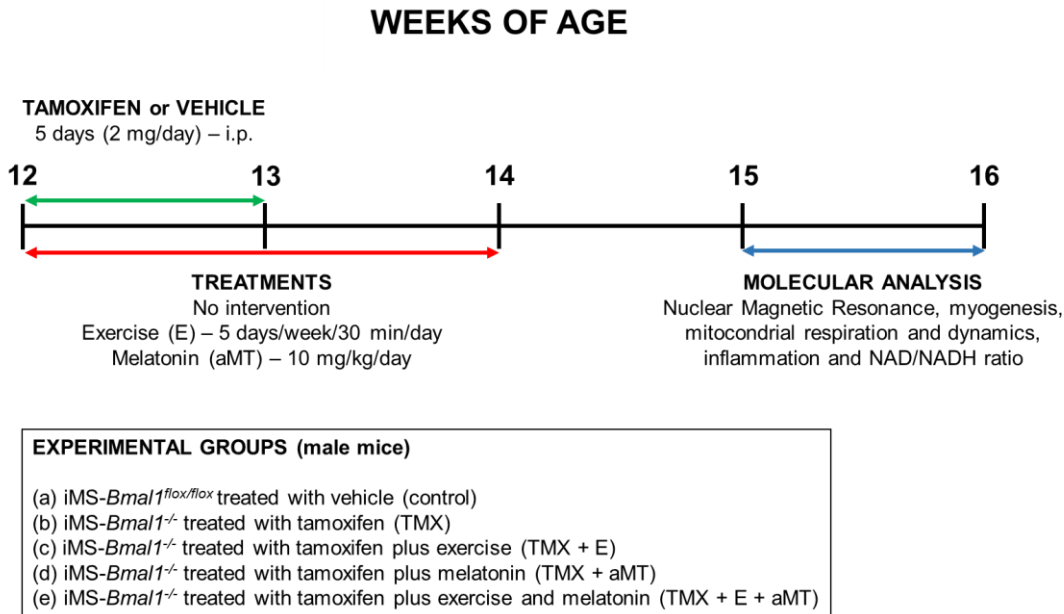


Figura 14. Esquema del plan de trabajo: grupos experimentales, tratamientos y análisis moleculares. A las 12 semanas de edad se trataron los ratones con vehículo o TMX (flecha verde). Los tratamientos con ejercicio y/o melatonina (flecha roja) comenzaron desde la semana 12 hasta la 14. Tras las intervenciones, se dejó una semana de descanso y se comenzaron los análisis moleculares en la semana 15.

2. Resonancia magnética nuclear

La obtención de imágenes por RMN se llevó a cabo en la Unidad de Resonancia magnética nuclear animal (RMA) del Centro de investigación biomédica de la Universidad de Granada, empleando un equipo Bruker Biospec 70/20 USR (Bruker BioSpin MRI GmbH, Madrid, Spain). Previo al inicio del procedimiento, los ratones se anestesiaron con isoflurano (1.5% en oxígeno), y se monitoreó la frecuencia respiratoria mediante un balón de aire colocado sobre los pulmones (SA Instruments, Inc., NY). En cada experimento, las tasas de respiración fueron similares entre los

ratones de los diferentes grupos experimentales. Para adquirir las imágenes anatómicas, se utilizó la secuencia axial T2 Turbo RARE de Bruker sobre el GM con los siguientes parámetros: TR/TE_{ef}= 950/24 ms, tamaño de matriz= 256 × 256, factor RARE= 8, campo de visión= 40 × 40 mm², 12 cortes, grosor de corte= 1 mm y promedios= 1. Posteriormente, en el análisis de imágenes se seleccionó la sección máxima del músculo y se realizaron las mediciones del área de sección transversal (CSA) correspondientes mediante el software ImageJ (Institutos Nacionales de Salud, USA).

3. Análisis de la expresión génica

3.1. Preparación del tejido

En la semana 15 se iniciaron las tomas de muestras para los análisis moleculares. Los animales se anestesiaron mediante una i.p. de equitesina (1 mL/kg) y sacrificados. Posteriormente, se extrajeron y lavaron los GM en solución salina, para luego sumergirlos en nitrógeno líquido y almacenarlos a -80°C hasta su procesamiento para la extracción de ARN.

3.2. Extracción de ARN

El ARN se aisló a partir de las muestras de tejido muscular de los distintos grupos experimentales. Para ello, se pesaron 50 mg de GM, se añadió el reactivo TRIzol Reagent (15596026, Invitrogen, Thermo Fisher, Madrid, Spain), y se disgregó con un homogenizador manual siguiendo las especificaciones del fabricante. Una vez se obtuvo

el ARN, se añadió un volumen de 50 µl de agua libre de nucleasas y se incubó a 58 °C durante 10 minutos. La integridad del ARN se verificó mediante electroforesis en agarosa al 2%, y la concentración fue determinada por espectrofotometría a 260/280 nm en un NanoDrop (NanoDrop ND 1000 V3.5.2, NanoDrop Technologies, USA). Finalmente, el ARN se alicuotó y almacenó a -80 °C para su posterior retrotranscripción.

3.3. Reacción de transcripción inversa

Para la síntesis de ADNc, se empleó el kit de transcripción inversa High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La reacción de transcripción inversa se realizó en un volumen de reacción total de 20 µl, que incluía 10 µl de máster mix, 1000 ng de ARN y el volumen necesario de agua libre de nucleasas. Posteriormente, la reacción se llevó a cabo en un termociclador Doppio (Avantor®, VWR) siguiendo el programa de ciclos indicado por el fabricante. El ADNc resultante se alicuotó y se conservó a -20 °C para su uso posterior.

3.4. qRT-PCR Cuantitativa

Para la qRT-PCR, se utilizó el kit PerfeCTa® SYBR® Green FastMix® (Quantabio, Beverly, Massachusetts, EE. UU.) en una reacción por pocillo que consistió en 10 µl de SYBR, 0,6 µl de cada primer (forward y reverse) a una concentración de 10 µM, y 1 µl de ADNc, completando un volumen final de 20 µl con agua libre de nucleasas. La amplificación se llevó a cabo en el equipo QuantStudio 7 Pro (Applied Biosystems™,

Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.). Las secuencias de los cebadores directo y reverso se muestran en la tabla 2. Los niveles de expresión de los genes de interés se normalizaron frente al gen de referencia β -actina. La cuantificación relativa del ARNm de cada gen objetivo, en comparación con β -actina, se realizó utilizando el método de Ct comparativo. Los datos fueron analizados con el software Design & Analysis (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.).

Tabla 2. Secuencias de los cebadores directo y reverso utilizados para qRT-PCR.

	Cebador directo	Cebador reverso
<i>pax7</i>	GTT CGA TTA GCC GAG TGC TCA	CAT CCA GAC GGT TCC CTT TGT
<i>myf5</i>	TCT GAC GGC ATG CCT GAA T	CTC GGA TGG CTC TGT AGA CG
<i>myod</i>	AAC TGC TCT GAT GGC ATG ATG G	TAG TAG GCG GTG TCG TAG CC
<i>myog</i>	TCC CAA CCC AGG AGA TCA TT	AGT TGG GCA TGG TTT CGT CT
<i>myf6</i>	TAA CTG CTA AGG AAG GAG GAG C	ATG GAA GAA AGG CGC TGA AGA
<i>mstn</i>	ACT TTG GGC TTG ACT GCG AT	AAA TCG ACC GTG AGG GGG TA
<i>pcg-1α</i>	GTA AGG GGC TGG TTG CCT G	CAA CCA GAG CAG CAC ACT CT
<i>drp1</i>	GCC TCA GATC GTC GTA GTG G	TTC CAT GTG GCA GGG TCAT T
<i>sirt1</i>	CGG CTA CCG AGG TCC ATA TAC	ACA ATC TGC CAC AGC GTC AT
<i>sirt3</i>	GTC CGG GAG GTG GGA GA	CAC CAT GAC CAC CAC CCT AC

4. Análisis de la respiración mitocondrial

Para medir la tasa de consumo de oxígeno (OCR), se aislaron las mitocondrias del GM como se describió anteriormente (Rogers et al., 2011). En resumen, tras sacrificar al animal mediante dislocación cervical, se extrajo inmediatamente el GM, se limpió en una

solución de lavado fría (50 ml de tampón de aislamiento y 250 mg de albúmina sérica bovina (BSA), y se trató con proteinasa K. Posteriormente, se homogenizó con 1 ml de tampón de aislamiento (250 mM de sacarosa, 2 mM de EDTA, 10 mM de TRIS ajustado a pH 7.4 con HCl) a 800 rpm y 4°C. El homogeneizado resultante se centrifugó a 1000 g durante 5 minutos a baja temperatura, y el sobrenadante se sometió a centrifugación repetida. Las mitocondrias en suspensión se centrifugaron a 23000 g durante 10 minutos, tras lo cual se retuvo el sedimento y se añadió 1 ml de tampón de aislamiento, seguido de otra centrifugación. En este paso, se añadió 1 ml de tampón de aislamiento y la mezcla se centrifugó a 13000 g durante 3 minutos, después de lo cual se añadieron 40 µl de MAS1X 0.2% BSA (140 mM de sacarosa, 440 mM de manitol, 20 mM de KH₂PO₄, 10 mM de MgCl₂, 4 mM de HEPES y 2 mM de EGTA ajustados a pH 7.2 con KOH).

Para medir la respiración mitocondrial, se utilizó el Seahorse XFe24 Analyzer (Agilent, Barcelona, España). A tal efecto, las mitocondrias aisladas se diluyeron en MAS 1X 0.2% BSA (2 µg de proteína/pozo en MG). Con la placa sobre hielo, se añadieron 50 µl de mitocondrias a cada pocillo y la mezcla se centrifugó a 2000 g durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se añadieron 450 µl de MAS 1X + sustratos (10 mM de glutamato, 10 mM de malato, 10 mM de succinato y 10 mM de piruvato) a cada pocillo. Para inhibir el complejo I (CI) en nuestros experimentos de respiración, se añadió rotenona (2 mM) junto con los otros sustratos. La OCR se midió secuencialmente en un estado acoplado con el sustrato (Estado 2), seguido por el Estado 3 (adenosín difosfato (ADP) y sustratos). Después de este paso, se consumió ADP en el Estado 4, y se añadió oligomicina (respiración en reposo o no fosforilante). Luego, se midió la respiración máxima

utilizando carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) (Estado 3u). Las inyecciones se realizaron en el siguiente orden: puerto A, 50 μ l de 80 mM de ADP (4 mM final); puerto B, 55 μ l de 3 mM de oligomicina (30 μ M final); puerto C, 60 μ l de 4 mM de FCCP (40 μ M final); y puerto D, 65 μ l de 4 mM de antimycina A (40 μ M final). Los resultados fueron analizados con el software Wave Pro-10.1.0 (Agilent, Technologies, California EE. UU.). Los datos se expresaron en pmol/min/mg de proteína.

5. Determinación de la concentración de proteínas y western blot

Para el análisis por western blot, se homogeneizaron los músculos GM a 1100 rpm en el buffer T-PER (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España), y se añadió un cóctel inhibidor de proteasas 100X (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). Las muestras se sonicaron al 35% durante 5 segundos y centrifugadas a 1000 g por 10 minutos a 4°C, tras lo cual se recogió el sobrenadante. La concentración de proteínas de cada muestra se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello se preparó una curva estándar de BSA con concentraciones crecientes de 0,05 a 0,6 mg/ml. A cada pocillo de una placa se le añadieron, por duplicado, 10 μ l de cada punto de la curva de calibración y de cada muestra, seguidos de 200 μ l de reactivo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Luego, la placa se incubó durante 15 minutos en oscuridad y con agitación suave. La absorbancia se midió en el espectrofotómetro Power Wave X-1 (BioTek Instruments, Inc., Vermont, USA) a una longitud de onda de 595 nm. Los resultados se expresaron en mg de proteína/ml.

A continuación, se mezclaron 50 µg de proteína con el tampón de carga (62,5 mM Tris – HCl, 2% SDS, 0,05% β-mercaptoetanol, 0,025% azul de bromofenol, 0,2% glicerol) y se llevaron al mismo volumen con tampón TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8). Las muestras preparadas se incubaron a 99°C durante 5 minutos y luego a 4°C por otros 5 minutos. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 10% utilizando un sistema de electroforesis mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad). Las proteínas se transfirieron a una membrana de polivinilideno difluoruro (PVDF) en una Mini Trans-Blot SD Transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), y las interacciones proteína-anticuerpo se detectaron mediante anticuerpos IgG de caballo conjugados con peroxidasa anti-ratón o anti-conejo, usando el sustrato Clarity™ Western ECL (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Las bandas fueron visualizadas con el sistema de imagen ChemiDoc MP (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y cuantificadas usando el software Image Lab (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Los anticuerpos primarios utilizados en este estudio se detallan en la tabla 3, y se empleó el anticuerpo gapdh como proteína de referencia.

Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios usados en western blot.

Proteína	Dilución	Referencia	Compañía
Tfam	1:200	sc-166965	Santa Cruz Biotechnology
Nrf1	1:200	sc-33771	Santa Cruz Biotechnology
Opa1	1:1000	612606	BD Transduction Lab
Fis1	1:200	sc-376447	Santa Cruz Biotechnology
Bnip3	1:1000	ab10433	Abcam
Parkin	1:1000	ab77924	Abcam
Pink1	1:500	10006283	Cayman Chemical
NAMPT	1:200	sc-393444	Santa Cruz Biotechnology
Sirt1	1:300	13161-1-AP	Proteintech
Sirt3	1:500	ab189860	Abcam
FGF21	1:500	ab171941	Abcam
Klotho	1:5000	67331-1-Ig	Proteintech
Nrf2	1:200	sc-722	Santa Cruz Biotechnology
Tnf-α	1:200	sc-52746	Santa Cruz Biotechnology
Bmal1	1:500	14268-1-AP	Proteintech
Clock	1:1000	ab3517	Abcam
Gapdh	1:200	sc-166574	Santa Cruz Biotechnology
Anti-rabbit	1:2000	31460	Thermo Scientific
Anti-mouse	1:5000	554002	BD Biosciences Pharmingen

6. Medida del nivel de NAD⁺/NADH

La cuantificación de los niveles de NAD⁺ y NADH se realizó mediante un kit colorimétrico para el análisis de NAD⁺/NADH (ab65348; Abcam, Cambridge, Reino Unido), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Las concentraciones de NAD⁺ y NADH se evaluaron utilizando un espectrofotómetro Power Wave X-1 (BioTek Instruments, Inc., Vermont, USA) y los valores se determinaron con base en una curva de calibración estándar.

7. Análisis estadístico

Los datos se expresan como media $\pm$ error estándar de la media (SEM), con un tamaño de muestra de $n = 7$ animales por grupo para la extracción de ARN, la qRT-PCR, los experimentos de *western blot* y los niveles de NAD⁺/NADH. Para la respiración mitocondrial, se utilizó un tamaño de muestra de $n = 10$ animales por grupo, de los cuales $n = 5$ animales por grupo se emplearon previamente para la RMN. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 8.0.1 software (GraphPad Software, Boston, MA, USA). Para las comparaciones estadísticas, se aplicó una prueba t no apareada, considerando significativos aquellos resultados con un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Parte de los resultados mostrados en esta sección están incluidos en el siguiente artículo de investigación:

Ramírez-Casas Y, Fernández-Martínez J, Martín-Estebané M, Aranda-Martínez P, López-Rodríguez A, Esquivel-Ruiz S, Yang Y, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Melatonin and exercise restore myogenesis and mitochondrial dynamics deficits associated with sarcopenia in iMS-*Bmal1*^{-/-} mice. Journal of Pineal Research, 2025 (aceptado).

Factor de Impacto: 8,3 (Q1)

1. Los ratones iMS-*Bmal1*^{-/-} presentan una miogénesis reducida, que se restaura con ejercicio y con melatonina

Dado que los animales con deficiencia de *Bmal1* en el músculo esquelético muestran alteraciones en la morfología y estructura muscular que se normalizan con el ejercicio y el tratamiento con melatonina (Fernández-Martínez et al., 2024), investigamos los marcadores de miogénesis relacionados con la proliferación y diferenciación de células musculares. Además, evaluamos la expresión de miostatina (*mstn*), una mioquina asociada con la pérdida de masa muscular (Baczek et al., 2020; Yu et al., 2021). Específicamente, medimos la expresión de MuSC (*pax7*) y de MRFs responsables de la diferenciación y formación de miofibras (*myf5*, *myod*, *myog* y *myf6*), así como de *mstn*, mediante qRT-PCR (Figura 14).

Se detectó una disminución significativa en la expresión de *pax7* en el músculo esquelético de animales con déficit de *Bmal1*, lo que indica una regeneración muscular deteriorada en comparación con los controles. El tratamiento con ejercicio y/o melatonina restauró los niveles de expresión de *pax7* (Figura 14A). En cuanto a los MRFs, se observó un patrón similar, con una disminución en la expresión de *myf5*, *myod*, *myog* y *myf6* en los animales TMX (Figuras 14B-E). Tanto el ejercicio como la melatonina ejercieron efectos protectores, aumentando la expresión de *myod*, *myog* y *myf6*, mejorando la miogénesis. Sin embargo, aunque el ejercicio y el tratamiento combinado recuperaron significativamente la expresión de *myf5*, la melatonina indujo solo una leve recuperación no significativa. Finalmente, la disminución significativa en la expresión de

Resultados

mstn observada en los ratones deficientes en *Bmal1* no se recuperó con los tratamientos (Figura 14F).

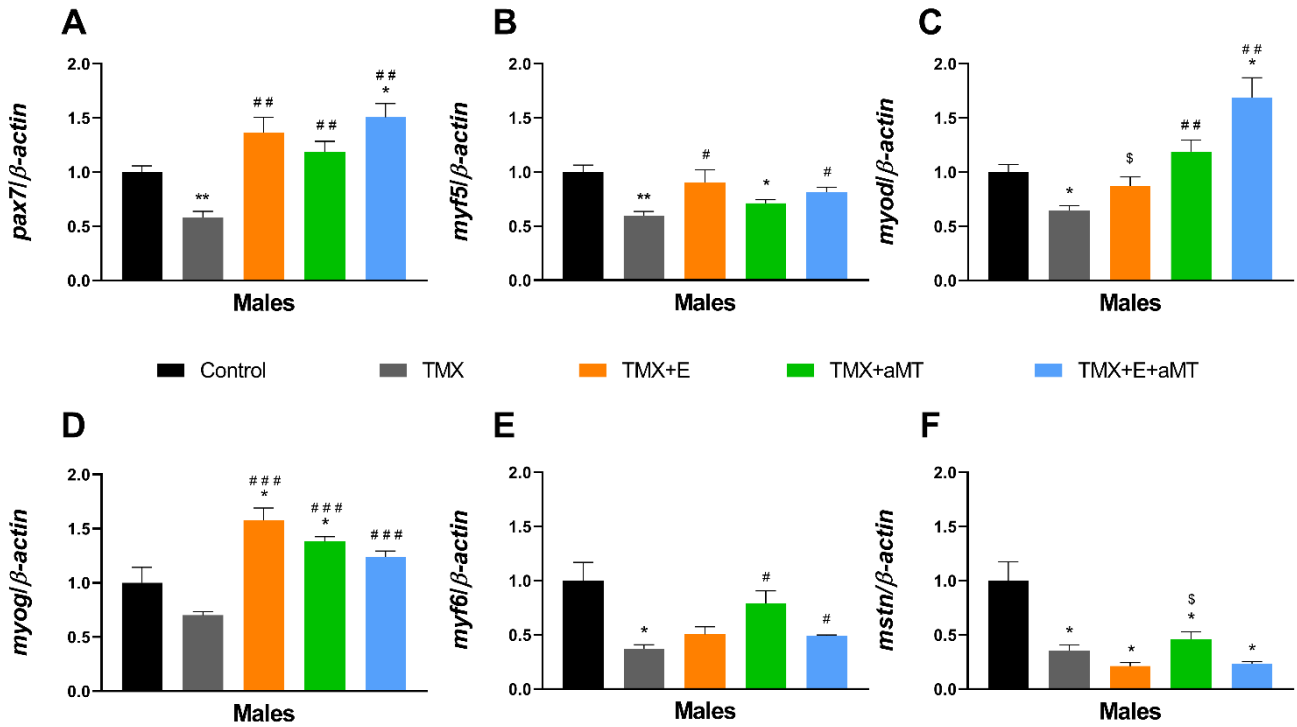


Figura 14. Análisis de la expresión de genes clave involucrados en la miogénesis y los efectos protectores de la melatonina y/o el ejercicio en ratones de los grupos control, TMX, TMX+E, TMX+aMT y TMX+E+aMT. (A) Expresión de ARNm de *pax7*; (B) expresión de ARNm de *myf5*; (C) expresión de ARNm de *myod*; (D) expresión de ARNm de *myog*; (E) expresión de ARNm de *myf6*; y (F) expresión de ARNm de *mstn*. Los datos se expresan como medias ± SEM ($n = 7$ animales/grupo). * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs. control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$ vs. TMX; § $p < 0.05$ vs. TMX+E+aMT.

2. Los ratones iMS-*Bmal1*^{-/-} presentan alteraciones morfológicas en el GM, que se restauran con ejercicio y con melatonina

Dado que los ratones iMS-*Bmal1*^{-/-} presentaban alteraciones en la morfología y estructura muscular (Fernández-Martínez et al., 2024), se evaluó si estos cambios también eran detectables in vivo mediante RMN. Para ello, se adquirieron imágenes de los diferentes grupos experimentales, a partir de las cuales se analizaron las medidas de longitud y el área transversal del GM (Figura 15A-B).

Estos hallazgos revelaron que la ausencia de *Bmal1* redujo significativamente tanto la longitud transversal del GM como el área de sección transversal total, aunque el ancho transversal permaneció sin cambios entre los grupos experimentales. Sin embargo, los animales tratados con ejercicio y/o melatonina mostraron un aumento en la longitud transversal y el área de sección transversal total, destacando los efectos protectores de estos tratamientos y restaurando los valores a niveles similares a los del grupo control (Figura 15B).

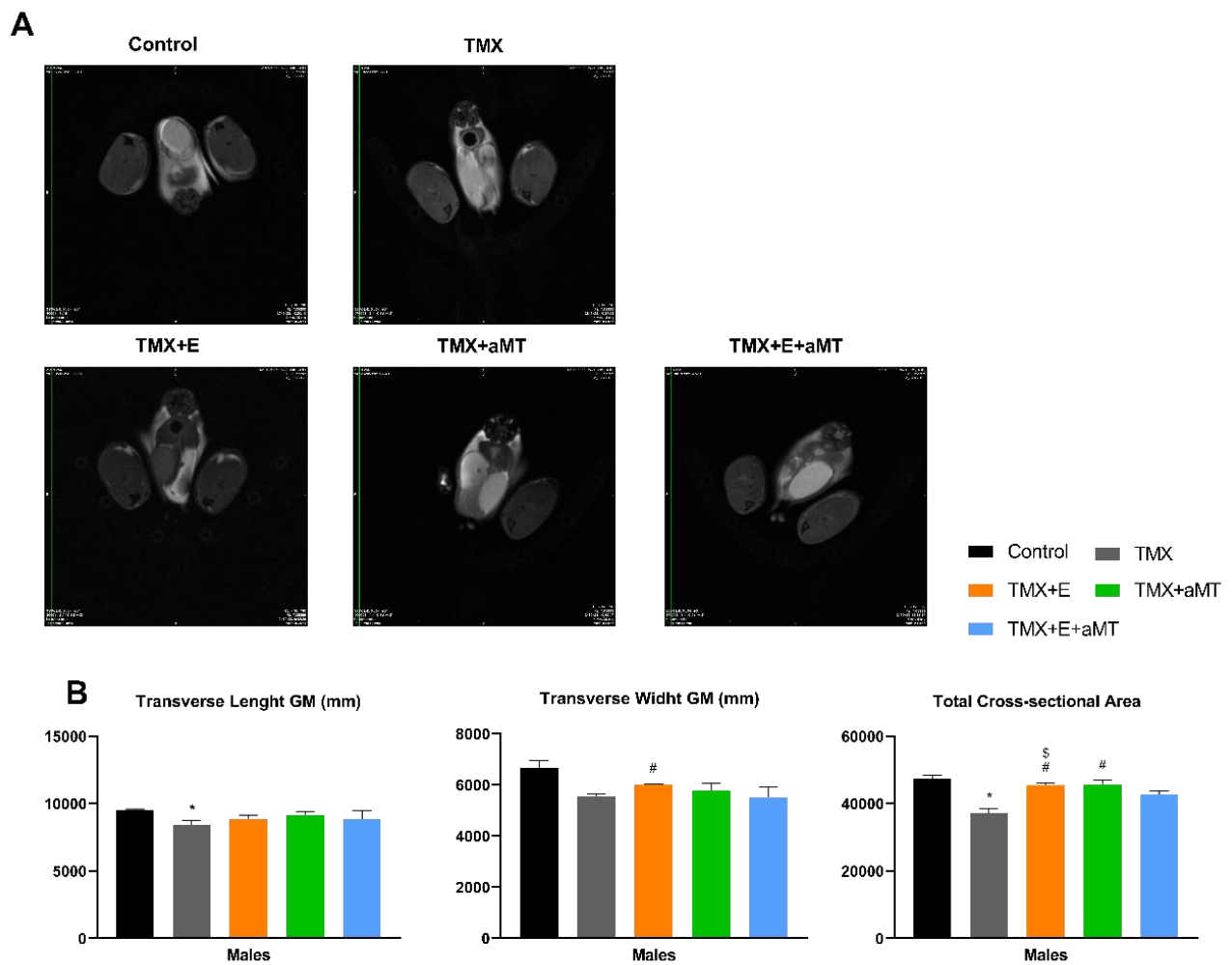


Figura 15. Alteraciones morfométricas en el GM debido a la ausencia de *Bmal1* y los efectos protectores del ejercicio y/o la melatonina. (A) Imágenes de RMN del GM en ratones control, TMX, TMX+E, TMX+aMT y TMX+E+aMT; y (B) análisis morfológico de la longitud transversal del GM (mm), ancho transversal del GM (mm) y el CSA. Los datos se expresan como medias $\pm$ SEM ($n = 5$ animales/grupo). * $p < 0.05$ vs. control. # $p < 0.05$ vs. TMX. \$ $p < 0.05$ vs. TMX+E+aMT.

3. Los ratones iMS-*Bmal1*^{-/-} no muestran una respiración mitocondrial afectada, pero se deteriora con el ejercicio y la inhibición del CI, mientras que la melatonina mejora la respiración a través del CI

Dado que previamente reportamos alteraciones estructurales en las mitocondrias con una actividad reducida de la succinato deshidrogenasa (SDH) en el músculo esquelético deficiente en *Bmal1* (Fernández-Martínez et al., 2024), decidimos explorar los mecanismos moleculares subyacentes a estos cambios en este modelo de ratón. Se analizaron el OCR, un indicador clave de la fosforilación oxidativa mitocondrial, así como la fuga de protones y la producción de ATP en mitocondrias aisladas del GM. Nuestro análisis no mostró diferencias significativas en el OCR y los estados respiratorios entre los animales control y TMX. Sin embargo, los animales sometidos a tratamiento con ejercicio presentaron una reducción notable en estos valores, posiblemente debido al daño mitocondrial localizado que ya habíamos revelado (Fernández-Martínez et al., 2024). Por otro lado, el tratamiento con melatonina mejoró los valores respiratorios, aunque no logró contrarrestar los efectos inducidos por el ejercicio (Figura 16 A, C).

Anteriormente también reportamos una reducción en la actividad de la SDH en el GM de los ratones deficientes en *Bmal1* (Fernández-Martínez et al., 2024). Aquí, la inhibición del CI con rotenona disminuyó el OCR en comparación con la respiración basal en TMX, lo que podría indicar una alteración a nivel del complejo II (CII), y esta reducción se observó en todos los tratamientos (Figura 16B, D). Es importante destacar

que la melatonina no pudo mejorar la respiración en mitocondrias tratadas con rotenona, lo que sugiere que su acción se da a nivel del CI (Figura 16D).

En cuanto a la fuga de protones y la producción de ATP, los animales TMX no mostraron desviaciones significativas respecto a los controles. No obstante, tanto el ejercicio como el tratamiento con melatonina resultaron en una disminución significativa de la fuga de protones y un aumento en la producción de ATP (Figura 16E). Aunque los valores de OCR disminuyeron en los grupos TMX+E y TMX+E+aMT, las mejoras observadas en la fuga de protones y la producción de ATP sugieren que estos tratamientos compensan la deficiencia mitocondrial. Cabe destacar que la rotenona no provocó cambios significativos, salvo en el grupo TMX+E+aMT, donde se observó una reducción en la fuga de protones y un aumento en la producción de ATP (Figura 16F).

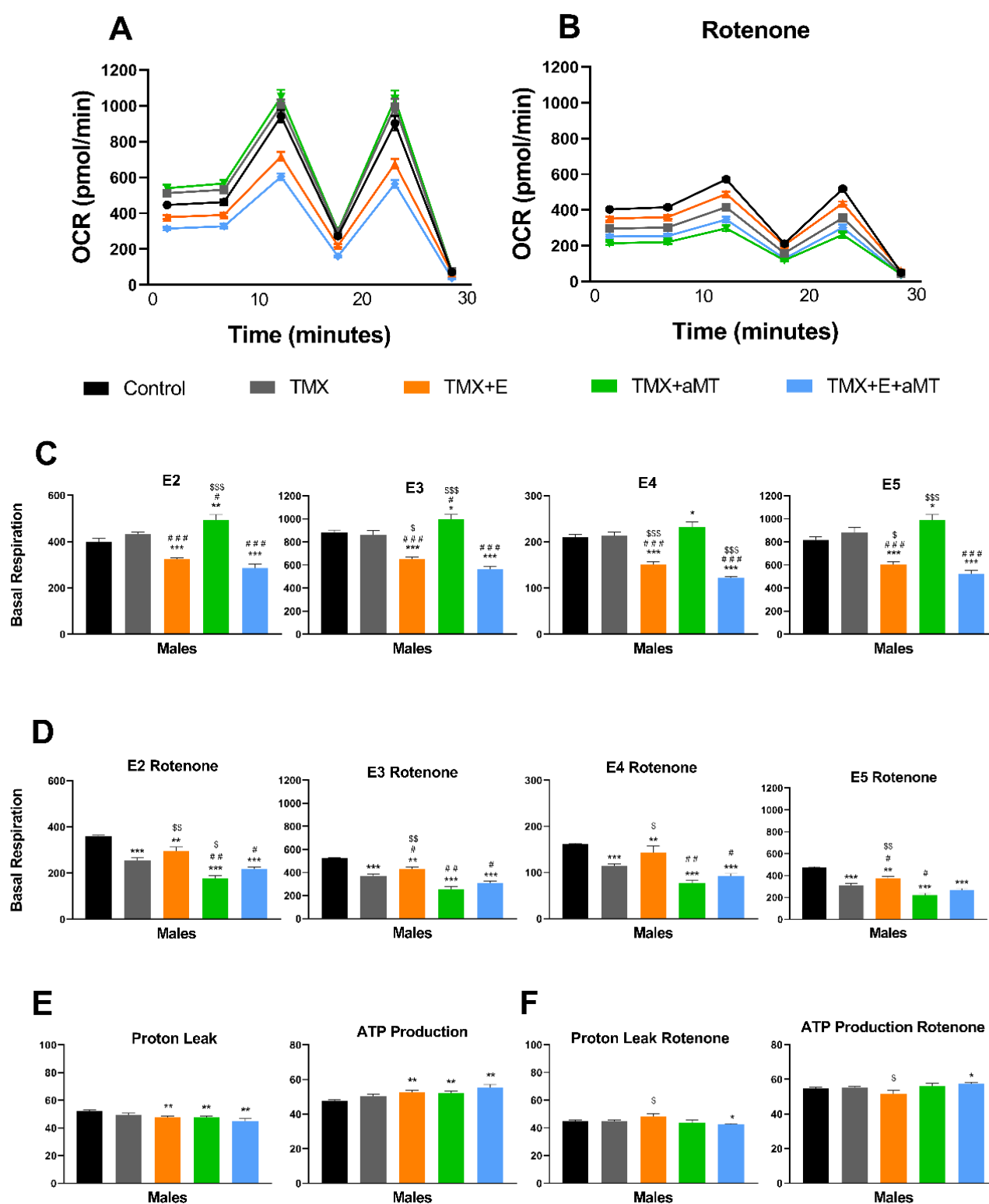


Figura 16. Parámetros respiratorios en mitocondrias aisladas del GM de ratones *iMS-Bmal1*^{-/-} y sus controles. (A) Medición de los valores de OCR en los grupos experimentales (pmol/min); (B) medición de los valores de OCR en los grupos experimentales con rotenona (pmol/min); (C) valores de los estados respiratorios en los grupos experimentales (pmol/min); (D) valores de los

estados respiratorios en los grupos experimentales con rotenona (pmol/min); (E) mediciones de fuga de protones y producción de ATP en los grupos experimentales; y (F) mediciones de fuga de protones y producción de ATP en los grupos experimentales con rotenona. Los datos se expresan como medias $\pm$ SEM ($n = 10$ animales/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. control. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. TMX. \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$, \$\$\$ $p < 0,001$ vs. TMX+E+aMT.

4. Los ratones iMS-*Bmal1*^{-/-} muestran una dinámica mitocondrial alterada, la cual fue normalizada por el ejercicio y el tratamiento con melatonina

Las alteraciones en la dinámica mitocondrial están relacionadas con el desarrollo de la sarcopenia, y *Bmal1* es necesario para mantener la función mitocondrial (de Goede et al., 2018; Leduc-Gaudet et al., 2021). En este estudio, analizamos la biogénesis mitocondrial, la fusión, la fisión y la mitofagia en el GM de ratones deficientes en *Bmal1*.

En cuanto a la biogénesis mitocondrial, observamos una disminución significativa en la expresión del ARNm de *pgc-1 α* en los animales TMX en comparación con los controles. Tanto el ejercicio como el tratamiento con melatonina restauraron eficazmente su expresión normal (Figura 17A). Además, los niveles de proteína de Tfam y Nrf1 disminuyeron en los animales TMX, incluso en aquellos tratados (Figura 17B,C). Estos resultados resaltan el papel crítico de *Bmal1* en el mantenimiento de la función adecuada de estos reguladores mitocondriales clave.

Resultados

Por otro lado, TMX indujo un aumento significativo en Opa1 en comparación con los controles, mientras que el ejercicio y, especialmente la melatonina, redujeron la fusión mitocondrial excesiva (Figura 17D). La expresión de *drp1* disminuyó en ausencia de *Bmal1*, siendo restaurada por el ejercicio y/o el tratamiento con melatonina (Figura 17E). En contraste, los niveles de Fis1 no mostraron diferencias significativas entre los grupos TMX y control; sin embargo, los tratamientos redujeron consistentemente los niveles de Fis1 en todos los grupos experimentales (Figura 17F).

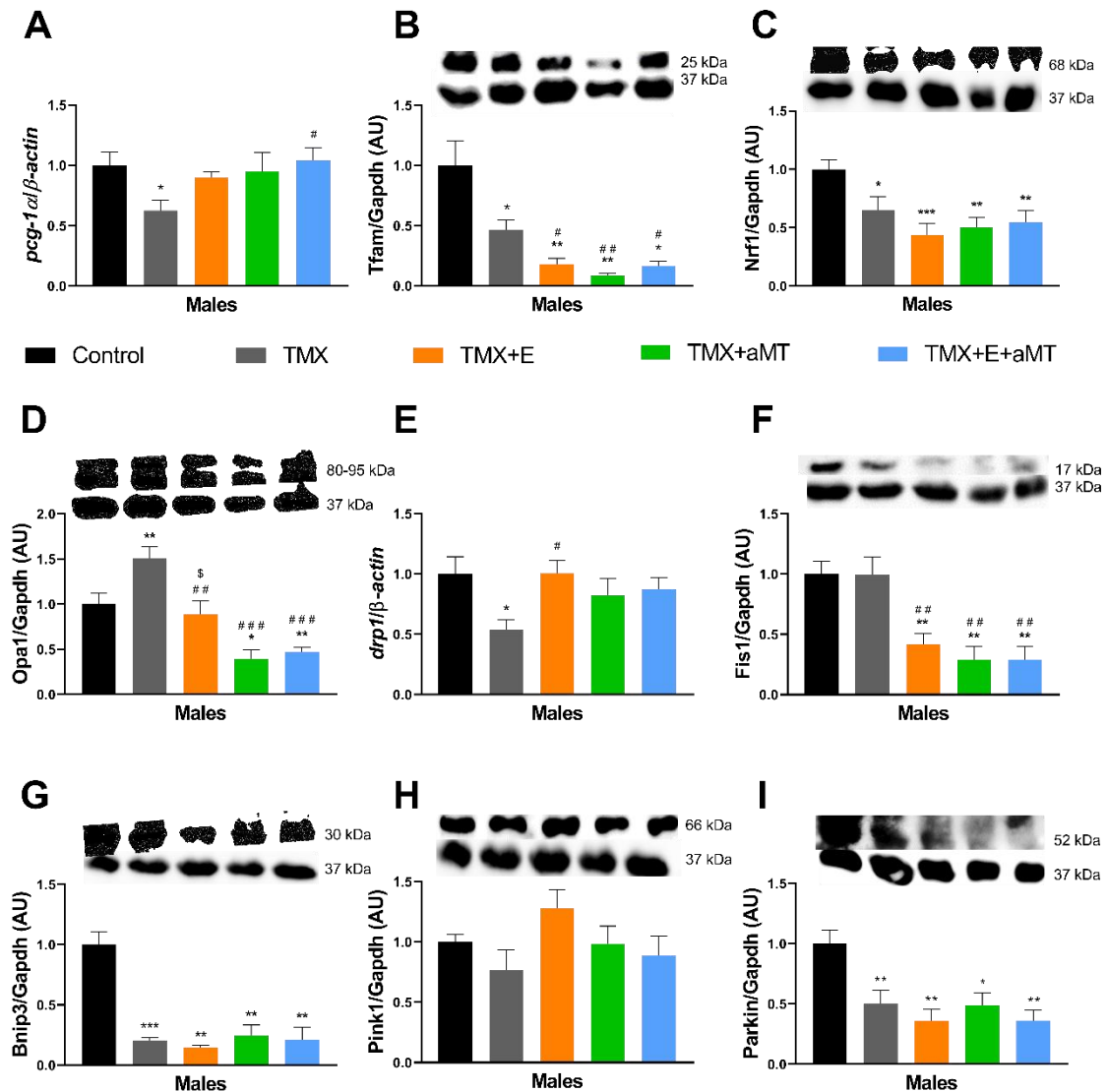


Figura 17. Análisis de genes y proteínas involucrados en la dinámica mitocondrial en ratones iMS-*Bmal1*^{-/-} y sus controles. Considerando la biogénesis mitocondrial: (A) expresión de mRNA

de *pcg-1 α*; (B) niveles de Tfam; y (C) niveles de Nrf1 en los controles y grupos experimentales. Marcadores de fusión y fisión mitocondrial, respectivamente; (D) niveles de Opa1; (E) expresión de mRNA de *drp1*; y (F) niveles de Fis1 en los grupos experimentales. Para mitofagia, se estudiaron los siguientes: (G) niveles de Bnip3; (H) niveles de Pink1; y (I) niveles de Parkin en controles y grupos experimentales. Los datos se expresan como medias $\pm$ SEM ($n = 10$ animales/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. control. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. TMX. \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$, \$\$\$ $p < 0,001$ vs. TMX+E+aMT.

5. Los ratones iMS-*Bmal1*^{-/-} presentan cambios en el eje

NAMPT-NAD⁺-SIRTs

El gen del reloj circadiano *Bmal1* potencia la expresión de NAMPT, aumentando la síntesis de NAD⁺ y activando Sirt1 y Sirt3, al tiempo que regula rítmicamente la transición de las mitocondrias entre estados de baja y alta OXPHOS (Acuña-Castroviejo et al., 2017; Peek et al., 2013). En este estudio, examinamos los componentes clave de esta vía.

Como era de esperar, la proteína Bmal1 estaba prácticamente ausente en los animales TMX y en aquellos tratados con ejercicio y/o melatonina (Figura 18A). Por el contrario, los niveles de Clock aumentaron significativamente en ausencia de *Bmal1*, pero se restauraron tras los tratamientos (Figura 18B). Además, los niveles de proteína NAMPT disminuyeron significativamente no solo en TMX, sino también en los grupos tratados, lo que indica su dependencia de *Bmal1* (Figura 18C). Como era previsible, el cociente NAD⁺/NADH disminuyó significativamente en los animales TMX, mientras que los tratamientos, especialmente la melatonina, restauraron este cociente en el músculo (Figura 18D).

También se midieron la expresión de ARNm y los niveles proteicos de Sirt1 y Sirt3 en los grupos experimentales. Aunque la expresión de *Sirt1* se mantuvo sin cambios en el GM deficiente en *Bmal1*, aumentó en respuesta a los tratamientos, principalmente con melatonina (Figura 18E). A pesar de ello, los niveles de proteína Sirt1 fueron notablemente más bajos en los animales TMX y en los grupos tratados (Figura 18F). Por otro lado, la expresión de *Sirt3* aumentó en todos los grupos experimentales, independientemente del estado de *Bmal1* (Figura 18G). Aunque los niveles de proteína Sirt3 fueron significativamente más altos en los animales TMX, los tratamientos los redujeron por debajo del control (Figura 18H).

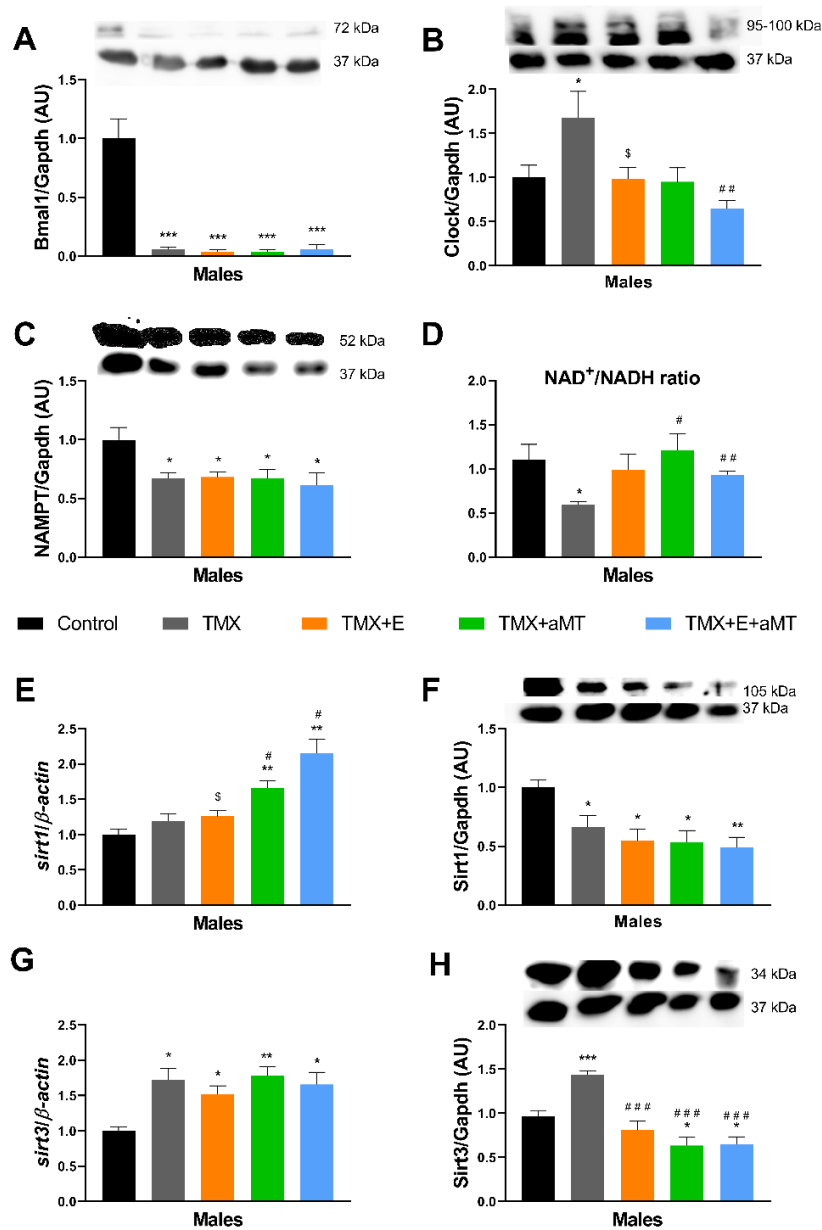


Figura 18. Análisis de genes y proteínas involucrados en el eje NAMPT-NAD⁺-SIRTs en ratones iMS-*Bmal1*^{-/-} y sus controles. (A) Niveles de proteína Bmal1; y (B) Clock en los grupos control y experimentales. (C) Niveles de proteína NAMPT; y (D) cociente NAD⁺/NADH. (E) Expresión de *sirt1*; y (F) niveles de proteína Sirt1 en los grupos experimentales. (G) Expresión de *sirt3* y (H) niveles de Sirt3 en controles y grupos experimentales. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM ($n = 7$ animales/grupo). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. TMX. \$ $p < 0.05$ vs. TMX+E+aMT.

6. Los ratones iMS-*Bmal1*^{-/-} presentan alteraciones en la defensa antioxidante, la respuesta inflamatoria y la vía FGF21-Klotho

El estrés oxidativo y la inflamación, que aumentan con la edad, son factores clave asociados con la sarcopenia. En consecuencia, se exploraron varias proteínas involucradas en estas vías, incluido el eje FGF21-Klotho, en nuestro modelo de ratón. En cuanto a la defensa antioxidante, los niveles de proteína Nrf2 se redujeron significativamente en ausencia de *Bmal1* y se recuperaron parcialmente con melatonina, mientras que el ejercicio también indujo una recuperación parcial (Figura 19A). TNF- α , un marcador de inflamación disminuyó en los ratones TMX y en los tratados con ejercicio y/o melatonina, lo que sugiere su dependencia de *Bmal1* (Figura 19B).

Dado su papel en la longevidad y su posible uso como marcador de sarcopenia (Arroyo et al., 2023; Bartali et al., 2013), se midieron los niveles de Klotho y FGF21 en los ratones iMS-*Bmal1*^{-/-}. Los niveles de Klotho se mantuvieron sin cambios en TMX, pero aumentaron en el grupo TMX+E+aMT en comparación con el control (Figura 19C). En contraste, los niveles de FGF21 disminuyeron con la pérdida de *Bmal1* en el músculo, y los tratamientos no lograron restaurar sus niveles (Figura 19D).

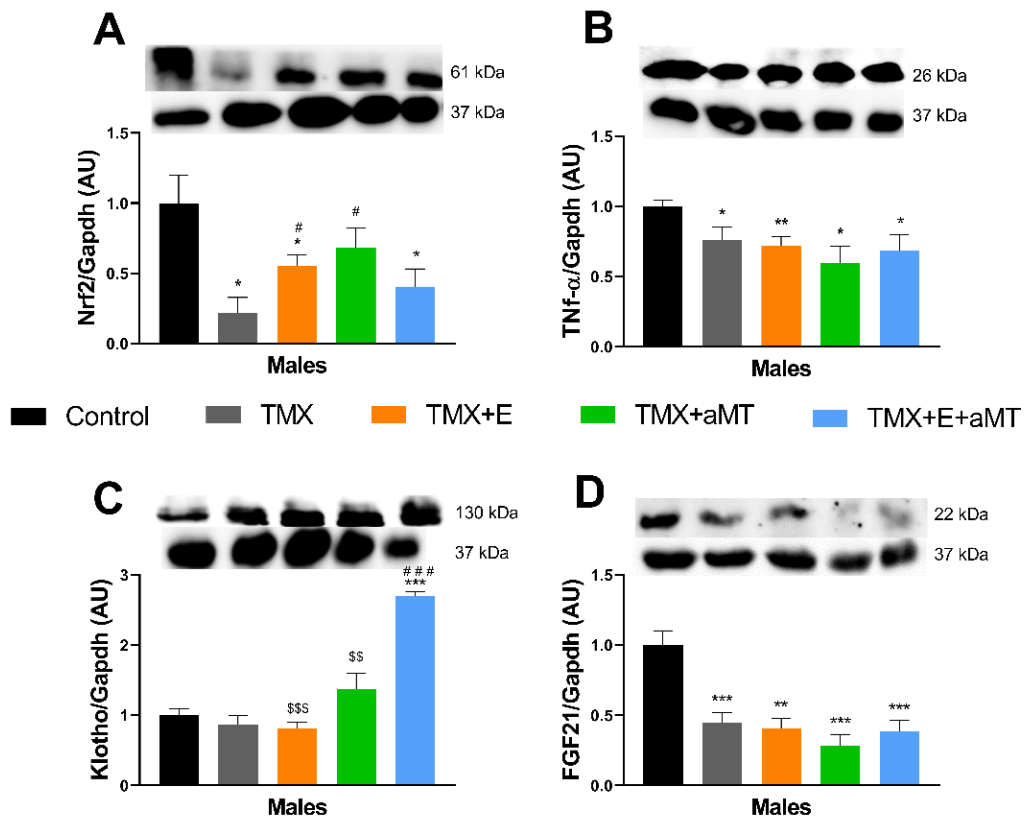


Figura 19. Análisis de proteínas involucradas en las vías inflamatorias y en la vía FGF21-Klotho en los ratones *iMS-Bmal1*^{-/-} y sus controles. Marcadores inflamatorios: (A) Niveles de Nrf2; y (B) Tnf-α en los grupos control y experimentales. Vía FGF21-Klotho: (C) Niveles de Klotho; y (D) FGF21. Los datos se expresan como media ± SEM ($n = 7$ animales/grupo). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. TMX. \$ $p < 0.05$ vs., \$\$ $p < 0.01$, \$\$\$ $p < 0.001$ vs. TMX+E+aMT.

DISCUSIÓN

Basándonos en nuestros resultados previos del modelo de ratón iMS-*Bmal1*^{-/-}, en el que se identificó la deficiencia de *Bmal1* como un factor crítico en el desarrollo de la sarcopenia (Fernández-Martínez et al., 2024), los datos presentados aquí proporcionan nuevas evidencias de los mecanismos moleculares que subyacen al deterioro muscular en ausencia de *Bmal1* en el músculo, identificando el papel de *Bmal1* en la homeostasis del músculo esquelético. A modo de esquema general, la Figura 20 muestra la interacción entre la melatonina y el ejercicio con las vías moleculares en el músculo esquelético analizadas.

El reloj molecular circadiano desempeña un papel clave en la regulación de la expresión de genes musculares implicados en la transcripción, la miogénesis y el metabolismo (Harfmann et al., 2015). La disminución de la miogénesis con la edad contribuye a la pérdida de masa muscular (Cruz-Jentoft & Sayer, 2019; Moustogiannis et al., 2021). En este estudio, demostramos que la deficiencia de *Bmal1* en el GM reduce la expresión de marcadores de MuSC y MRFs, lo que indica una regeneración muscular deteriorada. Estudios previos con modelos deficientes en *Bmal1* han demostrado que su ausencia compromete la regeneración muscular, estableciendo a este gen como un regulador positivo de la miogénesis al promover la expansión de MuSC durante la reparación del tejido muscular. Además, su ausencia se asocia con una reducción de la masa muscular y un cambio hacia fibras musculares más pequeñas (Chatterjee et al., 2013; Chatterjee et al., 2015). Curiosamente, aunque se esperaba que estos cambios se relacionaran con un aumento de *mstn*, un factor asociado a la pérdida de masa muscular (Baczek et al., 2020), observamos una menor expresión de

esta mioquina en los ratones deficientes de *Bmal1*. Estos hallazgos coinciden con los de Schroder et al. (2015), sugiriendo que *Bmal1* podría regular la expresión de *mstn* mediante mecanismos alternativos que contribuyen al daño muscular observado en ausencia de *Bmal1* (Schroder et al., 2015). Además, los ratones iMS-*Bmal1*^{-/-} mostraron alteraciones en la estructura morfométrica del músculo, con reducciones en la longitud transversal y el CSA, características asociadas con el envejecimiento muscular (Sayed et al., 2016; Sayed et al., 2018). En conjunto, estos hallazgos respaldan que la deficiencia de *Bmal1* en el músculo esquelético afecta principalmente la miogénesis y podría explicar la reducción en el tamaño de la fibra muscular y la atrofia observada en el GM, como se ha documentado previamente en este modelo animal (Fernández-Martínez et al., 2024).

Las mitocondrias son orgánulos esenciales para la estructura y función celular, y su disfunción, particularmente la reducción de OXPHOS, se asocia con enfermedades musculares como la sarcopenia (Angulo et al., 2016; Pei et al., 2024). Aunque nuestros estudios previos en ratones iMS-*Bmal1*^{-/-} reportaron daño estructural y menor número de mitocondrias (Fernández-Martínez et al., 2024), aquí no se observaron diferencias significativas en la OCR de los animales con TMX. Sin embargo, se comprobó que la deficiencia de *Bmal1* compromete la funcionalidad del CII, como lo demuestra la disminución de la actividad de SDH, enfatizando la vulnerabilidad selectiva de este complejo (Fernández-Martínez et al., 2024). Curiosamente, la inhibición del CI redujo significativamente la OCR, sugiriendo que este complejo puede influir indirectamente en el CII y compensar su deterioro. Estos resultados subrayan el papel esencial de *Bmal1* en la integridad mitocondrial y la eficiencia respiratoria, y podrían reflejar

mecanismos de adaptación metabólica en los que un aumento de la actividad del CI contribuye a mantener la función mitocondrial a pesar del deterioro del CII. Tales adaptaciones son fundamentales para preservar la homeostasis energética celular bajo condiciones de estrés, como se describe en estudios recientes sobre respuestas energéticas mitocondriales, como han descrito estudios recientes sobre respuestas mitocondriales a alteraciones en los procesos bioenergéticos (Bennett et al., 2022).

La dinámica mitocondrial también se ve alterada durante el envejecimiento, y *Bmal1* es un regulador clave de la integridad mitocondrial dentro del reloj circadiano del músculo esquelético (Del Campo et al., 2018; Kumar et al., 2024). En este estudio, mostramos cómo la falta de *Bmal1* interrumpe la dinámica mitocondrial con una reducción en la biogénesis mitocondrial, la división y la mitofagia, junto con un aumento en la fusión mitocondrial en comparación con los controles. Nuestros resultados son comparables con otros estudios que informan que la deficiencia de *Bmal1* afecta la dinámica mitocondrial en el músculo (Kumar et al., 2024) y otros tejidos (Jacobi et al., 2015; Li et al., 2020). Esta regulación mitocondrial mediada por *Bmal1* aclara cambios, incluida la morfología alterada, el aumento del tamaño mitocondrial y el daño, y la reducción del número de mitocondrias, observados previamente en GM y refuerza la noción de que *Bmal1* es necesario para mantener la función mitocondrial adecuada en el músculo esquelético (Fernández-Martínez et al., 2024) .

Además de las mitocondrias, la red de genes circadianos, junto con la vía NAMPT/NAD⁺/SIRT6, desempeña un papel clave en la regulación del metabolismo energético (Xia et al., 2023). Específicamente, el complejo BMAL1:CLOCK promueve la

expresión de NAMPT, que es fundamental para la síntesis de NAD⁺, el sustrato de las sirtuinas, incluidas SIRT1 y SIRT3 (Peek et al., 2013; Ramsey et al., 2009). Como era de esperar, confirmamos el aumento compensatorio en los niveles de la proteína Clock en el GM de los animales tratados con TMX, lo que respalda los datos previamente publicados en este modelo (Dyar et al., 2014; Schroder et al., 2015). La pérdida de *Bmal1* en el GM provoca una disminución en los niveles de NAMPT y una consecuente reducción en el cociente NAD⁺/NADH, lo que se ha relacionado con disfunción mitocondrial y reducción de la fuerza muscular (Migliavacca et al., 2019). La reducción de la proteína Sirt1 se ha asociado con enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Yuan et al., 2016), lo que resalta el papel de *Bmal1* en el mantenimiento de la estabilidad y función de Sirt1 durante el envejecimiento. Por otro lado, se ha observado que la expresión de Sirt3 aumenta en respuesta al estrés mitocondrial para ayudar a reducir los niveles excesivos de ROS (Papa & Germain, 2014). Sin embargo, niveles elevados de Sirt3 podrían compensar la ausencia de *Bmal1* en nuestro modelo de sarcopenia aguda en músculo esquelético.

La cronodisrupción dependiente de la edad y la inflamación crónica comparten vías comunes, y la primera podría desencadenar inflamación, ya que *Bmal1* desempeña un papel clave en la regulación del sistema inmunitario, la defensa antioxidante y la respuesta antiinflamatoria (Curtis et al., 2014; Y. Zhu et al., 2022). En este contexto, Nrf2, TNF- α , FGF21 y su correceptor Klotho están involucrados en estas vías y se han asociado con el fenotipo de fragilidad (Bartali et al., 2013; Huang et al., 2019; Sciorati et al., 2020). Los ratones iMS-*Bmal1*^{-/-} presentaron niveles bajos de Nrf2, lo que sugiere una respuesta antioxidante disminuida y una mayor susceptibilidad a la

inflamación y el estrés oxidativo (Ma et al., 2006; Zhang et al., 2015). Aunque los niveles elevados de TNF- α y FGF21 suelen estar asociados con inflamación, así como con una reducción de la masa y fuerza muscular (Jung et al., 2021; Schaap et al., 2009), nuestro modelo mostró una disminución en ambas proteínas, a pesar de niveles inalterados de Klotho. Esta reducción podría atribuirse a su dependencia de *Bmal1* para una función celular adecuada.

Si bien los tratamientos actuales son insuficientes para prevenir o revertir completamente la sarcopenia, el ejercicio y la melatonina han demostrado eficacia como estrategias terapéuticas independientemente de la presencia de *Bmal1* (Fernández-Martínez et al., 2024). Tanto el ejercicio como la melatonina regulan los ritmos moleculares en el músculo esquelético, cuya alteración podría contribuir a la sarcopenia (Choi et al., 2020). Mientras que el ejercicio proporciona múltiples beneficios para la homeostasis general (Pedersen & Saltin, 2015), una intensidad excesiva puede aumentar el estrés oxidativo. En este contexto, se ha demostrado que la melatonina ejerce un efecto protector sobre el tejido muscular al mitigar el daño oxidativo y reducir los marcadores inflamatorios (Kruk et al., 2021). Estudios recientes sugieren que el ejercicio puede influir en la secreción de melatonina, posiblemente a través de la activación del sistema nervioso simpático y el aumento subsecuente en la liberación de noradrenalina, un regulador clave de la síntesis de melatonina (Escames et al., 2012). Por lo tanto, los efectos combinados de la melatonina y el ejercicio podrían tener un impacto sinérgico, optimizando el rendimiento físico y la homeostasis muscular. Sin embargo, se necesita más investigación para dilucidar completamente la

interacción entre estos factores y sus efectos en la fisiología del músculo esquelético (Kruk et al., 2021).

En este estudio, el ejercicio y la melatonina restauraron la miogénesis alterada en los ratones *iMS-Bmal1^{-/-}*, en concordancia con el efecto de la melatonina en el aumento del potencial miogénico de las MuSC y la reducción de la fibrosis (Zhu et al., 2024). Además, el ejercicio regula la expresión de componentes centrales del reloj circadiano y de MyoD, ambos esenciales para el mantenimiento de la función del músculo esquelético (Martin et al., 2023). Estos tratamientos también revirtieron las alteraciones morfométricas en el GM de los ratones deficientes en *Bmal1* (Fernández-Martínez et al., 2024). Curiosamente, el ejercicio redujo la OCR en este modelo, reflejando un posible estrés o daño mitocondrial, como se observó previamente mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Fernández-Martínez et al., 2024), mientras que la melatonina mejoró la OCR, lo que indica su capacidad para aumentar la actividad del CI (León et al., 2005). Estos hallazgos sugieren que el CI es un objetivo terapéutico clave para reducir el deterioro mitocondrial, con la melatonina como una intervención protectora. Sorprendentemente, ambos tratamientos redujeron la fuga de protones mientras aumentaban la producción de ATP. Este efecto podría explicarse porque, aunque el ejercicio genera ROS, también induce adaptaciones fisiológicas que mejoran la eficiencia mitocondrial y la salud celular (Vargas-Mendoza et al., 2021). Los beneficios de la melatonina y el ejercicio también incluyen el mantenimiento de una dinámica mitocondrial saludable, ya que ambos son conocidos por mejorar la eficiencia mitocondrial (Sayed et al., 2018; Stacchiotti et al., 2020) y revertir alteraciones mitocondriales (Fernández-Martínez et al., 2024; Martín et al.,

2000). Además, los tratamientos con melatonina y ejercicio mejoraron el estado metabólico de los ratones *iMS-Bmal1^{-/-}* al aumentar el cociente NAD^+/NADH y preservar el NADH mitocondrial (Tan et al., 2005; Xia et al., 2023). También se sabe que la melatonina induce la sobreexpresión de *Sirt1* para proteger contra el estrés metabólico, favoreciendo la salud general y retrasando el envejecimiento (Mayo et al., 2017). Adicionalmente, la melatonina puede prevenir la disfunción mitocondrial activando la vía de señalización SIRT1-PGC-1 α -SIRT3, promoviendo la biogénesis mitocondrial en el músculo cardíaco (Naaz et al., 2020), lo que podría explicar los cambios observados en nuestro modelo de ratón. Sin embargo, a pesar del aumento en el cociente NAD^+/NADH y las mejoras metabólicas, la disminución en los niveles de SIRT1 y SIRT3 sugiere una menor actividad de estas desacetilasas. Esto podría deberse a otros factores regulatorios más allá del cociente NAD^+/NADH , como modificaciones postraduccionales e interacciones proteína-proteína, que pueden modular la actividad de las sirtuinas (Nogueiras et al., 2012). Además, el estado metabólico del músculo deficiente en *Bmal1* podría contribuir a este fenómeno. Tasas metabólicas más bajas y disfunción mitocondrial, comúnmente asociadas con la pérdida de *Bmal1*, podrían conducir a una estabilidad o actividad deteriorada de las sirtuinas (Papa & Germain, 2014; Yuan et al., 2016), contribuyendo aún más a la disminución observada en los niveles de SIRT1 y SIRT3.

Finalmente, aunque los tratamientos no afectaron los niveles de FGF21, los niveles de Klotho permanecieron independientes de *Bmal1* y aumentaron en respuesta a la combinación de ambos tratamientos. Este hallazgo es consistente con estudios previos que indican que ambas intervenciones mejoran los niveles de Klotho de

manera independiente al regular su expresión, proporcionando así beneficios antienvjecimiento (Ko et al., 2019; Prud'homme et al., 2022). Curiosamente, observamos una relación inversa entre Klotho y FGF21 durante los tratamientos. Mientras que Klotho aumentó, FGF21 no se restauró. Esto podría deberse a que Klotho es independiente de *Bmal1* en nuestro modelo, mientras que FGF21 depende de *Bmal1* en el músculo, sugiriendo que Klotho y FGF21 podrían tener roles distintos o incluso opuestos en la regulación de los procesos metabólicos y de envejecimiento, lo que justifica una mayor investigación para comprender su interacción.

En resumen, este estudio aclara los mecanismos por los cuales la deficiencia de *Bmal1* desencadena cambios moleculares que conducen al deterioro muscular y la sarcopenia. Además, reafirma que los tratamientos con ejercicio y/o melatonina mitigan el daño del músculo esquelético asociado con la pérdida de *Bmal1* (Figura 20). Estos resultados subrayan la importancia de realizar ensayos clínicos en humanos mediante la combinación de melatonina y ejercicio moderado para evaluar la efectividad de estas intervenciones en la prevención y ralentización de la sarcopenia.

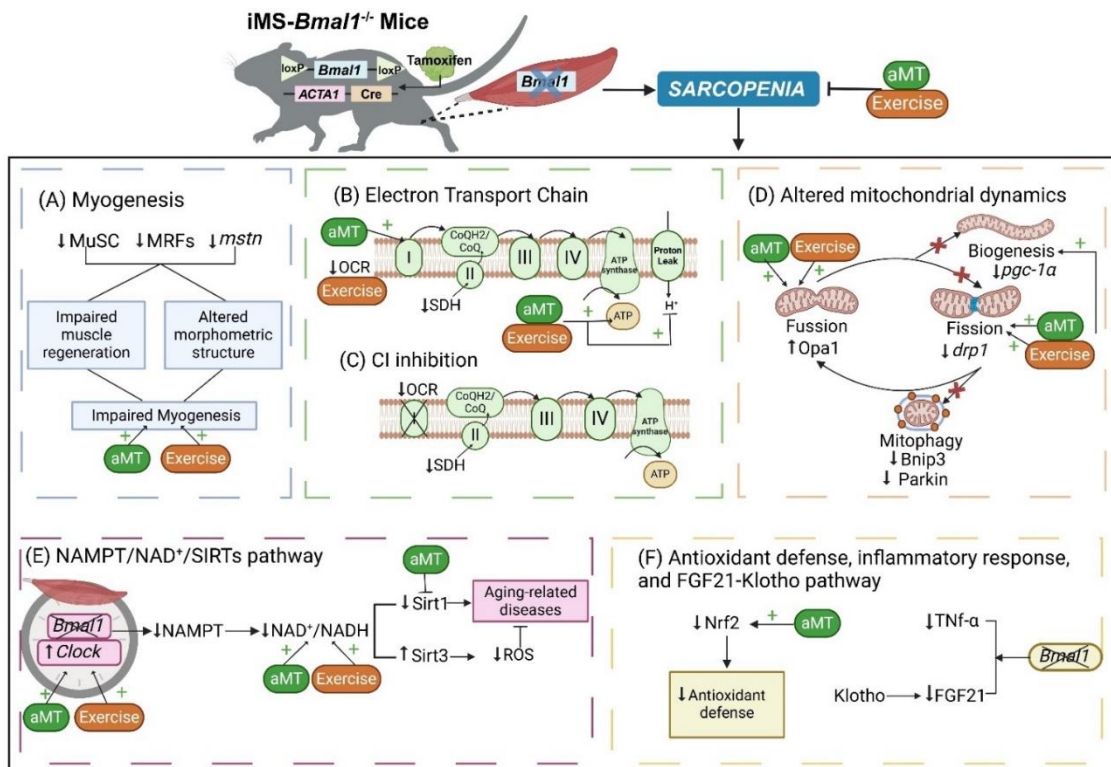


Figura 20. Mecanismos moleculares subyacentes al deterioro muscular inducido por la deficiencia de *Bmal1* y la sarcopenia: efectos protectores de los tratamientos con ejercicio y/o melatonina. (A) Miogénesis; (B) ETC completa y efectos de la melatonina y el ejercicio, y (C) respiración bajo inhibición del complejo I (CI); (D) dinámica mitocondrial; (E) vía NAMPT-NAD⁺-SIRT; y (F) defensa antioxidante, respuesta inflamatoria y vía FGF21-Klotho.

CONCLUSIONES

Conclusiones

Primera: Los cambios morfológicos en la estructura muscular, que conducen a atrofia y fibrosis observados previamente en este modelo, se deben en parte a la reducción de la miogénesis causada por la inactivación de *Bmal1* en el músculo esquelético en los ratones iMS-*Bmal1*^{-/-}.

Segunda: La ausencia de *Bmal1* no modifica sustancialmente la respiración mitocondrial, siendo inhibida significativamente tras el bloqueo del CI con rotenona y, de forma inesperada, por el ejercicio, mientras que la melatonina la restaura. Estos resultados concuerdan con un estudio anterior nuestro en el que veíamos que el ejercicio en estos ratones inducía daño mitocondrial, sugiriendo que el tipo de ejercicio puede no ser siempre beneficioso.

Tercera: Se observa un cambio significativo en la dinámica mitocondrial en ausencia de *Bmal1*, con aumento de *Opa1* y disminución de *drp1*. Estas moléculas recíprocamente regulan la morfología de las crestas mitocondriales, primando la fusión sobre la fisión mitocondrial, posiblemente en un intento de compensar el daño mitocondrial observado en dicho modelo.

Cuarta: Como era de esperar, la ausencia de *Bmal1* reduce NAMPT y como consecuencia el cociente NAD⁺/NADH, lo que afecta principalmente a SIRT1. El aumento de SIRT3, cuya función es principalmente mitocondrial, habla de nuevo sobre estos mecanismos de compensación ante un músculo dañado.

Quinta: La deficiencia de *Bmal1* en el músculo esquelético afecta la regulación de vías antioxidantes, con una reducción significativa de Nrf2 y previsiblemente las vías dependientes de esta molécula, que justifica también la sarcopenia observada.

Conclusiones

Sexta: Si bien FGF21 se reduce drásticamente en ausencia de *Bmal1*, sugiriendo su dependencia de este gen, y por tanto ni la melatonina ni el ejercicio la modifican, mientras que Klotho si aumenta en respuesta a los tratamientos, de nuevo pensamos que de manera compensadora.

Séptima: En general en todos los casos anteriores, salvo el caso de la respiración mitocondrial, el tratamiento con ejercicio, y especialmente con melatonina, son estrategias terapéuticas efectivas que mitigan el daño del músculo esquelético asociado con la pérdida de *Bmal1*. Estos resultados avalan el uso controlado del ejercicio y la importancia de realizar ensayos clínicos en humanos para evaluar la efectividad de estas intervenciones en la prevención y/o ralentización de la sarcopenia.

CONCLUSIONS

Conclusions

First: The morphological changes in muscle structure, leading to atrophy and fibrosis previously observed in this model, are partly attributable to the reduction in myogenesis caused by the inactivation of *Bmal1* in skeletal muscle in iMS-*Bmal1*^{-/-} mice.

Second: The absence of *Bmal1* does not substantially alter mitochondrial respiration, which is significantly inhibited after CI blockade with rotenone and, unexpectedly, by exercise, while melatonin restores it. These results are consistent with our previous study, in which we observed that exercise in these mice induced mitochondrial damage, suggesting that the type of exercise may not always be beneficial.

Third: A significant change in mitochondrial dynamics is observed in the absence of *Bmal1*, with increased Opa1 and decreased *drp1*. Since these proteins reciprocally regulate mitochondrial cristae morphology, favoring fusion over fission, this may represent a compensatory response to the mitochondrial damage observed in this model.

Fourth: As expected, the absence of *Bmal1* reduces NAMPT levels and consequently the NAD⁺/NADH ratio, primarily affecting SIRT1. The increase in SIRT3, whose function is mostly mitochondrial, again points to compensatory mechanisms in response to muscle damage.

Fifth: *Bmal1* deficiency in skeletal muscle affects the regulation of antioxidant pathways, with a significant reduction in Nrf2 and, presumably, its downstream targets, which also helps explain the observed sarcopenia.

Sixth: Although FGF21 is drastically reduced in the absence of *Bmal1*, suggesting its dependence on this gene and therefore neither melatonin nor exercise modify its

Conclusions

levels, Klotho does increase in response to the treatments, again suggesting a compensatory mechanism.

Seventh: Overall, in all the cases mentioned above, except for mitochondrial respiration, treatment with exercise, and especially melatonin, proves to be an effective therapeutic strategy to mitigate skeletal muscle damage associated with *Bmal1* loss. These results support the controlled use of exercise and highlight the importance of conducting clinical trials in humans to assess the efficacy of these interventions in the prevention and/or delay of sarcopenia.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuna-Castroviejo, D., Escames, G., Rodríguez, M. I., & Lopez, L. C. (2007). Melatonin role in the mitochondrial function. *Front Biosci*, 12, 947-963. <https://doi.org/10.2741/2116>
- Acuña-Castroviejo, D., Carretero, M., Doerrier, C., López, L. C., García-Corzo, L., Tresguerres, J. A., & Escames, G. (2012). Melatonin protects lung mitochondria from aging. *Age (Dordr)*, 34(3), 681-692. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9267-8>
- Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Díaz-Casado, M. E., Lima-Cabello, E., López, L. C., Rosales-Corral, S., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2014). Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci*, 71(16), 2997-3025. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1579-2>
- Acuña-Castroviejo, D., Lowenstein, P. R., Rosenstein, R., & Cardinali, D. P. (1986). Diurnal variations of benzodiazepine binding in rat cerebral cortex: disruption by pinealectomy. *J Pineal Res*, 3(2), 101-109. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1986.tb00732.x>
- Acuña-Castroviejo, D., Martín, M., Macías, M., Escames, G., León, J., Khaldy, H., & Reiter, R. J. (2001). Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res*, 30(2), 65-74. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2001.300201.x>
- Acuña-Castroviejo, D., Pablos, M. I., Menendez-Pelaez, A., & Reiter, R. J. (1993). Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 82(2), 253-256.
- Acuña-Castroviejo, D., Rahim, I., Acuña-Fernández, C., Fernández-Ortiz, M., Solera-Marín, J., Sayed, R. K. A., Díaz-Casado, M. E., Rusanova, I., López, L. C., & Escames, G. (2017). Melatonin, clock genes and mitochondria in sepsis. *Cell Mol Life Sci*, 74(21), 3965-3987. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2610-1>
- Acuña-Castroviejo, D., Reiter, R. J., Menéndez-Peláez, A., Pablos, M. I., & Burgos, A. (1994). Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J Pineal Res*, 16(2), 100-112. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1994.tb00089.x>
- Acuña Castroviejo, D., López, L. C., Escames, G., López, A., García, J. A., & Reiter, R. J. (2011). Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem*, 11(2), 221-240. <https://doi.org/10.2174/156802611794863517>
- Acuña Castroviejo, D., Rosenstein, R. E., Romeo, H. E., & Cardinali, D. P. (1986). Changes in gamma-aminobutyric acid high affinity binding to cerebral cortex membranes after pinealectomy or melatonin administration to rats. *Neuroendocrinology*, 43(1), 24-31. <https://doi.org/10.1159/000124504>
- Ahluwalia, A., Brzozowska, I. M., Hoa, N., Jones, M. K., & Tarnawski, A. S. (2018). Melatonin signaling in mitochondria extends beyond neurons and neuroprotection: Implications for angiogenesis and cardio/gastroprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(9), E1942-e1943. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722131115>
- Alheib, O., da Silva, L. P., Kwon, I. K., Reis, R. L., & Correló, V. M. (2023). Preclinical research studies for treating severe muscular injuries: focus on tissue-engineered strategies. *Trends Biotechnol*, 41(5), 632-652.

- <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.09.010>
- Andrews, J. L., Zhang, X., McCarthy, J. J., McDearmon, E. L., Hornberger, T. A., Russell, B., Campbell, K. S., Arbogast, S., Reid, M. B., Walker, J. R., Hogenesch, J. B., Takahashi, J. S., & Esser, K. A. (2010). CLOCK and BMAL1 regulate MyoD and are necessary for maintenance of skeletal muscle phenotype and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(44), 19090-19095. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014523107>
- Angulo, J., El Assar, M., & Rodríguez-Mañas, L. (2016). Frailty and sarcopenia as the basis for the phenotypic manifestation of chronic diseases in older adults. *Mol Aspects Med*, 50, 1-32. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.06.001>
- Anna, G., & Kannan, N. N. (2021). Post-transcriptional modulators and mediators of the circadian clock. *Chronobiol Int*, 38(9), 1244-1261. <https://doi.org/10.1080/07420528.2021.1928159>
- Aranda-Martínez, P., Fernández-Martínez, J., Ramírez-Casas, Y., Rodríguez-Santana, C., Rusanova, I., Escames, G., & Acuña-Castroviejo, D. (2023). Chronodisruption and Loss of Melatonin Rhythm, Associated with Alterations in Daily Motor Activity and Mitochondrial Dynamics in Parkinsonian Zebrafish, Are Corrected by Melatonin Treatment. *Antioxidants (Basel)*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/antiox12040954>
- Argyropoulou, D., Geladas, N. D., Nomikos, T., & Paschalis, V. (2022). Exercise and Nutrition Strategies for Combating Sarcopenia and Type 2 Diabetes Mellitus in Older Adults. *J Funct Morphol Kinesiol*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/jfmk7020048>
- Arroyo, E., Leber, C. A., Burney, H. N., Narayanan, G., Moorthi, R., Avin, K. G., Warden, S. J., Moe, S. M., & Lim, K. (2023). Relationship between klotho and physical function in healthy aging. *Sci Rep*, 13(1), 21158. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-47791-5>
- Asher, G., Gatfield, D., Stratmann, M., Reinke, H., Dibner, C., Kreppel, F., Mostoslavsky, R., Alt, F. W., & Schibler, U. (2008). SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell*, 134(2), 317-328. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.050>
- Axelrod, J., & Weissbach, H. (1960). Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science*, 131(3409), 1312. <https://doi.org/10.1126/science.131.3409.1312>
- Bachmanov, A. A., Reed, D. R., Beauchamp, G. K., & Tordoff, M. G. (2002). Food intake, water intake, and drinking spout side preference of 28 mouse strains. *Behav Genet*, 32(6), 435-443. <https://doi.org/10.1023/a:1020884312053>
- Baczek, J., Silkiewicz, M., & Wojszel, Z. B. (2020). Myostatin as a Biomarker of Muscle Wasting and other Pathologies-State of the Art and Knowledge Gaps. *Nutrients*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/nu12082401>
- Bartali, B., Semba, R. D., & Araujo, A. B. (2013). Klotho, FGF21 and FGF23: Novel Pathways to Musculoskeletal Health? *J Frailty Aging*, 2(4), 179-183. <https://doi.org/10.14283/jfa.2013.26>
- Bauer, J., Morley, J. E., Schols, A., Ferrucci, L., Cruz-Jentoft, A. J., Dent, E., Baracos, V. E., Crawford, J. A., Doehner, W., Heymsfield, S. B., Jatoi, A., Kalantar-Zadeh, K.,

- Lainscak, M., Landi, F., Laviano, A., Mancuso, M., Muscaritoli, M., Prado, C. M., Strasser, F., . . . Anker, S. D. (2019). Sarcopenia: A Time for Action. An SCWD Position Paper. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 10(5), 956-961.
<https://doi.org/10.1002/jcsm.12483>
- Beaudart, C., Rolland, Y., Cruz-Jentoft, A. J., Bauer, J. M., Sieber, C., Cooper, C., Al-Daghri, N., Araujo de Carvalho, I., Bautmans, I., Bernabei, R., Bruyère, O., Cesari, M., Cherubini, A., Dawson-Hughes, B., Kanis, J. A., Kaufman, J. M., Landi, F., Maggi, S., McCloskey, E., . . . Fielding, R. A. (2019). Assessment of Muscle Function and Physical Performance in Daily Clinical Practice : A position paper endorsed by the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO). *Calcif Tissue Int*, 105(1), 1-14.
<https://doi.org/10.1007/s00223-019-00545-w>
- Benítez-King, G., & Antón-Tay, F. (1993). Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia*, 49(8), 635-641.
<https://doi.org/10.1007/bf01923944>
- Benítez-King, G., Ríos, A., Martínez, A., & Antón-Tay, F. (1996). In vitro inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim Biophys Acta*, 1290(2), 191-196.
[https://doi.org/10.1016/0304-4165\(96\)00025-6](https://doi.org/10.1016/0304-4165(96)00025-6)
- Bennett, C. F., Latorre-Muro, P., & Puigserver, P. (2022). Mechanisms of mitochondrial respiratory adaptation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 23(12), 817-835.
<https://doi.org/10.1038/s41580-022-00506-6>
- Brack, A. S., Conboy, I. M., Conboy, M. J., Shen, J., & Rando, T. A. (2008). A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell*, 2(1), 50-59.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.10.006>
- Brack, A. S., Conboy, M. J., Roy, S., Lee, M., Kuo, C. J., Keller, C., & Rando, T. A. (2007). Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science*, 317(5839), 807-810.
<https://doi.org/10.1126/science.1144090>
- Brzoska, E., Ciemerych, M. A., Przewozniak, M., & Zimowska, M. (2011). Regulation of muscle stem cells activation: the role of growth factors and extracellular matrix. *Vitam Horm*, 87, 239-276.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-386015-6.00031-7>
- Buhr, E. D., & Takahashi, J. S. (2013). Molecular components of the Mammalian circadian clock. *Handb Exp Pharmacol*(217), 3-27.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0_1
- Calvani, R., Marini, F., Cesari, M., Tosato, M., Picca, A., Anker, S. D., von Haehling, S., Miller, R. R., Bernabei, R., Landi, F., & Marzetti, E. (2017). Biomarkers for physical frailty and sarcopenia. *Aging Clin Exp Res*, 29(1), 29-34.
<https://doi.org/10.1007/s40520-016-0708-1>
- Calvo, J. R., & Maldonado, M. D. (2024). Immunoregulatory properties of melatonin in the humoral immune system: A narrative review. *Immunol Lett*, 269, 106901.
<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2024.106901>
- Cardinali, D. P., & Freire, F. (1975). Melatonin effects on brain. Interaction with microtubule protein, inhibition of fast axoplasmic flow and induction of crystalloid and tubular formations

- in the hypothalamus. *Mol Cell Endocrinol*, 2(5), 317-330.
[https://doi.org/10.1016/0303-7207\(75\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0303-7207(75)90019-2)
- Charif, S. E., & Dorfman, V. B. (2025). Melatonin, modulation of hypothalamic activity, and reproduction. *Vitam Horm*, 127, 283-303.
<https://doi.org/10.1016/bs.vh.2024.06.003>
- Chatterjee, S., Nam, D., Guo, B., Kim, J. M., Winnier, G. E., Lee, J., Berdeaux, R., Yechoor, V. K., & Ma, K. (2013). Brain and muscle Arnt-like 1 is a key regulator of myogenesis. *J Cell Sci*, 126(Pt 10), 2213-2224.
<https://doi.org/10.1242/jcs.120519>
- Chatterjee, S., Yin, H., Nam, D., Li, Y., & Ma, K. (2015). Brain and muscle Arnt-like 1 promotes skeletal muscle regeneration through satellite cell expansion. *Exp Cell Res*, 331(1), 200-210.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.08.041>
- Cho, M. R., Lee, S., & Song, S. K. (2022). A Review of Sarcopenia Pathophysiology, Diagnosis, Treatment and Future Direction. *J Korean Med Sci*, 37(18), e146.
<https://doi.org/10.3346/jkms.2022.37.e146>
- Choi, Y., Cho, J., No, M. H., Heo, J. W., Cho, E. J., Chang, E., Park, D. H., Kang, J. H., & Kwak, H. B. (2020). Re-Setting the Circadian Clock Using Exercise against Sarcopenia. *Int J Mol Sci*, 21(9).
<https://doi.org/10.3390/ijms21093106>
- Ciemerych, M. A., Archacka, K., Grabowska, I., & Przewoźniak, M. (2011). Cell cycle regulation during proliferation and differentiation of mammalian muscle precursor cells. *Results Probl Cell Differ*, 53, 473-527. https://doi.org/10.1007/978-3-642-19065-0_20
- Cruz-Jentoft, A. J., Baeyens, J. P., Bauer, J. M., Boirie, Y., Cederholm, T., Landi, F., Martin, F. C., Michel, J. P., Rolland, Y., Schneider, S. M., Topinková, E., Vandewoude, M., & Zamboni, M. (2010). Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing*, 39(4), 412-423.
<https://doi.org/10.1093/ageing/afq034>
- Cruz-Jentoft, A. J., Bahat, G., Bauer, J., Boirie, Y., Bruyère, O., Cederholm, T., Cooper, C., Landi, F., Rolland, Y., Sayer, A. A., Schneider, S. M., Sieber, C. C., Topinkova, E., Vandewoude, M., Visser, M., & Zamboni, M. (2019). Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing*, 48(1), 16-31.
<https://doi.org/10.1093/ageing/afy169>
- Cruz-Jentoft, A. J., & Sayer, A. A. (2019). Sarcopenia. *Lancet*, 393(10191), 2636-2646.
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(19\)31138-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(19)31138-9)
- Curtis, A. M., Bellet, M. M., Sassone-Corsi, P., & O'Neill, L. A. (2014). Circadian clock proteins and immunity. *Immunity*, 40(2), 178-186.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.02.002>
- Damluji, A. A., Alfaraidhy, M., AlHajri, N., Rohant, N. N., Kumar, M., Al Malouf, C., Bahrainy, S., Ji Kwak, M., Batchelor, W. B., Forman, D. E., Rich, M. W., Kirkpatrick, J., Krishnaswami, A., Alexander, K. P., Gerstenblith, G., Cawthon, P., deFilippi, C. R., & Goyal, P. (2023). Sarcopenia and Cardiovascular Diseases. *Circulation*, 147(20), 1534-1553.
<https://doi.org/10.1161/circulationaha.123.064071>
- de Goede, P., Wefers, J., Brombacher, E. C., Schrauwen, P., & Kalsbeek, A. (2018). Circadian rhythms in mitochondrial respiration. *J Mol*

- Endocrinol*, 60(3), R115-r130.
<https://doi.org/10.1530/jme-17-0196>
- de Paula, F. A., Mendonça, V. A., Lage, V., da Silva, G. P., de Almeida, H. C., Lima, L. P., Santos, J. N. V., de Castro, D. P., da Paixão, C. F., Rodrigues, A., de Oliveira, V. C., Scheidt Figueiredo, P. H., Bernardo-Filho, M., Lacerda, A. C. R., & Taiar, R. (2021). Immediate Effects of Whole-Body Vibration Associated with Squatting Exercises on Hemodynamic Parameters in Sarcopenic Older People: A Randomized Controlled Trial. *Int J Environ Res Public Health*, 18(22).
<https://doi.org/10.3390/ijerph182211852>
- Del Campo, A., Contreras-Hernández, I., Castro-Sepúlveda, M., Campos, C. A., Figueroa, R., Tevy, M. F., Eisner, V., Casas, M., & Jaimovich, E. (2018). Muscle function decline and mitochondria changes in middle age precede sarcopenia in mice. *Aging (Albany NY)*, 10(1), 34-55.
<https://doi.org/10.18632/aging.101358>
- Deng, W. G., Tang, S. T., Tseng, H. P., & Wu, K. K. (2006). Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding. *Blood*, 108(2), 518-524.
<https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3691>
- Deschenes, M. R. (2004). Effects of aging on muscle fibre type and size. *Sports Med*, 34(12), 809-824.
<https://doi.org/10.2165/00007256-200434120-00002>
- Dinkova-Kostova, A. T., & Abramov, A. Y. (2015). The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radic Biol Med*, 88(Pt B), 179-188.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.036>
- Dyar, K. A., Ciciliot, S., Wright, L. E., Biensø, R. S., Tagliazucchi, G. M., Patel, V. R., Forcato, M., Paz, M. I., Gudiksen, A., Solagna, F., Albiero, M., Moretti, I., Eckel-Mahan, K. L., Baldi, P., Sassone-Corsi, P., Rizzuto, R., Biciato, S., Pilegaard, H., Blaauw, B., & Schiaffino, S. (2014). Muscle insulin sensitivity and glucose metabolism are controlled by the intrinsic muscle clock. *Mol Metab*, 3(1), 29-41.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.10.005>
- Erren, T. C., & Reiter, R. J. (2009). Defining chronodisruption. *J Pineal Res*, 46(3), 245-247.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00665.x>
- Erren, T. C., Reiter, R. J., & Piekarski, C. (2003). Light, timing of biological rhythms, and chronodisruption in man. *Naturwissenschaften*, 90(11), 485-494.
<https://doi.org/10.1007/s00114-003-0468-6>
- Escames, G., León, J., Macías, M., Khaldy, H., & Acuña-Castroviejo, D. (2003). Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J*, 17(8), 932-934.
<https://doi.org/10.1096/fj.02-0692fje>
- Escames, G., López, L. C., Ortiz, F., López, A., García, J. A., Ros, E., & Acuña-Castroviejo, D. (2007). Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice. *FEBS J*, 274(8), 2135-2147.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05755.x>
- Escames, G., López, L. C., Tapias, V., Utrilla, P., Reiter, R. J., Hito, A. B., León, J., Rodríguez, M. I., & Acuña-Castroviejo, D. (2006). Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res*, 40(1), 71-

78. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00281.x>
- Escames, G., Ozturk, G., Baño-Otálora, B., Pozo, M. J., Madrid, J. A., Reiter, R. J., Serrano, E., Concepción, M., & Acuña-Castroviejo, D. (2012). Exercise and melatonin in humans: reciprocal benefits. *J Pineal Res*, 52(1), 1-11. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00924.x>
- Evans, W. J., Morley, J. E., Argilés, J., Bales, C., Baracos, V., Guttridge, D., Jatoi, A., Kalantar-Zadeh, K., Lochs, H., Mantovani, G., Marks, D., Mitch, W. E., Muscaritoli, M., Najand, A., Ponikowski, P., Rossi Fanelli, F., Schambelan, M., Schols, A., Schuster, M., . . . Anker, S. D. (2008). Cachexia: a new definition. *Clin Nutr*, 27(6), 793-799. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2008.06.013>
- Fernández-Martínez, J., Ramírez-Casas, Y., Aranda-Martínez, P., López-Rodríguez, A., Sayed, R. K. A., Escames, G., & Acuña-Castroviejo, D. (2024). iMS-Bmal1(-/-) mice show evident signs of sarcopenia that are counteracted by exercise and melatonin therapies. *J Pineal Res*, 76(1), e12912. <https://doi.org/10.1111/jpi.12912>
- Fernández-Martínez, J., Ramírez-Casas, Y., Yang, Y., Aranda-Martínez, P., Martínez-Ruiz, L., Escames, G., & Acuña-Castroviejo, D. (2023). From Chronodisruption to Sarcopenia: The Therapeutic Potential of Melatonin. *Biomolecules*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/biom13121779>
- Fernández-Ortiz, M., Sayed, R. K. A., Fernández-Martínez, J., Cionfrini, A., Aranda-Martínez, P., Escames, G., de Haro, T., & Acuña-Castroviejo, D. (2020). Melatonin/Nrf2/NLRP3 Connection in Mouse Heart Mitochondria during Aging. *Antioxidants (Basel)*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/antiox9121187>
- Fernández-Ortiz, M., Sayed, R. K. A., Román-Montoya, Y., de Lama MÁ, R., Fernández-Martínez, J., Ramírez-Casas, Y., Florido-Ruiz, J., Rusanova, I., Escames, G., & Acuña-Castroviejo, D. (2022). Age and Chronodisruption in Mouse Heart: Effect of the NLRP3 Inflammasome and Melatonin Therapy. *Int J Mol Sci*, 23(12). <https://doi.org/10.3390/ijms23126846>
- Fishbein, A. B., Knutson, K. L., & Zee, P. C. (2021). Circadian disruption and human health. *J Clin Invest*, 131(19). <https://doi.org/10.1172/jci148286>
- Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., & De Benedictis, G. (2000). Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*, 908, 244-254. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x>
- Fried, L. P., Tangen, C. M., Walston, J., Newman, A. B., Hirsch, C., Gottdiener, J., Seeman, T., Tracy, R., Kop, W. J., Burke, G., & McBurnie, M. A. (2001). Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 56(3), M146-156. <https://doi.org/10.1093/gerona/56.3.m146>
- Frontera, W. R., & Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int*, 96(3), 183-195. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>
- Fukunaga, K., Horikawa, K., Shibata, S., Takeuchi, Y., & Miyamoto, E. (2002). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent long-term potentiation in the rat suprachiasmatic nucleus and its inhibition by melatonin. *J*

- Neurosci Res*, 70(6), 799-807.
<https://doi.org/10.1002/jnr.10400>
- Garcia, J. A., Volt, H., Venegas, C., Doerrier, C., Escames, G., Lopez, L. C., & Acuna-Castroviejo, D. (2015). Disruption of the NF-kappaB/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor-alpha and blocks the septic response in mice. *FASEB J*, 29(9), 3863-3875.
<https://doi.org/10.1096/fj.15-273656>
- García, J. J., Piñol-Ripoll, G., Martínez-Ballarín, E., Fuentes-Broto, L., Miana-Mena, F. J., Venegas, C., Caballero, B., Escames, G., Coto-Montes, A., & Acuña-Castroviejo, D. (2011). Melatonin reduces membrane rigidity and oxidative damage in the brain of SAMP8 mice. *Neurobiol Aging*, 32(11), 2045-2054.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.12.013>
- Guo, Y., Guan, T., Shafiq, K., Yu, Q., Jiao, X., Na, D., Li, M., Zhang, G., & Kong, J. (2023). Mitochondrial dysfunction in aging. *Ageing Res Rev*, 88, 101955.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.101955>
- Hardeland, R. (2012). Melatonin in aging and disease -multiple consequences of reduced secretion, options and limits of treatment. *Aging Dis*, 3(2), 194-225.
- Harfmann, B. D., Schroder, E. A., & Esser, K. A. (2015). Circadian rhythms, the molecular clock, and skeletal muscle. *J Biol Rhythms*, 30(2), 84-94.
<https://doi.org/10.1177/0748730414561638>
- Harrington, M. E. (1997). The ventral lateral geniculate nucleus and the intergeniculate leaflet: interrelated structures in the visual and circadian systems. *Neurosci Biobehav Rev*, 21(5), 705-727.
[https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(96\)00019-x](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(96)00019-x)
- Hattar, S., Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M., & Yau, K. W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*, 295(5557), 1065-1070.
<https://doi.org/10.1126/science.1069609>
- Hodge, B. A., Wen, Y., Riley, L. A., Zhang, X., England, J. H., Harfmann, B. D., Schroder, E. A., & Esser, K. A. (2015). The endogenous molecular clock orchestrates the temporal separation of substrate metabolism in skeletal muscle. *Skelet Muscle*, 5, 17.
<https://doi.org/10.1186/s13395-015-0039-5>
- Hoppeler, H. (1986). Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Int J Sports Med*, 7(4), 187-204. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1025758>
- Hu, J., Wang, Y., Ji, X., Zhang, Y., Li, K., & Huang, F. (2024). Non-Pharmacological Strategies for Managing Sarcopenia in Chronic Diseases. *Clin Interv Aging*, 19, 827-841.
<https://doi.org/10.2147/cia.S455736>
- Huang, D. D., Fan, S. D., Chen, X. Y., Yan, X. L., Zhang, X. Z., Ma, B. W., Yu, D. Y., Xiao, W. Y., Zhuang, C. L., & Yu, Z. (2019). Nrf2 deficiency exacerbates frailty and sarcopenia by impairing skeletal muscle mitochondrial biogenesis and dynamics in an age-dependent manner. *Exp Gerontol*, 119, 61-73.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.01.022>
- Jacobi, D., Liu, S., Burkewitz, K., Kory, N., Knudsen, N. H., Alexander, R. K., Unluturk, U., Li, X., Kong, X., Hyde, A. L., Gangl, M. R., Mair, W. B., & Lee, C. H. (2015). Hepatic Bmal1 Regulates Rhythmic Mitochondrial

- Dynamics and Promotes Metabolic Fitness. *Cell Metab*, 22(4), 709-720. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.08.006>
- Jiang, H., Liu, B., Lin, J., Xue, T., Han, Y., Lu, C., Zhou, S., Gu, Y., Xu, F., Shen, Y., Xu, L., & Sun, H. (2024). MuSCs and IPCs: roles in skeletal muscle homeostasis, aging and injury. *Cell Mol Life Sci*, 81(1), 67. <https://doi.org/10.1007/s00018-023-05096-w>
- Jung, H. W., Park, J. H., Kim, D. A., Jang, I. Y., Park, S. J., Lee, J. Y., Lee, S., Kim, J. H., Yi, H. S., Lee, E., & Kim, B. J. (2021). Association between serum FGF21 level and sarcopenia in older adults. *Bone*, 145, 115877. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.115877>
- Ko, J. W., Shin, N. R., Jung, T. Y., Shin, I. S., Moon, C., Kim, S. H., Lee, I. C., Kim, S. H., Yun, W. K., Kim, H. C., & Kim, J. C. (2019). Melatonin attenuates cisplatin-induced acute kidney injury in rats via induction of anti-aging protein, Klotho. *Food Chem Toxicol*, 129, 201-210. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.049>
- Kondratov, R. V., Kondratova, A. A., Gorbacheva, V. Y., Vykhovanets, O. V., & Antoch, M. P. (2006). Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev*, 20(14), 1868-1873. <https://doi.org/10.1101/gad.1432206>
- Kruk, J., Aboul-Enein, B. H., & Duchnik, E. (2021). Exercise-induced oxidative stress and melatonin supplementation: current evidence. *J Physiol Sci*, 71(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s12576-021-00812-2>
- Kumar, A., Vaca-Dempere, M., Mortimer, T., Deryagin, O., Smith, J. G., Petrus, P., Koronowski, K. B., Greco, C. M., Segalés, J., Andrés, E., Lukesova, V., Zinna, V. M., Welz, P. S., Serrano, A. L., Perdiguero, E., Sassone-Corsi, P., Benitah, S. A., & Muñoz-Cánoves, P. (2024). Brain-muscle communication prevents muscle aging by maintaining daily physiology. *Science*, 384(6695), 563-572. <https://doi.org/10.1126/science.adj8533>
- Kumar, V. (1996). Melatonin: a master hormone and a candidate for universal panacea. *Indian J Exp Biol*, 34(5), 391-402.
- Leduc-Gaudet, J. P., Hussain, S. N. A., Barreiro, E., & Gouspillou, G. (2021). Mitochondrial Dynamics and Mitophagy in Skeletal Muscle Health and Aging. *Int J Mol Sci*, 22(15). <https://doi.org/10.3390/ijms22158179>
- Lefta, M., Wolff, G., & Esser, K. A. (2011). Circadian rhythms, the molecular clock, and skeletal muscle. *Curr Top Dev Biol*, 96, 231-271. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385940-2.00009-7>
- Lei, Y., Gan, M., Qiu, Y., Chen, Q., Wang, X., Liao, T., Zhao, M., Chen, L., Zhang, S., Zhao, Y., Niu, L., Wang, Y., Zhu, L., & Shen, L. (2024). The role of mitochondrial dynamics and mitophagy in skeletal muscle atrophy: from molecular mechanisms to therapeutic insights. *Cell Mol Biol Lett*, 29(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s11658-024-00572-y>
- León, J., Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2005). Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res*, 38(1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2004.00181.x>
- León, J., Macías, M., Escames, G., Camacho, E., Khaldy, H., Martín, M., Espinosa, A., Gallo, M. A., & Acuña-Castroviejo, D. (2000). Structure-related inhibition of calmodulin-

- dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenes. *Mol Pharmacol*, 58(5), 967-975. <https://doi.org/10.1124/mol.58.5.967>
- Lerner, A. B., Case, J. D., & Takahashi, Y. (1960). Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J Biol Chem*, 235, 1992-1997.
- Li, E., Li, X., Huang, J., Xu, C., Liang, Q., Ren, K., Bai, A., Lu, C., Qian, R., & Sun, N. (2020). BMAL1 regulates mitochondrial fission and mitophagy through mitochondrial protein BNIP3 and is critical in the development of dilated cardiomyopathy. *Protein Cell*, 11(9), 661-679. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00713-x>
- Li, Q., Zheng, T., Chen, J., Li, B., Zhang, Q., Yang, S., Shao, J., Guan, W., & Zhang, S. (2025). Exploring melatonin's multifaceted role in female reproductive health: From follicular development to lactation and its therapeutic potential in obstetric syndromes. *J Adv Res*, 70, 223-242. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2024.04.025>
- Li, Y., Tian, X., Luo, J., Bao, T., Wang, S., & Wu, X. (2024). Molecular mechanisms of aging and anti-aging strategies. *Cell Commun Signal*, 22(1), 285. <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01663-1>
- Liu, P., Huang, G., Wei, T., Gao, J., Huang, C., Sun, M., Zhu, L., & Shen, W. (2018). Sirtuin 3-induced macrophage autophagy in regulating NLRP3 inflammasome activation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1864(3), 764-777. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.12.027>
- Liu, T., & Borjigin, J. (2005). N-acetyltransferase is not the rate-limiting enzyme of melatonin synthesis at night. *J Pineal Res*, 39(1), 91-96. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00223.x>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, 186(2), 243-278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>
- López, A., García, J. A., Escames, G., Venegas, C., Ortiz, F., López, L. C., & Acuña-Castroviejo, D. (2009). Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J Pineal Res*, 46(2), 188-198. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00647.x>
- López, L. C., Escames, G., Ortiz, F., Ros, E., & Acuña-Castroviejo, D. (2006). Melatonin restores the mitochondrial production of ATP in septic mice. *Neuro Endocrinol Lett*, 27(5), 623-630.
- Lowrey, P. L., & Takahashi, J. S. (2004). Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 5, 407-441. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.5.061903.175925>
- Ma, Q., Battelli, L., & Hubbs, A. F. (2006). Multiorgan autoimmune inflammation, enhanced lymphoproliferation, and impaired homeostasis of reactive oxygen species in mice lacking the antioxidant-activated transcription factor Nrf2. *Am J Pathol*, 168(6), 1960-1974. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.051113>
- Macías, M., Escames, G., Leon, J., Coto, A., Sbihi, Y., Osuna, A., & Acuña-Castroviejo, D. (2003). Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem*, 270(5),

- 832-840.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03430.x>
- Martín, M., Macías, M., Escames, G., León, J., & Acuña-Castroviejo, D. (2000). Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *Faseb j*, 14(12), 1677-1679.
<https://doi.org/10.1096/fj.99-0865fje>
- Martin, R. A., Viggars, M. R., & Esser, K. A. (2023). Metabolism and exercise: the skeletal muscle clock takes centre stage. *Nat Rev Endocrinol*, 19(5), 272-284.
<https://doi.org/10.1038/s41574-023-00805-8>
- Marzetti, E., Calvani, R., Cesari, M., Buford, T. W., Lorenzi, M., Behnke, B. J., & Leeuwenburgh, C. (2013). Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: from signaling pathways to clinical trials. *Int J Biochem Cell Biol*, 45(10), 2288-2301.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.024>
- Marzetti, E., Privitera, G., Simili, V., Wohlgemuth, S. E., Aulisa, L., Pahor, M., & Leeuwenburgh, C. (2010). Multiple pathways to the same end: mechanisms of myonuclear apoptosis in sarcopenia of aging. *ScientificWorldJournal*, 10, 340-349.
<https://doi.org/10.1100/tsw.2010.27>
- Mayo, J. C., Sainz, R. M., González Menéndez, P., Cepas, V., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2017). Melatonin and sirtuins: A "not-so unexpected" relationship. *J Pineal Res*, 62(2).
<https://doi.org/10.1111/jpi.12391>
- McCarthy, J. J., Andrews, J. L., McDearmon, E. L., Campbell, K. S., Barber, B. K., Miller, B. H., Walker, J. R., Hogenesch, J. B., Takahashi, J. S., & Esser, K. A. (2007). Identification of the circadian transcriptome in adult mouse skeletal muscle. *Physiol Genomics*, 31(1), 86-95.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00066.2007>
- Mehrzadi, S., Pourhanifeh, M. H., Mirzaei, A., Moradian, F., & Hosseinzadeh, A. (2021). An updated review of mechanistic potentials of melatonin against cancer: pivotal roles in angiogenesis, apoptosis, autophagy, endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. *Cancer Cell Int*, 21(1), 188.
<https://doi.org/10.1186/s12935-021-01892-1>
- Menendez-Pelaez, A., Poeggeler, B., Reiter, R. J., Barlow-Walden, L., Pablos, M. I., & Tan, D. X. (1993). Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J Cell Biochem*, 53(4), 373-382.
<https://doi.org/10.1002/jcb.240530415>
- Mezhnina, V., Ebeigbe, O. P., Poe, A., & Kondratov, R. V. (2022). Circadian Control of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Homeostasis. *Antioxid Redox Signal*, 37(10-12), 647-663.
<https://doi.org/10.1089/ars.2021.0274>
- Migliavacca, E., Tay, S. K. H., Patel, H. P., Sonntag, T., Civiletto, G., McFarlane, C., Forrester, T., Barton, S. J., Leow, M. K., Antoun, E., Charpagne, A., Seng Chong, Y., Descombes, P., Feng, L., Francis-Emmanuel, P., Garratt, E. S., Giner, M. P., Green, C. O., Karaz, S., . . . Feige, J. N. (2019). Mitochondrial oxidative capacity and NAD(+) biosynthesis are reduced in human sarcopenia across ethnicities. *Nat Commun*, 10(1), 5808.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-13694-1>
- Miller, B. H., McDearmon, E. L., Panda, S., Hayes, K. R., Zhang, J., Andrews, J.

- L., Antoch, M. P., Walker, J. R., Esser, K. A., Hogenesch, J. B., & Takahashi, J. S. (2007). Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(9), 3342-3347.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0611724104>
- Mitchell, W. K., Williams, J., Atherton, P., Larvin, M., Lund, J., & Narici, M. (2012). Sarcopenia, dynapenia, and the impact of advancing age on human skeletal muscle size and strength; a quantitative review. *Front Physiol*, 3, 260.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00260>
- Morley, J. E., Abbatecola, A. M., Argiles, J. M., Baracos, V., Bauer, J., Bhasin, S., Cederholm, T., Coats, A. J., Cummings, S. R., Evans, W. J., Fearon, K., Ferrucci, L., Fielding, R. A., Guralnik, J. M., Harris, T. B., Inui, A., Kalantar-Zadeh, K., Kirwan, B. A., Mantovani, G., . . . Anker, S. D. (2011). Sarcopenia with limited mobility: an international consensus. *J Am Med Dir Assoc*, 12(6), 403-409.
<https://doi.org/10.1016/j.jamda.2011.04.014>
- Moustogiannis, A., Philippou, A., Taso, O., Zevolis, E., Pappa, M., Chatzigeorgiou, A., & Koutsilieris, M. (2021). The Effects of Muscle Cell Aging on Myogenesis. *Int J Mol Sci*, 22(7).
<https://doi.org/10.3390/ijms22073721>
- Naaz, S., Mishra, S., Pal, P. K., Chattopadhyay, A., Das, A. R., & Bandyopadhyay, D. (2020). Activation of SIRT1/PGC 1 α /SIRT3 pathway by melatonin provides protection against mitochondrial dysfunction in isoproterenol induced myocardial injury. *Heliyon*, 6(10), e05159.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05159>
- Nakahata, Y., Sahar, S., Astarita, G., Kaluzova, M., & Sassone-Corsi, P. (2009). Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science*, 324(5927), 654-657.
<https://doi.org/10.1126/science.1170803>
- Nakahira, K., Haspel, J. A., Rathinam, V. A., Lee, S. J., Dolinay, T., Lam, H. C., Englert, J. A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, H. P., Fitzgerald, K. A., Ryter, S. W., & Choi, A. M. (2011). Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol*, 12(3), 222-230.
<https://doi.org/10.1038/ni.1980>
- Nguyen, K. D., Fentress, S. J., Qiu, Y., Yun, K., Cox, J. S., & Chawla, A. (2013). Circadian gene Bmal1 regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes. *Science*, 341(6153), 1483-1488.
<https://doi.org/10.1126/science.1240636>
- Nogueiras, R., Habegger, K. M., Chaudhary, N., Finan, B., Banks, A. S., Dietrich, M. O., Horvath, T. L., Sinclair, D. A., Pfluger, P. T., & Tschöp, M. H. (2012). Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiol Rev*, 92(3), 1479-1514.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2011>
- Ogawa, S., Yakabe, M., & Akishita, M. (2016). Age-related sarcopenia and its pathophysiological bases. *Inflamm Regen*, 36, 17.
<https://doi.org/10.1186/s41232-016-0022-5>
- Papa, L., & Germain, D. (2014). SirT3 regulates the mitochondrial unfolded protein response. *Mol Cell Biol*, 34(4), 699-710.
<https://doi.org/10.1128/mcb.01337-13>
- Pedersen, B. K., & Saltin, B. (2015). Exercise as medicine - evidence for

- prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand J Med Sci Sports*, 25 Suppl 3, 1-72.
<https://doi.org/10.1111/sms.12581>
- Peek, C. B., Affinati, A. H., Ramsey, K. M., Kuo, H. Y., Yu, W., Sena, L. A., Ilkayeva, O., Marcheva, B., Kobayashi, Y., Omura, C., Levine, D. C., Bacsik, D. J., Gius, D., Newgard, C. B., Goetzman, E., Chandel, N. S., Denu, J. M., Mrksich, M., & Bass, J. (2013). Circadian clock NAD⁺ cycle drives mitochondrial oxidative metabolism in mice. *Science*, 342(6158), 1243417.
<https://doi.org/10.1126/science.1243417>
- Pei, L., Yao, Z., Liang, D., Yang, K., & Tao, L. (2024). Mitochondria in skeletal system-related diseases. *Biomed Pharmacother*, 181, 117505.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117505>
- Perreau-Lenz, S., Pévet, P., Buijs, R. M., & Kalsbeek, A. (2004). The biological clock: the bodyguard of temporal homeostasis. *Chronobiol Int*, 21(1), 1-25. <https://doi.org/10.1081/cbi-120027984>
- Pierrefiche, G., & Laborit, H. (1995). Oxygen free radicals, melatonin, and aging. *Exp Gerontol*, 30(3-4), 213-227.
[https://doi.org/10.1016/0531-5565\(94\)00036-3](https://doi.org/10.1016/0531-5565(94)00036-3)
- Price, F. D., von Maltzahn, J., Bentzinger, C. F., Dumont, N. A., Yin, H., Chang, N. C., Wilson, D. H., Frenette, J., & Rudnicki, M. A. (2014). Inhibition of JAK-STAT signaling stimulates adult satellite cell function. *Nat Med*, 20(10), 1174-1181.
<https://doi.org/10.1038/nm.3655>
- Prud'homme, G. J., Kurt, M., & Wang, Q. (2022). Pathobiology of the Klotho Antiaging Protein and Therapeutic Considerations. *Front Aging*, 3, 931331.
<https://doi.org/10.3389/fragi.2022.931331>
- Rahim, I., Sayed, R. K., Fernández-Ortiz, M., Aranda-Martínez, P., Guerra-Librero, A., Fernández-Martínez, J., Rusanova, I., Escames, G., Djerdjouri, B., & Acuña-Castroviejo, D. (2021). Melatonin alleviates sepsis-induced heart injury through activating the Nrf2 pathway and inhibiting the NLRP3 inflammasome. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 394(2), 261-277.
<https://doi.org/10.1007/s00210-020-01972-5>
- Ramsey, K. M., Yoshino, J., Brace, C. S., Abrassart, D., Kobayashi, Y., Marcheva, B., Hong, H. K., Chong, J. L., Buhr, E. D., Lee, C., Takahashi, J. S., Imai, S., & Bass, J. (2009). Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis. *Science*, 324(5927), 651-654.
<https://doi.org/10.1126/science.1171641>
- Reiter, R. J. (1993). The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*, 49(8), 654-664.
<https://doi.org/10.1007/bf01923947>
- Rizzo, V., Porta, C., Moroni, M., Scoglio, E., & Moratti, R. (2002). Determination of free and total (free plus protein-bound) melatonin in plasma and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 774(1), 17-24. [https://doi.org/10.1016/s1570-0232\(02\)00168-x](https://doi.org/10.1016/s1570-0232(02)00168-x)
- Rodríguez-Santana, C., López-Rodríguez, A., Martínez-Ruiz, L., Florido, J., Cela, O., Capitanio, N., Ramírez-Casas, Y., Acuña-Castroviejo, D., & Escames, G. (2023). The Relationship between Clock Genes, Sirtuin 1, and Mitochondrial Activity in Head and Neck Squamous Cell Cancer: Effects of Melatonin Treatment. *Int*

- J Mol Sci*, 24(19).
<https://doi.org/10.3390/ijms241915030>
- Rodriguez, C., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolín, I., Herrera, F., Martín, V., & Reiter, R. J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*, 36(1), 1-9.
<https://doi.org/10.1046/j.1600-079x.2003.00092.x>
- Rodríguez, M. I., Carretero, M., Escames, G., López, L. C., Maldonado, M. D., Tan, D. X., Reiter, R. J., & Acuña-Castroviejo, D. (2007). Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice. *Free Radic Res*, 41(1), 15-24.
<https://doi.org/10.1080/10715760600936359>
- Rogers, G. W., Brand, M. D., Petrosyan, S., Ashok, D., Elorza, A. A., Ferrick, D. A., & Murphy, A. N. (2011). High throughput microplate respiratory measurements using minimal quantities of isolated mitochondria. *PLoS One*, 6(7), e21746.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021746>
- Romanello, V., Guadagnin, E., Gomes, L., Roder, I., Sandri, C., Petersen, Y., Milan, G., Masiero, E., Del Piccolo, P., Foretz, M., Scorrano, L., Rudolf, R., & Sandri, M. (2010). Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. *Embo j*, 29(10), 1774-1785.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2010.60>
- Rosenberg, I. H. (1997). Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutr*, 127(5 Suppl), 990s-991s.
<https://doi.org/10.1093/jn/127.5.990s>
- Rosenwasser, A. M., & Turek, F. W. (2015). Neurobiology of Circadian Rhythm Regulation. *Sleep Med Clin*, 10(4), 403-412.
<https://doi.org/10.1016/j.jsmc.2015.08.003>
- Rudic, R. D., McNamara, P., Curtis, A. M., Boston, R. C., Panda, S., Hogenesch, J. B., & Fitzgerald, G. A. (2004). BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol*, 2(11), e377.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020377>
- Sanchez-Hidalgo, M., de la Lastra, C. A., Carrascosa-Salmoral, M. P., Naranjo, M. C., Gomez-Corvera, A., Caballero, B., & Guerrero, J. M. (2009). Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Exp Gerontol*, 44(5), 328-334.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2009.02.002>
- Sanchez-Tocino, M. L., Cigarrán, S., Ureña, P., González-Casas, M. L., Mas-Fontao, S., Gracia-Iguacel, C., Ortíz, A., & Gonzalez-Parra, E. (2024). Definition and evolution of the concept of sarcopenia. *Nefrologia (Engl Ed)*, 44(3), 323-330.
<https://doi.org/10.1016/j.nefro.2023.08.007>
- Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S. H., & Goldberg, A. L. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, 117(3), 399-412.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00400-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00400-3)
- Sayed, R. K., de Leonadis, E. C., Guerrero-Martínez, J. A., Rahim, I., Mokhtar, D. M., Saleh, A. M., Abdalla, K. E., Pozo, M. J., Escames, G., López, L. C., & Acuña-Castroviejo, D. (2016). Identification of morphological markers of sarcopenia at early stage of aging in skeletal muscle of mice. *Exp Gerontol*, 83, 22-30.

- <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.07.007>
- Sayed, R. K., Fernández-Ortiz, M., Fernández-Martínez, J., Aranda Martínez, P., Guerra-Librero, A., Rodríguez-Santana, C., de Haro, T., Escames, G., Acuña-Castroviejo, D., & Rusanova, I. (2021). The Impact of Melatonin and NLRP3 Inflammasome on the Expression of microRNAs in Aged Muscle. *Antioxidants (Basel)*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/antiox10040524>
- Sayed, R. K. A., Fernández-Ortiz, M., Diaz-Casado, M. E., Aranda-Martínez, P., Fernández-Martínez, J., Guerra-Librero, A., Escames, G., López, L. C., Alsaadawy, R. M., & Acuña-Castroviejo, D. (2019). Lack of NLRP3 Inflammasome Activation Reduces Age-Dependent Sarcopenia and Mitochondrial Dysfunction, Favoring the Prophylactic Effect of Melatonin. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 74(11), 1699-1708. <https://doi.org/10.1093/gerona/glz079>
- Sayed, R. K. A., Fernández-Ortiz, M., Diaz-Casado, M. E., Rusanova, I., Rahim, I., Escames, G., López, L. C., Mokhtar, D. M., & Acuña-Castroviejo, D. (2018). The Protective Effect of Melatonin Against Age-Associated, Sarcopenia-Dependent Tubular Aggregate Formation, Lactate Depletion, and Mitochondrial Changes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 73(10), 1330-1338. <https://doi.org/10.1093/gerona/gly059>
- Scarpulla, R. C. (2011). Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta*, 1813(7), 1269-1278. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.09.019>
- Schaap, L. A., Pluijm, S. M., Deeg, D. J., Harris, T. B., Kritchevsky, S. B., Newman, A. B., Colbert, L. H., Pahor, M., Rubin, S. M., Tylavsky, F. A., & Visser, M. (2009). Higher inflammatory marker levels in older persons: associations with 5-year change in muscle mass and muscle strength. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 64(11), 1183-1189. <https://doi.org/10.1093/gerona/glp097>
- Schiaffino, S., Blaauw, B., & Dyar, K. A. (2016). The functional significance of the skeletal muscle clock: lessons from Bmal1 knockout models. *Skelet Muscle*, 6, 33. <https://doi.org/10.1186/s13395-016-0107-5>
- Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*, 91(4), 1447-1531. <https://doi.org/10.1152/physrev.0031.2010>
- Schroder, E. A., Harfmann, B. D., Zhang, X., Srikuea, R., England, J. H., Hodge, B. A., Wen, Y., Riley, L. A., Yu, Q., Christie, A., Smith, J. D., Seward, T., Wolf Horrell, E. M., Mula, J., Peterson, C. A., Butterfield, T. A., & Esser, K. A. (2015). Intrinsic muscle clock is necessary for musculoskeletal health. *J Physiol*, 593(24), 5387-5404. <https://doi.org/10.1113/jp271436>
- Sciorati, C., Gamberale, R., Monno, A., Citterio, L., Lanzani, C., De Lorenzo, R., Ramirez, G. A., Esposito, A., Manunta, P., Manfredi, A. A., & Rovere-Querini, P. (2020). Pharmacological blockade of TNF α prevents sarcopenia and prolongs survival in aging mice. *Aging (Albany NY)*, 12(23), 23497-23508. <https://doi.org/10.18632/aging.202200>
- Sharafati-Chaleshtori, R., Shirzad, H., Rafieian-Kopaei, M., & Soltani, A. (2017). Melatonin and human mitochondrial diseases. *J Res Med*

- Sci*, 22, 2.
<https://doi.org/10.4103/1735-1995.199092>
- Silva, N. L., Oliveira, R. B., Fleck, S. J., Leon, A. C., & Farinatti, P. (2014). Influence of strength training variables on strength gains in adults over 55 years-old: a meta-analysis of dose-response relationships. *J Sci Med Sport*, 17(3), 337-344.
<https://doi.org/10.1016/j.jsams.2013.05.009>
- Slominski, R. M., Reiter, R. J., Schlabritz-Loutsevitch, N., Ostrom, R. S., & Slominski, A. T. (2012). Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol*, 351(2), 152-166.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.01.004>
- Spengler, M. L., Kuropatwinski, K. K., Comas, M., Gasparian, A. V., Fedtsova, N., Gleiberman, A. S., Gitlin, I., Artemicheva, N. M., Deluca, K. A., Gudkov, A. V., & Antoch, M. P. (2012). Core circadian protein CLOCK is a positive regulator of NF- κ B-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(37), E2457-2465.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1206274109>
- Stacchiotti, A., Favero, G., & Rodella, L. F. (2020). Impact of Melatonin on Skeletal Muscle and Exercise. *Cells*, 9(2).
<https://doi.org/10.3390/cells9020288>
- Steffl, M., Bohannon, R. W., Sontakova, L., Tufano, J. J., Shiells, K., & Holmerova, I. (2017). Relationship between sarcopenia and physical activity in older people: a systematic review and meta-analysis. *Clin Interv Aging*, 12, 835-845.
<https://doi.org/10.2147/cia.S132940>
- Steinhilber, D., Brungs, M., Werz, O., Wiesenberger, I., Danielsson, C., Kahlen, J. P., Nayeri, S., Schröder, M., & Carlberg, C. (1995). The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem*, 270(13), 7037-7040.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.13.7037>
- Stojkovic, K., Wing, S. S., & Cermakian, N. (2014). A central role for ubiquitination within a circadian clock protein modification code. *Front Mol Neurosci*, 7, 69.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00069>
- Suofu, Y., Li, W., Jean-Alphonse, F. G., Jia, J., Khattar, N. K., Li, J., Baranov, S. V., Leronni, D., Mihalik, A. C., He, Y., Cecon, E., Wehbi, V. L., Kim, J., Heath, B. E., Baranova, O. V., Wang, X., Gable, M. J., Kretz, E. S., Di Benedetto, G., . . . Friedlander, R. M. (2017). Dual role of mitochondria in producing melatonin and driving GPCR signaling to block cytochrome c release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(38), E7997-e8006.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1705768114>
- Takahashi, J. S. (2017). Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat Rev Genet*, 18(3), 164-179.
<https://doi.org/10.1038/nrg.2016.150>
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Leon, J., Hardeland, R., Poeggeler, B., & Reiter, R. J. (2005). Interactions between melatonin and nicotinamide nucleotide: NADH preservation in cells and in cell-free systems by melatonin. *J Pineal Res*, 39(2), 185-194.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00234.x>
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Terron, M. P., Flores, L. J., & Reiter, R. J. (2007).

- One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res*, 42(1), 28-42.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00407.x>
- Tian, X., Huo, X., Dong, P., Wu, B., Wang, X., Wang, C., Liu, K., & Ma, X. (2015). Sulfation of melatonin: enzymatic characterization, differences of organs, species and genders, and bioactivity variation. *Biochem Pharmacol*, 94(4), 282-296.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.02.010>
- Urata, Y., Honma, S., Goto, S., Todoroki, S., Iida, T., Cho, S., Honma, K., & Kondo, T. (1999). Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, 27(7-8), 838-847.
[https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00131-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00131-8)
- Valenzuela, F. J., Vera, J., Venegas, C., Muñoz, S., Oyarce, S., Muñoz, K., & Lagunas, C. (2016). Evidences of Polymorphism Associated with Circadian System and Risk of Pathologies: A Review of the Literature. *Int J Endocrinol*, 2016, 2746909.
<https://doi.org/10.1155/2016/2746909>
- van Moorsel, D., Hansen, J., Havekes, B., Scheer, F., Jörgensen, J. A., Hoeks, J., Schrauwen-Hinderling, V. B., Duez, H., Lefebvre, P., Schaper, N. C., Hesselink, M. K. C., Staels, B., & Schrauwen, P. (2016). Demonstration of a day-night rhythm in human skeletal muscle oxidative capacity. *Mol Metab*, 5(8), 635-645.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.06.012>
- Vargas-Mendoza, N., Angeles-Valencia, M., Morales-González, Á., Madrigal-Santillán, E. O., Morales-Martínez, M., Madrigal-Bujaidar, E., Álvarez-González, I., Gutiérrez-Salinas, J., Esquivel-Chirino, C., Chamorro-Cevallos, G., Cristóbal-Luna, J. M., & Morales-González, J. A. (2021). Oxidative Stress, Mitochondrial Function and Adaptation to Exercise: New Perspectives in Nutrition. *Life*, 11(11), 1269.
<https://www.mdpi.com/2075-1729/11/11/1269>
- Venegas, C., García, J. A., Escames, G., Ortiz, F., López, A., Doerrier, C., García-Corzo, L., López, L. C., Reiter, R. J., & Acuña-Castroviejo, D. (2012). Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J Pineal Res*, 52(2), 217-227.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00931.x>
- Verma, A. K., Singh, S., & Rizvi, S. I. (2023). Aging, circadian disruption and neurodegeneration: Interesting interplay. *Exp Gerontol*, 172, 112076.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2022.112076>
- Viggars, M. R., Berko, H. E., Hesketh, S. J., Wolff, C. A., Gutierrez-Monreal, M. A., Martin, R. A., Jennings, I. G., Huo, Z., & Esser, K. A. (2024). Skeletal muscle BMAL1 is necessary for transcriptional adaptation of local and peripheral tissues in response to endurance exercise training. *bioRxiv*.
<https://doi.org/10.1101/2023.10.13.562100>
- Volt, H., García, J. A., Doerrier, C., Díaz-Casado, M. E., Guerra-Librero, A., López, L. C., Escames, G., Tresguerres, J. A., & Acuña-Castroviejo, D. (2016). Same molecule but different expression: aging and sepsis trigger NLRP3 inflammasome activation, a target of melatonin. *J Pineal Res*, 60(2), 193-205.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12303>

- Vriend, J., & Reiter, R. J. (2015). Melatonin feedback on clock genes: a theory involving the proteasome. *J Pineal Res*, 58(1), 1-11.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12189>
- Wada, T., Ichihashi, Y., Suzuki, E., Kosuge, Y., Ishige, K., Uchiyama, T., Makishima, M., Nakao, R., Oishi, K., & Shimba, S. (2018). Deletion of Bmal1 Prevents Diet-Induced Ectopic Fat Accumulation by Controlling Oxidative Capacity in the Skeletal Muscle. *Int J Mol Sci*, 19(9).
<https://doi.org/10.3390/ijms19092813>
- Welz, P. S., & Benitah, S. A. (2020). Molecular Connections Between Circadian Clocks and Aging. *J Mol Biol*, 432(12), 3661-3679.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.12.036>
- Wiesenberg, I., Missbach, M., Kahlen, J. P., Schröder, M., & Carlberg, C. (1995). Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res*, 23(3), 327-333.
<https://doi.org/10.1093/nar/23.3.327>
- Wolff, C. A., Gutierrez-Monreal, M. A., Meng, L., Zhang, X., Douma, L. G., Costello, H. M., Douglas, C. M., Ebrahimi, E., Pham, A., Oliveira, A. C., Fu, C., Nguyen, A., Alava, B. R., Hesketh, S. J., Morris, A. R., Endale, M. M., Crislip, G. R., Cheng, K. Y., Schroder, E. A., . . . Esser, K. A. (2023). Defining the age-dependent and tissue-specific circadian transcriptome in male mice. *Cell Rep*, 42(1), 111982.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111982>
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R. C., & Spiegelman, B. M. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 98(1), 115-124.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80611-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80611-x)
- Wurtman, R. J., Axelrod, J., & Phillips, L. S. (1963). MELATONIN SYNTHESIS IN THE PINEAL GLAND: CONTROL BY LIGHT. *Science*, 142(3595), 1071-1073.
<https://doi.org/10.1126/science.142.3595.1071>
- Xia, Y., Yao, B., Fu, Z., Li, L., Jin, S., Qu, B., Huang, Y., & Ding, H. (2023). Clock genes regulate skeletal muscle energy metabolism through NAMPT/NAD(+)/SIRT1 following heavy-load exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 325(5), R490-r503.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00261.2022>
- Xu, L., Zheng, Y. L., Yin, X., Xu, S. J., Tian, D., Zhang, C. Y., Wang, S., & Ma, J. Z. (2020). Excessive Treadmill Training Enhances Brain-Specific MicroRNA-34a in the Mouse Hippocampus. *Front Mol Neurosci*, 13, 7.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00007>
- Xu, X., & Wen, Z. (2023). The mediating role of inflammaging between mitochondrial dysfunction and sarcopenia in aging: a review. *Am J Clin Exp Immunol*, 12(6), 109-126.
- Yartseva, V., Goldstein, L. D., Rodman, J., Kates, L., Chen, M. Z., Chen, Y. J., Foreman, O., Siebel, C. W., Modrusan, Z., Peterson, A. S., & Jovičić, A. (2020). Heterogeneity of Satellite Cells Implicates DELTA1/NOTCH2 Signaling in Self-Renewal. *Cell Rep*, 30(5), 1491-1503.e1496.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.100>
- Yu, D., Cai, Z., Li, D., Zhang, Y., He, M., Yang, Y., Liu, D., Xie, W., Li, Y., & Xiao, W. (2021). Myogenic Differentiation of Stem Cells for Skeletal Muscle Regeneration. *Stem Cells Int*, 2021,

8884283.
<https://doi.org/10.1155/2021/8884283>
- Yuan, Y., Cruzat, V. F., Newsholme, P., Cheng, J., Chen, Y., & Lu, Y. (2016). Regulation of SIRT1 in aging: Roles in mitochondrial function and biogenesis. *Mech Ageing Dev*, 155, 10-21.
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.02.003>
- Zammit, P. S. (2017). Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 72, 19-32.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.11.011>
- Zhang, H., Davies, K. J. A., & Forman, H. J. (2015). Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radic Biol Med*, 88(Pt B), 314-336.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.036>
- Zhang, H., Squadrito, G. L., Uppu, R., & Pryor, W. A. (1999). Reaction of peroxynitrite with melatonin: A mechanistic study. *Chem Res Toxicol*, 12(6), 526-534.
<https://doi.org/10.1021/tx980243t>
- Zhang, X. Z., Xie, W. Q., Chen, L., Xu, G. D., Wu, L., Li, Y. S., & Wu, Y. X. (2022). Blood Flow Restriction Training for the Intervention of Sarcopenia: Current Stage and Future Perspective. *Front Med (Lausanne)*, 9, 894996.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2022.894996>
- Zhao, D., Yu, Y., Shen, Y., Liu, Q., Zhao, Z., Sharma, R., & Reiter, R. J. (2019). Melatonin Synthesis and Function: Evolutionary History in Animals and Plants. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10, 249.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00249>
- Zhong, Z., Umemura, A., Sanchez-Lopez, E., Liang, S., Shalapour, S., Wong, J., He, F., Boassa, D., Perkins, G., Ali, S. R., McGeough, M. D., Ellisman, M. H., Seki, E., Gustafsson, A. B., Hoffman, H. M., Diaz-Meco, M. T., Moscat, J., & Karin, M. (2016). NF- κ B Restricts Inflammasome Activation via Elimination of Damaged Mitochondria. *Cell*, 164(5), 896-910.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.057>
- Zhu, G. Z., Zhao, K., Li, H. Z., Wu, D. Z., Chen, Y. B., Han, D., Gao, J. W., Chen, X. Y., Yu, Y. P., Huang, Z. W., Tu, C., & Zhong, Z. M. (2024). Melatonin ameliorates age-related sarcopenia by inhibiting fibrogenic conversion of satellite cell. *Mol Med*, 30(1), 238.
<https://doi.org/10.1186/s10020-024-00998-2>
- Zhu, P., Hamlish, N. X., Thakkar, A. V., Steffek, A. W. T., Rendleman, E. J., Khan, N. H., Waldeck, N. J., DeVilbiss, A. W., Martin-Sandoval, M. S., Mathews, T. P., Chandel, N. S., & Peek, C. B. (2022). BMAL1 drives muscle repair through control of hypoxic NAD(+) regeneration in satellite cells. *Genes Dev*, 36(3-4), 149-166.
<https://doi.org/10.1101/gad.349066.121>
- Zhu, Y., Liu, Y., Escames, G., Yang, Z., Zhao, H., Qian, L., Xue, C., Xu, D., Acuña-Castroviejo, D., & Yang, Y. (2022). Deciphering clock genes as emerging targets against aging. *Ageing Res Rev*, 81, 101725.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101725>