### MECANISMOS DE SARCOPENIA: CONEXIÓN ENTRE CRONODISRUPCIÓN, INFLAMACIÓN, DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y PÉRDIDA MUSCULAR EN EL ENVEJECIMIENTO



GRUPO DE INVESTIGACIÓN CTS-101: COMUNICACIÓN INTERCELULAR

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA (CIBM)

PARQUE TECNOLÓGICO DE CIENCIAS DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA

FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE GRANADA

Programa de Doctorado en Biomedicina

Bajo la supervisión del Dr. DARÍO ACUÑA CASTROVIEJO

## JOSÉ FERNÁNDEZ MARTÍNEZ 2024

### MECANISMOS DE SARCOPENIA: CONEXIÓN ENTRE CRONODISRUPCIÓN, INFLAMACIÓN, DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y PÉRDIDA MUSCULAR EN EL ENVEJECIMIENTO

Memoria que presenta el graduado en Bioquímica

D. José Fernández Martínez

como aspirante al grado de Doctor

Fdo.: José Fernández Martínez

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

Fdo.: Dr. Darío Acuña Castroviejo

Doctor en Medicina

Catedrático Emérito de Fisiología de la UGR

Universidad de Granada

2024

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales Autor: José Fernández Martínez ISBN: 978-84-1195-194-4 URI: <u>https://hdl.handle.net/10481/89810</u>

# CERTIFICACIONES

D. Darío Acuña Castroviejo, Catedrático Emérito de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

#### CERTIFICA QUE:

D. José Fernández Martínez, Graduado en Bioquímica, ha realizado bajo su dirección y en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada, el trabajo titulado "MECANISMOS DE SARCOPENIA: CONEXIÓN ENTRE CRONODISRUPCIÓN, INFLAMACIÓN, DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y PÉRDIDA MUSCULAR EN EL ENVEJECIMIENTO" reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 17 de noviembre de 2023

V.º B.º Director

El interesado

Darío Acuña Castroviejo

José Fernández Martínez

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, el graduado José Fernández Martínez recibió apoyo económico de las siguientes fuentes:

- Tipo de contrato/ayuda: Contrato predoctoral de Formación de Profesorado Universitario 2018 (FPU18/01736), Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, España. Organismo: Universidad de Granada. Centro: Centro de Investigación Biomédica (CIBM) y Facultad de Medicina. Departamento: Fisiología. Duración: Tiempo completo (31/10/2019 - 30/10/2023).
- Tipo de contrato/ayuda: EMBO Scientific Exchange Grant 9151. Organismo: Universidad de Padua, Italia. Centro: Veneto Institute of Molecular Medicine (VIMM). Departamento: Ciencias Biomédicas. Duración: Tiempo completo (01/09/2021 – 30/11/2023).

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

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: 10.20944/preprints202310.2087.v1. (Artículo en revisión)

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

#### Otras publicaciones:

Martínez-Ruiz L, Florido J, Rodriguez-Santana C, López-Rodríguez A, Guerra-Librero A, Fernández-Gil BI, García-Tárraga P, García-Verdugo JM, Oppel F, Sudhoff H, Sánchez-Porras D, Ten-Steve A, Fernández-Martínez J, González-García P, Rusanova I, Acuña-Castroviejo D, Carriel VS, Escames G. Intratumoral injection of melatonin enhances tumor regression in cell line-derived and patient-derived xenografts of head and neck cancer by increasing mitochondrial oxidative stress. *Biomed Pharmacother*. 2023. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115518.

**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.

Lozano-Lorca M, Olmedo-Requena R, Rodríguez-Barranco M, Redondo-Sánchez D, Jiménez-Pacheco A, Vázquez-Alonso F, Arana-Asensio E, Sánchez MJ, Fernández-Martínez J, Acuña-Castroviejo D, Jiménez-Moleón JJ. Salivary Melatonin Rhythm and Prostate Cancer: CAPLIFE Study. *J Urol.* 2022. doi: 10.1097/JU.00000000002294.

Sayed RKA, Fernández-Ortiz M, Rahim I, Fernández-Martínez J, Aranda-Martínez P, Rusanova I, Martínez-Ruiz L, Alsaadawy RM, Escames G, Acuña-Castroviejo D. The Impact of Melatonin Supplementation and NLRP3 Inflammasome Deletion on Age-Accompanied Cardiac Damage. *Antioxidants*. 2021. doi: 10.3390/antiox10081269.

Sayed RKA, 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. The Impact of Melatonin and NLRP3 Inflammasome on the Expression of microRNAs in Aged Muscle. *Antioxidants*. 2021. doi: 10.3390/antiox10040524.

Fernández-Ortiz M, Sayed RKA, Fernández-Martínez J, Cionfrini A, Aranda-Martínez P, Escames G, de Haro T, Acuña-Castroviejo D. Melatonin/Nrf2/NLRP3 Connection in Mouse Heart Mitochondria during Aging. *Antioxidants*. 2020. doi: 10.3390/antiox9121187.

Sayed RKA, Mokhtar DM, Fernández-Ortiz M, Fernández-Martínez J, Aranda-Martínez P, Escames G, Acuña Castroviejo D. Lack of retinoid acid receptor-related orphan receptor alpha accelerates and melatonin supplementation prevents testicular aging. *Aging*. 2020. doi: 10.18632/aging.103654.

Rahim I, Sayed RK, Fernández-Ortiz M, Aranda-Martínez P, Guerra-Librero A,
Fernández-Martínez J, Rusanova I, Escames G, Djerdjouri B, Acuña-Castroviejo
D. Melatonin alleviates sepsis-induced heart injury through activating the Nrf2 pathway
and inhibiting the NLRP3 inflammasome. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol.*2020. doi: 10.1007/s00210-020-01972-5.

Sayed RKA, Fernández-Ortiz M, Díaz-Casado ME, Aranda-Martínez P, Fernández-Martínez J, Guerra-Librero A, Escames G, López LC, Alsaadawy RM, Acuña Castroviejo D. 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.* 2019. doi: 10.1093/15erona/glz079.

Rusanova I, Fernández-Martínez J, Fernández-Ortiz M, Aranda-Martínez P, Escames G, García-García FJ, Mañas L, Acuña-Castroviejo D. Involvement of plasma miRNAs, muscle miRNAs and mitochondrial miRNAs in the pathophysiology of frailty. *Exp Gerontol.* 2019. doi: 10.1016/j.exger.2019.110637.

Fernandez-Gil BI, Guerra-Librero A, Shen YQ, Florido J, Martínez-Ruiz L, García-López S, Adan C, Rodríguez-Santana C, Acuña-Castroviejo D, Quiñones-Hinojosa A, Fernández-Martínez J, Abdel Moneim AE, López LC, Rodríguez Ferrer JM, Escames G. Melatonin Enhances Cisplatin and Radiation Cytotoxicity in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma by Stimulating Mitochondrial ROS Generation, Apoptosis, and Autophagy. *Oxid Med Cell Longev*. 2019. doi: 10.1155/2019/7187128.

#### Capítulos de libro:

**Quiles-Morales J, Varela-López A, Fernández-Martínez J, Aranda-Martínez P, Acuña-Castroviejo D.** Procedimientos experimentales y modelos en envejecimiento, cronobiología y metabolismo. En Zúñiga JM y Orellana JM (Eds.), *Ciencia y tecnología en investigación animal* (Capítulo E.05.02). Editorial Universidad de Alcalá y SECAL. 2023.

#### Participación en proyectos de investigación:

Nombre del proyecto: Evaluación de los efectos del entrenamiento diurno versus nocturno sobre el ritmo circadiano, la calidad del sueño y el estado de recuperación en futbolistas amateur. Referencia: PPJIB2021-21. Investigador principal: José Fernández Martínez, Jesús Olivares Jabalera. Agencia: Vicerrectorado de Investigación y Transferencia, Universidad de Granada. Fecha: 01/01/2022 - 31/12/2022. Fondos: 1.500,00 €.

Nombre del proyecto: Glucocálix, nueva diana terapéutica para la melatonina en la sepsis. Referencia: A-CTS-124-UGR20. Investigador principal: Darío Acuña

Castroviejo, Tomás de Haro Muñoz. Agencia: Consejería de Economía, Innovación y Ciencia. Fecha: 01/07/2021 - 30/06/2023. Fondos: 45.000,00 €.

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 €.

Nombre del proyecto: Análisis de la conexión entre genes reloj, melatonina y mitocondria en el modelo de parkinson en el pez cebra. **Referencia:** P18-RT-698. **Investigador principal:** Darío Acuña Castroviejo. **Agencia:** Consejería de Conocimiento, Investigación y Universidad, Junta de Andalucía. **Fecha:** 01/01/2020 - 31/03/2023. **Fondos:** 119.652,00 €.

Nombre del proyecto: Looking for the connection between clock genes and mitochondrial impairment in aging and age-related loss of muscle fibers. Ciber de Fragilidad y Envejecimiento. Referencia: CB/10/00238. Investigador principal: Darío Acuña Castroviejo. Agencia: CIBERFES, Instituto de Salud Carlos III. Fecha: 01/09/2016 - 30/09/2020. Fondos: 120.000,00 €.

<u>Contribuciones a congresos relacionados con esta Tesis Doctoral</u> (comunicaciones orales):

**XV Jornadas de Formación CIBERES 2022.** Characterization of the skeletal musclespecific and inducible Bmal1 knockout mouse (iMS-Bmal1<sup>-/-</sup>) 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 Bmall inducible y específico de músculo esquelético (iMS-Bmal1<sup>-/-</sup>) como modelo para el estudio de la sarcopenia. 2022. Granada (España). **Fernández-Martínez J**, Ramírez-Casas Y, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

II Simposium de Medicina de Precisión. Genes reloj en el envejecimiento muscular.2021. Granada (España). Fernández-Martínez J, Acuña-Castroviejo D.

I Simposium de Medicina de Precisión. Genes reloj en el envejecimiento muscular. 2019. Granada (España). Fernández-Ortiz M, Sayed RKA, Fernández-Martínez J, Rusanova I, Acuña-Castroviejo D.

13<sup>th</sup> Conference on Mitochondrial Physiology and MitoEAGLE WG and MC Meeting – MiP18/MitoEAGLE. Mitochondria, melatonin, and neuroinflammation in Parkinson's disease. 2018. Jurmala (Letonia). Acuña-Castroviejo D, López-Ramírez A, Díaz-Casado ME, Fernández-Ortiz M, Fernández-Martínez J, Escames G.

Contribuciones a congresos relacionados con esta Tesis Doctoral (pósteres):

11<sup>th</sup> 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.

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

11<sup>th</sup> International Meeting on Mitochondrial Pathology - EUROMIT 2023. MPTPinduced 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.

**Mitochondrial Medicine Meeting** – **mitoNice 2022.** Evaluation of mitochondrial dysfunction and the therapeutic capacity of exercise and melatonin in the iMS-Bmal1<sup>-/-</sup> 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 mitocondrial 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.

7<sup>th</sup> International Congress of Myology – MYOLOGY 2022. Characterization of the skeletal muscle-specific and inducible Bmal1 knockout mouse (iMS-Bmal1<sup>-/-</sup>) 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.

7<sup>th</sup> 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.

#### **IV National Congress for Young Researchers in Biomedicine – CONBIOPREVAL**

**2020.** Development and evaluation of a method for determination of melatonin in human saliva by UHPLC-MS/MS and application in prostate cancer patients. 2020. Granada (España). **Fernández-Martínez J**, Guerra-Librero A, Fernández-Ortiz M, Acuña-Castroviejo D.

IV National Congress for Young Researchers in Biomedicine – CONBIOPREVAL
2020. Development of a melatonin-deficient zebrafish model using CRISPR/Cas9. 2020.
Granada (España). Aranda-Martínez P, Fernández-Martínez J, Ramírez-Casas Y,
Acuña-Castroviejo D.

I Congreso de Investigadores del PTS. Determinación de la respiración mitocondrial in vivo en el modelo de Parkinson en el pez cebra revela la eficacia de la melatonina en el restablecimiento de la normalidad mitocondrial. 2019. Granada (España). Aranda-Martínez P, Díaz-Casado ME, Rusanova I, Fernández-Ortiz M, Fernández-Martínez J, Acuña-Castroviejo D.

# AGRADECIMIENTOS

Siempre me ha costado transmitir mis sentimientos y agradecimientos hacia las personas que quiero. Es más, si puedo lo evito. Aunque todas ellas pueden estar seguras de que siempre las tengo en mente. En este apartado de la Tesis Doctoral haré el esfuerzo en dedicar algunas palabras a todos ellos, intentando ser breve y siempre con "mi toque", así le quitamos hierro al asunto.

A Darío, mi director de Tesis, gracias por confiar en mí y estar siempre dispuesto a todo. También gracias por regañarme; esos "¡Jose, coño!" o "Te veo un poco pez" espabilan a cualquiera, y a posteriori te das cuenta de que vienen bien. Gracias a ello hoy voy con pantalón largo, sin enseñarle los pelillos al tribunal.

A Germaine, directora de nuestro grupo de investigación. Gracias por formarnos como científicos, por alentarnos a perseguir todas las oportunidades y por impulsarnos en ese camino. Tu espontaneidad y sonrisa le dan vida al laboratorio.

A Luis Carlos, jefe dentro del laboratorio y compañero fuera, gracias por tus buenos consejos y por tu sentido común. Por cierto, hay que retomar el pádel.

A Iryna, con la que empecé y terminaré esta etapa. A la que le tengo un gran cariño, y no solo porque me tiene que evaluar. Siempre recordaré tu ayuda en mis primeros pasos con el temible UHPLC-MS/MS, además del primer Congreso del PTS.

A Paula, por acogerme en el laboratorio, convertirse en mi amiga, y luego en algo más; si bien es cierto que luego yo la acogí en mi piso. Por ser sencilla y compleja a la vez, por quererme y aguantarme, por estar siempre dispuesta a todo. Ahora empezamos una nueva etapa. Cruza los dedos.

A Yolanda, porque esta Tesis Doctoral es tan suya como mía. Gracias por compartir todo este proceso conmigo; juntos lo hemos sacado adelante. También agradezco tu paciencia y cómo has respetado todas mis manías. No sé cómo lo has logrado. Sin olvidar los momentos de fiesta. Gracias por tus ruedas cubanas, "yolijitos" y demás. No cambies. Me llevo a una gran amiga.

A todos los integrantes del grupo tan chulo que formamos estos años, dentro y fuera del laboratorio. Especialmente a los antiguos, que no viejos, a los que estaban cuando yo llegué y me acogieron como uno más. Gracias Javi, Agustín, Eliana, Laura, Chufi y Ana, gracias por todo. También gracias a los que, como yo, han ido uniéndose de una u otra forma, en distintos momentos, a este grupo tan heterogéneo en el que, además de científicos, tenemos jugadores de pádel, fisioterapeutas, analistas de fútbol, nutricionistas, "chufísticos", incluso novios y padres. Gracias Araceli, Antonia, Julia (Ceuta), Laura (alta), Dani (Córdoba), Alba, Julia, Sergio, Juanma, Miguel Ángel, Aitana, Fátima, Dani (Málaga), Josua, Teresa, Antoñito, María Jesús, Laura Hidalgo, Patri, Álex, Fernando y padres, especialmente los de Laura, Agustín y Javi. Con ellos he pasado unos de los mejores años de mi vida. Pasé de no salir ni un fin de semana a salir todos. A destacar la combinación Chigrín-Mezquita 14, Alhendín, y la toma de un número considerable de litrillos, así como las casas rurales, Tesis, torneos de pádel, comidas de Navidad y fiestas con Estrella Galicia en lo de Darío y Germaine que, por cierto, hay que retomar. En realidad, podría escribir un par de páginas con todos estos momentos.

A mis compañeros de laboratorio, con los que siempre puedo contar y con los que he compartido tartas de cumpleaños, empanadas del Mercadona, torneos de pádel, lotería, porras de fútbol y pipetas, entre otras cosas. En definitiva, grandes momentos. Gracias María, Pilar, Elena, Laura Jiménez, Sara, César, Enrica, Inma, Juan, Víctor, Yaco y Celia. También a muchos de los que han pasado por el laboratorio y a los que aprecio y recuerdo con cariño. Gracias a Ramy, Marisol, Bota, Arailym, Aya, Armi, Erika, Inma, África, mi compi de pádel Andrés, etc. Al Prof. Bert Blaauw de la Universidad de Padua, por acogerme durante la estancia en su grupo de investigación y por seguir ofreciéndome oportunidades. También a Cici. A todos los amigos que hicimos en Padua, especialmente a Pepa, a la que considero una hermana menor.

A mis amigos y amigas del pueblo de María, los de toda la vida; y a los que conocí en el instituto, que ya son para toda la vida. Al PISO, donde siempre había que estar alerta y donde más he disfrutado. Gracias a los CELEBÉRRIMOS, a los que les deseo lo mejor entre semana y lo peor en el fin de semana; gracias a ellos he tardado más en finalizar la Tesis.

Por último, a mi familia. A mis padres y hermanos. Gracias por hacer posible esto. Sobre todo, a mi madre, con la que he hablado por teléfono tantas horas estos años como ratones he genotipado en esta Tesis. A mis abuelos, tíos y prima, a los que están y también a los que ya no están. También a mi segunda familia ahora, los padres de Paula, que me cuidan como si fuera su hijo, y ahora lo hacen con mis hermanos.

Sin olvidar a todo el que se me haya olvidado, gracias.

### ABREVIATURAS

A: banda anisotrópica	COX-2: ciclooxigenasa-2
AADC: L-aminoácido aromático	CSA: área de sección transversal
descarboxilasa	<b>DD:</b> oscuridad total
AANAT: arilalquilamina N-	DXA: densitometría ósea
acetiltransferasa	E: ejercicio
ACTA1: actina alfa 1 de músculo	e: endomisio
esquelético humana	ECL: quimioluminiscencia mejorada
ADN: ácido desoxirribonucleico	EELS: espectroscopía de pérdida de
AFMK: N1-acetil-N2-formil-5-metoxi-	energía de electrones
cinuramina	EWGSOP: Grupo de Trabajo Europeo
AMK: N1-acetil-5-metoxi-cinuramina	sobre Sarcopenia en Personas Mayores
aMT: melatonina o N-acetil-5-	F1/2: primera/segunda generación filial
metoxitriptamina	FDA: Administración de Alimentos y
ASMT: N-acetilserotonina O-	Medicamentos de los Estados Unidos
metiltransferasa	FI: índice de fragilidad
ATP: adenosín trifosfato	G6PD: glucosa-6-fosfato
AWGS: Grupo de Trabajo Asiático	deshidrogenasa
sobre Sarcopenia	GABA: ácido γ-aminobutírico
BC: capilar sanguíneo	GM: músculo gastrocnemio
<b>BSA:</b> albúmina sérica bovina	GPx: glutatión peroxidasa
CaMKII: proteína quinasa	GRd: glutatión reductasa
Ca <sup>2+</sup> /calmodulina II	GSH: glutatión reducido
CAT: catalasa	<b>GSK-3β:</b> glucógeno sintasa quinasa 3β
CK1E: caseína quinasa 1E	GSSH: glutatión oxidado
Col: colágeno	H: zona H

H&E: Hematoxilina y Eosina	MPTP: poro de transición de
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : peróxido de hidrógeno	permeabilidad mitocondrial
HPLC: cromatografía líquida de alta	MuSCs: células satélite
resolución	MyHC: cadena pesada de miosina
i.p.: intraperitoneal	NAD <sup>+</sup> : nicotinamida adenina
I: banda isotrópica	dinucleótido (en forma oxidada)
ICD-10: Clasificación Internacional de	NADH: nicotinamida adenina
Enfermedades-10	dinucleótido (en forma reducida)
<b>IFM:</b> intermiofibrilar	NADPH: nicotinamida adenina
IgG/M: inmunoglobulina G/M	dinucleótido fosfato (en forma reducida)
<b>IL-1<math>\beta/6</math>:</b> interleuquina-1 $\beta/6$	NAMPT: nicotinamida
<b>INF-</b> γ: interferón-γ	fosforribosiltransferasa
iNOS: óxido nítrico sintasa	Ne: fibra nerviosa
ipRGC: células ganglionares	<b>NF-<math>\kappa</math>B:</b> factor nuclear $\kappa$ B
intrínsecamente fotosensibles	NO: óxido nítrico
<b>ΙκΒ:</b> inhibidor de κΒ	NQO2: quinona oxidoreductasa 2
LD: 12 horas de luz/12 horas de	NSQ: núcleos supraquiasmáticos
oscuridad	O <sub>2</sub> <sup></sup> : radical superóxido
LOO: radical peroxilo	<b>OH</b> : radical hidroxilo
MAPK: proteína quinasa activada por	<b>ONOO</b> <sup>-</sup> : peroxinitrito
mitógenos	<b>OXPHOS:</b> fosforilación oxidativa
MER: receptor del estrógeno mutado	P: perimisio
MF: fibra muscular	P4ha1: subunidad alfa 1 de la prolil 4-
Mf: miofibrilla	hidroxilasa
	PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la	SIDA: síndrome de inmunodeficiencia
polimerasa	adquirida
<b>PVDF:</b> fluoruro de polivinilideno	SIRT1/3: sirtuina 1/3
<b>RNS:</b> especies reactivas del nitrógeno	SOD: superóxido dismutasa
RORs: receptores huérfanos	SPF: libre de patógenos específicos
relacionados con retinoides	TEM: microscopía electrónica de
ROS: especies reactivas del oxígeno	transmisión
S: sarcómero	TMX: tamoxifeno
SD: desviación estándar	<b>TNF-</b> $\alpha$ : factor de necrosis tumoral- $\alpha$
SDH: succinato deshidrogenasa	TPH: triptófano hidroxilasa
SDS-PAGE: electroforesis en gel de	VG: Van Gieson
poliacrilamida con dodecilsulfato	VIH: virus de la inmunodeficiencia
sódico	humana
SEM: error estándar de la media	Z: línea Z
	γ-GCS: γ-glutamilcisteína sintasa

"Que la Fuerza te acompañe."

### **Obi-Wan Kenobi (Star Wars)**

A mi madre, padre y hermanos.

A Paula.

## RESUMEN
El envejecimiento implica una declinación gradual en la funcionalidad de los organismos a lo largo del tiempo, lo cual incrementa el riesgo de padecer enfermedades importantes. La sarcopenia, que se caracteriza por la pérdida de masa y función muscular, constituye una enfermedad grave en personas mayores, y está asociada con caídas, deterioro funcional, fragilidad y un mayor riesgo de mortalidad. Aunque los mecanismos subyacentes a la sarcopenia no están completamente claros, se ha sugerido que implican procesos más allá de la pérdida de masa y atrofia muscular. Estudios indican que otros factores como la inflamación crónica, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la apoptosis, así como cambios hormonales y microvasculares, contribuyen a este deterioro funcional del músculo esquelético envejecido.

Cada vez hay más evidencias que respaldan la relación entre cronodisrupción y envejecimiento, lo que puede llevar a las deficiencias que resultan en sarcopenia. Los genes y proteínas reloj también se expresan en el músculo esquelético, donde BMAL1, una proteína reloj que conecta este mecanismo con el sistema inmunitario, desempeña un papel crucial en la salud del músculo esquelético, participando en la regulación y reparación muscular, y mejorando el funcionamiento de las mitocondrias en este tejido. Debido a que la expresión de *Bmal1* disminuye con la edad, la cronodisrupción en el reloj periférico del músculo podría estar relacionada con la sarcopenia. No obstante, no existen datos que identifiquen una relación causal entre la reducción de la expresión de *Bmal1* en

El ejercicio de resistencia y una dieta adecuada son las principales estrategias en el tratamiento de la sarcopenia. Sin embargo, estos métodos pueden no ser suficientes para prevenir o revertir la sarcopenia, especialmente para contrarrestar los numerosos mecanismos fisiopatológicos que conducen a esta enfermedad. Actualmente, no se

#### José Fernández Martínez

dispone de fármacos específicamente aprobados para la sarcopenia, aunque se han sugerido varios con resultados y efectos secundarios diversos. En este sentido, la melatonina, también conocida como N-acetil-5-metoxitriptamina (aMT), se postula como un excelente candidato para el tratamiento de la sarcopenia debido a sus propiedades. Esta hormona es producida por la glándula pineal y se genera también en tejidos extrapineales, incluido el músculo esquelético. Además de sus funciones cronobióticas, que dependen de su producción rítmica en la glándula pineal, la melatonina posee importantes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, al mismo tiempo que estimula la formación de ATP en las mitocondrias. Estos beneficios de la melatonina han sido demostrados en múltiples condiciones experimentales, incluyendo situaciones de inflamación aguda y crónica, envejecimiento y sarcopenia.

Por tanto, el objetivo de este trabajo fue demostrar la relación causal entre cronodisrupción (en particular el déficit de *Bmal1* con la edad), inflamación, disfunción mitocondrial y pérdida muscular durante el envejecimiento en el modelo de ratón *knockout* para *Bmal1* inducible y específico de músculo esquelético (iMS-*Bmal1*-/-). Además, se investigó si la melatonina, con sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y cronobióticas, en combinación con el ejercicio, podía contrarrestar la sarcopenia, y si esto requería la presencia de *Bmal1* en el músculo esquelético.

Para este estudio, se utilizaron ratones machos y hembras iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup>, así como sus controles (iMS-*Bmal1*<sup>flox/flox</sup>), los cuales se generaron en nuestro laboratorio. Estos animales se sometieron a diferentes tratamientos, incluyendo ejercicio y/o administración de melatonina. Se analizó el ritmo circadiano de la actividad locomotora de estos ratones mediante el programa de recopilación y análisis de datos de comportamiento circadiano ClockLab. Además, se llevaron a cabo pruebas de campo abierto y en cinta de correr

(*treadmill*) para evaluar la actividad locomotora espontánea, resistencia y fatiga de los animales. Estos datos, junto con las mediciones del peso corporal y del músculo gastrocnemio (GM), se utilizaron para calcular el índice de fragilidad (FI). También se llevaron a cabo análisis histológicos y de microscopía electrónica en el GM de estos ratones. Se realizaron las tinciones de Hematoxilina y Eosina (H&E) para un examen histológico general, tinción de Van Gieson (VG) para diferenciar el tejido conectivo y las fibras musculares, y tinción de succinato deshidrogenasa (SDH) para la detección de la capacidad oxidativa mitocondrial de las fibras musculares. Además, se estudió el perfil de tipo de fibra mediante inmunofluorescencia. Por último, se realizaron análisis morfométricos y cuantitativos sobre las imágenes obtenidas de microscopía óptica y electrónica.

Los resultados de este trabajo demostraron que la pérdida de *Bmal1* en el músculo esquelético de ratones iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup> machos y hembras conduce a una disminución de la condición física y masa muscular en ambos sexos, junto con un aumento en el índice de fragilidad que define un estado de sarcopenia. Estos cambios están vinculados a la reducción del tamaño de las fibras musculares y al aumento de la infiltración de colágeno, sugiriendo la presencia de atrofia y fibrosis, características clave de la sarcopenia. Además, la inactivación de *Bmal1* en el músculo esquelético induce una cronodisrupción que se manifiesta en una disminución de la actividad locomotora, especialmente durante la noche, afectando tanto a ratones machos como hembras. Este fenómeno también provoca un adelanto de fase, particularmente notable en las hembras, indicando una influencia significativa en el ritmo circadiano y sugiriendo posibles diferencias entre los sexos. Además, la pérdida de *Bmal1* en el músculo esquelético ocasiona un cambio hacia fibras musculares más oxidativas en machos, sin afectar a las hembras. A pesar de este cambio, se observa una disminución en la capacidad oxidativa mitocondrial, sugiriendo

una posible adaptación compensatoria ante la reducción de la función mitocondrial. La falta de *Bmal1* en el músculo esquelético en ratones de ambos sexos también conlleva un deterioro en la ultraestructura del músculo gastrocnemio, evidenciando un aumento en el daño mitocondrial y una reducción en el número de mitocondrias, factores subyacentes en el desarrollo de la sarcopenia. La melatonina y el ejercicio mitigaron los efectos adversos de la pérdida de *Bmal1* en ratones mutantes de ambos sexos, con la excepción del daño mitocondrial, el cual se agravó como resultado del ejercicio excesivo.

Estos hallazgos respaldan la importancia de *Bmal1* en la salud musculoesquelética y establecen el ratón iMS-*Bmal1*-/- como un modelo valioso para estudiar la sarcopenia. Además, el ejercicio y la melatonina demuestran ser herramientas terapéuticas efectivas para contrarrestar la sarcopenia, independientemente de la presencia de *Bmal1* en el músculo esquelético, destacando la relevancia de los genes reloj como posibles dianas terapéuticas en enfermedades asociadas al envejecimiento.

### SUMMARY

Aging involves a gradual decline in organism functionality over time, increasing the risk of major diseases. Sarcopenia, characterized by muscle loss and dysfunction, is a serious condition in older individuals, linked to falls, functional decline, frailty, and higher mortality risk. While the underlying mechanisms of sarcopenia are not entirely clear, it has been suggested that they involve processes beyond the loss of muscle mass and atrophy. Studies indicate that other factors such as chronic inflammation, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and apoptosis, as well as hormonal and microvascular changes, contribute to this functional deterioration of aged skeletal muscle.

There is growing evidence supporting the relationship between circadian disruption and aging, which may lead to deficits culminating in sarcopenia. Clock genes and proteins are also expressed in skeletal muscle, where BMAL1, a clock protein connecting this mechanism with the immune system, plays a crucial role in muscle health, participating in regulation, repair, and enhancing mitochondrial function in this tissue. Because *Bmal1* expression decreases with age, peripheral muscle clock disruption may be related to sarcopenia. However, there is no data identifying a causal relationship between reduced *Bmal1* expression in aging skeletal muscle and the deficits that lead to sarcopenia.

Resistance exercise and a proper diet are key strategies in treating sarcopenia. However, these methods may not be sufficient to prevent or reverse sarcopenia, especially in countering the numerous pathophysiological mechanisms leading to this condition. Currently, there are no specific drugs approved for sarcopenia, although several have been suggested with varied results and side effects. In this regard, melatonin, also known as Nacetyl-5-methoxytryptamine (aMT), is proposed as an excellent candidate for sarcopenia treatment due to its properties. This hormone is produced by the pineal gland and is also generated in extrapineal tissues, including skeletal muscle. In addition to its chronobiotic functions, dependent on pineal gland production, melatonin possesses significant antioxidant and anti-inflammatory properties, while also ATP formation in mitochondria. These benefits of melatonin have been demonstrated in multiple experimental conditions, including acute and chronic inflammation, aging, and sarcopenia.

The aim of this study was, then, to demonstrate the causal relationship between circadian disruption (specifically *Bmal1* deficiency with age), inflammation, mitochondrial dysfunction, and muscle loss during aging in the inducible skeletal muscle-specific *Bmal1* knockout mouse model (iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup>). Additionally, we investigated whether melatonin, with its anti-inflammatory, antioxidant, and chronobiotic properties, in combination with exercise, could counteract sarcopenia, and whether this required the presence of *Bmal1* in skeletal muscle.

To conduct this study, male and female iMS-*Bmal1*--- mice, as well as their controls (iMS-*Bmal1*<sup>flox/flox</sup>), previously generated in our laboratory, were used. These animals underwent different treatments, including exercise and/or melatonin administration. The circadian rhythm of locomotor activity of these mice was analyzed using the ClockLab program for circadian behavior data collection and analysis. In addition, open field and treadmill tests were performed to evaluate spontaneous locomotor activity, endurance, and fatigue of the animals. These data, along with measurements of body weight and gastrocnemius muscle (GM), were used to calculate the frailty index (FI). Histological and electron microscopy analyses were also carried out on the GM of these mice. Hematoxylin and Eosin (H&E) staining was performed for a general histological examination, Van Gieson (VG) staining to differentiate connective tissue and muscle fibers, and succinate dehydrogenase (SDH) staining for the detection of mitochondrial oxidative capacity in muscle fibers. Additionally, fiber type profile was

studied through immunofluorescence. Finally, various morphometric and quantitative analyses were performed on the images obtained from optical and electron microscopy.

The results of this study demonstrated that the loss of *Bmal1* in the skeletal muscle of iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup> male and female mice leads to a decrease in physical fitness and muscle mass in both sexes, along with an increase in the frailty index defining a state of sarcopenia. These changes are linked to a reduction in the size of muscle fibers and an increase in collagen infiltration, suggesting the presence of atrophy and fibrosis, key characteristics of sarcopenia. Additionally, the inactivation of *Bmal1* in skeletal muscle induces chronodisruption manifested by a decrease in locomotor activity, especially during the night, affecting both male and female mice. This phenomenon also causes a phase advance, particularly noticeable in females, indicating a significant influence on the circadian rhythm and suggesting possible sex differences. Furthermore, the loss of *Bmal1* in skeletal muscle results in a shift towards more oxidative muscle fibers in males, without affecting females. Despite this shift, a decrease in mitochondrial oxidative capacity is observed, suggesting a possible compensatory adaptation to the reduction in mitochondrial function. The absence of *Bmal1* in the skeletal muscle in mice of both sexes also leads to deterioration in the ultrastructure of the gastrocnemius muscle, indicating an increase in mitochondrial damage and a reduction in the number of mitochondria, underlying factors in the development of sarcopenia. Melatonin and exercise mitigated the adverse effects of *Bmal1* loss in mutant mice of both sexes, with the exception of mitochondrial damage, which was exacerbated as a result of excessive exercise.

These findings support the importance of *Bmal1* in musculoskeletal health and establish the iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup> mouse as a valuable model for studying sarcopenia. Additionally, exercise and melatonin prove to be effective therapeutic tools to counteract

sarcopenia, regardless of the presence of *Bmal1* in skeletal muscle, highlighting the relevance of clock genes as potential therapeutic targets in age-associated diseases.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Sarcopenia: pérdida de masa y función muscular asociada al	
envejecimiento	3
1.1 Envejecimiento	3
1.2 Sarcopenia	7
1.2.1 Definición	7
1.2.2 Etiología, sintomatología y diagnóstico	8
1.2.3 Fisiopatología	11
1.2.4 Conexión entre inflamación, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y apo	ptosis
en el envejecimiento 1.2.5 Tratamiento	13
2. Papel de los genes reloj en el músculo esquelético	17
2.1 Organización del sistema circadiano	17
2.2 Conexión entre genes reloj e inflamación en el envejecimiento	20
2.3 Genes reloj en el músculo esquelético	24
3. Melatonina como enfoque terapéutico en la sarcopenia	27
3.1 Melatonina	27
3.1.1 Síntesis y metabolismo	27
3.1.2 Dianas de la melatonina	29
3.1.3 Acciones de la melatonina pineal y extrapineal	31
3.2 Antecedentes	30
HIPÓTESIS V OBIETIVOS	30
1 1 Hinótesis	•• JJ
1.1 mpowsis 1.2 Objetivos	41
1.2 Objetivos immenial	42
1.2.2 Objetivos específicos	42
	40
MATERIALES Y METODOS	43
1. Animales, tratamientos y diseño experimental	45
1.1 Generación del modelo de ratón <i>knockout</i> para <i>Bmal1</i> inducible y específico de músculo esquelético	45
1 2 Análisis de la especificidad de recombinación	48
1.3 Tratamientos	50
1.4 Justificación del diseño experimental	52
2. Análisis del ritmo circadiano de la actividad locomotora	54
3. Análisis de la actividad física	54
3.1 Evaluación de la actividad locomotora espontánea, resistencia y fatiga	54
3.2 Cálculo del índice de fragilidad	55
4. Análisis histológicos y de microscopía electrónica	56
4.1 Preparación del tejido	56
4.2 Histología e histoquímica del músculo esquelético	57
4.3 Inmunofluorescencia para la identificación del tipo de fibra	57
4.5 Análisis de microscopía electrónica de transmisión	59
	<b>7</b> 0

5. Análisis estadístico ...... 60

RESULTADOS
1. Inactivación de <i>Bmal1</i> por tamoxifeno en ratones iMS- <i>Bmal1<sup>-/-</sup></i> 65
2. La falta de <i>Bmal1</i> en el músculo esquelético induce un avance de fase en la actividad locomotora de los ratones, con el ejercicio y principalmente la melatonina previniendo la pérdida de ritmo 67
3. La falta de <i>Bmal1</i> en el músculo esquelético conduce a una disminución en la actividad física en ratones que se correlaciona con un aumento en el índice de fragilidad, normalizándose con los tratamientos de melatonina y ejercicio70
4. La falta de <i>Bmal1</i> en el músculo esquelético induce una reducción en la actividad de la SDH y cambios en los tipos de fibras del GM, los cuales se normalizaron después de las intervenciones con melatonina y ejercicio
5. La falta de <i>Bmal1</i> en el músculo esquelético revela cambios histológicos y morfométricos en el GM, que son contrarrestados por la melatonina y el ejercicio75
6. La falta de <i>Bmal1</i> en el músculo esquelético provoca alteraciones ultraestructurales en las mitocondrias intermiofibrilares del GM, que son revertidas con el tratamiento de melatonina, pero no con el ejercicio
DISCUSIÓN 83
CONCLUSIONES
CONCLUSIONS 97
BIBLIOGRAFÍA 101
ANEXO 125

## INTRODUCCIÓN

# 1. Sarcopenia: pérdida de masa y función muscular asociada al envejecimiento

#### 1.1. Envejecimiento

El envejecimiento puede definirse de manera amplia como el declive funcional dependiente del tiempo que afecta a la mayoría de los organismos vivos, y se caracteriza por una pérdida progresiva de la integridad fisiológica, lo que conduce a una función deteriorada y una mayor vulnerabilidad a la muerte. Este deterioro es el principal factor de riesgo para el desarrollo de patologías humanas importantes, incluyendo cáncer, diabetes, trastornos cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y sarcopenia, entre otras. Por suerte, la investigación sobre el envejecimiento ha experimentado un avance sin precedentes en los últimos años, especialmente con el descubrimiento de que la velocidad de envejecimiento está controlada, al menos en cierta medida, por vías genéticas y procesos bioquímicos conservados durante la evolución (López-Otín et al., 2013). En una revisión de 2023, basada en numerosos estudios sobre envejecimiento realizados en diversos organismos de experimentación, incluidos roedores y humanos, estos mismos autores establecieron que el envejecimiento está impulsado por una serie de características distintivas que cumplen con las siguientes tres premisas: (1) su manifestación asociada a la edad, (2) la aceleración del envejecimiento al acentuarlas experimentalmente, y (3) la oportunidad de desacelerar, detener o revertir el envejecimiento mediante intervenciones terapéuticas en ellas. Estos investigadores propusieron las siguientes doce características distintivas del envejecimiento: inestabilidad genómica, acortamiento de los telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de proteostasis, macroautofagia disfuncional, detección de nutrientes desregulada,

disfunción mitocondrial, senescencia celular, agotamiento de células madre, comunicación intercelular alterada, inflamación crónica y disbiosis, todas ellas interconectadas entre sí y agrupadas en tres categorías principales (primarias, antagonistas e integrativas). Las características distintivas primarias se consideran causas principales de daño celular. Las antagonistas forman parte de las respuestas compensatorias al daño. Estas respuestas inicialmente disminuyen el daño, pero eventualmente, si son crónicas o exacerbadas, se vuelven perjudiciales por sí mismas. Las características integrativas son el resultado de las dos anteriores y son responsables del deterioro funcional asociado con el envejecimiento (Figura 1) (López-Otín et al., 2023).



**Figura 1. Características distintivas del envejecimiento.** El esquema recopila las 12 características distintivas del envejecimiento propuestas: inestabilidad genómica, acortamiento de los telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de proteostasis, macroautofagia disfuncional, detección de nutrientes desregulada, disfunción mitocondrial, senescencia celular, agotamiento

de células madre, comunicación intercelular alterada, inflamación crónica y disbiosis. Estas características distintivas se agrupan en tres categorías: primarias, antagonistas e integrativas. (López-Otín et al., 2023).

Claramente, el envejecimiento se está convirtiendo en una de las principales preocupaciones de la humanidad. Cada país del mundo está experimentando un crecimiento tanto en el número como en el porcentaje de personas mayores en la población. Se proyecta que entre 2022 y 2050, la proporción de la población mundial de 65 años o más aumentará del 10% al 16% (Figura 2 y Tabla 1). Para 2050, el número de personas de 65 años o más será más del doble que el número de niños menores de 5 años y aproximadamente igual que el número de niños menores de 12 años.



**Figura 2.** Proyección de la población global por grupos de edad, entre 1950 y 2100. (United Nations, DESA, Population Division. World Population Prospects 2022. http://population.un.org/wpp/).

Asimismo, en 2022, Europa y América del Norte tenían la mayor proporción de población mayor de 65 años, con casi el 19%, seguido de Australia y Nueva Zelanda

(16,6%). Ambas regiones continúan envejeciendo aún más. Las proyecciones indican que para 2050, uno de cada cuatro habitantes en Europa y América del Norte podría tener 65 años o más (Tabla 1) (United Nations, DESA, Population Division. World Population Prospects 2022. <u>http://population.un.org/wpp/</u>).

Tabla 1. Porcentaje de población de personas de 65 años o más en el mundo, agrupado por regiones, proyectado para 2022, 2030 y 2050. (United Nations, DESA, Population Division. World Population Prospects 2022. <u>http://population.un.org/wpp/</u>).

Region	2022	2030	2050
World	9.7	11.7	16.4
Sub-Saharan Africa	3.0	3.3	4.7
Northern Africa and Western Asia	5.5	7.0	12.5
Central and Southern Asia	6.4	8.1	13.4
Eastern and South-Eastern Asia	12.7	16.3	25.7
Latin America and the Caribbean	9.1	11.5	18.8
Australia/New Zealand	16.6	19.4	23.7
Oceania*	3.9	5.1	8.2
Europe and Northern America	18.7	22.0	26.9
Least developed countries	3.6	4.1	6.1
Landlocked developing countries (LLDC)	3.6	4.1	5.8
Small island developing States (SIDS)	8.9	11.3	16.0

\*excluding Australia and New Zealand

Este cambio demográfico, como consecuencia directa de una menor mortalidad y un aumento en la supervivencia a edades avanzadas, junto con una disminución sostenida en el nivel de fertilidad, va acompañado de otra transición, la transición epidemiológica, caracterizada por cambios en las enfermedades predominantes (Angulo et al., 2016). Como consecuencia, la prevención de la discapacidad y la preservación de la salud y la independencia en las personas mayores es ahora uno de los principales objetivos de la atención médica. En este contexto, la sarcopenia es un problema especialmente grave a medida que las personas viven más tiempo, donde la deficiencia muscular esquelética provoca pérdida de funcionalidad y fragilidad, empeorando la calidad de vida de las personas que la sufren.

#### 1.2. Sarcopenia

#### 1.2.1. Definición

Sarcopenia es un término derivado del griego  $\sigma \alpha \rho \zeta$  (sarx, que significa "carne") y  $\pi \epsilon v i \alpha$  (penia, que significa "pobreza" o "escasez"). Fue descrito por primera vez en la década de 1980 como una disminución relacionada con la edad en la masa muscular del cuerpo que afecta la movilidad, el estado nutricional y la independencia (Rosenberg, 1997). La definición ha evolucionado desde entonces, marcada por dos hitos recientes: la inclusión de la función muscular (definida por la fuerza muscular, la potencia muscular y el rendimiento físico) en el concepto, al demostrarse que esta es un predictor clínicamente más poderoso que la masa muscular por sí sola; y el reconocimiento de la sarcopenia como una condición independiente con un código de la Clasificación Internacional de Enfermedades-10 (ICD-10) (Anker et al., 2016; Cruz-Jentoft & Sayer, 2019). Sin embargo, la mayoría de los clínicos aún no están al tanto de esta condición y de las herramientas diagnósticas necesarias para identificarla.

En la actualidad, la definición más citada para la sarcopenia fue propuesta por el Grupo de Trabajo Europeo sobre Sarcopenia en Personas Mayores (EWGSOP), respaldada por el Grupo de Trabajo Asiático sobre Sarcopenia (AWGS), y actualizada como EWGSOP2 en enero de 2019. En ella, se define la sarcopenia como un trastorno progresivo y generalizado del músculo esquelético que implica la pérdida acelerada de masa y función muscular, asociada con un aumento de resultados adversos como caídas, declive funcional, fragilidad y mortalidad (Cruz-Jentoft et al., 2019).

#### 1.2.2. Etiología, sintomatología y diagnóstico

La sarcopenia es un fenómeno universal con una etiología compleja y multifactorial. Ocurre comúnmente como un proceso relacionado con la edad en personas mayores, aunque también puede ocurrir en la mediana edad en asociación con una variedad de condiciones. Entre los factores involucrados en la sarcopenia se incluyen el envejecimiento, como causa principal, pero también factores genéticos, la inactividad o estilo de vida sedentario, causas nutricionales (baja ingesta de proteínas y energía, deficiencia de vitamina D, ...), enfermedades óseas y articulares, trastornos cardiorrespiratorios, cambios hormonales (disminución en los niveles de testosterona y hormona del crecimiento), diabetes, trastornos neurológicos, cáncer, trastornos hepáticos y renales y factores iatrogénicos (ingreso hospitalario, efectos secundarios relacionados con drogas o medicamentos) (Cruz-Jentoft & Sayer, 2019; Fielding et al., 2011).

En la práctica clínica, se establece que una persona con baja fuerza muscular y baja masa o calidad muscular debe ser diagnosticada con sarcopenia. La condición puede entenderse mejor como un fallo o insuficiencia del músculo esquelético (Cruz-Jentoft, 2016). Como tal, la sarcopenia puede manifestarse agudamente (generalmente en el contexto de una enfermedad aguda o inmovilidad repentina, como durante una hospitalización) o tener un curso más prolongado (crónico). La masa y fuerza muscular (junto con la densidad mineral ósea) alcanzan su punto máximo durante la edad adulta joven y, después de un período de estabilidad, comienzan a disminuir gradualmente con la edad, con una declinación más rápida en la fuerza (Figura 3) (Cruz-Jentoft & Sayer, 2019; Ferrucci et al., 2012). Sin embargo, la mayoría de los casos de sarcopenia no se diagnostican, solo cuando se informa de síntomas relevantes. Estos síntomas podrían incluir caídas, debilidad, lentitud, pérdida de masa muscular autonotificada o dificultades para realizar actividades diarias. La detección de casos es especialmente relevante en

entornos de atención donde se podría esperar una mayor prevalencia de sarcopenia, como en ingresos temporales a hospitales, entornos de rehabilitación o residencias de ancianos (Morley et al., 2011).



**Figura 3. Porcentaje de pérdida de masa y fuerza muscular con la edad en hombres.** (Cruz-Jentoft & Sayer, 2019).

De hecho, la detección de la sarcopenia no es tan sencilla. En algunas ocasiones, se puede asociar la sarcopenia con la delgadez y no estar al tanto de que también puede estar presente en la obesidad, lo que conduce a un aumento de la discapacidad y la mortalidad. La obesidad sarcopénica suele identificarse cuando una persona presenta tanto baja masa muscular como aumento de la adiposidad, pero podría pasar desapercibida cuando el enfoque de atención se centra en la obesidad, lo que conduce a resultados adversos (Scott et al., 2014). La sarcopenia también puede confundirse con otras condiciones como la desnutrición o la caquexia (pérdida de peso severa y pérdida de masa muscular asociada con el cáncer, el VIH y el SIDA o fallo orgánico en etapa terminal), si bien es cierto que puede coexistir con ambas. En todas ellas existe una reducción de peso y masa muscular, pero solo la sarcopenia implica una reducción de la

fuerza muscular con función muscular deteriorada. La sarcopenia también está estrechamente relacionada con la fragilidad física, siendo descrita como el sustrato biológico del fenotipo de fragilidad, el cual implica pérdida de peso involuntaria, agotamiento autoinformado, debilidad (baja fuerza de agarre), velocidad de la marcha lenta y baja actividad física (Jeejeebhoy, 2012; Thomas, 2007). Como estamos viendo, la sarcopenia puede ocurrir en asociación con una variedad de condiciones crónicas en la mediana edad, presentando la mayoría de los pacientes más de una condición asociada.

En la actualidad, las herramientas de detección de sarcopenia no son precisas y aún no se ha demostrado su impacto en los resultados. El diagnóstico actual se basa en el uso del SARC-F, un instrumento de detección que consta de cinco preguntas que abordan la fuerza, la necesidad de asistencia para caminar, levantarse de una silla, subir escaleras y caídas y, posteriormente, la medición de una combinación de fuerza muscular, masa muscular y rendimiento físico, evaluados en ese orden, de acuerdo a los valores de referencia usados para el diagnóstico de sarcopenia según la EWGSOP2 (Cruz-Jentoft et al., 2019; Cruz-Jentoft & Sayer, 2019). La fuerza muscular se mide mediante una prueba de fuerza de agarre (Roberts et al., 2011) y el rendimiento físico mediante distintas pruebas de movilidad (Cruz-Jentoft & Sayer, 2019). La medición de la masa muscular en humanos es más compleja, ya que la mayoría de los métodos disponibles requieren suposiciones que pueden no siempre ser válidas y con grados variables de precisión y dificultad. La medición más directa disponible actualmente es la medida de creatinina en orina durante períodos de 24 horas. Otras medidas indirectas incluyen la antropometría, impedancia bioeléctrica, exploración de densidad ósea (DXA), técnicas de imagen (como la tomografía computarizada y resonancia magnética), ultrasonido, análisis del potasio corporal total y activación de neutrones (Fielding et al., 2011). Los biomarcadores sanguíneos de la sarcopenia aún no están disponibles en la práctica clínica.

La investigación en esta área ha resultado compleja por varias razones, incluyendo diferentes opiniones sobre la definición de la sarcopenia, el reconocimiento creciente de la sarcopenia aguda y crónica, la existencia de muchas vías interactivas involucradas en la fisiopatología, y el efecto de condiciones relacionadas (incluyendo aquellas que podrían imitar los síntomas de la sarcopenia y otras condiciones presentes en el paciente que afectan la sarcopenia).

#### 1.2.3. Fisiopatología

Aunque comportamientos como la inactividad física o la mala nutrición son conocidos por contribuir a la pérdida de masa y función muscular relacionada con la edad, no son la única explicación de esta patología (Buford et al., 2010). De hecho, se ha reportado la pérdida de masa y función muscular en atletas veteranos que siguen una buena alimentación (Brisswalter & Nosaka, 2013; Grassi et al., 1991; Pearson et al., 2002), lo que sugiere que otros factores influyen en esta condición debilitante. Actualmente, los mecanismos específicos que subyacen a la sarcopenia no están claros, aunque se han propuesto algunos procesos implicados en esta patología.

El envejecimiento perturba la homeostasis del músculo esquelético, resultando en un desequilibrio de las proteínas musculares, lo que conduce a una pérdida general de masa muscular esquelética, además de la pérdida de otros componentes críticos de los miocitos (orgánulos, contenido citoplasmático). Esto se traduce en una disminución tanto en el tamaño como en el número de fibras musculares (Angulo et al., 2016; Buford et al., 2010). Desde los 20 hasta los 80 años de edad, hay aproximadamente una reducción del 30% en la masa muscular y una disminución del área transversal de alrededor del 20% (Frontera et al., 2000). Esto es especialmente significativo en las extremidades inferiores, afectando significativamente la movilidad (Angulo et al., 2016). El músculo esquelético

de la mayoría de las especies de mamíferos, incluidos rata y ratón, está compuesto de cuatro tipos de poblaciones de fibras: lentas tipo 1 (oxidativas), rápidas tipo 2A (oxidativas), rápidas tipo 2B (glucolíticas) y rápidas tipo 2X (glucolíticas). Sin embargo, solo las fibras tipo 1, 2A y 2X están presentes en los músculos humanos. Tanto en humanos como en otras especies de mamíferos encontramos también fibras híbridas, formadas por distintas combinaciones entre los distintos tipos de fibras (Ciciliot et al., 2013; Murgia et al., 2021). Durante el envejecimiento, ocurren cambios morfológicos en las fibras musculares, como un aumento en la variabilidad del tamaño de las fibras, acumulación de fibras no agrupadas, dispersas y anguladas, núcleos situados en posición central, expansión del espacio extracelular y deposición de agregados de proteínas dentro de la matriz intersticial. Estos cambios morfológicos ocurren junto con una mayor infiltración de tejido no contráctil, como tejido adiposo (miosteatosis) o tejido conectivo (fibrosis). Los cambios en el músculo sarcopénico afectan especialmente a las fibras de tipo 2, que son especialmente importantes en actividades que implican fuerza y/o potencia. Con la edad, se produce una transición de las fibras musculares del tipo 2 al tipo 1, junto con una disminución en el número de células satélite (MuSCs) y de su capacidad proliferativa y regenerativa, especialmente en fibras de tipo 2, aumento de fibras híbridas y pérdida de neuronas motoras (Angulo et al., 2016; Buford et al., 2010; Cruz-Jentoft & Saver, 2019; Fielding et al., 2011; Hastings et al., 2020). Estos cambios contribuyen a las disminuciones en la capacidad funcional del músculo que a su vez contribuyen a la discapacidad funcional. No obstante, varios estudios informaron que la pérdida de masa muscular no puede ser la única explicación de la pérdida de fuerza muscular y función física en los adultos mayores (Angulo et al., 2016). Así, en este deterioro funcional tienen lugar varios mecanismos asociados al envejecimiento, entre ellos inflamación dependiente de la edad, estrés oxidativo, pérdida de la capacidad respiratoria mitocondrial y apoptosis, así como cambios en hormonas (principalmente hormonas sexuales y tiroideas) y factores de crecimiento y cambios microvasculares (Angulo et al., 2016; Buford et al., 2010; Cruz-Jentoft & Sayer, 2019).

## **1.2.4.** Conexión entre inflamación, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y apoptosis en el envejecimiento

El envejecimiento normal está acompañado de una inflamación crónica de bajo grado, denominada "inflammaging" (Franceschi & Campisi, 2014), que va acompañada de estrés oxidativo y deterioro mitocondrial, y está directamente relacionada con la condición de fragilidad y la sarcopenia (Ferrucci & Fabbri, 2018). Durante el envejecimiento, hay un aumento en la activación de la vía de inflamación del factor nuclear KB (NF-KB) promovida, entre otros factores, por el aumento del estrés oxidativo, ya sea por una mayor producción de radicales libres (especies reactivas del nitrógeno (RNS) y principalmente del oxígeno (ROS)), o una capacidad reducida de la defensa antioxidante, o ambos (Acuña-Castroviejo et al., 2017; Viña et al., 2016). Aunque se propuso el término "mitohormesis" para mostrar que el aumento de ROS puede causar un leve estrés oxidativo que a su vez promueve las defensas mitocondriales, esto solo ocurre ante un bajo grado de ROS (Ristow & Zarse, 2010). El papel de los radicales libres en el envejecimiento es un proceso mucho más complejo. Los radicales libres aumentan con la edad e inducen la activación de NF-κB y su traslocación al núcleo, donde controla la expresión de cerca de 200 genes, incluidos múltiples genes que dan lugar a proteínas inflamatorias y citoquinas proinflamatorias, incluyendo la pro-interleuquina-1ß (pro-IL-1β). Esta situación crea un ambiente prooxidante que puede dañar las mitocondrias a tal grado que provoque una sobreproducción de radicales libres. Este estrés oxidativo mitocondrial, a su vez, provoca la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP), liberando radicales libres y ADN mitocondrial al citosol. Estas moléculas desencadenan la activación del inflamasoma NLRP3 que a su vez activa una pro-caspasa-1 induciendo la maduración de la IL-1 $\beta$  y otras citoquinas proinflamatorias dependientes de NF- $\kappa$ B (Acuña-Castroviejo et al., 2017; Garcia et al., 2015; Nakahira et al., 2011). Entre otras cosas, la IL-1 $\beta$  activa aún más la respuesta de NF- $\kappa$ B, cerrando el ciclo vicioso y potenciando aún más la respuesta inflamatoria. Se ha demostrado que NF- $\kappa$ B también puede actuar como un factor protector contra la activación excesiva del inflamasoma NLRP3, al eliminar su principal fuente de activación, es decir, las mitocondrias induciendo la mitofagia (Zhong et al., 2016), aunque es probable que este mecanismo no funcione correctamente durante el envejecimiento. Además, varios estudios apuntan que durante el envejecimiento se produce una activación intensificada de la apoptosis, ya que la mitocondria se considera el principal sitio para la integración de señales apoptóticas y puede inducir la apoptosis a través de múltiples vías, y su función está deteriorada con la edad (Figura 4) (Buford et al., 2010; Marzetti et al., 2012).



FRAILTY AND SARCOPENIA

**Figura 4. Envejecimiento, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y apoptosis: factores entrelazados que contribuyen a la fragilidad y la sarcopenia.** La inflamación crónica de bajo grado, conocida como "*inflammaging*", acompaña al envejecimiento y se caracteriza por un aumento del estrés oxidativo, daño mitocondrial y apoptosis. Durante el envejecimiento, los niveles elevados de radicales libres activan la vía NF-κB, liberando citoquinas proinflamatorias que dañan aún más las mitocondrias y activan NLRP3, intensificando la inflamación. Estos procesos tienen lugar en varios tejidos, incluido el músculo esquelético, lo que explica la pérdida de masa muscular y la fragilidad asociadas con la edad. (Fernández-Martínez et al., 2023, artículo en revisión).

Los mecanismos moleculares descritos anteriormente se incrementan de manera exponencial con el envejecimiento en diversos órganos y tejidos, incluido el músculo esquelético (Ferrucci & Fabbri, 2018). Por lo tanto, en este tejido en particular, estos procesos podrían dar cuenta de la pérdida de fibras musculares y de la función muscular, así como del desarrollo de sarcopenia y fragilidad asociadas a la edad.

#### 1.2.5. Tratamiento

Las opciones para el tratamiento de la sarcopenia se basan en una comprensión de la fisiopatología y en la inclusión de terapias no farmacológicas y farmacológicas. Las terapias no farmacológicas para el tratamiento de la sarcopenia incluyen el ejercicio de resistencia y una nutrición adecuada (Cruz-Jentoft et al., 2014). El ejercicio de resistencia ha demostrado ser el principal enfoque no farmacológico para el tratamiento de la sarcopenia, respaldado por múltiples pruebas con resultados claramente positivos (Lozano-Montoya et al., 2017; Peterson et al., 2010; Peterson et al., 2011; Suetta et al., 2008; Vlietstra et al., 2018). Las intervenciones de ejercicio, especialmente aquellas basadas en el entrenamiento de resistencia, pueden desempeñar un papel en la mejora de la masa muscular, la fuerza y el rendimiento físico. Por otro lado, aunque la eficacia de la intervención nutricional sin ejercicio en el tratamiento de la sarcopenia no está clara, algunas evidencias muestran beneficios de ciertos patrones dietéticos, como la ingesta

#### José Fernández Martínez

adecuada de proteínas, vitamina D, nutrientes antioxidantes y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Robinson et al., 2018). Se ha informado que la suplementación con proteínas enriquecidas con leucina o proteína de suero de leche es eficaz para aumentar la masa muscular y, en menor medida, la función muscular. Por otro lado, la suplementación de vitamina D incrementa la fuerza muscular pero no tiene efecto en la masa muscular (Bauer et al., 2015; Gryson et al., 2014; Martínez-Arnau et al., 2020). Sin embargo, estos métodos pueden no ser suficientes para prevenir o revertir esta enfermedad, especialmente para contrarrestar los numerosos mecanismos fisiopatológicos que conducen a la sarcopenia. Además, en pacientes gravemente debilitados, la implementación de tratamientos basados en el ejercicio puede resultar poco práctica.

Actualmente, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) no ha aprobado ningún fármaco específico para el tratamiento de la sarcopenia. Se recomiendan varios agentes, incluyendo hormona de crecimiento, esteroides anabólicos o androgénicos como la testosterona, moduladores selectivos de los receptores androgénicos, agentes anabólicos de proteínas, estimulantes del apetito como la grelina, inhibidores de la miostatina, activadores de receptores II, bloqueadores de receptores  $\beta$ , inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, y activadores de troponina (Cho et al., 2022). Todos estos tratamientos pueden tener efectos positivos en la masa muscular y/o la fuerza. Sin embargo, tienen una eficacia variable, presentando algunos de ellos varios efectos secundarios.

#### 2. Papel de los genes reloj en el músculo esquelético

#### 2.1. Organización del sistema circadiano

Si lo consideramos desde una perspectiva evolutiva, todas las especies, incluidos los mamíferos, deben adaptar sus funciones vitales al entorno para sobrevivir. Debido a esto, experimentan cambios periódicos cada 24 horas, conocidos como ritmos circadianos, que adaptan los eventos fisiológicos al fotoperiodo diario o ciclo luz-oscuridad. Prácticamente todas las funciones en un organismo vivo cambian rítmicamente a lo largo del periodo de 24 horas. El mecanismo subyacente a este tipo de adaptación constituye el llamado "reloj biológico" y el fotoperiodo es la señal externa o Zeitgeber que sincroniza el reloj con la duración del día. Inicialmente, el control de los ritmos circadianos se atribuyó a la expresión rítmica de genes en un grupo de aproximadamente 20.000 neuronas en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) del hipotálamo (Buhr & Takahashi, 2013; Lowrey & Takahashi, 2004). Esta perspectiva ha cambiado y sabemos que la mayoría de las células periféricas, incluyendo las fibras musculares, también contienen relojes que funcionan de manera similar al reloj central, pero están influenciados por otras señales ambientales, como el horario de ingesta de alimentos y el ejercicio. El reloj central opera de manera jerárquica para sincronizar todos los relojes periféricos a través de la producción diaria de melatonina, que actúa como el mensajero de la oscuridad y proporciona información tanto del reloj como del calendario (Acuña-Castroviejo et al., 2017; Reiter, 1993). Recientemente, se ha revelado la existencia de una comunicación cruzada entre el cerebro y el músculo (Arosio et al., 2023; Scisciola et al., 2021). Aunque se sabe poco sobre el mecanismo por el cual los relojes central y periféricos se comunican.

La retina alberga células ganglionares fotosensibles especializadas que utilizan la melanopsina como pigmento visual. Estas células, denominadas células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGC), constituyen el 3-5% del total de células ganglionares y son directamente fotosensibles. A través del tracto retinohipotalámico, proyectan información hacia los NSQ para la adaptación a la luz del reloj circadiano (Hattar et al., 2002). Distinguiéndose de las células relacionadas con la visión diurna y nocturna, estas ipRGC desempeñan un papel clave en la regulación circadiana al liberar glutamato en las neuronas del NSQ, induciendo así la expresión de los genes reloj. Una vía secundaria desde el tracto geniculohipotalámico, que principalmente libera GABA, y las aferencias serotoninérgicas y noradrenérgicas al NSQ, pueden también modular las señales excitatorias del tracto retinohipotalámico (Harrington, 1997; Rosenwasser & Turek, 2015). El NSO, a su vez, emite dos tipos de señales eferentes: una homeostática, que afecta a los sistemas autónomo y neuroendocrino ubicados en el hipotálamo; y otra cronobiótica, que sigue una vía multisináptica compleja hacia la glándula pineal, que es responsable de la síntesis de melatonina (Kalsbeek et al., 2006; Perreau-Lenz et al., 2004). Mediante este mecanismo, el marcapasos central regula la fisiología circadiana y sincroniza los relojes periféricos a través de la producción diaria de melatonina, que también retroalimenta al reloj central (Vriend & Reiter, 2015). La producción de esta indolamina en la glándula pineal sigue un ritmo circadiano, alcanzando su punto máximo durante la noche, cuando se activa la expresión de las enzimas clave en la síntesis de melatonina: la arilalquilamina N-acetiltransferasa (AANAT) y la N-acetilserotonina Ometiltransferasa (ASMT). Debido a que la melatonina no se almacena en la glándula pineal, una vez sintetizada, se libera rápidamente a la circulación central y sistémica, llegando a todas las células del cuerpo. Durante el día, su síntesis es inhibida por la componente de longitud de onda de 460-480 nm de la luz (Reiter, 1993).

Desde un punto de vista molecular, cuatro genes principales (y sus respectivas proteínas), Clock (CLOCK), Bmal1 (BMAL1), Per1/2/3 (PER1/2/3) y Cry1/2 (CRY1/2), constituyen el núcleo del reloj biológico. Además,  $Ror\alpha/\beta/\gamma$  (ROR $\alpha/\beta/\gamma$ ) y Rev-erb $\alpha/\beta$ (REV-ERB $\alpha/\beta$ ) actúan como moduladores positivos y negativos (Cox & Takahashi, 2019). También, se identificó que Chrono y su producto, CHONO, son componentes fundamentales del reloj circadiano (Goriki et al., 2014). Estos genes y sus productos funcionan en bucles de retroalimentación transcripcional/traduccional. BMAL1 interactúa con CLOCK formando dímeros BMAL1:CLOCK, que se unen a más de 6.000 sitios en la cromatina, que corresponden a aproximadamente 3.000 genes. Entre ellos, BMAL1:CLOCK aumentan la expresión de los genes Cry y Per. Las proteínas CRY y PER forman homo- y heterodímeros en el citosol y luego ingresan al núcleo, donde se unen e inactivan el dímero BMAL1:CLOCK, disminuyendo la expresión de los primeros. En esta situación, una reducción adicional en los niveles relativos de CRY y PER no inhibe a BMAL1:CLOCK, iniciando un nuevo ciclo del reloj. Este mecanismo oscila con un periodo de 24 horas. En este bucle, ROR y REV-ERB actúan para potenciar y reprimir, respectivamente, la transcripción de BMAL1 (Figura 5) (Acuña-Castroviejo et al., 2017; Cox & Takahashi, 2019). A su vez, los componentes del reloj molecular pueden regularse a través de modificaciones post-traduccionales, incluidas la fosforilación con caseína quinasa 1ɛ (CK1ɛ), proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y glucógeno sintasa quinasa 3β (GSK-3β), la ubiquitinación y la acetilación/desacetilación de histonas y proteínas reloj (Lefta et al., 2011). El mecanismo molecular y estas modificaciones deben regularse para un funcionamiento adecuado, pero existen numerosas condiciones como el envejecimiento, la inflamación o diversas enfermedades que interrumpen el reloj biológico. La base de la maquinaria molecular del reloj fue revelada gracias al trabajo de Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash y Michael W. Young, quienes fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina o Fisiología en 2017 por sus contribuciones (Bargiello et al., 1984; Hardin et al., 1990; Liu et al., 1992; Price et al., 1998; Siwicki et al., 1988; Vosshall et al., 1994; Zehring et al., 1984).



**Figura 5. Bucle de retroalimentación transcripcional/traduccional de los genes del reloj.** Estos genes operan en ciclos de 24 horas. BMAL1 y CLOCK forman un heterodímero que activa la transcripción de CRY, PER, ROR y REV-ERB. CRY y PER se combinan para inhibir la actividad del complejo BMAL1:CLOCK, reduciendo la expresión de los primeros. Los reguladores ROR y REV-ERB activan y reprimen a BMAL1, respectivamente. (Fernández-Martínez et al., 2023, artículo en revisión).

#### 2.2. Conexión entre genes reloj e inflamación en el envejecimiento

Los cambios drásticos en el estilo de vida, con una mayor actividad durante la noche y menos horas de sueño, y el desarrollo de enfermedades crónicas en los seres humanos, constituyen una creciente amenaza para la correcta organización del reloj biológico (Abbott et al., 2020). El término cronodisrupción se define como una alteración en la organización del sistema circadiano que modifica los ritmos biológicos y, consecuentemente, la fisiología, el metabolismo y el comportamiento de los organismos vivos (Erren & Reiter, 2009). Por lo tanto, la cronodisrupción es un factor que predispone al desarrollo de múltiples enfermedades como problemas cardiovasculares, trastornos metabólicos, cáncer, enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o el Alzheimer y envejecimiento acelerado (Verma et al., 2023). Curiosamente, esta relación parece ser bidireccional, ya que algunos procesos de enfermedad también están asociados con una función circadiana alterada como síntoma temprano del trastorno (Abbott et al., 2020).

En un estudio reciente en ratones de tres grupos de edades diferentes, se observó que el envejecimiento reduce el número de genes expresados rítmicamente en varios tejidos, incluyendo el músculo esquelético, lo que indica un control circadiano debilitado (Wolff et al., 2023). Este hallazgo se suma a la creciente evidencia que sugiere una relación entre la disrupción del reloj biológico y el proceso de envejecimiento. A medida que las personas envejecen, el ritmo circadiano experimenta cambios significativos, probablemente como consecuencia de la alteración de algunos de los componentes del reloj biológico y el descenso natural de melatonina con la edad, lo que podría acelerar el proceso de envejecimiento. Por esta razón, se puede decir que la cronodisrupción promueve el envejecimiento y el envejecimiento facilita aquella (Verma et al., 2023; Welz & Benitah, 2020). Del mismo modo, la actividad de la inmunidad innata está regulada por el reloj biológico, y su alteración se refleja en patologías inflamatorias, daño tisular y activación de vías de deterioro muscular. Esto se acompaña de una liberación alterada de citoquinas/mioquinas. El reloj muscular desajustado también afecta la regulación de genes clave (mTOR, Atrogin, MyoD1, Pgc1, etc.), lo que tiene un impacto directo en el control de la masa muscular (Morena da Silva et al., 2023). Proteínas del reloj como BMAL1, CLOCK, PER, CRY, y los moduladores RORa y REV-ERBa, desempeñan un papel significativo en la inmunidad celular, la defensa y la inflamación

(Curtis et al., 2014), y la expresión de sus genes está alterada en el envejecimiento, principalmente en tejidos periféricos (Hood & Amir, 2017; Wolff et al., 2023). En particular, BMAL1 es un componente esencial que vincula el reloj molecular con la inmunidad, limitando así la inflamación. Cumple esta función de varias maneras. En primer lugar, BMAL1 se une a CLOCK impidiendo la acetilación de la subunidad p65 y la activación de NF-κB por parte de este último. Esto resulta en una reducción de la inducción de genes específicos, incluyendo citoquinas y reguladores de supervivencia y proliferación, lo que lleva a una disminución de la inflamación (Spengler et al., 2012). Nguyen et al demostraron que BMAL1 reduce directamente la expresión de la quimioquina CCL2, disminuyendo así el número de monocitos inflamatorios tanto en sangre como en tejidos afectados (Nguyen et al., 2013). Además, BMAL1 regula la producción circadiana de la proteína nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT), la enzima limitante en la síntesis de NAD<sup>+</sup>, cofactor de dos sirtuinas con actividad desacetilasa, SIRT1 y SIRT3. La primera inactiva NF-kB, gracias a su actividad desacetilasa, controlando la respuesta inmune, mientras que SIRT3 mejora la función mitocondrial, reduciendo la generación de radicales libres, lo que disminuye la activación del inflamasoma NLRP3 (Acuña-Castroviejo et al., 2017; Peek et al., 2013; Volt et al., 2016; Yeung et al., 2004). SIRT1, a su vez, regula distintos genes asociados al reloj circadiano, influvendo así en la inflamación. Se ha demostrado que SIRT1 se asocia directamente con el complejo BMAL1:CLOCK, donde es capaz de producir modificaciones en ambas proteínas, y también promueve la desacetilación y degradación de PER2. SIRT1 también es necesario para la transcripción de varios genes reloj principales, incluyendo Bmall, Rory, Per2 y Cryl (Asher et al., 2008; Nakahata et al., 2009). Es importante mencionar que BMAL1 induce la expresión de RORa y REV-ERBα, que activan e inhiben la expresión de *Bmal1*, respectivamente, influyendo así en
la inmunidad. Además, estudios realizados en células de músculo liso primarias y macrófagos humanos, han demostrado que RORα induce la transcripción del inhibidor de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B), impidiendo la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo (Delerive et al., 2001), y REV-ERBα regula la producción y liberación de la citoquina proinflamatoria IL-6 (Gibbs et al., 2012). Por último, las proteínas PER y CRY tienen diferentes roles en el proceso inflamatorio. Aunque existen tres proteínas PER, parece que PER2 es la más significativa en el control del sistema inmunológico. PER2 puede contribuir a la inflamación al restringir la actividad del complejo BMAL1:CLOCK y aumentar la producción de INF- $\gamma$  y IL-1 $\beta$  (Liu et al., 2006). PER2 también puede inhibir la actividad de REV-ERB $\alpha$ , teniendo así un papel más complejo en la inmunidad (Preitner et al., 2002). CRY1 y CRY2 inhiben diferentes citoquinas proinflamatorias. La ausencia de estos criptocromos desencadena la producción de óxido nítrico sintasa (iNOS), IL-6 y TNF- $\alpha$ , reflejando una condición proinflamatoria, lo que a su vez conduce a una mayor fosforilación de p65 y activación de la vía NF- $\kappa$ B (Narasimamurthy et al., 2012).

En conjunto, estos bucles explican cómo los genes reloj, dirigidos por BMAL1, influyen en el control de la inmunidad innata (Keller et al., 2009), fomentando un estado antiinflamatorio, que decae con el envejecimiento, como nosotros demostramos en estudios previos (Fernández-Ortiz et al., 2022; Sayed et al., 2021; Volt et al., 2016). La disrupción del sistema circadiano con la edad, por tanto, podría desencadenar los procesos de inflamación, que traen consigo estrés oxidativo, daño mitocondrial y apoptosis, mecanismos que, en el músculo esquelético, preceden a la sarcopenia. A su vez, los genes del reloj se perfilan como dianas emergentes contra el envejecimiento (Zhu et al., 2022).

### 2.3. Genes reloj en el músculo esquelético

El reloj molecular está presente en múltiples células y tejidos, incluido el músculo. Reeds et al observaron cambios en la síntesis y degradación de proteínas en el músculo esquelético de ratas durante 24 horas, lo que indica la presencia de un ritmo circadiano de este tejido (Reeds et al., 1986). Estudios posteriores de transcriptómica han identificado más de 200 genes que se expresan rítmicamente en el músculo esquelético de ratones, incluidos algunos pertenecientes al reloj molecular 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).

Cada vez hay más investigaciones que respaldan la importancia de los genes reloj en la salud muscular. De hecho, ratones mutantes para distintos genes reloj han mostrado una disminución en la función muscular. Los ratones mutantes homocigotos para *Clock*, específicamente aquellos con la proteína truncada CLOCK ( $\Delta$ 19), mostraron una reducción significativa en la expresión de genes relacionados con el sarcómero y la mitocondria. Esto resultó en alteraciones graves en su ritmo de actividad locomotora, fuerza y estructura muscular. Además, presentaron disminución del contenido mitocondrial y una vida más corta (Andrews et al., 2010; McCarthy et al., 2007; Pastore & Hood, 2013; Vitaterna et al., 1994). Por otro lado, los ratones knockout para Clock  $(Clock^{-/-})$  tuvieron alteraciones musculares mínimas y solo una pequeña reducción en la duración del ciclo circadiano de actividad locomotora. Sin embargo, experimentaron una disminución en la esperanza de vida y padecieron otras condiciones como cataratas y mayor riesgo de dermatitis (Debruyne et al., 2006; DeBruyne et al., 2007; Dubrovsky et al., 2010). Estas diferencias se deben posiblemente a las distintas mutaciones en el gen *Clock* entre los dos tipos de ratones, con posible compensación por parte de la proteína NPAS2 en los ratones *Clock<sup>-/-</sup>* en ausencia de CLOCK. Los modelos que implican a los

inhibidores del reloj molecular, *Per* y *Cry*, muestran impactos menos significativos en la salud muscular, manifestando solo ligeras alteraciones en el ritmo circadiano de la actividad locomotora, aunque la eliminación simultánea de ambos genes ha llevado a comportamientos completamente carentes de ritmo (Liu et al., 2007; van der Horst et al., 1999; Zheng et al., 2001). Por otro lado, se ha demostrado que *Rev-erba* está altamente expresado en el músculo esquelético oxidativo y que su deficiencia en el músculo conduce a una disminución en el contenido y función mitocondrial, así como a un aumento de la autofagia (Woldt et al., 2013).

El gen reloj más investigado en relación al músculo esquelético es *Bmal1*. El gen Bmal1 desempeña un papel crucial en la función muscular, ya que no solo es responsable de la regulación y reparación muscular (Chatterjee et al., 2015; Zhu et al., 2022), sino que también mejora la respiración al aumentar la capacidad oxidativa en este tejido (Kohsaka et al., 2014; Wada et al., 2018). Esto se debe a que *Bmal1* regula los procesos de dinámica mitocondrial y activa el metabolismo mitocondrial de manera dependiente de las sirtuinas SIRT1 y SIRT3, respectivamente, al regular los niveles de NAD<sup>+</sup>. Este gen reloj controla rítmicamente el eje NAMPT-NAD-SIRTs, regulando la transición de las mitocondrias de un estado de baja a alta fosforilación oxidativa (OXPHOS) y viceversa (Peek et al., 2013). Además, estudios recientes han indicado que los cambios en la morfología mitocondrial (es decir, fusión y fisión), así como la generación de nuevas mitocondrias, dependen de un reloj circadiano funcional, específicamente a través de la activación de SIRT1 y otras proteínas por el complejo BMAL1:CLOCK (de Goede et al., 2018). Estos datos respaldan la existencia de un ritmo diario en la capacidad oxidativa del músculo esquelético (van Moorsel et al., 2016). Por otro lado, Bmall también contribuye al desarrollo de hueso y cartílago, así como a la síntesis y liberación de colágeno en los condrocitos (Chen et al., 2023; Schroder et al., 2015). En el estudio del gen Bmall se han empleado diversos

modelos animales, como los ratones *Bmal1*<sup>-/-</sup> que carecen completamente del gen, y los ratones con deficiencia específica de *Bmal1* en el músculo esquelético. Los primeros muestran una forma más severa de patología, posiblemente debido a la afectación de múltiples funciones en el cuerpo además del músculo. Esto incluye una reducción significativa en la esperanza de vida, desarrollo de sarcopenia prematura, arritmia conductual, sensibilidad a la insulina y tolerancia a la glucosa deterioradas, calcificación ectópica y esterilidad. También presentan debilidad, disfunción mitocondrial y cambios en la arquitectura de los miofilamentos, lo que indica una fuerte afectación en la estructura y función del músculo esquelético (Andrews et al., 2010; Bunger et al., 2000; Kondratov et al., 2006; Rudic et al., 2004). Para comprender la función precisa de *Bmal1* en el músculo esquelético, se llevaron a cabo varios estudios en ratones deficientes en *Bmal1* en el músculo esquelético. Estos ratones exhibieron alteraciones en la marcha, la movilidad y la fuerza muscular, además de un aumento de fibras de tipo oxidativo, un incremento en la fibrosis muscular y cambios en el metabolismo del tejido muscular, especialmente en lo que respecta al metabolismo de la glucosa (Dyar et al., 2014; Hodge et al., 2015; Schroder et al., 2015).

Todos estos datos indican claramente que los genes del reloj, especialmente *Bmal1*, desempeñan un papel crucial en la salud del músculo esquelético, particularmente en el funcionamiento de las mitocondrias en este tejido.

26

# 3. Melatonina como enfoque terapéutico en la sarcopenia

### 3.1. Melatonina

La melatonina, conocida químicamente como N-acetil-5-metoxitriptamina, es una indolamina derivada del triptófano. Fue aislada por primera vez de glándulas pineales bovinas en 1958 por Aaron Lerner, quien identificó su estructura química (Lerner et al., 1960). Es una molécula altamente conservada a lo largo de la evolución, que se encuentra en casi todos los organismos, desde bacterias y plantas hasta invertebrados y mamíferos (Hardeland et al., 2006).

### 3.1.1. Síntesis y metabolismo

Inicialmente, se pensaba que la melatonina era producida exclusivamente por la glándula pineal y se investigaba principalmente por su papel en la regulación de los ritmos circadianos. Sin embargo, ahora sabemos que también se sintetiza en las células de la mayoría de los tejidos y órganos del cuerpo, incluido el músculo esquelético, a través de los mismos procesos enzimáticos que en la glándula pineal. Por tanto, diferenciamos dos tipos de melatonina, pineal y extrapineal, que poseen propiedades distintas (Acuña-Castroviejo et al., 2014; Stefulj et al., 2001). En animales vertebrados, la síntesis de melatonina pineal ocurre durante la noche, en sincronía con el ciclo luz-oscuridad y controlada por el reloj biológico central en los NSQ, como se explicó previamente. A nivel celular, la síntesis de melatonina tiene lugar en la mitocondria, aunque no todos los eventos de su síntesis ocurren necesariamente en este orgánulo. Esta comienza con la absorción de triptófano por los pinealocitos desde el torrente sanguíneo, que es hidroxilado por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH) en la posición 5, dando lugar al 5-hidroxitriptófano. Posteriormente, el 5-hidroxitriptófano se descarboxila para formar

serotonina (también conocida como 5-hidroxitriptamina) a través de la acción de la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC). La serotonina es acetilada por la enzima AANAT, lo que resulta en N-acetilserotonina. Luego, la N-acetilserotonina es metilada por la ASMT, produciendo finalmente la molécula de melatonina (Figura 6) (Zhao et al., 2019). Las enzimas AANAT y ASMT son fundamentales en la síntesis de melatonina, aunque existe controversia acerca de cuál de las dos actúa como la enzima limitante en el proceso (Liu & Borjigin, 2005). Es importante destacar que la melatonina pineal no se almacena en la glándula, sino que es liberada directamente al torrente sanguíneo, desde donde se distribuye por todo el cuerpo. En contraposición, aunque las mismas enzimas están involucradas en la síntesis de melatonina en tejidos periféricos, su producción no sigue un ritmo circadiano. En lugar de ello, cada tejido produce la cantidad necesaria en cada momento y la melatonina permanece dentro de la célula (Acuña-Castroviejo et al., 2014; Venegas et al., 2012).



**Figura 6. Síntesis de melatonina pineal.** La producción de esta molécula es nocturna y está regulada por el reloj biológico central el NSQ. Comienza con la hidrólisis del triptófano por la enzima TPH, dando lugar a 5-hidroxitriptófano. AADC luego lo decarboxila, creando serotonina. AANAT acetila la serotonina, produciendo N-acetilserotonina, la cual es posteriormente convertida en melatonina por ASMT. (Fernández-Martínez et al., 2023, artículo en revisión).

La melatonina pineal circulante tiene una vida media de aproximadamente 30 minutos en la sangre y se encuentra libre o conjugada con la albúmina. Esta se metaboliza principalmente en hígado, dando lugar a 6-hidroximelatonina y, en menor medida, a N-acetilserotonina. Aquí, varias isoformas del citocromo P450, específicamente las enzimas CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 y CYP2C19, producen estos metabolitos (Ma et al., 2005). Luego, la 6-hidroximelatonina y la N-acetilserotonina son metabolizadas por sulfotransferasas antes de ser excretadas en la orina (Tian et al., 2015). En los tejidos, la melatonina extrapineal puede ser descompuesta mediante procesos enzimáticos y no enzimáticos, produciendo los metabolitos N1-acetil-N2-formil-5-metoxi-cinuramina (AFMK) y N1-acetil-5-metoxi-cinuramina (AMK). Estos metabolitos desempeñan un papel crucial en la eliminación de radicales libres (Tan et al., 2007).

### 3.1.2. Dianas de la melatonina

Para llevar a cabo sus múltiples funciones, la melatonina puede interactuar con diversos receptores, proteínas citosólicas, o actuar de manera independiente por sí misma.

Aunque inicialmente se pensó que la melatonina podía atravesar todas las membranas biológicas debido a su naturaleza lipófila (Costa et al., 1995), en realidad es una molécula anfipática, con extremos hidrofílicos e hidrófobos. Esto limita su capacidad de difusión a través de membranas biológicas. Investigaciones en nuestro laboratorio han demostrado que la melatonina no atraviesa fácilmente las membranas celulares. En cambio, se acumula en la superficie de estas membranas y solo una fracción pequeña logra penetrar en el interior celular, saturándose a determinadas concentraciones sus niveles intranucleares e intramitocondriales (Venegas et al., 2012). Este mecanismo es esencial para prevenir un exceso de melatonina dentro de la célula, ya que su acción antioxidante podría interferir con el metabolismo energético normal.

Los receptores de melatonina están ampliamente distribuidos entre los distintos tejidos del organismo, entre ellos el músculo esquelético. Se han descrito dos tipos de receptores de membrana de melatonina acoplados a proteínas G en animales vertebrados, MT1 (Mel1<sub>a</sub>) y MT2 (Mel1<sub>b</sub>). Ambos tienen siete dominios transmembrana y, al unirse la melatonina, pueden modular la actividad de la adenilato ciclasa, fosfolipasas C y A<sub>2</sub>, canales de potasio y calcio, y guanilato ciclasa a través de distintos mecanismos (Aranda-Martínez et al., 2022; Slominski et al., 2012). En su momento se teorizó la existencia de un tercer sitio de unión de melatonina en la membrana celular (receptor MT3) (Dubocovich, 1995). Sin embargo, se descubrió que este objetivo biológico de la melatonina en realidad era la enzima citosólica quinona oxidoreductasa 2 (NQO2) (Nosjean et al., 2000). Otras proteínas citosólicas, como la calmodulina, la calreticulina, la tubulina y la proteína quinasa C, implicadas en el metabolismo del calcio y la modulación de la estructura del citoesqueleto, han mostrado ser dianas de la melatonina, ejerciendo diversos efectos tras su unión (Benítez-King & Antón-Tay, 1993; Benítez-King et al., 1996; Cardinali & Freire, 1975; Macías et al., 2003).

La melatonina también se une a receptores nucleares, concretamente a la subfamilia de los receptores huérfanos relacionados con retinoides (RORs), que incluyen ROR $\alpha$ , ROR $\beta$  y ROR $\gamma$ . Estos receptores están en el núcleo celular y constan de un dominio N-terminal, un dominio de unión al ADN y un dominio C-terminal donde se unen a sus ligandos (Jetten, 2009). Numerosos estudios, incluidos algunos de nuestro grupo, demostraron la presencia de melatonina en el núcleo celular, así como su habilidad

para unirse a estos receptores, particularmente a RORα, regulando la transcripción génica y llevando a cabo sus efectos (Acuña-Castroviejo et al., 1993; Acuña-Castroviejo et al., 1994; Becker-André et al., 1994; Carlberg & Wiesenberg, 1995; Menendez-Pelaez et al., 1993; Wiesenberg et al., 1995). Además, al igual que los receptores de membrana, los receptores nucleares presentan un ritmo circadiano similar al de la melatonina, con un pico de producción a las 3 am, lo que sugiere que su expresión está regulada por los niveles de melatonina en sangre (Venegas et al., 2013).

La melatonina, junto con sus metabolitos AFMK y AMK, es capaz de neutralizar directamente los ROS y RNS (Acuña Castroviejo et al., 2011), como veremos a continuación.

### 3.1.3. Acciones de la melatonina pineal y extrapineal

La melatonina es una molécula versátil con la capacidad de desempeñar múltiples funciones.

Por un lado, la melatonina pineal liberada en la circulación llega a cada célula del cuerpo y, tras su unión a los receptores de membrana MT1 y MT2, activa distintas vías involucradas en la regulación cronobiológica controlando así los relojes periféricos de diferentes tejidos, incluido el músculo esquelético (Acuña-Castroviejo et al., 2014; Reiter, 1993). Aquí, la melatonina, a través de los genes reloj, coordina de manera conjunta distintos procesos metabólicos, mitocondriales, inflamatorios y estructurales del músculo que siguen un patrón circadiano, descritos anteriormente.

Existe evidencia de que la degradación de las proteínas del reloj biológico como BMAL1, PER, CRY y REV-ERB, así como posiblemente otros componentes, es mediada por el sistema ubiquitina-proteasoma (Gatfield & Schibler, 2007; Stojkovic et al., 2014). Se ha sugerido que la melatonina podría regular esta degradación al inhibir el proteasoma, ya que comparte similitudes con su inhibidor (Vriend & Reiter, 2014, 2015). Además, se ha observado que la melatonina se une a la Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (León et al., 2000) y bloquea la actividad de la proteína quinasa Ca<sup>2+</sup>/calmodulina II (CaMKII) (Fukunaga et al., 2002), que controla la fosforilación del proteasoma (Jarome et al., 2013). Este mecanismo podría ser la forma en que la melatonina regula la degradación de las proteínas del reloj, sincronizando los relojes periféricos y proporcionando estabilidad al ritmo. Sin embargo, actualmente se desconoce si los genes reloj controlan a su vez la síntesis de melatonina en tejidos extrapineales (Acuña-Castroviejo et al., 2014). No como en la glándula pineal, donde se ha demostrado que el complejo BMAL1:CLOCK activa la transcripción de AANAT por su unión a la región E-box de este gen (Chong et al., 2000), estimulando la producción rítmica de melatonina.

Mientras que la melatonina pineal tiene funciones cronobióticas, la melatonina extrapineal actúa como antioxidante y antiinflamatorio, teniendo como principal blanco de acción la mitocondria (Acuna-Castroviejo et al., 2007). Este orgánulo se encuentra claramente afectado en el músculo esquelético envejecido.

La capacidad antioxidante de la melatonina se encuentra directamente ligada a su habilidad para ser producida en diversas células del organismo en grandes cantidades, significativamente más altas que las concentraciones de melatonina pineal encontradas en sangre (Venegas et al., 2012), ejerciendo así un efecto local. Se ha detectado la expresión no circadiana de los genes *Aanat* y *Asmt* en tejidos periféricos, tales como el corazón, hígado, estómago, intestino, músculo esquelético, testículos y ovarios, entre otros (Acuña-Castroviejo et al., 2014; Stefulj et al., 2001). Tanto la melatonina como sus metabolitos, AFMK y AMK, tienen la capacidad de neutralizar directamente los radicales libres, interactuando con diversas especies reactivas de oxígeno y del nitrógeno, incluyendo el radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>), el radical superóxido (O2<sup>-•</sup>), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el óxido nítrico (NO), los peroxinitritos (ONOO<sup>-</sup>) y los radicales peroxilo (LOO') (Acuña-Castroviejo et al., 2001; Zhang et al., 1999). Además, se ha demostrado que esta hormona es capaz de eliminar los radicales libres de manera indirecta al regular la actividad y expresión de otros sistemas antioxidantes, un efecto que podría ser mediado por su interacción con la calmodulina y su receptor nuclear (Tomás-Zapico & Coto-Montes, 2005), o con sus receptores de membrana MT1 y MT2 en el caso de la melatonina pineal (Rodriguez et al., 2004). En primer lugar, la melatonina potencia la actividad de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GRd), impulsando el ciclo del glutatión y manteniendo el equilibrio entre el glutatión oxidado y reducido (GSSG/GSH) (Escames et al., 2006; Martín, Macías, Escames, León, et al., 2000). También estimula la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintasa ( $\gamma$ -GCS), aumentando la producción de GSH (Urata et al., 1999), y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), que provee el NADPH necesario para la GRd (Pierrefiche & Laborit, 1995). Además, la melatonina refuerza la actividad y expresión de otras enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) (Acuna-Castroviejo et al., 2007; Leon et al., 2004). Dado que la mitocondria es la principal fuente de radicales libres, este orgánulo es su objetivo principal (Venegas et al., 2012). Más allá de su función antioxidante, la melatonina juega un papel crucial en mantener la homeostasis mitocondrial, preservando la integridad y funcionalidad de las membranas y aumentando la bioenergética mitocondrial (Acuña Castroviejo et al., 2011; García et al., 2011; López et al., 2009; Martín, Macías, Escames, Reiter, et al., 2000; Martín et al., 2002). Estas funciones de la melatonina son especialmente importantes en el tejido muscular, donde las mitocondrias son orgánulos críticos encargados de regular el estado metabólico del músculo esquelético (Hood et al., 2019).

La melatonina también puede actuar como molécula antiinflamatoria siendo capaz de modular las vías de la inmunidad innata dependientes de NF-kB y del inflamasoma NLRP3. Específicamente, la melatonina se une a su receptor nuclear RORa, activando SIRT1, que a su vez desacetila NF- $\kappa$ B, inhibiendo su unión al ADN y su activación, lo que resulta en una menor expresión de iNOS y citoquinas proinflamatorias como TNF-α y IL-6, entre otras. Así, la melatonina previene la activación del inflamasoma NLRP3 y de caspasa-1, así como de la IL-1β (Acuña-Castroviejo et al., 2017; Garcia et al., 2015). Además, la melatonina inhibe la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), evitando la producción excesiva de mediadores inflamatorios (Deng et al., 2006). Adicionalmente, en situaciones de estrés, la melatonina potencia la expresión de NRF2, un regulador transcripcional de enzimas antioxidantes que está implicado en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial (Dinkova-Kostova & Abramov, 2015; Rahim et al., 2021), que ayuda en la respuesta antiinflamatoria. Finalmente, la melatonina también desempeña un papel crucial en la apoptosis al inhibirla a través de la regulación del equilibrio BAX/BCL2 y la reducción de la actividad y expresión de la caspasa-3 (Mehrzadi et al., 2021).

Todas estas propiedades de la melatonina la convierten en un agente terapéutico potencial frente a una gran cantidad de enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como la sarcopenia, en la que la cronodisrupción, la inflamación crónica, el estrés oxidativo, el daño mitocondrial y la pérdida de masa muscular en el músculo envejecido pueden ser contrarrestadas por la melatonina (Figura 7).



Figura 7. Resumen de las vías moleculares involucradas en la sarcopenia y acciones de la melatonina. La sarcopenia es una condición asociada con varios factores, incluyendo la cronodisrupción, la inflamación crónica, la disfunción mitocondrial, la interrupción de la proteostasis y la pérdida de músculo esquelético. La cronodisrupción conduce a la alteración de los genes y proteínas reloj, especialmente BMAL1, que pierde sus funciones antiinflamatorias. Afecta a la regulación de NAD<sup>+</sup>, el cual es utilizado por SIRT1/3, influenciando tanto en la vía NF- $\kappa$ B como en la OXPHOS. Además, los niveles de NAD<sup>+</sup> son controlados por estas dos desacetilasas. La inflamación crónica es un proceso caracterizado por la activación de NF-KB causada por niveles elevados de ROS y una disminución de las defensas antioxidantes. Esta activación resulta en niveles elevados de citoquinas proinflamatorias y una reducción en la actividad de enzimas antioxidantes. El ambiente oxidativo provoca daño en las mitocondrias, lo que lleva a un aumento en los niveles de ROS y la activación de NLRP3, intensificando así la inflamación. En este escenario, p62 no puede iniciar la mitofagia para la degradación de mitocondrias dañadas. La disfunción mitocondrial lleva a alteraciones en la fusión, fisión y mitofagia de estos orgánulos. La interrupción de la proteostasis y la pérdida de músculo esquelético conducen al cambio de fibras musculares tipo 2 a tipo 1, una reducción tanto en el tamaño como en la cantidad de fibras, y una reducción de MuSCs y neuronas motoras. Además, hay un aumento en la fibrosis y la miosteatosis. Estos mecanismos en conjunto afectan la integridad del músculo esquelético, contribuyendo en última instancia a la fragilidad. La melatonina, al actuar en diversos sitios celulares, presenta múltiples propiedades beneficiosas que le permiten contrarrestar estos procesos, reduciendo así el daño muscular y mejorando la sarcopenia. (Fernández-Martínez et al., 2023, artículo en revisión).

### **3.2.** Antecedentes

Las mitocondrias funcionan tanto como fuente de síntesis de melatonina como diana de esta indolamina (Acuna-Castroviejo et al., 2007; Venegas et al., 2012). La disminución de melatonina en los tejidos asociada al envejecimiento (Hardeland, 2012; Sanchez-Hidalgo et al., 2009) parece estar vinculada a la disfunción mitocondrial que ocurre durante este proceso. Además, la producción de melatonina pineal también experimenta una disminución significativa con la edad (Hardeland, 2012), lo que potencialmente conduce a una reducción del control circadiano y a la interrupción de los genes del reloj en varios tejidos. En múltiples condiciones experimentales, incluyendo inflamación aguda y crónica, envejecimiento y sarcopenia, la melatonina consistentemente mejoró la defensa antioxidante endógena, redujo la activación de la inmunidad innata y estimuló las mitocondrias (Escames et al., 2006; Fernández-Ortiz et al., 2020; Fernández-Ortiz et al., 2022; Garcia et al., 2015; Rahim et al., 2017; Sayed et al., 2021; Sayed et al., 2019; Sayed et al., 2018; Sayed et al., 2021; Volt et al., 2016). Además, también se demostró que la melatonina tiene la capacidad de restaurar la expresión de los genes del reloj, que se encuentra alterada en estas patologías, así como en otras condiciones como el cáncer o el Parkinson (Aranda-Martínez et al., 2023; Rodríguez-Santana et al., 2023).

Particularmente, nuestro grupo de investigación ha demostrado los beneficios de la melatonina en el músculo esquelético envejecido. En un estudio inicial en nuestro grupo de investigación, utilizando ratones C57BL/6J de diferentes edades (3-4 meses, 12 meses y 24 meses), se identificó el comienzo precoz de la sarcopenia a los 12 meses de edad (Sayed et al., 2016). Ésta se caracterizó por una disminución en la actividad locomotora y en la masa del músculo, acompañada de un aumento en el índice de fragilidad. Además, se observaron cambios en la estructura y ultraestructura muscular, una reducción en el tamaño y pérdida de fibras de tipo 2, junto con un incremento en el tamaño de las mitocondrias, indicando posibles alteraciones en la dinámica mitocondrial. Estos cambios empeoraron en los animales de mayor edad. El tratamiento con melatonina mejoró la función y estructura muscular en ratones envejecidos, al mismo tiempo que redujo el daño en las mitocondrias y los núcleos apoptóticos en el músculo. Por lo tanto, se sugirió que la melatonina podría ser un tratamiento potencial para la sarcopenia (Sayed et al., 2018).

Dado que la sarcopenia está vinculada al envejecimiento, se empleó un modelo de ratón sin NLRP3 para investigar el papel de la inflamación. Se determinó que este inflamasoma juega un papel en el desarrollo y progresión de la sarcopenia tanto en el músculo esquelético como en el cardíaco. Este efecto fue mitigado con el tratamiento de melatonina (Fernández-Ortiz et al., 2020; Sayed et al., 2021; Sayed et al., 2019; Sayed et al., 2021). Además, se evaluó la expresión y ritmo circadiano de los genes del reloj en estos ratones mutantes. El envejecimiento resultó en cambios en la fase de *Clock*, una reducción en la amplitud de *Bmal1*, *Per2* y *Clock*, y una pérdida de ritmo en *Per2* y *Rora*. Por otro lado, NLRP3 alteró la acrofase de *Clock*, *Per2* y *Rora*. La administración de melatonina en estos ratones permitió reducir la inflamación asociada a la edad y restablecer el ritmo de los genes alterados (Fernández-Ortiz et al., 2022).

En conjunto, estos datos postulan a la melatonina como un potencial candidato frente a la sarcopenia, y sugieren que la melatonina es el vínculo entre los genes del reloj y las mitocondrias en el músculo esquelético.

37

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

# 1. Hipótesis

Cada vez hay más evidencias que apoyan la relación entre cronodisrupción y enfermedad. Los genes reloj participan en el control de al menos un 10% del genoma, una regulación deteriorada con el envejecimiento. Ya que cada célula posee su propio reloj molecular, la disrupción dependiente de la edad de los genes reloj en el músculo esquelético debería tener consecuencias a nivel de homeostasis y función muscular.

Varios estudios, incluidos los realizados en nuestro laboratorio, respaldan esta visión, que incluye la reducción paralela dependiente de la edad en *Bmal1* y *Rora* y un aumento en la expresión de *Rev-erba* en el músculo gastrocnemio de ratones. El reloj muscular intrínseco es necesario para la salud musculoesquelética, y estos cambios podrían explicar el aumento de la inflamación local por medio de NF- $\kappa$ B y del inflamasoma NLRP3, la generación de ROS, el deterioro de la defensa antioxidante dependiente de NRF2 y el daño mitocondrial producidos en el envejecimiento, conduciendo a un incremento en la pérdida de fibras musculares y sarcopenia. Sin embargo, no existen datos que identifiquen una relación causal entre la reducción de la expresión de *Bmal1* en el músculo esquelético envejecido y estos déficits que culminan en sarcopenia.

En base a lo anterior, nosotros planteamos que la pérdida de *Bmal1* en músculo esquelético asociada a la edad, puede ser causa de aquellos cambios que desembocan finalmente en la sarcopenia. La evaluación de esta hipótesis requiere un ratón *knockout* para *Bmal1* específico de músculo esquelético. Asimismo, probamos si la melatonina, debido a sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y cronobióticas, restableciendo la expresión de los genes reloj, puede ser capaz de contrarrestar la sarcopenia, y si esta

requiere de la presencia de *Bmal1* en el músculo esquelético. Además, ya que el ejercicio puede modular genes relacionados con el envejecimiento y ha demostrado beneficios contra la sarcopenia, empleamos ambos, ejercicio y/o melatonina como intervenciones terapéuticas para combatir esta condición.

# 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo principal

Demostrar la relación causal entre cronodisrupción (en particular el déficit de *Bmal1* con la edad), inflamación, disfunción mitocondrial y pérdida muscular durante el envejecimiento en el modelo de ratón *knockout* para *Bmal1* inducible y específico de músculo esquelético (iMS-*Bmal1*-/-).

### 2.2. Objetivos específicos

Objetivo 1. Generar el modelo de ratón iMS-Bmal1<sup>-/-</sup> y sus controles (iMS-Bmal1<sup>flox/flox</sup>).

Objetivo 2. Evaluar si los ratones iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup> son proclives a desarrollar sarcopenia.

<u>Objetivo 3.</u> Evaluar las distintas vías y mecanismos relacionados con la sarcopenia en el GM de ratones iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup> y sus controles.

<u>Objetivo 4.</u> Evaluar la eficacia de una intervención terapéutica con ejercicio y/o melatonina para contrarrestar la sarcopenia en ratones iMS-*Bmal1*-/- y sus controles.

# MATERIALES Y MÉTODOS

# 1. Animales, tratamientos y diseño experimental

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

Se generaron ratones *knockout* para *Bmal1* inducibles y específicos de músculo esquelético (iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup>) mediante el cruce de ratones homocigotos que expresaban el gen *Bmal1* entre dos sitios LoxP (*Bmal1*<sup>flox/flox</sup>, B6.129S4(Cg)-Arntl<sup>im1Weit</sup>/J, The Jackson Laboratory) con ratones heterocigotos que portaban la recombinasa Cre fusionada en cada extremo 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<sup>+/-</sup>, B6.Cg-Tg(ACTA1-cre/Esr1\*)2Kesr/J, The Jackson Laboratory), como se describe en Hodge et al (Hodge et al., 2015). De forma breve, las hembras *Bmal1*<sup>flox/flox</sup> se cruzaron con los machos Cre<sup>+/-</sup> para obtener la generación F1 de ratones doblemente heterocigotos *Bmal1*<sup>flox/flox</sup>, dando lugar a la generación F2 de ratones *Bmal1*<sup>flox/flox</sup> Cre<sup>+/-</sup> (denominados como iMS-*Bmal1*<sup>flox/flox</sup>) necesarios para el estudio (Figura 8).



Figura 8. Generación del ratón knockout para Bmall inducible y específico de músculo esquelético mediante el uso del sistema Cre/LoxP. Las hembras homocigotas para Bmall "floxeado" por secuencias LoxP (Bmall<sup>flox/flox</sup>) se cruzaron con los machos heterocigotos que expresaban de manera inducible y específica en el músculo esquelético la recombinasa Cre fusionada en cada extremo 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<sup>+/-</sup>) para obtener la generación F1 de ratones doblemente heterocigotos Bmallflox/- Cre+/-. Posteriormente, los machos de la generación F1 se cruzaron con las hembras *Bmall*<sup>flox/flox</sup>, dando lugar a la generación F2 de ratones Bmall<sup>flox/flox</sup> Cre<sup>+/-</sup> (denominados como iMS-Bmall<sup>flox/flox</sup>) necesarios para el estudio. Para generar el ratón iMS-Bmal1<sup>-/-</sup>, se activó la recombinación Cre/LoxP inducida por tamoxifeno en ratones iMS-Bmallflox/flox mediante inyecciones intraperitoneales (i.p.) de tamoxifeno, lo que resulta en la eliminación de las secuencias "floxeadas", es decir, del gen Bmal1, en los músculos esqueléticos. A nivel molecular, normalmente, la proteína Cre fusionada se presenta en el citoplasma de las células en las que se expresa unida a la proteína HSP90. Al unirse a los esteroides sintéticos (como el tamoxifeno), la interacción entre HSP90 y la recombinasa Cre fusionada se interrumpe. Esto provoca la translocación nuclear de esta última y la interacción de Cre con los sitios LoxP.

Los ratones se genotiparon mediante PCR utilizando ADN genómico aislado de muestras de cola, siguiendo el protocolo proporcionado por The Jackson Laboratory. Fundamentalmente, las muestras de cola fueron digeridas con proteinasa K (PROK-50, Omega Bio-tek, Norcross, GA, EE. UU.) y el ADN se extrajo con isopropanol y se cuantificó por densitometría óptica a 260/280 nm en NanoDrop (NanoDrop ND-1000 V3.5.2, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE. UU.). Los cebadores utilizados para la detección del gen *Bmal1* entre dos sitios LoxP y del transgén Cre, así como los posibles productos de ADN obtenidos, se resumen en la Tabla 2. La separación del producto de PCR se llevó a cabo en un gel de agarosa al 2% (0,005% de solución de tinción de ácidos nucleicos RedSafe (21141, iNtRON Biotechnology, Burlington, MA, EE. UU.) para visualizar los productos de ADN.

	B6.129S4(Cg)-Arntl <sup>tm1Weit</sup> /J			B6.Cg-Tg(ACTA1- cre/Esr1*)2Kesr/J	
Forward $(5' \rightarrow 3')$	ACT GGA AGT AAC TTT ATC AAA CTG			AGG TGG ACC TGA TCA TGG AG	
Reverse $(5' \rightarrow 3')$	CTG ACC AAC TTG CTA ACA ATT A			ATA CCG GAG ATC ATG CAA GC	
Internal Positive Control Forward (5' → 3')				CTA GGC CA GAA AGA TO	C AGA ATT CT
Internal Positive Control Reverse (5' → 3')				GTA GGT GC AGC ATC AT	GA AAT TCT TC C
Expected Results	Mutant = 431 bp	Heterozygote = 327 bp and 431 bp	Wild type = 327 bp	Transgene = 440 bp	Internal positive control = 324 bp

**Tabla 2.** Cebadores utilizados para la detección del gen *Bmal1* "floxeado" y del transgén Cre y posibles resultados obtenidos.

Los ratones iMS-*Bmal1*<sup>flox/flox</sup> se trataron con vehículo, para obtener controles, o se trataron con tamoxifeno (T5648, Sigma-Aldrich, Madrid, España), para generar los ratones *knockout* condicionales (iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup>). Para generar el ratón iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup>, se activó la recombinación Cre/LoxP inducida por tamoxifeno en ratones iMS-*Bmal1*<sup>flox/flox</sup> mediante inyecciones intraperitoneales (i.p.) de tamoxifeno a dosis de 2 mg/día durante cinco días consecutivos cuando los ratones alcanzaron las 12 semanas de edad, lo que resulta en la eliminación de las secuencias "floxeadas" en los músculos esqueléticos de las extremidades, cara/lengua y diafragma. Los animales control consistieron en ratones iMS-*Bmal1*<sup>flox/flox</sup> de 12 semanas de edad tratados con vehículo (15% de etanol en aceite de girasol), que mantienen el gen *Bmal1* en los músculos esqueléticos (Figuras 8 y 9).

Los ratones se mantuvieron en la instalación de animales libre de patógenos específicos (SPF) del Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada, a 22 °C  $\pm$  1 °C y con un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad, con luz encendida a las 08:00 h, y se les proporcionó dieta y agua del grifo *ad libitum*.

Los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo 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 ley española para experimentación animal (R.D. 53/2013). El protocolo fue aprobado por el Comité Ético de Andalucía (#29/05/2020/069).

### 1.2. Análisis de la especificidad de recombinación

El análisis de la especificidad de recombinación se llevó a cabo mediante PCR y *western blot*. Los ratones iMS-*Bmal1*<sup>flox/flox</sup> fueron inyectados (vía intraperitoneal) ya sea con vehículo (iMS-*Bmal1*<sup>flox/flox</sup>) o tamoxifeno (iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup>) a las 12 semanas de edad. Tres y cinco semanas después de la inyección, es decir, a las semanas 15 y 17 de edad, los ratones fueron anestesiados por inyección i.p. de equitesina (1 mL/kg) y sacrificados, y se extrajeron el músculo gastrocnemio y el hígado, los cuales fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C hasta su análisis.

El ADN genómico fue extraído de los tejidos como se describió previamente. Para evaluar la especificidad de la recombinación, se llevó a cabo una PCR con el ADN de los tejidos y cebadores para los alelos recombinados y no recombinados, como se describe en Hodge et al (Hodge et al., 2015). Los cebadores 5' y 3' para el alelo no recombinado fueron los mismos que los cebadores usados en el genotipado y produjeron un producto de 431 Se incluyó segundo cebador 5'pares de bases. un CTCCTAACTTGGTTTTTGTCTGT-3' para detectar el alelo recombinado, que mostró una banda a 572 pares de bases. La separación del producto de PCR se llevó a cabo en un gel de agarosa al 2% (0,005% de solución de tinción de ácidos nucleicos RedSafe) para visualizar los productos de ADN.

Para el análisis por *western blot*, las muestras de GM e hígado se homogeneizaron en un reactivo de extracción de proteínas de tejidos (78510, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España), al que se añadió un cóctel de inhibidores de proteasas (78429, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España), se sonicaron y se centrifugaron a  $1000 \times g$  durante 15 minutos a 4 °C. Las proteínas se cuantificaron mediante ensayo de Bradford y se desnaturalizaron a 99 °C durante 5 minutos. Luego, se cargaron 50 µg de proteína de muestra en un gel SDS-PAGE al 12% y la electroforesis se llevó a cabo utilizando el sistema de electroforesis mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Madrid, España). La transferencia de las proteínas a la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) se realizó en una celda Mini Trans-Blot (Bio-Rad, Madrid, España) y las interacciones proteína-anticuerpo se detectaron utilizando anticuerpos secundarios IgG de caballo conjugados con peroxidasa (anti-ratón o anti-conejo), utilizando un sustrato de *western blotting* de quimioluminiscencia mejorada (ECL) (1705061, Bio-Rad, Madrid, España). Las bandas se detectaron con el sistema de imagen ChemiDoc MP (Bio-Rad, Madrid, España) y se cuantificaron con el software Image Lab (Bio-Rad, Madrid, España). Los anticuerpos primarios fueron anti-BMAL1 (14268-1-AP, Proteintech, Manchester, Reino Unido), y anti-GAPDH (sc-166574, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania) como control de carga.

### **1.3. Tratamientos**

Los animales fueron separados por sexo y divididos en los siguientes cinco grupos (n = 36 animales por grupo (18 machos y 18 hembras)) (Figura 9): (a) iMS-*Bmal1*<sup>flox/flox</sup> tratados con vehículo (control), (b) iMS-*Bmal1*<sup>flox/flox</sup> tratados con tamoxifeno (TMX) para generar iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup> (ratón *knockout* condicional para *Bmal1*), (c) iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup> tratados con ejercicio (TMX + E), (d) iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup> tratados con melatonina (TMX + aMT), y (e) iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup> tratados con ejercicio más melatonina (TMX + E + aMT).

El ejercicio consistió en 2 semanas en una cinta de correr horizontal (5 días/semana, 30 minutos/día, hasta una velocidad de 30 cm/s, más 2 días de recuperación/semana, necesarios para reducir el estrés en los animales, según informes previos (Xu et al., 2020)), comenzando a las 12 semanas de edad (Figura 9).

La melatonina se administró a una dosis de 10 mg/kg/día en la dieta durante 2 semanas, comenzando cuando los animales alcanzaron las 12 semanas (Figura 9), según estudios previos que muestran la eficacia de esta dosis en la prevención de la sarcopenia dependiente de la edad (Rodríguez et al., 2007; Sayed et al., 2019; Sayed et al., 2018). La preparación del pienso con melatonina se realizó por la Unidad de Producción de Dietas de la Universidad de Granada. La cantidad de melatonina en el pienso para roedores (50 mg/kg de pienso) se calculó según el consumo promedio diario de alimento, el número, peso y edad de los ratones (Bachmanov et al., 2002), para asegurar que cada ratón recibiera 10 mg/kg de peso corporal diariamente. La concentración de melatonina en el

pienso se verificó mediante HPLC (concentración teórica = 50 mg/kg de pienso vs. concentración medida =  $47,2 \pm 2,0$  mg/kg de pienso).



#### WEEKS OF AGE

**Figura 9. Resumen del diseño del estudio: grupos experimentales y tratamientos.** Los tratamientos con tamoxifeno o vehículo (verde) se realizaron durante la semana 12 de edad. Los tratamientos con ejercicio y/o melatonina (rojo) comenzaron en la semana 12 y continuaron durante dos semanas (semanas 12 y 13). El análisis del ritmo circadiano de la actividad locomotora (azul) comenzó en la semana 14 de edad en condiciones de LD (ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad), luego los ratones fueron cambiados a condiciones de DD (oscuridad total durante 24 horas) durante dos semanas adicionales (semanas 15 y 16). La actividad física, la microscopía óptica y electrónica y el análisis del perfil de tipos de fibras (azul) se realizaron durante la semana 15.

No medimos los niveles de melatonina en nuestros grupos experimentales. Sin embargo, hemos publicado en otros artículos los niveles de melatonina alcanzados después de la administración *in vivo* de esta dosis en ratas y en ratones. La administración de 10 mg/kg/día de melatonina aumentó el contenido de melatonina en todos los compartimentos subcelulares de manera dosis-dependiente. En ratas, la administración de melatonina a 10 mg/kg incrementó los niveles de la indolamina en sangre hasta 2.350 ng/mL después de 1 hora de administración y 300 pg/mg de proteína después de 2 horas

en todos los compartimentos subcelulares. En ratones, 10 mg/kg de melatonina aumentaron sus niveles endógenos en las mitocondrias hasta 175 pg/mg de proteína.

Todos los análisis se llevaron a cabo cuando los ratones alcanzaron las 15 semanas de edad, excepto la evaluación del ritmo circadiano de la actividad locomotora, que comenzó en la semana 14 (Figura 9).

### 1.4. Justificación del diseño experimental

Se eligió la edad de 12 semanas para comenzar con las inyecciones de tamoxifeno para eliminar cualquier efecto que la falta de *Bmal1* pudiera tener en el desarrollo del músculo esquelético y en el rápido crecimiento que ocurre durante la maduración postnatal. Se llevaron a cabo experimentos preliminares para evaluar la duración del efecto del tamoxifeno. Nuestros datos mostraron que 5 días de administración de tamoxifeno (semana 12) fueron suficientes para inhibir *Bmal1* durante al menos 5 semanas (de las 12 a las 17 semanas de edad, Figura A1). Por lo tanto, solo inyectamos tamoxifeno durante este período de tiempo asegurando la ausencia de *Bmal1* durante todo el diseño experimental. Para realizar el análisis, elegimos la edad de 15 semanas (3 semanas después de la inyección con tamoxifeno) porque fue suficiente para la aparición de alteraciones significativas en el músculo esquelético causadas por la pérdida de *Bmal1*.

En segundo lugar, queríamos evaluar si los tratamientos (melatonina y/o ejercicio) podían contrarrestar los efectos de la ausencia de *Bmal1* en el músculo esquelético en comparación con el vehículo. Para esto, llevamos a cabo diferentes evaluaciones de distinta duración. El análisis más prolongado fue la evaluación circadiana porque necesitábamos tres semanas, una para la condición de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad (LD) y 2 semanas para la condición de oscuridad total (DD), y estas se llevaron

a cabo entre las semanas 14 y 17, justo después de finalizar los tratamientos. Por ello, los tratamientos se realizaron solo durante dos semanas, en las semanas 12 y 13. Después de la primera semana en condiciones "control", es decir, condiciones de LD durante la semana 14, los animales continuaron durante 2 semanas adicionales bajo condiciones de DD durante las semanas 15 y 16. Otros grupos de animales con el mismo horario de LD durante la semana 14, se utilizaron en la semana 15 para las pruebas de actividad física, estudios histológicos y de microscopía electrónica (Figura 9). Con este programa, analizamos la condición del músculo esquelético al mismo tiempo en todos los grupos, es decir, 3 semanas después de las invecciones con tamoxifeno y una después de finalizar los tratamientos y, al mismo tiempo, evaluamos si dos semanas de tratamientos eran suficientes para proteger el músculo. Este paradigma experimental fue elegido porque en artículos previos mostramos que dos meses de terapia con melatonina fueron suficientes para prevenir y recuperar de la sarcopenia en ratones de edad avanzada (modelo crónico) (Sayed et al., 2019; Sayed et al., 2018). Por lo tanto, en el modelo agudo utilizado aquí, se espera que dos semanas de tratamiento con melatonina tengan un efecto protector similar.

Por último, no se realizó ningún tratamiento con ejercicio (y, por ende, tampoco con melatonina) durante la evaluación del ritmo circadiano de la actividad locomotora porque durante la evaluación de este, los animales se mantuvieron en jaulas individualizadas colocadas en un gabinete cerrado ventilado con control de luz. Durante las 3 semanas del experimento, no se les podía perturbar, solo para renovar el agua, para asegurar un análisis circadiano de confianza. Por lo tanto, no pudimos sacar a los animales de la jaula para realizar el tratamiento con ejercicio en la cinta.

53

# 2. Análisis del ritmo circadiano de la actividad locomotora

Se utilizó una cohorte de ratones para el análisis del comportamiento circadiano, siguiendo un Protocolo Básico normalizado (Banks & Nolan, 2011). Se recopilaron los datos de actividad de carrera en rueda de un total de 12 ratones (6 machos y 6 hembras) de cada grupo experimental. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales con una rueda para correr (Actimetrics, Wilmette, IL, EE. UU.) ubicadas en un gabinete ventilado con control de luz. Se registró la actividad bajo un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad durante 7 días, siguiendo la adaptación de los animales a este horario. Luego, los animales fueron mantenidos en completa oscuridad durante 14 días y todas las grabaciones fueron analizadas utilizando el programa ClockLab (Actimetrics, Wilmette, IL, EE. UU.). Se obtuvieron actogramas y perfiles de actividad, usados para representar los ritmos de actividad circadianos, el período circadiano (calculado utilizando el periodograma de Chi-cuadrado), como medida del reloj circadiano interno de los animales, y otros parámetros circadianos.

# 3. Análisis de la actividad física

# 3.1. Evaluación de la actividad locomotora espontánea, resistencia y fatiga

La actividad locomotora espontánea de los animales experimentales fue evaluada en una prueba de campo abierto como se describió previamente (Sayed et al., 2018). La prueba de campo abierto consistió en una caja de seguimiento individualizada, con paredes opacas para que los ratones no pudieran ver la habitación. Cada animal fue colocado en

el centro del área de las 9 pm en adelante, bajo exposición a luz roja, con acceso *ad libitum* a agua y alimento, y su movimiento fue monitoreado mediante el sistema de seguimiento de video SMART (Panlab Harvard Apparatus SMART v.3.0.03, Barcelona, España). Los animales fueron monitoreados durante 30 minutos después de un tiempo de adaptación de 30 minutos. Se cuantificaron la distancia total, el tiempo de descanso y la velocidad promedio de cada ratón. Se adquirieron imágenes digitales que representaban los mapas de la actividad locomotora.

Se evaluó la resistencia y fatiga utilizando una prueba en la cinta de correr como se describió anteriormente (Sayed et al., 2018). Antes de la prueba de la cinta, los ratones se adaptaron durante 3-5 días a una velocidad constante de 9 cm/s durante 20 minutos para familiarizarse con el aparato de dicha cinta (Panlab Harvard Apparatus LE8710 Treadmill Controller, Barcelona, España) y las estimulaciones aversivas. El día del experimento, la velocidad del aparato se ajustó inicialmente a 9 cm/s durante 5 minutos y luego la velocidad se incrementó en 2 cm/s cada minuto hasta que el ratón alcanzó el agotamiento. Se consideró punto de agotamiento cuando los ratones dejaron de correr en la cinta durante más de 10-20 segundos. Se cuantificaron el tiempo de agotamiento y la distancia recorrida por cada animal.

### **3.2.** Cálculo del índice de fragilidad

Se ha propuesto y validado un índice de fragilidad que se correlaciona con el índice humano en animales, incluyendo ratones y primates (Martinez de Toda et al., 2018). Por consiguiente, y utilizando los criterios clínicos para humanos, calculamos el FI a partir de los datos de análisis zoométricos y de actividad física muscular. Este cálculo utiliza las siguientes variables: peso = relación de peso del músculo gastrocnemio/peso corporal; resistencia = tiempo de descanso y tiempo de agotamiento; lentitud = velocidad promedio; y actividad física = distancia total y distancia recorrida. Los datos correspondientes a los grupos control de machos y hembras se utilizaron como valores de referencia, y el FI se calculó como se describe en Sayed et al (Sayed et al., 2018) (consultar Tabla A2). Por lo tanto, un aumento en el FI indica un deterioro de los animales, y un FI disminuido (negativo) indica una mejora en la condición física de los animales en comparación con los grupos control.

# 4. Análisis histológicos y de microscopía electrónica

### 4.1. Preparación del tejido

Después de los estudios de fenotipado, los animales fueron pesados, anestesiados por inyección intraperitoneal de equitesina (1 mL/kg) y sacrificados para obtener el músculo gastrocnemio para estudios histológicos y de microscopía electrónica de transmisión (TEM) (R. K. Sayed et al., 2016).

Los ratones utilizados para procedimientos histológicos fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se extrajeron los GM, los cuales fueron pesados, embebidos en una cantidad adecuada de OCT (KMA-0100-00A, CellPath Ltd, Mochdre, Reino Unido), congelados en isopentano enfriado con nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C hasta su posterior análisis.

Los animales utilizados para TEM fueron perfundidos vía intracardiaca con solución salina tibia seguida de una solución de fijador de Trump recién preparado (3,7% de formaldehído más 1% de glutaraldehído en solución salina). Se extrajo el GM desde su origen hasta su inserción y se eliminó el exceso de tejido conectivo. Los músculos se pesaron y se sumergieron en glutaraldehído al 2,5% en buffer de cacodilato 0,1 M (pH

7,4) a 4 °C durante la noche. Antes, los músculos se dividieron en pequeños fragmentos para asegurar que el fijador llegara a todo el tejido. Luego, estas muestras se procesaron para el análisis de TEM.

### 4.2. Histología e histoquímica del músculo esquelético

Las secciones de músculo congelado se tiñeron con H&E para un examen histológico general, tinción de VG para diferenciar el tejido conectivo y las fibras musculares, y tinción de SDH para la detección de la capacidad oxidativa mitocondrial de las fibras musculares. Se obtuvieron secciones transversales de músculo congelado (10 µm de espesor) utilizando un crióstato Leica CM1850 mantenido a -20 °C y se montaron en portaobjetos de vidrio *Superfrost* (631-0108, VWR, Leuven, Bélgica). Las secciones se examinaron y se tomaron imágenes digitales con un microscopio NIKON Eclipse Ni-U equipado con una cámara Nikon DS-Ri2. Las imágenes se analizaron con el software ImageJ (Institutos Nacionales de Salud). Se adquirieron medidas morfométricas del área de sección transversal (CSA), el perímetro y el diámetro de Feret de las fibras musculares a partir de imágenes de secciones teñidas con H&E tomadas a una magnificación de objetivo de 40×, mientras que el número total de fibras musculares se obtuvo a partir de imágenes teñidas con H&E a una magnificación de 10×. El análisis del contenido de colágeno y la actividad de la SDH se realizaron a partir de imágenes de secciones teñidas con VG y SDH, respectivamente, tomadas a una magnificación de 10×.

### 4.3. Inmunofluorescencia para la identificación del tipo de fibra

Se tiñeron secciones congeladas del músculo gastrocnemio con anticuerpos monoclonales específicos para las diferentes isoformas de la cadena pesada de miosina (MyHC), siguiendo el protocolo descrito en Dyar et al (Dyar et al., 2014). Se utilizaron tres anticuerpos primarios diferentes distribuidos por el Banco de Hibridomas de Estudios del Desarrollo (DSHB, Universidad de Iowa, EE. UU.): IgG2b de ratón específico para MyHC-1 (BA-D5, sobrenadante, dilución 1:50); IgG1 de ratón específico para MyHC-2A (SC-71, sobrenadante, dilución 1:100); e IgM de ratón específico para MyHC-2B (BF-F3, concentrado, dilución 1:100). Dado que las fibras de tipo 2X no son reconocidas por estos anticuerpos, aparecen en negro. Se utilizaron anticuerpos secundarios comprados en Jackson ImmunoResearch para unirse selectivamente a cada anticuerpo primario: antiratón IgG2b de cabra marcado con DyLight 405 (115-475-207, dilución 1:200), para unirse a BA-D5; anti-ratón IgG1 de cabra marcado con Alexa Fluor 488 (115-545-205, dilución 1:200), para unirse a SC-71; y anti-ratón IgM de cabra marcado con Alexa Fluor 594 (115-585-075, dilución 1:200), para unirse a BF-F3.

Brevemente, después de la fijación en metanol, las secciones de GM de 10 μm se incubaron con un reactivo de bloqueo de IgG de ratón (MKB-2213-1, Vector Laboratories, Barcelona, España) durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se lavaron rápidamente con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se preparó una solución con todos los anticuerpos primarios en PBS que contenía un 1% de albúmina sérica bovina (BSA) y se incubaron las secciones durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de 3 lavados de 5 minutos con PBS, las secciones se incubaron durante 40 minutos a 37 °C con una solución que contenía los tres anticuerpos secundarios diferentes, diluidos en PBS que contenía un 1% de BSA. Después de 3 lavados de 5 minutos con PBS y un enjuague rápido en agua destilada, las secciones se montaron con un medio acuoso de montaje para fluorescencia (00-4958-02, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). Para excluir cualquier posible reacción cruzada, se realizó una incubación "control" sin anticuerpos primarios e incubaciones "control" con cada anticuerpo primario y anticuerpos secundarios no específicos. Las imágenes se adquirieron con un
microscopio NIKON Eclipse Ni-U equipado con una cámara Nikon DS-Ri2. Las imágenes de un solo color se fusionaron y luego se realizó el análisis de la composición del tipo de fibra utilizando el software ImageJ.

#### 4.4. Análisis de microscopía electrónica de transmisión

Las muestras fueron procesadas siguiendo el protocolo previamente descrito (Sayed et al., 2018) y examinadas con un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss Libra 120 Plus (EELS). Tras la fijación en glutaraldehído al 2,5% en un tampón de cacodilato 0,1 M (pH 7,4), pequeños fragmentos de tejido muscular se postfijaron en la misma solución, pero ahora incluyendo tetróxido de osmio al 1% y ferrocianuro de potasio al 1% durante 1 hora. Posteriormente, las muestras se trataron con ácido tánico al 0,15% durante solo 50 segundos, se incubaron en acetato de uranilo al 1% durante 1,5 horas con agitación, se deshidrataron en etanol y se incluyeron en resina. Se realizaron cortes ultrafinos de 70 nm de grosor utilizando un ultramicrótomo Leica Reichert-Jung ULTRACUT E y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Estos cortes se examinaron luego con un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss Libra 120 Plus (EELS) y se capturaron micrografías electrónicas digitales. Se realizaron mediciones de las longitudes de los sarcómeros (S), la banda anisotrópica (A), la banda isotrópica (I) y de los miofilamentos de la zona H, así como análisis del área de sección transversal (CSA), el número de mitocondrias intermiofibrilares (IFM) y el daño mitocondrial (%), todo esto sobre imágenes de TEM. Las imágenes se analizaron con el software ImageJ.

#### 5. Análisis estadístico

Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM de n = 6 animales de cada sexo por grupo (para la evaluación del ritmo circadiano de la actividad locomotora), n = 12 animales de cada sexo por grupo (para la actividad física muscular y la evaluación del índice de fragilidad), y n = 4 animales de cada sexo por grupo (para las pruebas de imagen). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Se utilizaron ANOVA de dos y tres vías para las comparaciones estadísticas y se consideró significativo cuando p < 0,05.

# RESULTADOS

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

Fernández-Martínez J, Ramírez-Casas Y, Aranda-Martínez P, López-Rodríguez A,

Sayed RKA, Escames G, Acuña-Castroviejo D. iMS-Bmal1<sup>-/-</sup> mice show evident signs of sarcopenia that are counteracted by exercise and melatonin therapies.

Journal of Pineal Research, 2023

doi:10.1111/jpi.12912

Factor de Impacto: 10,3 (D1)

### 1. Inactivación de *Bmal1* por tamoxifeno en ratones iMS-*Bmal1-/-*

Nuestros datos confirmaron la inactivación específica de *Bmal1* en el músculo esquelético adulto mediante análisis de PCR y *western blot*. La recombinación del exón-8 (es decir, la región de unión al ADN) del gen *Bmal1* se detectó específicamente en el músculo gastrocnemio de ratones iMS-*Bmal1*<sup>flox/flox</sup> tratados con tamoxifeno (es decir, ratones iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup>), tanto en machos como en hembras, a las 15 semanas de edad (3 semanas después de las inyecciones), confirmando la especificidad tisular del modelo de ratón (Figura 10A). En ratones iMS-*Bmal1*<sup>flox/flox</sup> tratados con vehículo, tanto en machos como en hembras, no se identificó recombinación en el músculo ni en el hígado (usado como ejemplo de tejido no muscular) (Figura 10A). El análisis por *western blot* confirmó la depleción de la proteína BMAL1 en el GM de ratones iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup> tanto en machos como en hembras, sin efecto en el hígado. En contraste, se detectó la presencia de BMAL1 en el músculo y el hígado de ratones iMS-*Bmal1*<sup>flox/flox</sup> tanto en machos como en hembras (Figura 10B y 10C).





2. La falta de *Bmal1* en el músculo esquelético induce un avance de fase en la actividad locomotora de los ratones, con el ejercicio y principalmente la melatonina previniendo la pérdida de ritmo

Durante el día (de 08:00 a 20:00 horas), la actividad de ratones machos y hembras no fue modificada por el tamoxifeno o las intervenciones con ejercicio y/o melatonina. Sin embargo, se produjo una reducción significativa en la actividad durante la noche (de 20:00 a 08:00 horas) en ambos sexos de ratones TMX, la cual fue contrarrestada con melatonina, pero no con ejercicio (Figura 11A). Los actogramas (Figura 11C), perfiles de actividad (Figura 11D) y períodos (Figura 11F) en condiciones de LD fueron bastante similares en ratones TMX machos y hembras en comparación con los controles, sin influencia de los tratamientos. Las hembras presentaron una mayor actividad que los machos durante la noche, siendo significativa en el grupo control (Figura 11A). Estos cambios también se reflejaron en los actogramas (Figura 11C) y perfiles de actividad (Figura 11D). El período circadiano en condiciones de LD no mostró variabilidad entre los sexos y no dependió de una interacción entre el momento del día, el sexo o el tratamiento después del análisis de ANOVA de tres vías (Figura 11F).

<sup>(</sup>B) Análisis por *western blot* de la expresión de BMAL1 y (C) cuantificación en muestras de GM e hígado de ratones machos y hembras iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup> e iMS-*Bmal1*<sup>flox/flox</sup>. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6 animales/grupo (3 machos y 3 hembras)). \*\*\* p < 0,001 vs. iMS-*Bmal1*<sup>flox/flox</sup>.

Posteriormente, los ratones se colocaron en condiciones de DD durante 14 días para obtener las mediciones locomotoras circadianas en condiciones de oscilación espontánea. El comportamiento de los ratones fue similar al de los estudios de LD. Aquí, la falta de Bmal1 no alteró la actividad de los animales de ambos sexos en el día subjetivo (de 08:00 a 20:00 horas), pero disminuyó significativamente su actividad en la noche subjetiva (de 20:00 a 08:00 horas), en comparación con los controles. El ejercicio y/o la melatonina tampoco afectaron la actividad locomotora durante el día subjetivo, pero, de manera similar a los estudios de LD, la melatonina tendió a contrarrestar la pérdida de actividad en los ratones TMX durante la noche (Figura 11B). Los actogramas de los animales TMX machos y hembras en condiciones de DD mostraron un avance en el inicio de la actividad (avance de fase) más temprano y más pronunciado en comparación con los controles, especialmente en las hembras. La melatonina, pero no el ejercicio, restauró completamente el ritmo normal de actividad/descanso en ambos sexos (Figuras 11C y 11E). Estas variaciones en los ritmos de actividad circadiana se confirmaron mediante cambios en el período circadiano en condiciones de DD, que fue significativamente más corto en las ratonas TMX en comparación con los controles. El ejercicio y/o la melatonina aumentaron el período de oscilación espontánea en los machos y principalmente en las hembras (Figura 11F). Nuevamente, las hembras presentaron una mayor actividad locomotora que los machos en la noche subjetiva y, en el día subjetivo, solo fue significativa en el grupo TMX + E + aMT (Figuras 11B, 11C y 11E). El período circadiano en condiciones de DD no mostró diferencias significativas entre los sexos y, nuevamente, no dependió de una interacción entre el momento del día, el sexo o el tratamiento después del análisis de ANOVA de tres vías (Figura 11F) (consultar Tabla A1).



Figura 11. Variaciones en el ritmo circadiano de la actividad locomotora con la falta de *Bmal1* en GM y el efecto cronobiótico de los tratamientos de ejercicio y/o melatonina. (A) Análisis de la actividad luz/oscuridad en condiciones de LD y (B) actividad luz/oscuridad subjetiva en condiciones de DD en ratones machos y hembras (y ambos juntos) control, TMX, TMX + E, TMX + aMT y TMX + E + aMT mantenidos en jaulas con ruedas de ejercicio. (C) Actogramas representativos de los mismos grupos de animales, primero sincronizados en condiciones de LD durante 7 días, y luego mantenidos en oscuridad constante (DD) durante 14 días en jaulas con ruedas de ejercicio. Las zonas grises representan la oscuridad. (D) Perfiles de actividad locomotora para ratones machos y hembras (y también ambos juntos) control, TMX, TMX + E, TMX + aMT y TMX + E + aMT mantenidos en condiciones de LD y (E) de DD en jaulas con ruedas de ejercicio. (F) Análisis del período circadiano en los mismos grupos de animales en condiciones de LD y de DD. Los datos se expresan como media ± SEM (n = 12 animales/grupo (6 machos y 6 hembras)). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 vs. control; # p < 0,05, ## p < 0,01, ### < 0,001 vs. TMX; \$ p < 0,05, \$\$ p < 0,01 vs. TMX + E + aMT; & p < 0,05 vs. machos.

3. La falta de *Bmal1* en el músculo esquelético conduce a una disminución en la actividad física en ratones que se correlaciona con un aumento en el índice de fragilidad, normalizándose con los tratamientos de melatonina y ejercicio

Los ratones machos y hembras TMX mostraron una disminución significativa en la distancia total y la velocidad promedio, y un aumento significativo en el tiempo de descanso en comparación con sus controles correspondientes en la prueba de campo abierto. El ejercicio y/o la melatonina restauraron los cambios en la distancia total, la velocidad promedio y el tiempo de descanso causados por la pérdida específica de *Bmal1* en el músculo esquelético en ambos sexos, mientras que la combinación de ambos tratamientos mostró una mayor recuperación. Hubo una tendencia a aumentar la distancia total y la velocidad promedio y disminuir el tiempo de descanso en las hembras en comparación con los machos, siendo significativo en el grupo TMX (Figura 12A). Los

mapas típicos de actividad locomotora adquirida se representan en la Figura 12B. En la prueba de la cinta, los animales TMX machos y, en menor medida, las hembras recorrieron una distancia más corta y resistieron el agotamiento durante menos tiempo que los controles. No se observó un efecto significativo del ejercicio en la actividad de los ratones machos y hembras. Sin embargo, estos cambios se revirtieron en los machos y hembras de los grupos TMX + aMT y TMX + E + aMT, lo que sugiere un efecto principal de la melatonina. No se encontraron diferencias significativas en la actividad entre los sexos (Figura 12C).

La falta de Bmal1 en el músculo esquelético no modificó el peso corporal de los ratones machos y hembras TMX. En contraste, se observó una disminución significativa en el peso del GM y la relación entre el peso del GM y el peso corporal en machos y hembras del grupo TMX en comparación con los controles. No se encontró ningún efecto del tratamiento con melatonina en el peso corporal, el peso del GM y la relación entre el peso del GM y el peso corporal en los animales machos y hembras. De manera similar, la intervención con ejercicio no modificó el peso corporal en ratones machos y hembras. Sin embargo, aumentó el peso del GM y la relación entre el peso del GM y el peso corporal, como se refleja en los grupos TMX + E y TMX + E + aMT, aunque sin alcanzar los niveles de los grupos control. Además, las hembras de todos los grupos experimentales mostraron valores significativamente más bajos para el peso corporal y el peso del GM en comparación con los machos, como era de esperar. No se observaron variaciones entre los ratones machos y hembras en la relación entre el peso del GM y el peso corporal, excepto en los grupos de tratamiento, que presentaron valores más bajos en las hembras, sugiriendo un mayor efecto del ejercicio y/o la melatonina en los machos que en las hembras (Figura 12D).

La Figura 12E y la Tabla A2 muestran el índice de fragilidad calculado a partir de la actividad física (Figuras 12A y 12C) y los datos zoométricos (Figura 12D) para cada grupo experimental. La pérdida de *Bmal1* en el músculo esquelético incrementó el FI, y las intervenciones con ejercicio y melatonina por separado normalizaron el FI recuperando el deterioro físico de los ratones machos y hembras TMX. El tratamiento de ejercicio más melatonina redujo aún más el estado de fragilidad de los ratones machos y hembras TMX, aunque solo se detectó un efecto sinérgico en las hembras. No hubo diferencias en el FI entre los sexos (consultar Tabla A1).



Figura 12. Cambios en la actividad física, parámetros zoométricos y el índice de fragilidad con la pérdida de *Bmal1* en el GM y el efecto protector de los tratamientos con ejercicio y/o melatonina. (A) Análisis de la prueba de campo abierto mediante seguimiento de video en ratones machos y hembras de los grupos control, TMX, TMX + E, TMX + aMT y TMX + E + aMT. (B) Imágenes de la actividad locomotora capturadas por el sistema de seguimiento de video SMART. (C) Análisis en cinta de correr de los mismos grupos de animales. (D) Análisis del peso corporal, peso del GM y relación del peso del GM con el peso corporal en ratones machos y hembras de

los grupos control, TMX, TMX + E, TMX + aMT y TMX + E + aMT. (E) Índice de fragilidad calculado para cada grupo experimental en comparación con sus respectivos grupos control de machos y hembras (utilizados como valores de referencia). Los valores positivos indican índices de fragilidad más altos, mientras que los valores negativos indican una mejora en la condición de fragilidad. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 24 animales/grupo (12 machos y 12 hembras)). \* 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; & p < 0,05, & p < 0,01, & 0,01, & 0,01, & 0,01 vs. TMX + E + aMT; & p < 0,05, & 0,01, & 0,01, & 0,01 vs. TMX + E + aMT; & p < 0,05, & 0,01, & 0,01, & 0,01 vs. TMX + E + aMT; & p < 0,05, & 0,01, & 0,01, & 0,01 vs. TMX + E + aMT; & p < 0,05, & 0,01, & 0,01, & 0,01 vs. TMX + E + aMT; & p < 0,05, & 0,01, & 0,01 vs. TMX + E + aMT; & p < 0,05, & 0,01, & 0,01 vs. TMX + E + aMT; & 0,001 vs.

4. La falta de *Bmal1* en el músculo esquelético induce una reducción en la actividad de la SDH y cambios en los tipos de fibras del GM, los cuales se normalizaron después de las intervenciones con melatonina y ejercicio

Examinamos la actividad de la SDH y la composición de los tipos de fibras en las regiones profundas y superficiales del músculo gastrocnemio, debido a la presencia de dos áreas distintas con diferente capacidad oxidativa mitocondrial en este músculo (Chang et al., 2018). La ausencia de *Bmal1* redujo significativamente la actividad de la SDH en la región profunda del GM en machos y hembras en comparación con los controles, sin cambios en el GM superficial. La administración de melatonina aumentó aún más la actividad de la SDH en las áreas profundas y superficiales del GM en ambos sexos. El ejercicio mejoró la capacidad oxidativa mitocondrial en las áreas profundas y superficiales del GM en machos, pero no en hembras (Figuras 13A y 13B).

El perfil de tipos de fibras en ratones TMX machos y hembras fue comparable al de los controles, con el GM profundo predominantemente compuesto por fibras tipo 2A y 2B, y pocas fibras tipo 1 y 2X, y el GM superficial compuesto casi en su totalidad por

fibras tipo 2B. Sin embargo, el análisis cuantitativo reveló un aumento significativo de las fibras tipo 2A y una reducción de las fibras tipo 2B en la región profunda del GM en machos TMX, sin cambios en hembras. Las intervenciones con ejercicio y/o melatonina restablecieron el porcentaje normal de fibras tipo 2A y 2B en la región profunda del GM en machos. En otros casos, los tratamientos no modificaron el perfil de tipos de fibras (Figuras 13C y 13D). Como se muestra en la Figura 13D, el análisis cuantitativo reveló pequeñas variaciones en la composición de las fibras musculares entre los sexos en algunos grupos experimentales (consultar Tabla A1).



**Figura 13. Cambios en la capacidad oxidativa mitocondrial y el perfil de tipos de fibras con la falta de** *Bmal1* **en el GM profundo y superficial, y el efecto protector de los tratamientos con ejercicio y/o melatonina.** (A) Imágenes de microscopía óptica de secciones transversales del músculo gastrocnemio profundo y superficial de los ratones machos y hembras de los grupos control, TMX, TMX + E, TMX + aMT y TMX + E + aMT, teñidas con tinción de succinato deshidrogenasa. Un color azul más intenso indica una mayor actividad de la SDH. La barra de

escala es de 200 µm. (B) Análisis cuantitativo de la actividad de la SDH en el GM profundo y superficial de los mismos grupos de animales. (C) Imágenes de inmunofluorescencia de secciones transversales del GM profundo y superficial de los ratones machos y hembras de los grupos control, TMX, TMX + E, TMX + aMT y TMX + E + aMT, teñidas con anticuerpos anti-miosina específicos para las cadenas pesadas de miosina tipo 1/lenta (azul), tipo 2A (verde) y tipo 2B (rojo). Las fibras de tipo 2X no están teñidas y aparecen en negro. La barra de escala es de 200 µm. (D) Cuantificación de la proporción relativa de los diferentes tipos de fibras en el GM profundo y superficial de los mismos grupos de animales. Los datos obtenidos en el análisis cuantitativo se expresan como media ± SEM (n = 8 animales/grupo (4 machos y 4 hembras)). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 vs. control; # p < 0,05, ## p < 0,01, ### p < 0,001 vs. TMX; \$\$ p < 0,01 vs. TMX + E + aMT; && p < 0,01, && p < 0,001 vs. machos.

### 5. La falta de *Bmal1* en el músculo esquelético revela cambios histológicos y morfométricos en el GM, que son contrarrestados por la melatonina y el ejercicio

El músculo gastrocnemio de los controles machos y hembras mostró una estructura muscular normal (Leyenda Figura 5). Las fibras musculares del músculo esquelético de animales machos y hembras que carecían de *Bmal1* en el músculo esquelético mostraron algunos cambios, incluyendo atrofia de las fibras musculares y un aumento significativo en el contenido de colágeno. Sin embargo, los músculos estaban correctamente dispuestos y los núcleos se encontraban en posición periférica. Las intervenciones con ejercicio y/o melatonina tuvieron un efecto protector en las fibras musculares de los ratones TMX machos y hembras. Ambas terapias preservaron la arquitectura normal de las fibras, restaurando el tamaño normal de las fibras y reduciendo, en parte, las acumulaciones de tejido colágeno. No se encontraron variaciones en la estructura de las fibras musculares entre los sexos. El análisis del contenido de colágeno no reveló cambios entre los sexos, excepto en el grupo TMX + aMT, que presentó una mayor acumulación de colágeno en las hembras (Figuras 14A, 14C y 14D).

Morfométricamente, la pérdida de *Bmal1* en el músculo esquelético indujo una disminución significativa en el área de sección transversal individual de las fibras musculares, el perímetro y el diámetro de Feret en los ratones TMX machos y una ligera reducción de estos parámetros en las hembras TMX, en comparación con sus respectivos controles. Sin embargo, se observó un aumento en el número de fibras musculares en ambos ratones machos y hembras TMX en comparación con los controles. El ejercicio y/o la melatonina aumentaron el CSA de las fibras musculares, el perímetro y el diámetro de Feret en ratones machos y hembras, y disminuyeron el número de fibras en los músculos de los machos, sin efectos significativos en el número de fibras en las hembras. Las hembras presentaron un mayor número de fibras musculares que los machos. El CSA individual de las fibras musculares, el perímetro y el diámetro con el tratamiento combinado de ejercicio y melatonina en las hembras en comparación con los machos (Figura 14B) (consultar Tabla A1).



Figura 14. Cambios histológicos y morfométricos en el GM debido a la falta de Bmal1 y el efecto protector de los tratamientos con ejercicio y/o melatonina. (A) Imágenes de microscopía óptica de secciones transversales del músculo gastrocnemio de ratones machos y hembras en los grupos control, TMX, TMX + E, TMX + aMT y TMX + E + aMT, teñidas con hematoxilina y eosina. Observar la estructura normal de los músculos de los machos y hembras del grupo control, que consisten en haces de fibras musculares (MF) separados por espacios estrechos de endomisio (e) y perimisio (P), con capilares sanguíneos (BC) y fibras nerviosas (Ne) incrustadas en estos espacios, los cuales son soportados por una pequeña cantidad de fibras de colágeno (Col). Las fibras individuales son multinucleadas, y los núcleos se ubican periféricamente. Las flechas señalan los núcleos. La barra de escala es de 50 µm. (B) Análisis morfométrico del área de sección transversal de las fibras, el perímetro, el diámetro de Feret y el número de fibras musculares en el GM de los mismos grupos de animales. (C) Imágenes de microscopía óptica de secciones transversales del GM de ratones machos y hembras en los grupos control, TMX, TMX + E, TMX + aMT y TMX + E + aMT, teñidas con la tinción de Van Gieson. Col, fibras de colágeno. Las acumulaciones de colágeno aparecen en rosa. La barra de escala es de 50 µm. (D) Análisis cuantitativo del contenido de colágeno en el GM de los mismos grupos de animales. Los datos obtenidos en el análisis morfométrico y cuantitativo se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 8 animales/grupo (4 machos y 4 hembras)). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 vs. control; # p < 0.05, # p < 0.01, # # p < 0.001 vs. TMX; \$ p < 0.01 vs. TMX + E + aMT; & p < 0.05, &&& p < 0.001 vs. machos.

## 6. La falta de *Bmal1* en el músculo esquelético provoca alteraciones ultraestructurales en las mitocondrias intermiofibrilares del GM, que son revertidas con el tratamiento de melatonina, pero no con el ejercicio

La microscopía electrónica de transmisión de las miofibrillas del músculo gastrocnemio (Figura 15A) y las mitocondrias intermiofibrilares (Figura 16A) en ratones machos y hembras control reveló una arquitectura ultraestructural del músculo esquelético normal (Leyenda Figura 15). Sin embargo, la falta de *Bmal1* indujo la desorganización del retículo sarcoplásmico (asteriscos rojos) y la destrucción de las crestas de las IFM (asteriscos negros), donde algunas IFM presentaban vacuolas de varios tamaños (flechas

rojas). La terapia de ejercicio tuvo poco impacto en la preservación de la orientación de las miofibrillas, el daño de las IFM y la desorganización del retículo sarcoplásmico. Sin embargo, estas alteraciones fueron interesantemente evitadas con la administración de melatonina.

Desde el punto de vista morfométrico, los ratones machos no mostraron cambios significativos en la longitud del sarcómero entre los grupos experimentales. Sin embargo, las ratonas TMX tratadas con ejercicio aumentaron la longitud del sarcómero. La falta de *Bmal1* se asoció con una disminución significativa en la longitud de la banda A en los animales machos. Las terapias con ejercicio y/o melatonina no mostraron efecto en los grupos. La longitud de la banda I mostró cambios no significativos entre los grupos de machos. Sin embargo, en las hembras, el único aumento significativo se encontró en las ratonas TMX tratadas con melatonina. La longitud de la zona H se incrementó significativamente en los ratones machos TMX, y este aumento se restauró significativamente con las intervenciones de melatonina y con ejercicio más melatonina (Figura 15B).



Figura 15. Alteraciones ultraestructurales en las miofibrillas del GM con la falta de *Bmal1* y el efecto profiláctico de los tratamientos con ejercicio y/o melatonina. (A) Micrografías electrónicas de transmisión del músculo gastrocnemio de ratones machos y hembras en los grupos control, TMX, TMX + E, TMX + aMT y TMX + E + aMT. Observar la disposición normal de las miofibrillas en machos y hembras del grupo control (Mf), que están compuestas por miofilamentos delgados y gruesos. Los finos miofilamentos de actina están unidos a la línea Z (Z), y sus otros extremos ingresan en la banda A (A), donde terminan en la zona H (H). Los

gruesos miofilamentos de miosina se extienden a lo largo de la banda A. Por lo tanto, hay una banda I (I) a ambos lados de la línea Z. El intervalo entre dos líneas Z sucesivas se conoce como sarcómero (S). Los espacios intermiofibrilares muestran un retículo sarcoplásmico orientado de manera normal (flechas blancas) y las mitocondrias intermiofibrilares compactas (flechas negras). Asterisco negro, IFM con crestas destruidas; Asterisco rojo, espacio intersticial amplio con retículo sarcoplásmico interrumpido; Flecha roja, vacuolas mitocondriales. La barra de escala es de 1 µm. (B) Análisis morfométrico de la longitud del sarcómero, banda A, banda I y zona H. Los datos obtenidos en el análisis morfométrico y cuantitativo se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 8 animales/grupo (4 machos y 4 hembras)). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 vs. control; # p < 0,05, ## p < 0,01 vs. TMX; \$ p < 0,05, \$\$ p < 0,01 vs. TMX + E + aMT; && p < 0,01 vs. machos.

La falta de *Bmal1* indujo un aumento significativo en el área de sección transversal de las IFM en ambos sexos, y este aumento fue reducido por las terapias de melatonina y ejercicio. Además, el tamoxifeno redujo significativamente el número de IFM, y esta reducción fue revertida en machos y hembras con la intervención de melatonina, pero no con el ejercicio. La pérdida de *Bmal1* indujo un aumento significativo en el porcentaje de daño mitocondrial. La intervención con ejercicio mantuvo e incluso aumentó el daño en machos, pero lo redujo en hembras. El tratamiento con melatonina mostró una disminución significativa en el daño mitocondrial en ambos sexos. El ejercicio y la melatonina juntos redujeron significativamente el daño en las IFM inducido por el tamoxifeno en ambos sexos (Figura 16B) (consultar Tabla A1).



**Figura 16.** Alteraciones ultraestructurales en las mitocondrias intermiofibrilares del GM con la falta de *Bmal1* y el efecto protector de los tratamientos con ejercicio y/o melatonina. (A) Micrografías electrónicas de transmisión de las IFM en el músculo gastrocnemio de ratones machos y hembras en los grupos control, TMX, TMX + E, TMX + aMT y TMX + E + aMT. Flecha negra, IFM intacta; Flecha blanca, retículo sarcoplásmico orientado normalmente; Asterisco negro, IFM con crestas destruidas; Asterisco rojo, espacio intersticial amplio con retículo sarcoplásmico interrumpido; Flecha roja, vacuolas mitocondriales. La barra de escala es de 0.5 μm. (B) Análisis morfométrico del área de sección transversal de las IFM, número y

porcentaje de daño mitocondrial. Los datos obtenidos en el análisis morfométrico y cuantitativo se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 8 animales/grupo (4 machos y 4 hembras)). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 vs. control: # p < 0,05, ## p < 0,01, ### p < 0,001 vs. TMX; \$\$\$ p < 0,01 vs. TMX + E + aMT; & p < 0,05, && p < 0,01, && p < 0,001 vs. machos.

# DISCUSIÓN

Los resultados reportados aquí proporcionan las primeras pruebas que demuestran la necesidad del gen reloj *Bmal1* intrínseco del músculo para el mantenimiento de la estructura y función del músculo esquelético y la prevención de la fragilidad. Además, nuestros hallazgos en ratones deficientes en *Bmal1* en músculo esquelético comparten muchas similitudes con otros datos obtenidos en el modelo de ratón crónico y dependiente de la edad de sarcopenia (Sayed et al., 2016; Sayed et al., 2018), lo que demuestra que el primero es una herramienta útil para estos estudios.

Cada vez hay más evidencias que respaldan la relación entre cronodisrupción y enfermedad (Neves et al., 2022). Los genes reloj controlan la mayoría de las funciones cíclicas, incluidos los genes controlados por el reloj, lo que conduce a ritmos en varios sistemas fisiológicos que se ven afectados con el envejecimiento (Rijo-Ferreira & Takahashi, 2019; Yu & Weaver, 2011). Debido a que cada célula del organismo contiene su propio reloj molecular (Yu & Weaver, 2011), la alteración dependiente de la edad en la expresión de los genes reloj en el músculo esquelético debería tener consecuencias en términos de homeostasis y función muscular. En ese sentido, el gen *Bmal1* es de especial relevancia, ya que se ha demostrado que su presencia en el músculo esquelético es esencial para el mantenimiento de la salud muscular (Schroder et al., 2015; Wada et al., 2018; Zhu et al., 2022), y su expresión disminuye con la edad (Volt et al., 2016). A la luz de estas observaciones, se debe considerar una relación causal entre la reducción de la expresión de *Bmal1* en el músculo esquelético envejecido y la sarcopenia.

La asociación entre el deterioro funcional y la baja masa muscular subyace en la debilidad muscular, lo cual es importante para estimar el riesgo de mortalidad (Newman et al., 2006). En este trabajo mostramos que la eliminación inducida por tamoxifeno de *Bmal1* conduce a una disminución de la condición física y la masa muscular esquelética

en animales machos y hembras. Estos cambios resultan en un aumento en el índice de fragilidad, un signo clínico relevante de la condición de fragilidad en ratones (Martinez de Toda et al., 2018). En experimentos anteriores utilizando ratones hembras C57BL/6J jóvenes (3-4 meses), de edad temprana (12 meses) y de edad avanzada (24 meses), identificamos el inicio temprano de la sarcopenia a los 12 meses de edad, con una reducción en la actividad locomotora y la relación entre el peso del músculo gastrocnemio y el peso corporal, y un aumento en el FI, cambios que empeoraron en los animales de edad avanzada (Sayed et al., 2016; Sayed et al., 2018). Estos datos sugieren que la deficiencia de Bmall en el músculo esquelético compromete su condición física y concuerdan con informes previos que muestran que la inactivación de *Bmal1* en el músculo esquelético afecta a la marcha, movilidad y fuerza muscular (Hodge et al., 2015; Schroder et al., 2015). Otros autores que utilizaron una eliminación total de Bmall de todo el organismo encontraron un fenotipo más dramático, con una reducción en la actividad locomotora, el peso corporal y muscular, y la fuerza muscular, así como una esperanza de vida reducida. La inactivación global de Bmal1 también produjo una pérdida inmediata y completa de la ritmicidad circadiana en oscuridad constante (Bunger et al., 2000; Kondratov et al., 2006).

Aquí, analizamos si la inactivación de *Bmal1* localmente en el músculo esquelético también puede afectar el ritmo locomotor. Los ratones machos y hembras iMS-*Bmal1*-/- muestran una disminución de la actividad tanto en condiciones de luz/oscuridad como en completa oscuridad en comparación con los controles. Como era de esperar, el daño del músculo esquelético de los ratones deficientes en *Bmal1* redujo aún más su actividad física cuando esta es más alta, es decir, durante la noche y la noche subjetiva. La actividad mínima de los ratones durante el día y el día subjetivo dificultó detectar un efecto, si lo hubo, de la ausencia de *Bmal1*. También observamos que la

pérdida de Bmal1 provoca un adelanto de fase en DD en comparación con los controles, con una disminución en el período endógeno, afectando principalmente a las hembras. El adelanto de fase está relacionado con la alteración del reloj del músculo y la enfermedad (Wolff et al., 2013), y más específicamente, el ritmo circadiano de Bmal1 está asociado con el control del inicio y final de las fases de actividad (Ono et al., 2017). Estas diferencias de género también se habían reportado en humanos, siendo las mujeres de una fase de sueño más temprana y periodos circadianos ligeramente más cortos que los hombres de la misma edad, y estos hallazgos podrían explicar algunas diferencias de comportamiento encontradas entre los sexos (Nicolaides & Chrousos, 2020). En esta línea, también detectamos que las hembras tienen una mayor actividad que los machos en todos los grupos experimentales, incluidos los controles, como ya se ha informado en la literatura. Un estudio reciente en hembras ovariectomizadas y machos suplementados con estrógenos demostró que los estrógenos, al aumentar la actividad de la óxido nítrico sintasa, y aumentar la expresión de fibras de tipo 1 y disminuir las de tipo 2 (Bartling et al., 2017; Borbélyová et al., 2019), desempeñan un papel crucial en la mejora del rendimiento físico en las hembras (Oydanich et al., 2019), lo que podría ser una posible explicación para esto.

Los cambios observados en los ratones iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup> se extienden a la estructura y composición del músculo. La ausencia de *Bmal1* en el músculo esquelético se correlaciona con una reducción en el tamaño de las fibras musculares y un aumento del tejido colágeno, indicando atrofia y fibrosis, respectivamente, dos características distintivas de la sarcopenia, que también reportamos en ratones de 24 meses de edad (Sayed et al., 2016; Sayed et al., 2018). La debilidad y pérdida de masa muscular relacionadas con la edad están asociadas con un cambio de tipo de fibra de rápido a lento (Purves-Smith et al., 2014) y, aquí, mostramos que la falta de *Bmal1* en el músculo

esquelético conduce a un aumento de las fibras tipo 2A, más oxidativas, y una reducción de las fibras tipo 2B, más glucolíticas, en el GM profundo de los machos, sin afectar a las hembras, lo que concuerda con la reducción de lactato en el GM de ratones de 24 meses analizado mediante espectroscopia in vivo, reflejando una reducción de la respiración anaeróbica con la edad (Sayed et al., 2018). Nuestros datos también concuerdan con otros modelos knockout de Bmall que estudiaron los músculos sóleo, extensor largo de los dedos y tibial anterior (Dyar et al., 2014; Hodge et al., 2015; Schroder et al., 2015), y sugieren un cambio hacia un tipo de fibra más oxidativa con la edad. A pesar del mayor porcentaje de fibras oxidativas en animales iMS-Bmal1<sup>-/-</sup>, detectamos una reducción en la actividad de la SDH en el GM profundo, pero no en la región superficial, en machos y hembras, lo que indica una capacidad oxidativa mitocondrial reducida. Esto sugiere que el cambio hacia un tipo de fibra más oxidativa podría ser un mecanismo compensatorio para contrarrestar la disminución de la función mitocondrial normal. Dado que Bmall participa en la bioenergética y dinámica mitocondrial del músculo (Jacobi et al., 2015; Peek et al., 2013), y que la bioenergética mitocondrial está comprometida en el músculo esquelético con la edad y la sarcopenia (Del Campo et al., 2018; Gouspillou et al., 2014), el daño mitocondrial puede subyacer en el desarrollo de la sarcopenia asociada con la pérdida de Bmall en el músculo esquelético. Esta sugerencia está respaldada por el deterioro de la ultraestructura del GM analizada aquí con un aumento en el daño mitocondrial y la reducción en su número, y respalda completamente la idea de que *Bmal1* intrínseco al músculo esquelético es necesario para la salud musculoesquelética (Schroder et al., 2015). Los cambios en la estructura y función del GM, incluidos los depósitos de colágeno, están relacionados con la ausencia de *Bmal1*, que inactiva la subunidad alfa 1 de la prolil 4-hidroxilasa (P4ha1) (Chen et al., 2023), y el deterioro de la función mitocondrial que probablemente promueva un fenotipo inflamatorio que afecta su función miogénica (Peek et al., 2013; Schroder et al., 2015; Wada et al., 2018; Zhu et al., 2022). De hecho, *Bmal1* está relacionado con el control de la actividad inmunológica de NF-kB y la función y dinámica mitocondrial a través de la activación de dos sirtuinas dependientes de NAD<sup>+</sup>, SIRT1 y SIRT3, respectivamente, y con el control de procesos homeostáticos (de Goede et al., 2018; Peek et al., 2013; Yeung et al., 2004). El deterioro de estos mecanismos fisiológicos por la pérdida de *Bmal1* puede llevar al fenotipo muscular desarrollado en nuestro modelo. Hasta la fecha, sin embargo, no hay suficiente conocimiento molecular para explicar todos estos cambios, y se necesitan estudios futuros para aclarar el(los) mecanismo(s) a través de los cuales la pérdida de *Bmal1* solo en las fibras musculares contribuye a su deterioro. En general, los resultados descritos anteriormente dependen de la ausencia de *Bmal1* en el GM porque después de la administración de tamoxifeno, la expresión de *Bmal1* se vio inhibida durante toda la duración de los experimentos.

Existe una creciente evidencia científica en ratones y humanos de que el ejercicio físico y la melatonina desempeñan un papel protector en la sarcopenia relacionada con la edad (Christian & Benian, 2020; Coto-Montes et al., 2016; Hurst et al., 2022; Jin et al., 2021; Shen et al., 2023; Yoo et al., 2018), incluidos estudios de nuestro laboratorio (Rodríguez et al., 2007; Sayed et al., 2019; Sayed et al., 2018). El ejercicio ayuda a las personas con sarcopenia, aunque no es suficiente para prevenir o revertir esta enfermedad. Por otro lado, la melatonina pineal ejerce funciones cronobióticas, pero también significativas funciones antioxidantes y antiinflamatorias complementadas con el aumento de la eficiencia mitocondrial, estas últimas siendo dependientes de su producción extrapineal que también ocurre en el músculo esquelético de mamíferos, incluidos los humanos (Escames et al., 2006; Garcia et al., 2015; Leonardo-Mendonça et al., 2017; López et al., 2009; Martín, Macías, Escames, León, et al., 2000; Rahim et al.,

2017; Sayed et al., 2018; Volt et al., 2016). Intervenciones con ejercicio y/o melatonina conservan la masa muscular y la actividad física alterada en animales iMS-Bmal1<sup>-/-</sup> machos y hembras, con algunos efectos sinérgicos entre ambos. Estos tratamientos restauraron el FI a valores normales, respaldando su beneficio para prevenir la fragilidad. Además, el ejercicio, pero principalmente la melatonina, restaura el ritmo normal de actividad/reposo en ambos sexos. Esto se debe probablemente a que, como mostramos aquí, la falta de Bmall afecta a las mitocondrias, el orgánulo donde se sintetiza la melatonina, reduciendo sus niveles endógenos que se recuperan después de su administración a estos ratones. Asimismo, además de la conexión entre la melatonina y los genes reloj, esta indolamina es capaz de controlar directamente el ritmo de los ratones incluso en ausencia de *Bmal1* en el GM. El ejercicio, aunque se sabe que controla algunos genes relacionados con el envejecimiento, tiene, sin embargo, un menor efecto cronobiótico que la melatonina (Forbes-Robertson et al., 2012). Cabe destacar que la melatonina no pudo recuperar la actividad total de los ratones que carecían de *Bmal1*, lo cual puede depender en parte de que la melatonina, en concentraciones mucho más altas que la melatonina pineal, es decir, cuando se administra exógenamente, posee cierto efecto hipnótico dependiente del tiempo que promueve un estado de somnolencia en los ratones (Matsumoto, 1999; Sharma et al., 2018). Además, los efectos beneficiosos de la melatonina junto con el ejercicio se extienden para mantener la arquitectura normal del GM, aumentando el tamaño de las fibras y reduciendo el tejido colágeno. Ambos tratamientos restablecieron el perfil de tipos de fibras normal y mejoraron la capacidad oxidativa mitocondrial en el GM de los ratones, previniendo el cambio hacia un tipo de fibra más oxidativa causado por la pérdida de Bmal1. Aunque el ejercicio es útil para modificar la plasticidad mitocondrial y adaptarlas a los requisitos metabólicos (Memme et al., 2021), encontramos aquí que el ejercicio aumenta aún más el daño mitocondrial en los ratones TMX. Esto es consistente con hallazgos que muestran que el ejercicio excesivo provoca un deterioro mitocondrial en el músculo esquelético (Flockhart et al., 2021; Lee et al., 2015). Este efecto paradójico probablemente depende del exceso de ROS producido por estas mitocondrias dañadas. La melatonina, sin embargo, contrarrestó totalmente el daño a las mitocondrias inducido por el tamoxifeno y restauró su número y área de sección transversal, debido probablemente al restablecimiento de la biogénesis mitocondrial y los efectos antioxidantes de la primera (Acuña Castroviejo et al., 2011; Nasoni et al., 2021; Sayed et al., 2018).

A partir de estudios experimentales (López et al., 2017; Venegas et al., 2012), sugerimos que la dosis equivalente en humanos de melatonina es de 50 mg a 500 mg/día. Estudios realizados en atletas con entrenamiento de resistencia mostraron una alteración en su ritmo de actividad motora que se restableció después de la administración diaria de 100 mg de melatonina durante cuatro semanas (Leonardo-Mendonça et al., 2015). Por otro lado, se sabe que el ejercicio mejora la sarcopenia en personas mayores y puede prevenir la pérdida de fibras musculares esqueléticas (Hurst et al., 2022; Shen et al., 2023; Yoo et al., 2018). Por lo tanto, una intervención primaria en humanos podría ser el ejercicio junto con 50 mg de melatonina en un programa diario, aunque sería muy interesante realizar un ensayo clínico para evaluar estos enfoques.

Nuestros hallazgos pueden resumirse en: 1) el GM de los ratones iMS-*Bmal1*-/muestra cambios significativos en el comportamiento, morfología y funcionalidad que aclaran la participación del reloj muscular intrínseco (*Bmal1*) en la homeostasis del músculo esquelético; 2) dado que el ratón iMS-*Bmal1*-/- es propenso a la sarcopenia en el GM y comparte muchas similitudes con otros modelos de sarcopenia, incluidos los ratones de edad avanzada, se puede considerar como un modelo agudo adecuado para el estudio de la enfermedad; 3) los resultados respaldan el ejercicio y, principalmente, la melatonina como herramientas terapéuticas para contrarrestar la sarcopenia mediante un mecanismo que no requiere la presencia de *Bmal1* en el músculo esquelético; y 4) los genes reloj se presentan como dianas emergentes contra las enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Zhu et al., 2022).

# CONCLUSIONES
**Primera:** La inactivación de *Bmal1* en el músculo esquelético de ratones iMS-*Bmal1*-/-, tanto en machos como en hembras, conduce a una disminución en la condición física y la masa muscular en ambos sexos. Además, se observa un aumento en el índice de fragilidad, lo que caracteriza un estado de sarcopenia.

**Segunda:** Estos cambios dependen de la disminución del tamaño de las fibras musculares y del aumento de la infiltración de colágeno, sugiriendo así la presencia de atrofia y fibrosis, dos rasgos clave de la sarcopenia, debido a la ausencia de *Bmal1* en el músculo esquelético.

**Tercera:** Además, la inactivación de *Bmal1* en el músculo esquelético induce un estado de cronodisrupción que se manifiesta en una disminución de la actividad locomotora en ratones machos y hembras, especialmente durante la noche. Además, provoca un adelanto de fase que afecta principalmente a las hembras, lo que señala una influencia importante en el ritmo circadiano y sugiere posibles diferencias entre sexos.

**Cuarta:** La pérdida de *Bmal1* en el músculo esquelético provoca un cambio hacia fibras musculares más oxidativas en machos, sin afectar a las hembras. A pesar de este cambio, se observa una disminución en la capacidad oxidativa mitocondrial, indicando una posible adaptación compensatoria ante esta reducción de la función mitocondrial.

**Quinta:** En ratones de ambos sexos, la falta de *Bmal1* en el músculo esquelético conlleva un deterioro en la ultraestructura del músculo gastrocnemio, evidenciando un aumento en el daño mitocondrial y una reducción en el número de mitocondrias. Estas alteraciones pueden ser factores subyacentes en el desarrollo de la sarcopenia.

**Sexta:** El ejercicio y/o la melatonina conservan la masa muscular y actividad física en ratones iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup> machos y hembras, con ciertos efectos sinérgicos, previniendo así

la fragilidad. Estos tratamientos, principalmente la melatonina, restauran el ritmo normal de actividad/reposo en estos animales. La combinación de melatonina y ejercicio mejora la estructura muscular, revierte el cambio hacia un tipo de fibra muscular más oxidativa y aumenta la capacidad oxidativa mitocondrial en ratones de ambos sexos, contrarrestando los efectos de la pérdida de *Bmal1*. No obstante, el ejercicio excesivo aumenta el daño mitocondrial en ratones TMX, pero la melatonina contrarresta este efecto.

**Séptima:** En general, estos hallazgos respaldan plenamente la idea de que *Bmal1* intrínseco al músculo esquelético es necesario para la salud musculoesquelética, y convierten al ratón iMS-*Bmal1*-/- en un modelo adecuado para estudiar la sarcopenia.

**Octava:** Los resultados respaldan el ejercicio y, sobre todo, la melatonina, como herramientas terapéuticas para contrarrestar la sarcopenia independientemente de la presencia de *Bmal1* en el músculo esquelético. Además, los genes reloj surgen como objetivos prometedores contra las enfermedades asociadas al envejecimiento.

## CONCLUSIONS

**First:** The inactivation of *Bmal1* in the skeletal muscle of iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup> mice, both in males and females, leads to a decrease in physical fitness and muscle mass in both sexes. Additionally, an increase in frailty index is observed, defining a state of sarcopenia.

**Second:** These changes depend on the reduction in the size of muscle fibers and an increase in collagen infiltration, suggesting the presence of atrophy and fibrosis, two key features of sarcopenia, due to the absence of *Bmal1* in skeletal muscle.

**Third:** In addition, the inactivation of *Bmal1* in skeletal muscle induces a state of chronodisruption manifested by a decrease in locomotor activity in male and female mice, especially during the night. It also causes a phase advance that mainly affects females, indicating a significant influence on circadian rhythm and suggesting possible sex differences.

**Fourth:** The loss of *Bmal1* in skeletal muscle leads to a shift toward more oxidative muscle fibers in males, without affecting females. Despite this shift, a decrease in mitochondrial oxidative capacity is observed, indicating a possible compensatory adaptation to this reduction in mitochondrial function.

**Fifth:** In mice of both sexes, the lack of *Bmal1* in skeletal muscle results in deterioration of the gastrocnemius muscle ultrastructure, demonstrating an increase in mitochondrial damage and a reduction in the number of mitochondria. These alterations may be underlying factors in the development of sarcopenia.

**Sixth:** Exercise and/or melatonin preserve muscle mass and physical activity in iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup> male and female mice, with certain synergistic effects, thus preventing frailty. These treatments, especially melatonin, restore the normal activity/rest rhythm in these animals. The combination of melatonin and exercise improves muscle structure, reverses the shift toward a more oxidative muscle fiber type, and increases mitochondrial oxidative capacity in mice of both sexes, counteracting the effects of *Bmal1* loss. However, excessive exercise increases mitochondrial damage in TMX mice, but melatonin counteracts this effect.

**Seventh:** Overall, these findings fully support the idea that intrinsic *Bmal1* in skeletal muscle is necessary for musculoskeletal health, making the iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup> mouse an appropriate model for studying sarcopenia.

**Eighth:** The results support exercise and, above all, melatonin, as therapeutic tools to counteract sarcopenia regardless of the presence of *Bmal1* in skeletal muscle. Additionally, clock genes emerge as promising targets against age-associated diseases.

# BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, S. M., Malkani, R. G., & Zee, P. C. (2020). Circadian disruption and human health: A bidirectional relationship. *Eur J Neurosci*, 51(1), 567-583. doi:10.1111/ejn.14298
- Acuna-Castroviejo, D., Escames, G., Rodriguez, M. I., & Lopez, L. C. (2007). Melatonin role in the mitochondrial function. *Front Biosci, 12, 947-963.* doi:10.2741/2116
- 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. doi:10.1007/s00018-014-1579-2
- 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. doi: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. doi: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. doi: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. doi:10.2174/156802611794863517
- 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. doi: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. doi:10.1016/j.mam.2016.06.001
- Anker, S. D., Morley, J. E., & von Haehling, S. (2016). Welcome to the ICD-10 code for sarcopenia. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 7(5), 512-514. doi:10.1002/jcsm.12147
- Aranda-Martínez, P., Fernández-Martínez,
  J., Ramírez-Casas, Y., Guerra-Librero, A., Rodríguez-Santana, C.,
  Escames, G., & Acuña-Castroviejo,
  D. (2022). The Zebrafish, an

Outstanding Model for Biomedical Research in the Field of Melatonin and Human Diseases. *Int J Mol Sci*, *23*(13). doi:10.3390/ijms23137438

- 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, 12*(4). doi:10.3390/antiox12040954
- Arosio, B., Calvani, R., Ferri, E., Coelho-Junior, H. J., Carandina, A., Campanelli, F., Ghiglieri, V., Marzetti, E., & Picca, A. (2023).
  Sarcopenia and Cognitive Decline in Older Adults: Targeting the Muscle-Brain Axis. *Nutrients*, *15*(8). doi:10.3390/nu15081853
- 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. doi:10.1016/j.cell.2008.06.050
- 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. doi:10.1023/a:1020884312053
- Banks, G. T., & Nolan, P. M. (2011). Assessment of Circadian and Light-Entrainable Parameters in Mice Using Wheel-Running Activity. *Curr Protoc Mouse Biol*, 1(3), 369-

381. doi:10.1002/9780470942390.mo11 0123

- Bargiello, T. A., Jackson, F. R., & Young, M. W. (1984). Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in Drosophila. *Nature*, *312*(5996), 752-754. doi:10.1038/312752a0
- Bartling, B., Al-Robaiy, S., Lehnich, H., Binder, L., Hiebl, B., & Simm, A. (2017). Sex-related differences in the wheel-running activity of mice decline with increasing age. *Exp Gerontol*, 87(Pt B), 139-147. doi:10.1016/j.exger.2016.04.011
- Bauer, J. M., Verlaan, S., Bautmans, I., Brandt, K., Donini, L. M., Maggio, M., McMurdo, M. E., Mets, T., Seal, C., Wijers, S. L., Ceda, G. P., De Vito, G., Donders, G., Drey, M., Greig, C., Holmbäck, U., Narici, M., McPhee, J., Poggiogalle, E., Power, D., Scafoglieri, A., Schultz, R., Sieber, C. C., & Cederholm, T. (2015). Effects of a vitamin D and leucine-enriched whey protein nutritional supplement on measures of sarcopenia in older adults, the PROVIDE study: a randomized, placebo-controlled double-blind, trial. J Am Med Dir Assoc, 16(9), 740-747. doi:10.1016/j.jamda.2015.05.021
- Becker-André, M., Wiesenberg, I., Schaeren-Wiemers, N., André, E., Missbach, M., Saurat, J. H., & Carlberg, C. (1994). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. J Biol Chem, 269(46), 28531-28534.
- Benítez-King, G., & Antón-Tay, F. (1993). Calmodulin mediates melatonin

cytoskeletal effects. *Experientia*, 49(8), 635-641. doi:10.1007/bf01923944

- Benítez-King, G., Ríos, A., Martínez, A., & Antón-Tay, F. (1996). In vitro inhibition of Ca2+/calmodulindependent kinase II activity by melatonin. *Biochim Biophys Acta*, *1290*(2), 191-196. doi:10.1016/0304-4165(96)00025-6
- Borbélyová, V., Janišová, K., Mysliveček, J., & Riljak, V. (2019). Sex-related differences in locomotion and climbing of C57Bl/6NTac mice in a novel environment. *Physiol Res*, 68(Suppl 3), S353-s359. doi:10.33549/physiolres.934348
- Brisswalter, J., & Nosaka, K. (2013). Neuromuscular factors associated with decline in long-distance running performance in master athletes. *Sports Med*, 43(1), 51-63. doi:10.1007/s40279-012-0006-9
- Buford, T. W., Anton, S. D., Judge, A. R., Marzetti, E., Wohlgemuth, S. E., Carter, C. S., Leeuwenburgh, C., Pahor, M., & Manini, T. M. (2010). Models of accelerated sarcopenia: critical pieces for solving the puzzle of age-related muscle atrophy. *Ageing Res Rev, 9*(4), 369-383. doi:10.1016/j.arr.2010.04.004
- Buhr, E. D., & Takahashi, J. S. (2013). Molecular components of the Mammalian circadian clock. *Handb Exp Pharmacol*, (217), 3-27. doi:10.1007/978-3-642-25950-0\_1
- Bunger, M. K., Wilsbacher, L. D., Moran, S.
  M., Clendenin, C., Radcliffe, L. A.,
  Hogenesch, J. B., Simon, M. C.,
  Takahashi, J. S., & Bradfield, C. A.
  (2000). Mop3 is an essential
  component of the master circadian

pacemaker in mammals. *Cell*, *103*(7), 1009-1017. doi:10.1016/s0092-8674(00)00205-1

- Cardinali, D. P., & Freire, F. (1975). effects Melatonin brain. on with Interaction microtubule protein, inhibition of fast axoplasmic flow and induction of crystaloid and tubular formations in hypothalamus. the Mol Cell Endocrinol. 2(5).317-330. doi:10.1016/0303-7207(75)90019-2
- Carlberg, C., & Wiesenberg, I. (1995). The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. *J Pineal Res*, *18*(4), 171-178. doi:10.1111/j.1600-079x.1995.tb00157.x
- Chang, H., Kwon, O., Shin, M. S., Kang, G. M., Leem, Y. H., Lee, C. H., Kim, S. J., Roh, E., Kim, H. K., Youn, B. S., & Kim, M. S. (2018). Role of Angptl4/Fiaf in exercise-induced skeletal muscle AMPK activation. J Appl Physiol, 125(3), 715-722. doi:10.1152/japplphysiol.00984.20 16
- 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. doi:10.1016/j.yexcr.2014.08.041
- Chen, G., Tang, Q., Yu, S., Shen, Y., Sun, J., Peng, J., Yin, Y., Feng, G., Lu, X., Mei, G., Zhang, Y., Wan, Q., Zhang, L., & Chen, L. (2023).
  Developmental growth plate cartilage formation suppressed by artificial light at night via inhibiting BMAL1-driven collagen

hydroxylation. *Cell Death Differ*, 30(6), 1503-1516. doi:10.1038/s41418-023-01152-x

- 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. doi:10.3346/jkms.2022.37.e146
- Chong, N. W., Bernard, M., & Klein, D. C. (2000). Characterization of the chicken serotonin Nacetyltransferase gene. Activation via clock gene heterodimer/E box interaction. J Biol Chem, 275(42), 32991-32998. doi:10.1074/jbc.M005671200
- Christian, C. J., & Benian, G. M. (2020). Animal models of sarcopenia. *Aging Cell, 19*(10), e13223. doi:10.1111/acel.13223
- Ciciliot, S., Rossi, A. C., Dyar, K. A., Blaauw, B., & Schiaffino, S. (2013). Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol, 45*(10), 2191-2199. doi:10.1016/j.biocel.2013.05.016
- Costa, E. J., Lopes, R. H., & Lamy-Freund, M. T. (1995). Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J Pineal Res*, *19*(3), 123-126. doi:10.1111/j.1600-079x.1995.tb00180.x
- Coto-Montes, A., Boga, J. A., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2016). Melatonin as a Potential Agent in the Treatment of Sarcopenia. *Int J Mol Sci, 17*(10). doi:10.3390/ijms17101771
- Cox, K. H., & Takahashi, J. S. (2019). Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the

clock mechanism. *J Mol Endocrinol*, *63*(4), R93-r102. doi:10.1530/jme-19-0153

- Cruz-Jentoft, A. J. (2016). Sarcopenia, the last organ insufficiency. *European Geriatric Medicine*, 7(3), 195-196. doi:10.1016/j.eurger.2016.01.003
- 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. doi:10.1093/ageing/afy169
- Cruz-Jentoft, A. J., Landi, F., Schneider, S. M., Zúñiga, C., Arai, H., Boirie, Y., Chen, L. K., Fielding, R. A., Martin, F. C., Michel, J. P., Sieber, C., Stout, J. R., Studenski, S. A., Vellas, B., Woo, J., Zamboni, М., & Cederholm, T. (2014). Prevalence of and interventions for sarcopenia in ageing adults: a systematic review. Report of the International Sarcopenia Initiative (EWGSOP and IWGS). Age Ageing, 43(6), 748-759. doi:10.1093/ageing/afu115
- Cruz-Jentoft, A. J., & Sayer, A. A. (2019). Sarcopenia. *Lancet*, 393(10191), 2636-2646. doi: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. doi:10.1016/j.immuni.2014.02.002
- 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. doi:10.1530/jme-17-0196

- Debruyne, J. P., Noton, E., Lambert, C. M., Maywood, E. S., Weaver, D. R., & Reppert, S. M. (2006). A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. *Neuron*, 50(3), 465-477. doi:10.1016/j.neuron.2006.03.041
- DeBruyne, J. P., Weaver, D. R., & Reppert, S. M. (2007). CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat Neurosci, 10*(5), 543-545. doi:10.1038/nn1884
- 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, 10*(1), 34-55. doi:10.18632/aging.101358
- Delerive, P., Monté, D., Dubois, G., Trottein, F., Fruchart-Najib, J., Mariani, J., Fruchart, J. C., & Staels,
  B. (2001). The orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response. *EMBO Rep*, 2(1), 42-48. doi:10.1093/embo-reports/kve007
- 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. doi:10.1182/blood-2005-09-3691

- 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. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.0 4.036
- Dubocovich, M. L. (1995). Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci*, *16*(2), 50-56. doi:10.1016/s0165-6147(00)88978-6
- Dubrovsky, Y. V., Samsa, W. E., & Kondratov, R. V. (2010). Deficiency of circadian protein CLOCK reduces lifespan and increases age-related cataract development in mice. *Aging*, 2(12), 936-944. doi:10.18632/aging.100241
- 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, Sassone-Corsi, P., Ρ., Rizzuto, R., Bicciato, 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. doi:10.1016/j.molmet.2013.10.005
- Erren, T. C., & Reiter, R. J. (2009). Defining chronodisruption. *J Pineal Res*, 46(3), 245-247. doi:10.1111/j.1600-079X.2009.00665.x
- Escames, G., López, L. C., Tapias, V., Utrilla, P., Reiter, R. J., Hitos, 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. doi:10.1111/j.1600-079X.2005.00281.x

- 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*, 9(12). doi: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).
  doi:10.3390/ijms23126846
- Ferrucci, L., de Cabo, R., Knuth, N. D., & Studenski, S. (2012). Of Greek heroes, wiggling worms, mighty mice, and old body builders. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 67(1), 13-16. doi:10.1093/gerona/glr046
- Ferrucci, L., & Fabbri, E. (2018). Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol*, *15*(9), 505-522. doi:10.1038/s41569-018-0064-2
- Fielding, R. A., Vellas, B., Evans, W. J., Bhasin, S., Morley, J. E., Newman, A. B., Abellan van Kan, G., Andrieu, S., Bauer, J., Breuille, D., Cederholm, T., Chandler, J., De Meynard, C., Donini, L., Harris, T., Kannt, A., Keime Guibert, F., Onder, G., Papanicolaou, D., Rolland, Y., Rooks, D., Sieber, C.,

Souhami, E., Verlaan, S., & Zamboni, M. (2011). Sarcopenia: an undiagnosed condition in older adults. Current consensus definition: prevalence, etiology, and consequences. International working group on sarcopenia. *J Am Med Dir Assoc, 12*(4), 249-256. doi:10.1016/j.jamda.2011.01.003

- Flockhart, M., Nilsson, L. C., Tais, S., Ekblom, B., Apró, W., & Larsen, F. (2021). Excessive J. exercise training causes mitochondrial functional impairment and decreases glucose tolerance in healthy volunteers. Cell Metab, 33(5), 957-970.e956. doi:10.1016/j.cmet.2021.02.017
- Forbes-Robertson, S., Dudley, E., Vadgama, P., Cook, C., Drawer, S., & Kilduff, L. (2012). Circadian disruption and remedial interventions: effects and interventions for jet lag for athletic peak performance. *Sports Med*, 42(3), 185-208. doi:10.2165/11596850-000000000-00000
- Franceschi, C., & Campisi, J. (2014). Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 69 Suppl 1, S4-9. doi:10.1093/gerona/glu057
- Frontera, W. R., Hughes, V. A., Fielding, R.
  A., Fiatarone, M. A., Evans, W. J.,
  & Roubenoff, R. (2000). Aging of skeletal muscle: a 12-yr longitudinal study. *J Appl Physiol*, 88(4), 1321-1326.
  doi:10.1152/jappl.2000.88.4.1321
- Fukunaga, K., Horikawa, K., Shibata, S., Takeuchi, Y., & Miyamoto, E. (2002). Ca2+/calmodulin-

dependent protein kinase IIdependent long-term potentiation in the rat suprachiasmatic nucleus and its inhibition by melatonin. *J Neurosci Res*, 70(6), 799-807. doi: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 NFkappaB/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor-alpha and blocks the septic response in mice. Faseb J, 29(9), 3863-3875. doi: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. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.

12.013

- Gatfield, D., & Schibler, U. (2007). Physiology. Proteasomes keep the circadian clock ticking. *Science*, *316*(5828), 1135-1136. doi:10.1126/science.1144165
- Gibbs, J. E., Blaikley, J., Beesley, S., Matthews, L., Simpson, K. D., Boyce, S. H., Farrow, S. N., Else, K. J., Singh, D., Ray, D. W., & Loudon, A. S. (2012). The nuclear receptor REV-ERBα mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(2), 582-587. doi:10.1073/pnas.1106750109

- Goriki, A., Hatanaka, F., Myung, J., Kim, J.
  K., Yoritaka, T., Tanoue, S., Abe,
  T., Kiyonari, H., Fujimoto, K., Kato,
  Y., Todo, T., Matsubara, A., Forger,
  D., & Takumi, T. (2014). A novel
  protein, CHRONO, functions as a
  core component of the mammalian
  circadian clock. *PLoS Biol*, *12*(4),
  e1001839.
  doi:10.1371/journal.pbio.1001839
- Gouspillou, G., Bourdel-Marchasson, I., Rouland, R., Calmettes, G., Biran, M., Deschodt-Arsac, V., Miraux, S., Thiaudiere, E., Pasdois, P., Detaille, D., Franconi, J. M., Babot, M., Trézéguet, V., Arsac, L., & Diolez, P. (2014). Mitochondrial energetics is impaired in vivo in aged skeletal muscle. *Aging Cell*, *13*(1), 39-48. doi:10.1111/acel.12147
- Grassi, B., Cerretelli, P., Narici, M. V., & Marconi, C. (1991). Peak anaerobic power in master athletes. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 62(6), 394-399. doi:10.1007/bf00626609
- Gryson, C., Ratel, S., Rance, M., Penando,
  S., Bonhomme, C., Le Ruyet, P.,
  Duclos, M., Boirie, Y., & Walrand,
  S. (2014). Four-month course of soluble milk proteins interacts with exercise to improve muscle strength and delay fatigue in elderly participants. *J Am Med Dir Assoc*, 15(12), 958.e951-959. doi:10.1016/j.jamda.2014.09.011
- Hardeland, R. (2012). Melatonin in aging and disease -multiple consequences of reduced secretion, options and limits of treatment. *Aging Dis*, 3(2), 194-225.
- Hardeland, R., Pandi-Perumal, S. R., & Cardinali, D. P. (2006). Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol*, 38(3), 313-

316.

doi:10.1016/j.biocel.2005.08.020

- Hardin, P. E., Hall, J. C., & Rosbash, M. (1990). Feedback of the Drosophila period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*, 343(6258), 536-540. doi:10.1038/343536a0
- 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. doi:10.1016/s0149-7634(96)00019-x
- Hastings, R. L., Massopust, R. T., Haddix, S.
  G., Lee, Y. I., & Thompson, W. J. (2020). Exclusive vital labeling of myonuclei for studying myonuclear arrangement in mouse skeletal muscle tissue. *Skelet Muscle*, *10*(1), 15. doi:10.1186/s13395-020-00233-6
- 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. doi: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. doi:10.1186/s13395-015-0039-5
- Hood, D. A., Memme, J. M., Oliveira, A. N.,& Triolo, M. (2019). Maintenance of Skeletal Muscle Mitochondria in Health, Exercise, and Aging. *Annu*

*Rev Physiol, 81,* 19-41. doi:10.1146/annurev-physiol-020518-114310

- Hood, S., & Amir, S. (2017). The aging clock: circadian rhythms and later life. J Clin Invest, 127(2), 437-446. doi:10.1172/jci90328
- Hurst, C., Robinson, S. M., Witham, M. D., Dodds, R. M., Granic, A., Buckland, C., De Biase, S., Finnegan, S., Rochester, L., Skelton, D. A., & Sayer, A. A. (2022). Resistance exercise as a treatment for sarcopenia: prescription and delivery. Ageing, Age 51(2). doi:10.1093/ageing/afac003
- 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. doi:10.1016/j.cmet.2015.08.006
- Jarome, T. J., Kwapis, J. L., Ruenzel, W. L., & Helmstetter, F. J. (2013). CaMKII, but not protein kinase A, regulates Rpt6 phosphorylation and proteasome activity during the formation of long-term memories. *Front Behav Neurosci*, 7, 115. doi:10.3389/fnbeh.2013.00115
- Jeejeebhoy, K. N. (2012). Malnutrition, fatigue, frailty, vulnerability, sarcopenia and cachexia: overlap of clinical features. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 15*(3), 213-219. doi:10.1097/MCO.0b013e3283526 94f
- Jetten, A. M. (2009). Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical

roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal*, *7*, e003. doi:10.1621/nrs.07003

- Jin, H., Xie, W., Hu, P., Tang, K., Wang, X., Wu, Y., He, M., Yu, D., & Li, Y. (2021). The role of melatonin in sarcopenia: Advances and application prospects. *Exp Gerontol, 149*, 111319. doi:10.1016/j.exger.2021.111319
- Kalsbeek, A., Palm, I. F., La Fleur, S. E., Scheer, F. A., Perreau-Lenz, S., Ruiter, M., Kreier, F., Cailotto, C., & Buijs, R. M. (2006). SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J Biol Rhythms*, 21(6), 458-469. doi:10.1177/0748730406293854
- Keller, M., Mazuch, J., Abraham, U., Eom, G. D., Herzog, E. D., Volk, H. D., Kramer, A., & Maier, B. (2009). A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(50), 21407-21412. doi:10.1073/pnas.0906361106
- Kohsaka, A., Das, P., Hashimoto, I., Nakao, T., Deguchi, Y., Gouraud, S. S., Waki, H., Muragaki, Y., & Maeda, M. (2014). The circadian clock maintains cardiac function by regulating mitochondrial metabolism in mice. *PLoS One*, 9(11), e112811. doi:10.1371/journal.pone.0112811
- 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 componentof the circadian clock. *Genes Dev*, 20(14), 1868-1873. doi:10.1101/gad.1432206

- Lee, S., Kim, M., Lim, W., Kim, T., & Kang, C. (2015). Strenuous exercise induces mitochondrial damage in skeletal muscle of old mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 461(2), 354-360. doi:10.1016/j.bbrc.2015.04.038
- Lefta, M., Wolff, G., & Esser, K. A. (2011). Circadian rhythms, the molecular clock, and skeletal muscle. *Curr Top Dev Biol*, *96*, 231-271. doi:10.1016/b978-0-12-385940-2.00009-7
- Leon, J., Acuña-Castroviejo, D., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2004). Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci*, 75(7), 765-790. doi:10.1016/j.lfs.2004.03.003
- J., Macías, M., Escames, G., León. 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 kynurenines. Mol Pharmacol, 58(5), 967-975. doi:10.1124/mol.58.5.967
- Leonardo-Mendonça, R. C., Martinez-Nicolas, A., de Teresa Galván, C., Ocaña-Wilhelmi, J., Rusanova, I., Guerra-Hernández, E., Escames, G., & Acuña-Castroviejo, D. (2015). The benefits of four weeks of melatonin treatment on circadian patterns in resistance-trained athletes. *Chronobiol Int, 32*(8), 1125-1134. doi:10.3109/07420528.2015.10698 30
- Leonardo-Mendonça, R. C., Ocaña-Wilhelmi, J., de Haro, T., de Teresa-Galván, C., Guerra-Hernández, E.,

Rusanova, I., Fernández-Ortiz, M., Sayed, R. K. A., Escames, G., & Acuña-Castroviejo, D. (2017). The benefit of a supplement with the antioxidant melatonin on redox status and muscle damage in resistance-trained athletes. *Appl Physiol Nutr Metab*, 42(7), 700-707. doi:10.1139/apnm-2016-0677

- 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.
- Liu, A. C., Welsh, D. K., Ko, C. H., Tran, H. G., Zhang, E. E., Priest, A. A., Buhr, E. D., Singer, O., Meeker, K., Verma, I. M., Doyle, F. J., 3rd, Takahashi, J. S., & Kay, S. A. (2007). Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network. *Cell*, 129(3), 605-616. doi:10.1016/j.cell.2007.02.047
- Liu, J., Malkani, G., Shi, X., Meyer, M., Cunningham-Runddles, S., Ma, X., & Sun, Z. S. (2006). The circadian clock Period 2 gene regulates gamma interferon production of NK cells in host response to lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *Infect Immun*, 74(8), 4750-4756. doi:10.1128/iai.00287-06
- Liu, T., & Borjigin, J. (2005). Nacetyltransferase is not the ratelimiting enzyme of melatonin synthesis at night. *J Pineal Res*, *39*(1), 91-96. doi:10.1111/j.1600-079X.2005.00223.x
- Liu, X., Zwiebel, L. J., Hinton, D., Benzer, S., Hall, J. C., & Rosbash, M. (1992). The period gene encodes a predominantly nuclear protein in

adult Drosophila. *J Neurosci*, *12*(7), 2735-2744. doi:10.1523/JNEUROSCI.12-07-02735.1992

- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, *153*(6), 1194-1217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023).
  Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, 186(2), 243-278. doi: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. doi:10.1111/j.1600-079X.2008.00647.x
- López, A., Ortiz, F., Doerrier, C., Venegas, C., Fernández-Ortiz, M., Aranda, P., Díaz-Casado, M. E., Fernández-Gil, B., Barriocanal-Casado, Е., Escames, G., López, L. C., & Acuña-Castroviejo, D. (2017). Mitochondrial impairment and melatonin protection in parkinsonian mice do not depend of inducible or neuronal nitric oxide svnthases. PLoS One. 12(8), e0183090. doi:10.1371/journal.pone.0183090
- 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. doi:10.1146/annurev.genom.5.0619 03.175925

- Lozano-Montoya, I., Correa-Pérez, A., Abraha, I., Soiza, R. L., Cherubini, A., O'Mahony, D., & Cruz-Jentoft, A. J. (2017). Nonpharmacological interventions to treat physical frailty and sarcopenia in older patients: a systematic overview - the SENATOR Project ONTOP Series. *Clin Interv Aging, 12*, 721-740. doi:10.2147/cia.S132496
- Ma, X., Idle, J. R., Krausz, K. W., & Gonzalez, F. J. (2005). Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug Metab Dispos*, 33(4), 489-494. doi:10.1124/dmd.104.002410
- Macías, M., Escames, G., Leon, J., Coto, A., Sbihi, Y., Osuna, A., & Acuña-Castroviejo, D. (2003). Calreticulinmelatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem*, 270(5), 832-840. doi: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. doi:10.1096/fj.99-0865fje
- Martín, M., Macías, M., Escames, G., Reiter, R. J., Agapito, M. T., Ortiz, G. G., & Acuña-Castroviejo, D. (2000).
  Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. J Pineal Res, 28(4), 242-248. doi:10.1034/j.1600-079x.2000.280407.x
- Martín, M., Macías, M., León, J., Escames, G., Khaldy, H., & Acuña-Castroviejo, D. (2002). Melatonin

increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol, 34*(4), 348-357. doi:10.1016/s1357-2725(01)00138-8

- Martínez-Arnau, F. M., Fonfría-Vivas, R., Buigues, C., Castillo, Y., Molina, P., Hoogland, A. J., van Doesburg, F., Pruimboom, L., Fernández-Garrido, J., & Cauli, O. (2020). Effects of Leucine Administration in Sarcopenia: A Randomized and Placebo-controlled Clinical Trial. *Nutrients, 12*(4). doi:10.3390/nu12040932
- Martinez de Toda, I., Garrido, A., Vida, C., Gomez-Cabrera, M. C., Viña, J., & De la Fuente, M. (2018). Frailty Quantified by the "Valencia Score" as a Potential Predictor of Lifespan in Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci,* 73(10), 1323-1329. doi:10.1093/gerona/gly064
- Marzetti, E., Calvani, R., Bernabei, R., & Leeuwenburgh, C. (2012). Apoptosis in skeletal myocytes: a potential target for interventions against sarcopenia and physical frailty - a mini-review. *Gerontology*, 58(2), 99-106. doi:10.1159/000330064
- Matsumoto, M. (1999). The hypnotic effects of melatonin treatment on diurnal sleep in humans. *Psychiatry Clin Neurosci*, 53(2), 243-245. doi:10.1046/j.1440-1819.1999.00480.x
- 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).

Identificationofthecircadiantranscriptomeinadultmouseskeletalmuscle.PhysiolGenomics,31(1),86-95.doi: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. doi:10.1186/s12935-021-01892-1
- Memme, J. M., Erlich, A. T., Phukan, G., & Hood, D. A. (2021). Exercise and mitochondrial health. *J Physiol*, *599*(3), 803-817. doi:10.1113/jp278853
- Menendez-Pelaez, A., Poeggeler, B., Reiter, R. J., Barlow-Walden, L., Pablos, M. I., & Tan, D. X. (1993). Nuclear localization of melatonin in mammalian different tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. J Cell 373-382. Biochem, 53(4), doi:10.1002/jcb.240530415
- 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. doi:10.1073/pnas.0611724104
- Morena da Silva, F., Esser, K. A., Murach, K. A., & Greene, N. P. (2023). Inflammation o'clock: interactions of circadian rhythms with

inflammation-induced skeletal muscle atrophy. *J Physiol.* doi:10.1113/jp284808

- 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., A., Kalantar-Zadeh, Inui. K., Kirwan, B. A., Mantovani, G., Muscaritoli, M., Newman, A. B., Rossi-Fanelli, F., Rosano, G. M., Roubenoff, R., Schambelan, M., Sokol, G. H., Storer, T. W., Vellas, B., von Haehling, S., Yeh, S. S., & Anker, S. D. (2011). Sarcopenia limited mobility: with an international consensus. J Am Med Dir Assoc, 12(6), 403-409. doi:10.1016/j.jamda.2011.04.014
- Murgia, M., Nogara, L., Baraldo, M., Reggiani, C., Mann, M., & Schiaffino, S. (2021). Protein profile of fiber types in human skeletal muscle: a single-fiber proteomics study. *Skelet Muscle*, *11*(1), 24. doi:10.1186/s13395-021-00279-0
- 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. doi: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. doi:10.1038/ni.1980

- Narasimamurthy, R., Hatori, M., Nayak, S.
  K., Liu, F., Panda, S., & Verma, I.
  M. (2012). Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(31), 12662-12667. doi:10.1073/pnas.1209965109
- Nasoni, M. G., Carloni, S., Canonico, B., Burattini, S., Cesarini, E., Papa, S., Pagliarini, M., Ambrogini, P., Balduini, W., & Luchetti, F. (2021). Melatonin reshapes the mitochondrial network and promotes intercellular mitochondrial transfer via tunneling nanotubes after ischemic-like injury in hippocampal HT22 cells. J Pineal Res, 71(1),e12747. doi:10.1111/jpi.12747
- Neves, A. R., Albuquerque, T., Quintela, T., & Costa, D. (2022). Circadian rhythm and disease: Relationship, new insights, and future perspectives. J Cell Physiol, 237(8), 3239-3256. doi:10.1002/jcp.30815
- Newman, A. B., Kupelian, V., Visser, M., Simonsick, E. M., Goodpaster, B. H., Kritchevsky, S. B., Tylavsky, F. A., Rubin, S. M., & Harris, T. B. (2006). Strength, but not muscle mass, is associated with mortality in health, aging and the body composition study cohort. JGerontol A Biol Sci Med Sci, 61(1), 72-77. doi:10.1093/gerona/61.1.72
- 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. doi:10.1126/science.1240636

- Nicolaides, N. C., & Chrousos, G. P. (2020). Sex differences in circadian endocrine rhythms: Clinical implications. *Eur J Neurosci*, 52(1), 2575-2585. doi:10.1111/ejn.14692
- Nosjean, O., Ferro, M., Coge, F., Beauverger, P., Henlin, J. M., Lefoulon, F., Fauchere, J. L., Delagrange, P., Canet, E., & Boutin, J. A. (2000). Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. J Biol Chem, 275(40), 31311-31317. doi:10.1074/jbc.M005141200
- Ono, D., Honma, S., Nakajima, Y., Kuroda, S., Enoki, R., & Honma, K. I. (2017). Dissociation of Per1 and Bmal1 circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus in parallel with behavioral outputs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(18), E3699e3708. doi:10.1073/pnas.1613374114
- Oydanich, M., Babici, D., Zhang, J., Rynecki, N., Vatner, D. E., & Vatner, S. F. (2019). Mechanisms of sex differences in exercise capacity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 316*(6), R832-r838. doi:10.1152/ajpregu.00394.2018
- Pastore, S., & Hood, D. A. (2013). Endurance training ameliorates the metabolic and performance characteristics of circadian Clock mutant mice. *J Appl Physiol*, 114(8), 1076-1084. doi:10.1152/japplphysiol.01505.20 12
- Pearson, S. J., Young, A., Macaluso, A., Devito, G., Nimmo, M. A., Cobbold, M., & Harridge, S. D.

(2002). Muscle function in elite master weightlifters. *Med Sci Sports Exerc*, *34*(7), 1199-1206. doi:10.1097/00005768-200207000-00023

- Peek, C. B., Affinati, A. H., Ramsey, K. M., Kuo, H. Y., Yu, W., Sena, L. A., Ilkayeva, O., Marcheva, В., 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. doi:10.1126/science.1243417
- 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. doi:10.1081/cbi-120027984
- Peterson, M. D., Rhea, M. R., Sen, A., & Gordon, P. M. (2010). Resistance exercise for muscular strength in older adults: a meta-analysis. *Ageing Res Rev, 9*(3), 226-237. doi:10.1016/j.arr.2010.03.004
- Peterson, M. D., Sen, A., & Gordon, P. M. (2011). Influence of resistance exercise on lean body mass in aging adults: a meta-analysis. *Med Sci Sports Exerc*, 43(2), 249-258. doi:10.1249/MSS.0b013e3181eb62 65
- Pierrefiche, G., & Laborit, H. (1995). Oxygen free radicals, melatonin, and aging. *Exp Gerontol*, *30*(3-4), 213-227. doi:10.1016/0531-5565(94)00036-3
- Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht,

U., & Schibler, U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, *110*(2), 251-260. doi:10.1016/s0092-8674(02)00825-5

- Price, J. L., Blau, J., Rothenfluh, A., Abodeely, M., Kloss, B., & Young, M. W. (1998). double-time is a novel Drosophila clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell*, 94(1), 83-95. doi:10.1016/s0092-8674(00)81224-6
- Purves-Smith, F. M., Sgarioto, N., & Hepple, R. T. (2014). Fiber typing in aging muscle. *Exerc Sport Sci Rev*, *42*(2), 45-52. doi:10.1249/jes.00000000000012
- Rahim, I., Djerdjouri, B., Sayed, R. K., Fernández-Ortiz, M., Fernández-Gil, B., Hidalgo-Gutiérrez, A., López, L. C., Escames, G., Reiter, R. J., & Acuña-Castroviejo, D. (2017). Melatonin administration to wild-type mice and nontreated NLRP3 mutant mice share similar inhibition of the inflammatory response during sepsis. *J Pineal Res*, 63(1). doi:10.1111/jpi.12410
- Rahim, I., Sayed, R. K., Fernández-Ortiz, M., Aranda-Martínez, P., Guerra-Librero, A., Fernández-Martínez, J., Rusanova, I., Escames, G., Djerdjouri, В., & 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. doi:10.1007/s00210-020-01972-5

- Reeds, P. J., Palmer, R. M., Hay, S. M., & McMillan, D. N. (1986). Protein synthesis in skeletal muscle measured at different times during a 24 hour period. *Biosci Rep*, 6(2), 209-213. doi:10.1007/bf01115008
- Reiter, R. J. (1993). The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*, 49(8), 654-664. doi:10.1007/bf01923947
- Rijo-Ferreira, F., & Takahashi, J. S. (2019). Genomics of circadian rhythms in health and disease. *Genome Med*, *11*(1), 82. doi:10.1186/s13073-019-0704-0
- Ristow, M., & Zarse, K. (2010). How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Exp Gerontol*, *45*(6), 410-418. doi:10.1016/j.exger.2010.03.014
- Roberts, H. C., Denison, H. J., Martin, H. J., Patel, H. P., Syddall, H., Cooper, C., & Sayer, A. A. (2011). A review of the measurement of grip strength in clinical and epidemiological studies: towards a standardised approach. *Age Ageing*, 40(4), 423-429. doi:10.1093/ageing/afr051
- Robinson, S. M., Reginster, J. Y., Rizzoli,
  R., Shaw, S. C., Kanis, J. A.,
  Bautmans, I., Bischoff-Ferrari, H.,
  Bruyère, O., Cesari, M., Dawson-Hughes, B., Fielding, R. A.,
  Kaufman, J. M., Landi, F.,
  Malafarina, V., Rolland, Y., van
  Loon, L. J., Vellas, B., Visser, M., &
  Cooper, C. (2018). Does nutrition
  play a role in the prevention and
  management of sarcopenia? *Clin*

*Nutr,* 37(4), 1121-1132. doi:10.1016/j.clnu.2017.08.016

- Rodríguez-Santana, C., López-Rodríguez, A., Martinez-Ruiz, L., Florido, J., Cela, O., Capitanio, N., Ramírez-Casas, Y., Acuña-Castroviejo, D., & (2023).Escames, G. The Relationship between Clock Genes, Sirtuin 1. and Mitochondrial Head Activity in and Neck Squamous Cell Cancer: Effects of Melatonin Treatment. Int J Mol Sci. 24(19). doi: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. doi: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. doi:10.1080/10715760600936359
- Rosenberg, I. H. (1997). Sarcopenia: origins and clinical relevance. J Nutr, 127(5 Suppl), 990s-991s. doi: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. doi: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. doi: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. doi:10.1016/j.exger.2009.02.002
- Sayed, R. K., de Leonardis, 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. doi:10.1016/j.exger.2016.07.007
- Sayed, K., Fernández-Ortiz, R. М., 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, 10(4). doi: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. doi:10.1093/gerona/glz079

- Saved, R. K. A., Fernández-Ortiz, M., Diaz-Casado, M. E., Rusanova, I., Rahim, I., Escames, G., López, L. C., Mokhtar, D. M., & Acuña-D. Castroviejo, (2018). The Protective Effect of Melatonin Against Age-Associated, Sarcopenia-Dependent Tubular Formation, Aggregate Lactate Depletion, and Mitochondrial Changes. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 73(10), 1330-1338. doi:10.1093/gerona/gly059
- Sayed, R. K. A., Fernández-Ortiz, M., Rahim, I., Fernández-Martínez, J., Aranda-Martínez, P., Rusanova, I., Martínez-Ruiz, L., Alsaadawy, R. M., Escames, G., & Acuña-Castroviejo, D. (2021). The Impact of Melatonin Supplementation and NLRP3 Inflammasome Deletion on Age-Accompanied Cardiac Damage. *Antioxidants*, 10(8). doi:10.3390/antiox10081269
- 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., Peterson. Mula. J., C. A.. Butterfield, T. A., & Esser, K. A. (2015). Intrinsic muscle clock is for musculoskeletal necessary health. J Physiol, 593(24), 5387-5404. doi:10.1113/jp271436
- Scisciola, L., Fontanella, R. A., Surina, Cataldo, V., Paolisso, G., & Barbieri, M. (2021). Sarcopenia and Cognitive Function: Role of

Myokines in Muscle Brain Cross-<br/>Talk.Life,11(2).doi:10.3390/life11020173

- Scott, D., Sanders, K. M., Aitken, D., Hayes,
  A., Ebeling, P. R., & Jones, G.
  (2014). Sarcopenic obesity and dynapenic obesity: 5-year associations with falls risk in middle-aged and older adults. *Obesity*, 22(6), 1568-1574. doi:10.1002/oby.20734
- Sharma, R., Sahota, P., & Thakkar, M. M. (2018). Melatonin promotes sleep in mice by inhibiting orexin neurons in the perifornical lateral hypothalamus. *J Pineal Res*, 65(2), e12498. doi:10.1111/jpi.12498
- Shen, Y., Shi, Q., Nong, K., Li, S., Yue, J., Huang, J., Dong, B., Beauchamp, M., & Hao, Q. (2023). Exercise for sarcopenia in older people: A systematic review and network meta-analysis. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 14(3), 1199-1211. doi:10.1002/jcsm.13225
- Siwicki, K. K., Eastman, C., Petersen, G., Rosbash, M., & Hall, J. C. (1988). Antibodies to the period gene product of Drosophila reveal diverse tissue distribution and rhythmic changes in the visual system. *Neuron*, 1(2), 141-150. doi:10.1016/0896-6273(88)90198-5
- 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. doi:10.1016/j.mce.2012.01.004
- Spengler, M. L., Kuropatwinski, K. K., Comas, M., Gasparian, A. V.,

Fedtsova, N., Gleiberman, A. S., Gitlin, II, Artemicheva, N. M., Deluca, K. A., Gudkov, A. V., & Antoch, M. P. (2012). Core circadian protein CLOCK is a positive regulator of NF-κBmediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(37), E2457-2465. doi:10.1073/pnas.1206274109

- Stefulj, J., Hörtner, М., Ghosh, М., Schauenstein. K., Rinner. I.. Wölfler, A., Semmler, J., & Liebmann, P. M. (2001). Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. J Pineal Res, 30(4), 243-247. doi:10.1034/j.1600-079x.2001.300408.x
- 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. doi:10.3389/fnmol.2014.00069
- Suetta, C., Andersen, J. L., Dalgas, U., Berget, J., Koskinen, S., Aagaard, P., Magnusson, S. P., & Kjaer, M. (2008). Resistance training induces qualitative changes in muscle morphology, muscle architecture, and muscle function in elderly postoperative patients. J Appl Physiol (1985), 105(1), 180-186. doi:10.1152/japplphysiol.01354.20 07
- 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. doi:10.1111/j.1600-079X.2006.00407.x

- Thomas, D. R. (2007). Loss of skeletal muscle mass in aging: examining the relationship of starvation, sarcopenia and cachexia. *Clin Nutr*, 26(4), 389-399. doi:10.1016/j.clnu.2007.03.008
- 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. doi:10.1016/j.bcp.2015.02.010
- Tomás-Zapico, C., & Coto-Montes, A. (2005). A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. J Pineal Res, 39(2), 99-104. doi:10.1111/j.1600-079X.2005.00248.x
- Urata, Y., Honma, S., Goto, S., Todoroki, S., Iida, T., Cho, S., Honma, K., & T. (1999). Melatonin Kondo, induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 human in vascular endothelial cells. Free Radic Biol 27(7-8), Med. 838-847. doi:10.1016/s0891-5849(99)00131-8
- van der Horst, G. T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A. P., van Leenen, D., Buijs, R., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H., & Yasui, A. (1999). Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. Nature, 398(6728), 627-630. doi:10.1038/19323
- 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. doi:10.1016/j.molmet.2016.06.012

- Venegas, C., García, J. A., Doerrier, C., Volt, H., Escames, G., López, L. C., Reiter, R. J., & Acuña-Castroviejo, D. (2013). Analysis of the daily changes of melatonin receptors in the rat liver. J Pineal Res, 54(3), 313-321. doi:10.1111/jpi.12019
- 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. doi: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. doi:10.1016/j.exger.2022.112076
- Viña, J., Tarazona-Santabalbina, F. J., Pérez-Ros, P., Martínez-Arnau, F. M., Borras, C., Olaso-Gonzalez, G., Salvador-Pascual, A., & Gomez-Cabrera, M. C. (2016). Biology of frailty: Modulation of ageing genes and its importance to prevent ageassociated loss of function. *Mol Aspects Med*, 50, 88-108. doi:10.1016/j.mam.2016.04.005
- Vitaterna, M. H., King, D. P., Chang, A. M., Kornhauser, J. M., Lowrey, P. L.,

McDonald, J. D., Dove, W. F., Pinto, L. H., Turek, F. W., & Takahashi, J. S. (1994). Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science*, *264*(5159), 719-725. doi:10.1126/science.8171325

- Vlietstra, L., Hendrickx, W., & Waters, D.
  L. (2018). Exercise interventions in healthy older adults with sarcopenia: A systematic review and meta-analysis. *Australas J Ageing*, *37*(3), 169-183. doi:10.1111/ajag.12521
- 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. doi:10.1111/jpi.12303
- Vosshall, L. B., Price, J. L., Sehgal, A., Saez, L., & Young, M. W. (1994). Block in nuclear localization of period protein by a second clock mutation, timeless. *Science*, 263(5153), 1606-1609. doi:10.1126/science.8128247
- Vriend, J., & Reiter, R. J. (2014). Melatonin as a proteasome inhibitor. Is there any clinical evidence? *Life Sci*, *115*(1-2), 8-14. doi:10.1016/j.lfs.2014.08.024
- Vriend, J., & Reiter, R. J. (2015). Melatonin feedback on clock genes: a theory involving the proteasome. J Pineal Res, 58(1), 1-11. doi: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). doi:10.3390/ijms19092813

- Welz, P. S., & Benitah, S. A. (2020). Molecular Connections Between Circadian Clocks and Aging. J Mol Biol, 432(12), 3661-3679. doi:10.1016/j.jmb.2019.12.036
- Wiesenberg, I., Missbach, M., Kahlen, J. P., Schräder, 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. doi:10.1093/nar/23.3.327
- Woldt, E., Sebti, Y., Solt, L. A., Duhem, C., Lancel, S., Eeckhoute, J., Hesselink, M. K., Paquet, C., Delhaye, S., Shin, Y., Kamenecka, T. M., Schaart, G., Lefebvre, P., Nevière, R., Burris, T. P., Schrauwen, P., Staels, B., & Duez, H. (2013). Rev-erb-a modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. Nat Med, 19(8), 1039-1046. doi:10.1038/nm.3213
- 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., Delisle, B. P., Bryant, A. J., Gumz, M. L., Huo, Z., Liu, A. C., & Esser, K. A. (2023). Defining the age-

dependent and tissue-specific circadian transcriptome in male mice. *Cell Rep, 42*(1), 111982. doi:10.1016/j.celrep.2022.111982

- Wolff, G., Duncan, M. J., & Esser, K. A. (2013). Chronic phase advance alters circadian physiological rhythms and peripheral molecular clocks. *J Appl Physiol*, 115(3), 373-382. doi:10.1152/japplphysiol.01139.20 12
- 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.
  doi:10.3389/fnmol.2020.00007
- Yeung, F., Hoberg, J. E., Ramsey, C. S., Keller, M. D., Jones, D. R., Frye, R.
  A., & Mayo, M. W. (2004). Modulation of NF-kappaBdependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J*, 23(12), 2369-2380. doi:10.1038/sj.emboj.7600244
- Yoo, S. Z., No, M. H., Heo, J. W., Park, D. H., Kang, J. H., Kim, S. H., & Kwak, H. B. (2018). Role of exercise in age-related sarcopenia. J *Exerc Rehabil*, 14(4), 551-558. doi:10.12965/jer.1836268.134
- Yu, E. A., & Weaver, D. R. (2011). Disrupting the circadian clock: gene-specific effects on aging, cancer, and other phenotypes. *Aging*, 3(5), 479-493. doi:10.18632/aging.100323
- Zehring, W. A., Wheeler, D. A., Reddy, P., Konopka, R. J., Kyriacou, C. P., Rosbash, M., & Hall, J. C. (1984).

P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic Drosophila melanogaster. *Cell, 39*(2 Pt 1), 369-376. doi:10.1016/0092-8674(84)90015-1

- 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. doi:10.1021/tx980243t
- 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*, 10, 249.
  doi:10.3389/fendo.2019.00249
- Zheng, B., Albrecht, U., Kaasik, K., Sage, M., Lu, W., Vaishnav, S., Li, Q., Sun, Z. S., Eichele, G., Bradley, A., & Lee, C. C. (2001). Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. *Cell*, 105(5), 683-694. doi:10.1016/s0092-8674(01)00380-4
- 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. Н., Seki, E.. Gustafsson, A. B., Hoffman, H. M., Diaz-Meco, M. T., Moscat, J., & Karin, M. (2016). NF-KB Restricts Inflammasome Activation via Elimination of Damaged Mitochondria. Cell, 164(5), 896-910. doi:10.1016/j.cell.2015.12.057
- Zhu, P., Hamlish, N. X., Thakkar, A. V., Steffeck, 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.

doi: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. doi:10.1016/j.arr.2022.101725

## ANEXO



**Figura A1. Confirmación de la inactivación de** *Bmal1* **en el GM del ratón***knockout* **para** *Bmal1* **inducible y específico de músculo esquelético durante toda la duración del diseño experimental.** Ensayo de recombinación utilizando ADN genómico aislado del músculo gastrocnemio y el hígado (usado como ejemplo de tejido no muscular) de ratones machos y hembras iMS-*Bmal1*<sup>flox/flox</sup> tratados con tamoxifeno (es decir, ratones iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup>) y ratones iMS-*Bmal1*<sup>flox/flox</sup> tratados con vehículo a las 15 semanas de edad (3 semanas después de las inyecciones) y a las 17 semanas de edad (5 semanas después de las inyecciones). La recombinación del gen *Bmal1* (exón 8) produce un producto de PCR de 572 pares de bases. El alelo no recombinado se detecta a 431 pares de bases.

#### Figura A1

### Tabla A1. Valores de cada parámetro evaluado de todos los grupos experimentales.

Parameter	Control males	TMX males	TMX + E males	TMX + aMT males	TMX + E + aMT males	Control females	TMX females	TMX + E females	TMX + aMT females	TMX + E + aMT females
	$mean \pm SD$	$mean \pm SD$	$mean \pm SD$	$mean \pm SD$	$mean \pm SD$	$mean \pm SD$	$mean \pm SD$	$mean \pm SD$	$mean \pm SD$	$mean \pm SD$
CIRCADIAN RHYTHM OF LOCOMOTOR ACTIVITY										
Daytime activity in LD (counts)	601.33 ± 540.57	$578.29 \pm 629.24$	$\begin{array}{c} 1067.88 \pm \\ 1055.91 \end{array}$	$\begin{array}{c} 643.05 \pm \\ 268.59 \end{array}$	$880.08 \pm 353.25$	$359.21\pm78.06$	$\frac{1178.88}{2256.55} \pm$	447.17 ± 177.12	$733.94\pm227.31$	$810.25 \pm 11.67$
Nighttime activity in LD (counts)	$\begin{array}{c} 24048.13 \pm \\ 3412.85 \end{array}$	$\frac{18682.13 \pm 2622.81}{2}$	$\begin{array}{c} 14640.00 \pm \\ 3360.96 \end{array}$	$\begin{array}{l} 20647.61 \pm \\ 4188.89 \end{array}$	$21079.78 \pm 2702.42$	$\begin{array}{c} 33568.71 \pm \\ 5501.29 \end{array}$	$21616.17 \pm 7428.10$	$\begin{array}{c} 21432.25 \pm \\ 7979.03 \end{array}$	$\begin{array}{c} 31781.94 \pm \\ 8276.91 \end{array}$	$\begin{array}{c} 32279.75 \pm \\ 901.21 \end{array}$
Subjective day activity in DD (counts)	$2408.38 \pm \\ 1261.84$	$2753.54 \pm 1569.89$	$2508.33 \pm \\ 1456.87$	1944.31 ± 594.59	$785.25\pm538.99$	$\begin{array}{r} 3911.95 \pm \\ 1232.38 \end{array}$	$4509.46 \pm 2510.27$	$\begin{array}{c} 3015.04 \pm \\ 1298.82 \end{array}$	$\begin{array}{l} 4230.50 \pm \\ 825.32 \end{array}$	$\begin{array}{l} 4931.33 \pm \\ 3186.81 \end{array}$
Subjective night activity in DD (counts)	$29439.47 \pm \\ 3444.17$	$\begin{array}{c} 23044.46 \pm \\ 5238.39 \end{array}$	$\begin{array}{c} 20187.20 \pm \\ 3014.27 \end{array}$	$\begin{array}{l} 23743.69 \pm \\ 4218.91 \end{array}$	$21657.67 \pm \\ 4306.98$	$\begin{array}{c} 39278.58 \pm \\ 6315.51 \end{array}$	$28395.17 \pm \\6351.23$	$\begin{array}{c} 28991.45 \pm \\ 11026.21 \end{array}$	$34392.25 \pm 11164.42$	$35820.33 \pm 8527.93$
Period in LD (h)	$23.95\pm0.06$	$23.98 \pm 0.02$	$23.90\pm0.09$	$23.99\pm0.02$	$23.97\pm0.04$	$23.94\pm0.06$	$23.97\pm0.04$	$23.95\pm0.02$	$23.94\pm0.06$	$23.99\pm0.02$
Period in DD (h)	$23.83\pm0.06$	$23.77\pm0.07$	$23.85\pm0.09$	$23.91\pm0.07$	$23.89\pm0.11$	$23.87\pm0.14$	$23.66\pm0.08$	$23.86\pm0.07$	$23.89 \pm 0.21$	$24.06\pm0.17$
PHYSICAL ACTIVITY										
Total distance (cm)	$\begin{array}{l} 4118.23 \pm \\ 609.86 \end{array}$	$2743.84 \pm 569.96$	$3741.92 \pm 849.26$	$3747.29 \pm 848.01$	$\begin{array}{l} 4141.38 \pm \\ 1359.55 \end{array}$	$5261.79 \pm 729.60$	$3698.12 \pm 1118.15$	4743.86 ± 1232.97	$\begin{array}{l} 4260.56 \pm \\ 1141.81 \end{array}$	5076.05 ± 1127.63
Mean speed (cm/s)	$2.29\pm0.34$	$1.52\pm0.32$	$2.08\pm0.47$	$2.08\pm0.47$	$2.30\pm0.75$	$2.92\pm0.40$	$2.05\pm0.62$	$2.64\pm0.68$	$2.37\pm0.64$	$2.82\pm0.63$
Resting time (%)	$77.12 \pm 4.64$	$85.72 \pm 3.69$	$79.53 \pm 5.62$	$80.23 \pm 4.40$	$76.97 \pm 8.49$	$70.19 \pm 4.69$	$79.77 \pm 6.99$	$73.27\pm7.83$	$76.21\pm6.55$	$71.34 \pm 6.97$
Travelled distance (m)	$\begin{array}{c} 458.10 \pm \\ 106.15 \end{array}$	$336.45\pm 63.98$	$341.22\pm81.88$	$479.83\pm74.97$	$507.90 \pm 145.60$	$441.00\pm59.47$	$396.56\pm50.47$	$\begin{array}{c} 341.00 \pm \\ 130.58 \end{array}$	$516.83 \pm 103.59$	$555.83 \pm 142.53$
Exhaustion time (s)	$1667.10 \pm 191.46$	$1419.09 \pm 142.53$	$1442.33 \pm 169.85$	1679.58 ± 133.42	$1729.60 \pm 262.33$	$1638.25 \pm 109.62$	$1542.44 \pm 106.97$	$\begin{array}{c} 1404.00 \pm \\ 258.10 \end{array}$	$1722.67 \pm 196.70$	$1813.33 \pm 245.23$
Body weight (g)	$29.89 \pm 2.04$	$30.48 \pm 1.56$	$29.67 \pm 1.48$	$30.56\pm3.34$	$30.52 \pm 1.29$	$22.64 \pm 1.06$	$22.86 \pm 1.12$	$22.77 \pm 1.96$	$23.48\pm2.16$	$23.56 \pm 1.30$
GM weight (mg)	$198.94\pm15.15$	$166.59\pm14.90$	$190.86\pm9.46$	$174.09\pm12.31$	$188.02\pm11.36$	$145.08\pm11.58$	$116.53\pm7.13$	$130.85\pm9.55$	$117.26\pm9.55$	$133.94\pm6.32$

GM weight/body weight (%)	$0.67\pm0.05$	$0.55\pm0.03$	$0.63\pm0.04$	$0.56\pm0.03$	$0.62\pm0.03$	$0.64\pm0.05$	$0.50\pm0.03$	$0.56\pm0.06$	$0.50\pm0.03$	$0.56\pm0.02$
FI	0	$0.38\pm0.14$	$0.08\pm0.13$	$0.08\pm0.20$	$0.04\pm0.10$	0	$0.33 \pm 0.26$	$0.17\pm0.20$	$0.17\pm0.26$	$-0.04 \pm 0.19$
LIGHT MICROSCOPY										
SDH activity in deep GM (Intensity AU/fiber number)	$2590.17 \pm 615.43$	$1703.91 \pm 561.21$	$3575.30 \pm 778.26$	3332.53 ± 520.57	$3325.66 \pm 813.16$	$3035.00 \pm 771.26$	${}^{1580.38\pm}_{240.82}$	1825.94 ± 375.39	$3625.84 \pm 422.09$	$3916.21 \pm 616.96$
SDH activity in superficial GM (Intensity AU/fiber number)	$251.24\pm16.31$	$217.28\pm74.90$	$\begin{array}{c} 550.87 \pm \\ 223.30 \end{array}$	${}^{597.71\pm}_{201.88}$	$882.44 \pm 177.80$	$182.94 \pm \\176.03$	$185.62\pm62.66$	$185.86\pm70.89$	$633.16 \pm 112.36$	$445.65 \pm 126.31$
Type 1 fibers in deep GM (%)	$1.46 \pm 1.30$	$7.07 \pm 2.65$	$3.26\pm2.86$	$3.28\pm3.51$	$1.26\pm1.46$	$5.69 \pm 1.94$	$1.87\pm2.46$	$1.39\pm3.18$	$2.69\pm2.35$	$4.54\pm3.16$
Type 2A fibers in deep GM (%)	$25.46\pm7.05$	$48.73\pm3.50$	$34.83 \pm 9.99$	$27.25\pm7.94$	$32.07 \pm 7.37$	$41.46\pm 6.55$	$39.52\pm 6.82$	$37.39 \pm 6.98$	$41.11\pm9.25$	$40.54 \pm 9.79$
Type 2B fibers in deep GM (%)	$50.48 \pm 7.66$	$30.32\pm4.76$	$47.80 \pm 13.08$	$52.98 \pm 9.40$	$52.56 \pm 8.86$	$40.10 \pm 11.01$	$45.31\pm9.30$	$47.52\pm9.09$	$43.44 \pm 10.66$	$40.05\pm12.12$
Type 2X fibers in deep GM (%)	$18.34\pm5.50$	$13.89\pm3.16$	$14.11\pm3.64$	$16.49 \pm 4.08$	$10.61\pm4.82$	$12.75\pm4.00$	$13.30\pm5.25$	$11.72\pm3.86$	$12.76\pm3.25$	$14.86 \pm 4.19$
Type 1 fibers in superficial GM (%)	$0.00\pm0.00$	$0.00\pm0.00$	$0.00\pm0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00\pm0.00$	$0.00\pm0.00$	$0.02\pm0.05$	$0.00\pm0.00$	$0.00\pm0.00$	$0.00\pm0.00$
Type 2A fibers in superficial GM (%)	$0.00\pm0.00$	$0.78 \pm 1.28$	$0.64\pm0.75$	$0.15\pm0.43$	$1.06 \pm 1.06$	$0.98 \pm 0.55$	$0.69\pm0.95$	$0.43\pm0.76$	$0.36\pm0.39$	$0.23\pm0.31$
Type 2B fibers in superficial GM (%)	$98.43\pm0.69$	$97.56 \pm 3.19$	$97.08 \pm 1.57$	$98.86 \pm 1.29$	$97.48 \pm 2.40$	$95.97\pm0.95$	$96.63 \pm 1.69$	$97.90 \pm 2.37$	$98.06 \pm 1.60$	$98.50 \pm 1.49$
Type 2X fibers in superficial GM (%)	$1.57\pm0.69$	$1.69\pm2.07$	$2.28 \pm 1.46$	$0.99 \pm 0.91$	$2.33\pm2.04$	$3.41\pm0.73$	$2.66 \pm 1.33$	$1.67 \pm 1.77$	$1.59 \pm 1.48$	$1.30 \pm 1.20$
CSA of fibers (µm <sup>2</sup> )	$\begin{array}{c} 2106.45 \pm \\ 156.71 \end{array}$	$1728.87 \pm 213.73$	$\begin{array}{c} 2138.52 \pm \\ 304.26 \end{array}$	$2165.03 \pm 215.80$	$2588.94 \pm 179.18$	$\begin{array}{c} 1936.53 \pm \\ 207.75 \end{array}$	$\begin{array}{c} 1753.17 \pm \\ 254.00 \end{array}$	$\begin{array}{c} 2166.72 \pm \\ 401.14 \end{array}$	$\begin{array}{c} 2007.08 \pm \\ 249.43 \end{array}$	$2105.69 \pm 356.49$
Perimeter (µm)	$187.41\pm6.21$	$167.72\pm10.42$	$190.71\pm15.51$	$188.95\pm12.47$	$203.66\pm7.35$	$173.62\pm10.40$	$167.39\pm15.08$	$188.17\pm18.59$	$182.90\pm12.97$	$185.35\pm19.17$
Feret's diameter (µm)	$71.79 \pm 4.00$	$63.55\pm5.78$	$73.02\pm7.05$	$70.82\pm 6.58$	$75.68 \pm 4.05$	$65.55\pm5.40$	$61.51\pm6.24$	$71.02\pm8.28$	$68.85 \pm 5.83$	$69.19 \pm 7.71$
Number of fibers	$479.89\pm41.25$	$647.32\pm71.17$	$543.68\pm44.97$	$587.84\pm55.26$	$492.78\pm 66.51$	$609.00\pm72.54$	$704.87\pm39.15$	$670.29 \pm 68.33$	$682.88\pm51.34$	$665.72\pm57.29$
Collagen content (Intensity AU)	$\begin{array}{l} 46551.70 \pm \\ 57173.83 \end{array}$	$\begin{array}{c} 132500.214 \pm \\ 54637.19 \end{array}$	$\begin{array}{l} 97681.25 \pm \\ 40826.04 \end{array}$	$\begin{array}{c} 84184.70 \pm \\ 49440.03 \end{array}$	$\begin{array}{c} 96451.20 \pm \\ 23902.06 \end{array}$	$\begin{array}{c} 63024.90 \pm \\ 35158.26 \end{array}$	$\begin{array}{c} 179425.85 \pm \\ 63969.86 \end{array}$	$\begin{array}{l} 89700.30 \pm \\ 61357.85 \end{array}$	$\begin{array}{c} 132812.14 \pm \\ 47993.86 \end{array}$	$\frac{118691.88}{59853.82} \pm$
ELECTRON MICROSCOPY										

#### José Fernández Martínez

Sarcomere length (µm)	$1.72\pm0.12$	$1.64\pm0.20$	$1.74\pm0.17$	$1.69\pm0.04$	$1.73\pm0.18$	$1.82\pm0.15$	$1.77\pm0.14$	$1.97\pm0.11$	$1.91\pm0.03$	$1.78\pm0.09$
A-band length (µm)	$1.37\pm0.05$	$1.26\pm0.13$	$1.30\pm0.11$	$1.33\pm0.02$	$1.30\pm0.10$	$1.33\pm0.04$	$1.31\pm0.07$	$1.39\pm0.06$	$1.35\pm0.01$	$1.36\pm0.04$
I-band length (µm)	$0.36\pm0.09$	$0.34\pm0.08$	$0.39\pm0.10$	$0.37\pm0.05$	$0.41\pm0.09$	$0.47\pm0.06$	$0.41\pm0.09$	$0.47\pm0.05$	$0.54\pm0.03$	$0.40\pm0.05$
H-zone length (µm)	$0.12\pm0.02$	$0.15\pm0.02$	$0.13\pm0.01$	$0.12\pm0.01$	$0.13\pm0.01$	$0.13\pm0.02$	$0.13\pm0.01$	$0.15\pm0.02$	$0.12\pm0.01$	$0.13\pm0.01$
CSA of IFM mitochondria $(\mu m^2)$	$0.06\pm0.03$	$0.15\pm0.06$	$0.11\pm0.03$	$0.07\pm0.02$	$0.08\pm0.03$	$0.05\pm0.02$	$0.17\pm0.08$	$0.12\pm0.02$	$0.09\pm0.02$	$0.09\pm0.03$
Number of IFM mitochondria	$17.88 \pm 3.72$	$11.25\pm2.82$	$6.50 \pm 1.72$	$16.38\pm8.52$	$20.00\pm4.18$	$13.22\pm5.29$	$7.00\pm3.30$	$7.88 \pm 3.04$	$10.00\pm3.06$	$10.11\pm2.26$
Mitochondrial damage (%)	$15.38 \pm 4.08$	$30.87\pm9.41$	$43.76\pm8.19$	$20.30\pm7.61$	$16.07\pm10.93$	$15.20\pm5.45$	$46.97 \pm 16.83$	$31.76 \pm 11.47$	$15.72\pm4.00$	$26.31 \pm 6.51$

Notas: los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar (SD) para los parámetros medidos en los ratones machos y hembras de los grupos control, TMX, TMX + E, TMX + aMT y TMX + E + aMT (n = 6 animales de cada sexo por grupo (para la evaluación del ritmo circadiano de la actividad locomotora), n = 12 animales de cada sexo por grupo (para la evaluación de la actividad física muscular y del FI), y n = 4 animales de cada sexo por grupo (para las pruebas de imagen)). recuentos = número de rotaciones de la rueda; h = horas; cm = centímetros; cm/s = centímetros por segundo; % = porcentaje; m = metros; s = segundos; g = gramos; mg = miligramos; UA = unidades arbitrarias;  $\mu$ m<sup>2</sup> = micrómetros cuadrados;  $\mu$ m = micrómetros.
Parameter	Control males		TMX males		TMX + E males		TMX + aMT males		TMX + E + aMT males		Control females		TMX females		TMX + E females		TMX + aMT females		TMX + E + aMT females	
	mean ± SD	FI	mean ± SD	FI	mean ± SD	FI	mean ± SD	FI	mean ± SD	FI	mean ± SD	FI	mean ± SD	FI	mean ± SD	FI	mean ± SD	FI	mean ± SD	FI
Total distance (cm)	4118.23 ± 609.86	0	2743.84 ± 569.96	0.5	3741.92 ± 849.26	0	3747.29 ± 848.01	0	$4141.38 \pm 1359.55$	0	5261.79 ± 729.60	0	3698.12 ± 1118.15	0.5	4743.86± 1232.97	0	4260.56 ± 1141.81	0.25	5076.05 ± 1127.63	0
Travelled distance (m)	$458.10 \pm 106.15$	0	$336.45 \pm 63.98$	0.25	$341.22 \pm 81.88$	0.25	$479.83 \pm 74.97$	0	$507.90 \pm 145.60$	0	$441.00 \pm 59.47$	0	$\begin{array}{c} 396.56 \pm \\ 50.47 \end{array}$	0	$341.00 \pm 130.58$	0.25	$516.83 \pm 103.59$	-0.25	$555.83 \pm 142.53$	-0.25
Mean speed (cm/s)	$\begin{array}{c} 2.29 \pm \\ 0.34 \end{array}$	0	$\begin{array}{c} 1.52 \pm \\ 0.32 \end{array}$	0.5	$\begin{array}{c} 2.08 \pm \\ 0.47 \end{array}$	0	$\begin{array}{c} 2.08 \pm \\ 0.47 \end{array}$	0	$\begin{array}{c} 2.30 \pm \\ 0.75 \end{array}$	0	$\begin{array}{c} 2.92 \pm \\ 0.40 \end{array}$	0	$\begin{array}{c} 2.05 \pm \\ 0.62 \end{array}$	0.5	$\begin{array}{c} 2.64 \pm \\ 0.68 \end{array}$	0	$\begin{array}{c} 2.37 \pm \\ 0.64 \end{array}$	0.25	$\begin{array}{c} 2.82 \pm \\ 0.63 \end{array}$	0
Resting time (%)	77.12 ± 4.64	0	$\begin{array}{c} 85.72 \pm \\ 3.69 \end{array}$	0.25	$\begin{array}{c} 79.53 \pm \\ 5.62 \end{array}$	0	$\begin{array}{c} 80.23 \pm \\ 4.40 \end{array}$	0	$\begin{array}{c} 76.97 \pm \\ 8.49 \end{array}$	0	70.19 ± 4.69	0	79.77 ± 6.99	0.5	73.27 ± 7.83	0	76.21 ± 6.55	0.25	71.34 ± 6.97	0
Exhaustion time (s)	$1667.10 \pm 191.46$	0	1419.09 ± 142.53	0.25	$1442.33 \pm 169.85$	0.25	1679.58 ± 133.42	0	$\begin{array}{c} 1729.60 \pm \\ 262.33 \end{array}$	0	$1638.25 \pm 109.62$	0	$1542.44 \pm 106.97$	0	$\begin{array}{c} 1404.00 \pm \\ 258.10 \end{array}$	0.5	$1722.67 \pm 196.70$	0	$\begin{array}{c} 1813.33 \pm \\ 245.23 \end{array}$	-0.25
GM weight/body weight (%)	$\begin{array}{c} 0.67 \pm \\ 0.05 \end{array}$	0	$\begin{array}{c} 0.55 \pm \\ 0.03 \end{array}$	0.5	$0.63 \pm 0.04$	0	$\begin{array}{c} 0.56 \pm \\ 0.03 \end{array}$	0.5	$\begin{array}{c} 0.62 \pm \\ 0.03 \end{array}$	0.25	$\begin{array}{c} 0.64 \pm \\ 0.05 \end{array}$	0	$\begin{array}{c} 0.50 \pm \\ 0.03 \end{array}$	0.5	$\begin{array}{c} 0.56 \pm \\ 0.06 \end{array}$	0.25	$\begin{array}{c} 0.50 \pm \\ 0.03 \end{array}$	0.5	0.56 ± 0.02	0.25
FI Mean		0		0.38 ± 0.14		0.08 ± 0.13		0.08 ± 0.20		0.04 ± 0.10		0		0.33 ± 0.26		0.17 ± 0.20		0.17 ± 0.26		-0.04 ± 0.19

## Tabla A2. Valores del análisis zoométrico y de la actividad física muscular de todos los grupos experimentales utilizados para calcular el FI.

Notas: la actividad física se evalúa a través de la distancia total y la distancia recorrida; la lentitud se evalúa a través de la velocidad media; la resistencia se evalúa a través del tiempo de descanso y el tiempo de agotamiento; y el peso se evalúa mediante la relación peso del GM/peso corporal. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar (SD) para los parámetros medidos en los ratones machos y hembras de los grupos control, TMX, TMX + E, TMX + aMT y TMX + E + aMT (n = 24 animales/grupo (12 machos y 12 hembras)). cm = centímetros; m = metros; cm/s = centímetros por segundo; % = porcentaje; s = segundos.