



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA

EFFECTO DEL EJERCICIO EN RATAS WISTAR OBESAS- HIPOESTROGÉNICAS ADMINISTRADAS CON EXTRACTO LIPÍDICO DE TOMATE

TESIS

Que para obtener el grado de
Químico Farmacéutico Biólogo

PRESENTA:
BEATRIZ GUILLÉN GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS: **DRA. GUADALUPE BRAVO**
ASESOR DE TESIS: **DRA. RAQUEL RETANA UGALDE**



MÉXICO D.F 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

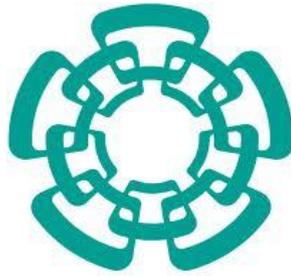


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 3 DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN (CINVESTAV) SEDE SUR, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. GUADALUPE BRAVO Y LA ASESORÍA DE LA DRA. RAQUEL RETANA UGALDE.

A mis PADRES
A mis HERMANOS
A mis PROFESORES

Especial agradecimiento a la DRA. GUADALUPE BRAVO y al ING.
PATRICK MAILLOUX SALINAS por compartir sus conocimientos
y brindarme su confianza.

A la Universidad Nacional Autónoma de México
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPIRITU”

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	
1. Obesidad	6
1.1 Tejido adiposo y sus efectos a nivel vascular.....	7
2. Hipoestrogenismo	9
2.1 Estrógenos.....	10
2.2 Fisiología del hipoestrogenismo.....	12
2.3 Estrógenos en la disfunción endotelial.....	13
3. Hipoestrogenismo y obesidad	16
3.1 Incidencia.....	17
3.2 Principales patologías.....	18
4. Terapia de reemplazo hormonal	19
5. Alternativas a la TRH: dieta y ejercicio	19
5.1 Ejercicio.....	21
5.2 <i>Lycopersicum esculentum</i>	22
5.2.1 Mecanismos biológicos del licopeno.....	23
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
III. HIPOTESIS.....	27
IV. OBJETIVOS.....	28
V. MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS.....	29
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	30
A. Tipo de estudio	30
B. Población.....	30

C. Grupos experimentales.....	30
D. Criterios de:.....	31
• Inclusión	
• Exclusión	
• Eliminación	
VII. METODO	32
A. Ovariectomía.....	32
B. Registro de la presión arterial media y frecuencia cardiaca.....	32
C. Ejercicio en caminadora	33
D. Método general de recolección y conservación de muestra.....	33
E. Preparación del extracto lipídico de jitomate.....	34
F. Determinación cuantitativa de parámetros bioquímicos en suero sanguíneo.....	35
a. Glucosa	
b. Triglicéridos	
c. Colesterol LDL	
d. Colesterol HDL	
e. Colesterol total	
G. Determinación colorimétrica de marcadores de estrés oxidativo.....	40
a. Nitritos totales	
b. Malondialdehído	
VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
IX. RESULTADOS	45
X. DISCUSIÓN	55
XI. CONCLUSIONES	62
XII. REFERENCIAS.....	63

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Ácidos grasos
AGL	Ácidos grasos libres
CAT	Catalasa
CCK	Colecistoquinina
CHE	Colesterol esterasa
COX	Ciclooxigenasa
CV	Cardiovascular
ECV	Enfermedades cardiovasculares
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
EPHX-1	Epóxido hidrolasa-1
EROS	Especies reactivas de oxígeno
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FHA	Hormona folículo estimulante
GPR	Receptor acoplado a proteína G
HA	Hipertensión arterial
HDLc	Lipoproteína de alta densidad ligada a colesterol
HMGCoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
IMC	Índice de masa corporal
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
LDLc	Lipoproteína de baja densidad ligada a colesterol
MnSOD	Manganeso superóxido dismutasa
NOS	Sintasa de óxido nítrico

OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido nítrico
PAI	Inhibidores del activador de plasminógeno
PAM	Presión arterial media
RE	Receptores a estrógenos
RL	Radicales libres
SCV	Sistema cardiovascular
SOD	Superóxido dismutasa
TA	Tejido adiposo
TAB	Tejido adiposo blanco
TAP	Tejido adiposo pardo
THR	Terapia de reemplazo hormonal
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa

RESUMEN

La obesidad sigue siendo uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, que afecta a la mayor parte de la población femenina. El hipoestrogenismo, el sedentarismo y la mala alimentación son algunos de los factores que conllevan a la obesidad, haciendo vulnerables a las personas al desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Los efectos producidos por el hipoestrogenismo se han tratado de minimizar mediante el reemplazo hormonal; sin embargo, en los últimos años se han reportado efectos secundarios graves, como la aparición de cáncer de mama y enfermedades cerebrovasculares, es por eso que se recomienda hacer cambios en la alimentación e incorporar el ejercicio dentro de la vida diaria como una alternativa o bien complementar la terapia hormonal.

Se evaluó el efecto del ejercicio en un modelo de rata Wistar, obesa e hipoestrogénica al cual se le administró un extracto lipídico de jitomate. Se formaron 4 grupos experimentales: Ovariectomizadas-Obesas-vehículo-sedentarias (Ov-Ob-veh-sed), Ovariectomizadas-Obesas-extracto-sedentarias (Ov-Ob-ext-sed), Ovariectomizadas-Obesas-vehículo-ejercicio (Ov-Ob-veh-ejer), Ovariectomizadas-Obesas-extracto-ejercicio (Ov-Ob-ext-ejer). El extracto lipídico de polvo de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) se administró vía oral (2mg/Kg) y el ejercicio se realizó en caminadora (30cm/seg) durante 20 minutos diariamente durante cuatro semanas.

En cuanto al peso, los animales tratados con el extracto más ejercicio mostraron disminución significativa con respecto al grupo Ov-Ob-veh-sed ($F_{(3,96)} = 49.89$, $p < 0.001$). Se detectó disminución significativa en la presión arterial media (PAM) del grupo Ov-Ob-veh-ejer ($F_{(3,40)} = 23.78$, $p < 0.001$). Los niveles de glucosa en suero sanguíneo demuestran una disminución significativa del grupo Ov-Ob-veh-ejer ($F_{(3,23)} = 18.21$, $p < 0.001$) comparado con los demás grupos, los niveles de triglicéridos fueron más elevados en el grupo Ov-Ob-ext ejer ($F_{(3,23)} = 6.308$, $p < 0.001$), el LDLc del grupo (Ov-Ob-ext-ejer) fue significativamente menor ($F_{(3,36)} = 6.547$, $p < 0.001$), así como un incremento en las HDLc ($F_{(3,40)} = 9.704$, $p < 0.001$) con respecto al grupo Ov-Ob-veh-sed. En las aortas torácicas, los niveles de nitritos totales y malondialdehído disminuyeron significativamente ($F_{(3,19)} = 12.36$ y $F_{(3,13)} = 28.33$, $p < 0.001$) con respecto a las ratas sedentarias mostrando relevancia de la combinación de este tratamiento. Posiblemente influirá en la disminución de riesgo en enfermedades cardiovasculares, sin embargo se necesitan hacer más análisis para poder sustentar este hecho.

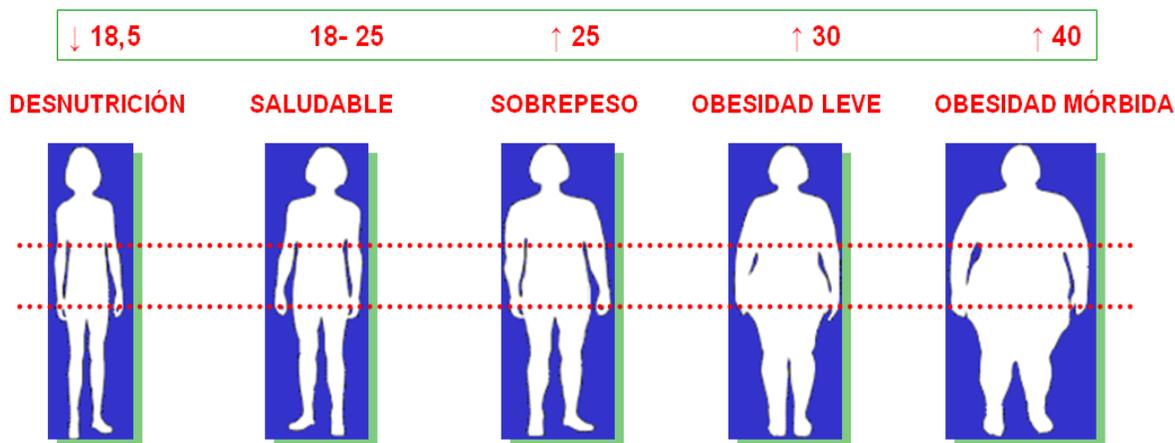
I. INTRODUCCIÓN

1. Obesidad

La obesidad es un proceso patológico progresivo con múltiples manifestaciones órgano-específicas, originando síntomas físicos, psicológicos y sociales que afectan directamente la calidad de vida de las personas que lo padecen. Puede ser factor de riesgo para patologías como: diabetes Mellitus tipo2, síndrome metabólico, cáncer, dislipidemias y enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis, infartos, enfermedades coronarias, etc ^{1,2}.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), clasifica a la obesidad según el índice de masa corporal (IMC), el cual consiste en dividir el peso en kilogramos entre la estatura elevado al cuadrado. Un IMC mayor a 25 se considera obesidad o sobrepeso, siendo un factor predisponente para desarrollar enfermedades cardiovasculares (ECV).

$$\begin{aligned} &\text{❖ ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC):} \\ &\text{IMC} = \frac{\text{masa (kg)}}{(\text{altura (m)})^2} \end{aligned}$$



De acuerdo con la *Food and Agriculture Organization* (FAO), México es uno de los países con el mayor número de individuos obesos a nivel mundial, hecho que reveló en su publicación *The State of Food and Agriculture*.

La etiología de la obesidad incluye factores genéticos del metabolismo como la regulación endocrina del apetito; factores ambientales, socioculturales y psicológicos, que en conjunto provocan un desequilibrio energético ¹. Por ejemplo, la regulación del apetito está controlado por grelina (sistema gastrointestinal), leptina (tejido adiposo), neuropéptido Y (hipotálamo) o melanocortina (hipofosis), entre otros. La grelina estimula la sensación de apetito y cuando las reservas de grasa son suficientes (a largo plazo) la leptina estimula el receptor en el núcleo paraventricular del hipotálamo que inhibe la producción de neuropéptido Y, provocando así supresión del apetito. Un desbalance en estas hormonas y en las vías de señalización produce exceso de tejido adiposo conocido como obesidad ^{2,3}.

El sedentarismo juega un papel muy importante en la aparición de la obesidad aún en personas sin predisposición genética ⁵, ya que al presentarse un desbalance energético por aumento en calorías consumidas y una disminución en calorías gastadas, traerá como consecuencia incremento del tejido grasa.

La obesidad contribuye a la hipertensión arterial por mecanismos como son: resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, aumento de la actividad adrenérgica y de concentraciones de aldosterona, retención de sodio y líquidos, favoreciendo el incremento en la frecuencia cardiaca (FC) y la presión arterial (PA) ⁶.

1.1 Tejido adiposo y sus efectos a nivel vascular

El tejido adiposo (TA) además de ser un reservorio de energía, es un órgano endocrino activo cuya célula especializada es el adipocito que contienen principalmente triglicéridos, colesterol y fosfolípidos. Se distinguen dos tipos de tejido: el tejido adiposo blanco (TAB) o unilocular y el tejido adiposo pardo (TAP) o plurilocular.

El TA es capaz de establecer comunicación con el resto del cuerpo mediante la síntesis y la liberación de moléculas activas llamadas adiponectinas, las cuales actúan localmente y a distancia por medio de efectos autocrinos, paracrinos y endocrinos ^{5,6}. Produce distintos tipos de citocinas o péptidos de regulación como: leptina (controla los mecanismos del apetito y balance energético), adiponectina, resistina, angiotensinógeno II, visfatina (regulación del tono vascular y procesos inflamatorios); además de quimiocinas como IL-6 y TNF α entre otros.

En los procesos inflamatorios a nivel vascular, el TNF α produce una disminución de óxido nítrico (ON) en las células endoteliales, ocasionando una vasoconstricción sostenida. La IL-6, ejerce actividad antiinflamatoria y proinflamatoria, controla la función vascular gracias al incremento de IL-1 y TNF α , además estimula la producción hepática de proteína C reactiva considerada como factor predictor de la aterosclerosis ^{6,8}.

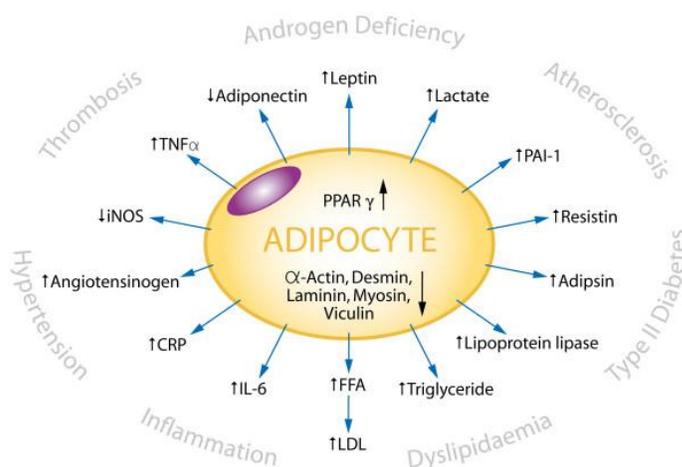


Figura 1. Adipocinas que se producen por el tejido adiposo que contribuyen a diversas enfermedades. **CRP**, proteína C reactiva; **PAI-1**, inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1; **PPAR γ** , receptor gamma para el activador del proliferador de peroxisoma; **FFA**, ácidos grasos libres; **LDL**, lipoproteínas de baja densidad; **IL-6**, interleucina-6; **iNOS**, sintasa de óxido nítrico inducible; **TNF α** factor de necrosis tumoral alfa. Tomado de: Carruthers y cols. 2008.

El tejido adiposo produce factores que dañan la función vascular, lo que incrementa el riesgo de sufrir eventos cardiovasculares, así como infartos, hipertensión, dislipidemias entre otros (Figura 1) ⁷.

2. Hipoestrogenismo

El hipoestrogenismo se refiere a la disminución de estrógenos en la mujer ⁹, el cual puede presentarse por diversas causas, entre ellas por:

1) Causa natural: Es el periodo en el que la producción de hormonas en los ovarios cesa de manera natural. Este proceso comienza con descenso de inhibina B, este péptido (producido por las células de la granulosa) inhibe a la hormona folículo estimulante (FSH) ocasionando un aumento considerable en los niveles de esta hormona. La FSH, al ser de origen hipofisiario, sirve como un biomarcador de la falla ovárica. Tras el agotamiento folicular, esta hormona se estabiliza un año después de presentarse la menopausia ¹¹.

2) Enfermedad: La producción de estrógenos se ve afectado debido a alguna disfunción ovárica; por ejemplo, el síndrome de ovario poliquístico, cáncer de ovario, falla ovárica prematura, etc ⁹.

3) Extirpación quirúrgica: La extirpación en histerectomías de uno o ambos ovarios se debe a patologías benignas como endometriosis, o malignas como cáncer ¹⁰.

El hipoestrogenismo por causas naturales comienza entre los 45 y 56 años de edad ¹¹. Comienza con un decline en la función ovárica con alternados ciclos ovulatorios normales (perimenopausia o climaterio). Posteriormente se presenta la menopausia la cual dura aproximadamente un año a partir de la última menstruación ¹², etapa en donde la mujer experimenta una serie de cambios. No todas las mujeres presentan los mismos síntomas ni los padecen con igual intensidad. Los síntomas más habituales son: sofocaciones, insomnio, irritabilidad, estados de ánimo depresivos, apatía, palpitaciones, adormecimiento y hormigueo de miembros, dolor de cabeza, fatiga, disminución de la libido, aumento de vello, incremento de peso y dificultad para perderlo. Posteriormente, esta reducción estrogénica provoca una gran cantidad de manifestaciones clínicas como aumento en el riesgo de sufrir fracturas osteoporóticas, enfermedades a nivel cardiovascular, Alzheimer, entre otros ¹³.

2.1 Estrógenos

Existen tres tipos principales de estrógenos: estrona, estradiol y estriol. La estrona es el estrógeno predominante en la menopausia ya que se genera por el TA y por las glándulas suprarrenales (Figura 2). El estradiol, sintetizado en las células de la granulosa, es el estrógeno más bioactivo ya que propicia la ovulación, la concepción y el embarazo; además, regula el metabolismo de ácidos grasos y colesterol, participa en la regulación, crecimiento y diferenciación de glándulas mamarias, sistema cardiovascular (SCV), inmune, esquelético, nervioso, entre otros¹⁴.

Actualmente se han identificado dos tipos de receptores a estrógenos (RE) que son miembros de la superfamilia de los receptores nucleares, los RE α y RE β . Ambos actúan como factores de transcripción cuando son activados por los estrógenos o por determinados factores de crecimiento para promover la expresión génica o actuar directamente sobre ciertos órganos¹⁵. Sin embargo, nuevos estudios sugieren que por lo menos hay dos receptores más, uno acoplado a proteínas G (GPR30) y otro llamado RE "X", poco descrito aún¹⁶.

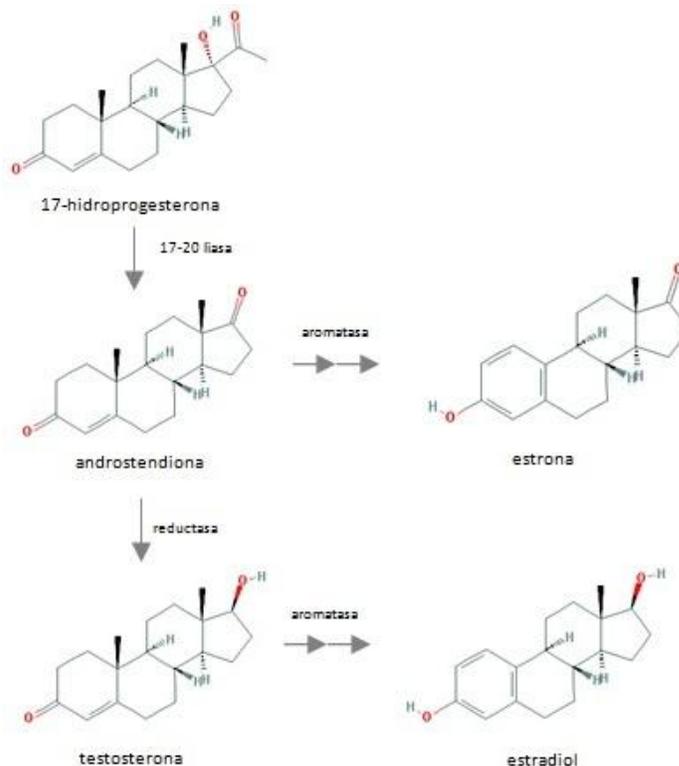


Figura 2. Conversión de progesterona a estrógenos y andrógenos. Adaptado de: Thomas M Devlin. 2006.

Los RE α y RE β son muy parecidos y parecen actuar de manera muy similar, pero probablemente los beta sean los más distribuidos en el organismo ²⁷.

En ausencia de estrógeno, los RE se encuentran secuestrados en un complejo inhibitorio multiprotéico en el citoplasma de las células blanco. Cuando la hormona entra a la célula, se une a su receptor provocando una homodimerización que conlleva a una unión de alta afinidad con elementos de respuesta de estrógenos (ERE) o a una fracción de ADN. También se puede producir una respuesta con la unión a cinasas de factores de crecimiento.

Durante el hipoestrogenismo los niveles circulantes de estradiol son muy variables, usualmente entre 10-20pg/ml. Este estradiol no es liberado de manera gonadal, es convertido de manera exógena ¹¹.

La Tabla 1 muestra los niveles de estrógenos de mujeres en edad fértil y no fértil. Después de la menopausia, la producción de androstendiona, testosterona, y estrógenos declinan significativamente.

Hormonas	Periodo reproductivo (mg/día)	Postmenopausia (mg/día)	Ooforectomizadas u ovariectomizadas (mg/día)
Androstendiona	2-3	0.5-1.5	0.4-1.2
Dehidroepiandrosterona (DHEA)	6-8	1.5-4.0	1.5-4.0
Sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAs)	8-16	4-9	4-9
Testosterona	0.2-0.25	0.05-0.18	0.02-0.12
Estrógenos	0.350	0.045	0.045

Tabla 1. Niveles de esteroides en sangre de mujeres en periodo reproductivo, postmenopáusicas y ooforectomizadas. Tomado de: Altchek A. y cols. 2003.

Los niveles de estrógenos circulantes en las mujeres ooforectomizadas u ovariectomizadas son producto de la conversión extragonadal a partir de los andrógenos. Diversos estudios muestran que el principal productor de estrógenos circulantes es el tejido adiposo, aquí la estrona es sintetizada a partir de dehidroepiandrosterona secretada por las glándulas suprarrenales ¹⁷.

2.2 Fisiopatología del hipoestrogenismo

El hipoestrogenismo causa grandes cambios metabólicos en la mujer. La carencia de estrógenos tiene efectos en diferentes órganos estrógeno-dependientes, los más significativos se producen sobre el sistema cardiovascular y el tejido óseo ¹⁸.

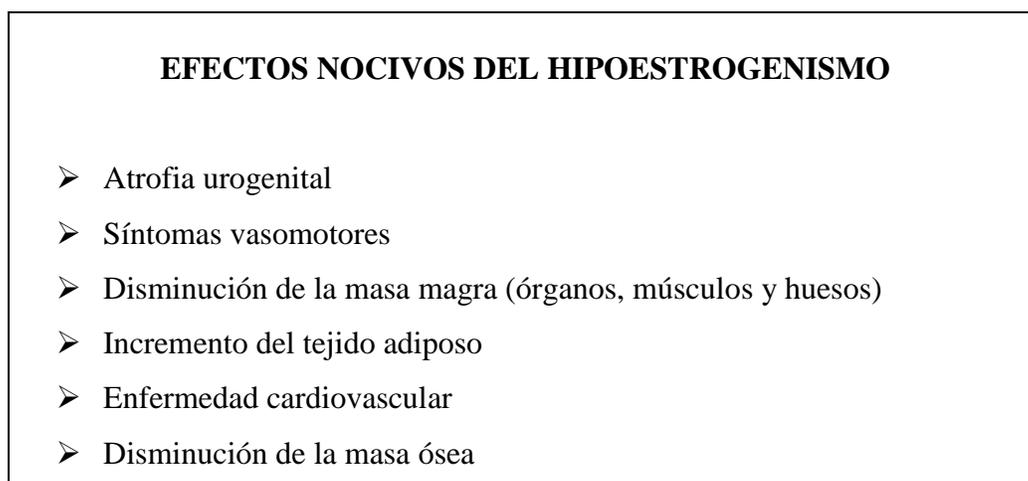


Figura 3. Principales desórdenes en el organismo ocasionados por la disminución de estrógenos.

2.3. Efectos sistémicos del hipoestrogenismo

En la postmenopausia o hipoestrogenismo la concentración de lipoproteínas de baja densidad (LDLc) aumentan y las lipoproteínas de alta densidad (HDLc) disminuyen; estos parámetros son indicadores del desarrollo de hipertensión arterial (HA). También existe disminución en el metabolismo de carbohidratos, aunque este hecho aún no se ha esclarecido ¹⁹. El envejecimiento también es un factor importante en la aparición de enfermedades vasculares ya que se relaciona con el aumento en la oxidación ²⁰.

Durante y después de la menopausia ocurren alteraciones en los depósitos grasos ya que el hipoestrogenismo tiene efectos negativos sobre el metabolismo de las grasas favoreciendo la obesidad, éste acontecimiento incrementa el riesgo cardiovascular aterosclerótico ¹⁸.

La actividad de los estrógenos en la regulación de los lípidos se ha confirmado en estudios recientes en ratones sin receptores a estrógenos o aromatasas, enzima necesaria para la biosíntesis de los estrógenos. Los resultados indican que los ratones desarrollaron hiperlipidemia así como un aumento en la masa grasa ²¹.

2.4. Estrógenos en la disfunción endotelial

En las células endoteliales y el músculo liso se expresan los RE α y RE β ; éstos receptores han demostrado ser los responsables de la codificación de genes en la mitocondria vascular, siendo los RE β los que predominan en la regulación de genes involucrados en la cadena de transporte de electrones, sin embargo aún no queda bien establecido el mecanismo de acción vascular en ambos receptores ²².

Una vez que ingresa el estrógeno por difusión simple, el complejo estrógeno-receptor actúa sobre el tejido vascular como factor de transcripción y de manera directa induce la expresión de genes en diversas células como se observa en la Tabla 2.

CÉLULAS VASCULARES	OTRAS CÉLULAS
Prostaciclina	Factor transformador
eNOS	Factor de crecimiento plaquetario
Fibrinógeno	Factor tisular
iNOS	Antitrombina III
nNOS	PAI
Endotelina	Apoproteína A, B, D
Colágeno	Enzima convertidora de angiotensina
Metaloproteína	

Tabla 2. Diversos genes que se codifican por estrógenos. Tomado de: Perez CS y cols. 2001.

Así mismo, se ha reportado un mecanismo directo el cual no depende de la expresión génica. El estrógeno activa la eNOS (sintasa de óxido nítrico endotelial) en células endoteliales, vía fosfatidilinositol 3-cinasa/Akt, esto conduce a la fosforilación de la eNOS en serina posición 1177 provocando incremento en la producción de ON y por tanto vasodilatación ²³. El aumento de ON involucra toda una serie de mecanismos protectores del SCV, como inactivación plaquetaria y la inhibición de la adhesión leucocitaria ¹⁹. Además, las hormonas estrogénicas han demostrado modular el balance de agentes vasodilatadores y vasoconstrictores ²⁴.

Por otro lado, los estrógenos también se relacionan con el efecto antioxidante en las células; es decir, disminuyen el estrés oxidativo producido por radicales libres de oxígeno. Estos radicales libres o especies reactivas de oxígeno (EROs) son moléculas altamente reactivas que afectan a lípidos (peroxidación lipídica), ácidos nucleicos y proteínas, estos eventos se han relacionado con el envejecimiento y enfermedades degenerativas como diabetes, problemas neuronales, cáncer y aterosclerosis ^{25, 26}.

La peroxidación lipídica juega un papel muy importante en el desarrollo de aterosclerosis ya que descompone a los ácidos grasos poliinsaturados que son esenciales para el organismo (función cardioprotectora). Este mecanismo comienza cuando un radical libre ataca a un carbón alfa de un ácido graso poliinsaturado para formar un lípido radical llamado peroxil, que puede reaccionar con otros ácidos grasos poliinsaturados para formar un lipoperóxido, así se produce una reacción en cadena de un número creciente de ácidos grasos provocando daño tisular. Los productos finales de esta reacción son algunos alcoholes, cetonas y aldehídos reactivos como el malondialdehído, que reaccionan con proteínas y ADN ocasionando enfermedades patogénicas.

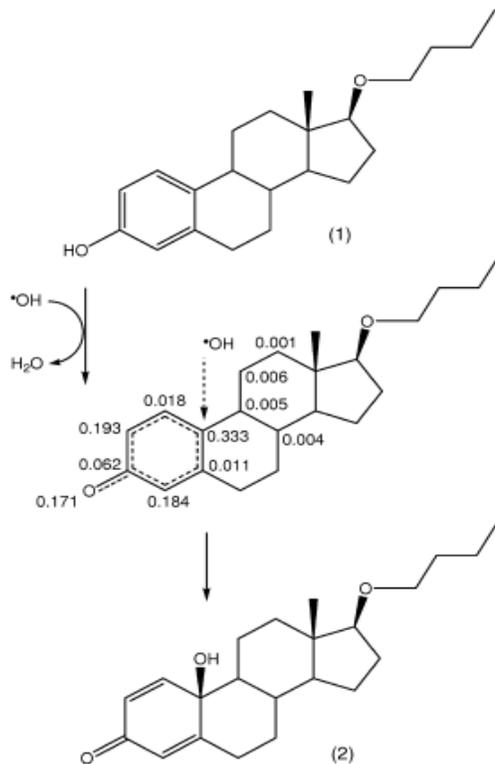


Figura 4. Un posible mecanismo para la captura de radicales libres del 17β-butoxiestra-1,3,5(10)trien-3-ol (7OBu-E2) (1), un derivado de estrógeno encontrado en experimentos con neuronas *in vitro*. La segunda estructura muestra las densidades de los átomos (C y O) lo cual nos indica la captura preferencial de •OH por el C10. Tomado de: Porkai-Tartai K. y cols. 2008.

Un estudio, realizado en la Universidad de California en el 2005 por Duckles y colaboradores, demostró que los estrógenos modulan la función mitocondrial en la vasculatura. Se utilizó un modelo de isquemia *in vitro* en células endoteliales de cerebro de ratón, para producir elevados niveles de EROs. Tras la administración de 17-βestradiol (E₂) aumentó la producción de ATP, además se detectaron los REα en las mitocondrias por inmunoblot y disminución de los niveles de EROs en comparación con los cultivos con estrés oxidativo. Estos hallazgos indican que el E₂ puede preservar la función mitocondrial endotelial y proporcionar protección contra la isquemia²⁷.

Otros estudios sugieren que los estrógenos pueden contribuir a la disminución de EROs mediante el incremento de la fosforilación oxidativa en mitocondrias cerebrovasculares. Tras la exposición con estrógeno sintético, la actividad de la citrato

sintasa y el complejo IV aumenta; es decir, provoca disminución en los niveles de producción de superóxido y peróxido ²⁸.

Los mecanismos precisos aún no se entienden pero la evidencia sugiere la participación de ambas acciones, genómicas y no genómicas. En particular los efectos de E₂ sobre las EROs pueden ser un mecanismo que subyace a los efectos protectores de esta hormona (Figura 5).

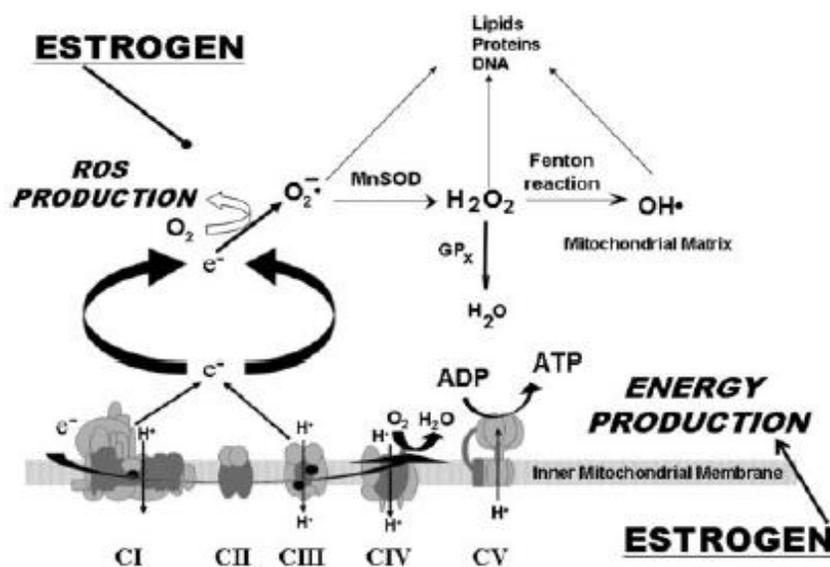


Figura 5. Posible efecto de los estrógenos en la actividad mitocondrial. Los estrógenos promueven la producción de energía mientras disminuyen los niveles de ROS durante la fosforilación oxidativa. Este sistema genera electrones que interactúan con el oxígeno produciendo superóxido, el cual se metaboliza por la enzima manganeso superóxido dismutasa. El peróxido de hidrógeno producido es reducido a H₂O por la glutatión peroxidasa-1. Tomado de: Miller MV. y cols. 2008.

3. Obesidad e hipoestrogenismo

Actualmente se sabe que el hipoestrogenismo promueve aumento en la masa grasa y peso corporal, además de alteraciones cardiovasculares en humanos y roedores. La disminución del metabolismo por la edad, la disminución de estrógenos y de actividad física, son factores predisponentes para la aparición de obesidad en mujeres. Además, la obesidad y el hipoestrogenismo están estrechamente relacionados con el desarrollo de ECV ²⁹.

Existen diversas vías por el cual el hipoestrogenismo y la obesidad se encuentran relacionados. Por ejemplo, la leptina, que informa al cerebro la magnitud de las reservas energéticas (involucrada con la sensación de saciedad), y su activador colecistoquinina (CCK) son regulados por los estrógenos estimulando su secreción, por lo tanto esta disminución ocasiona que la persona tenga un desbalance en la sensación de apetito-saciedad³⁰.

La *North American Menopause Society* afirma que el envejecimiento, el estilo de vida y factores ambientales, tales como, la falta de ejercicio físico y el incremento en el consumo calórico, están estrechamente relacionados con la aparición de obesidad y morbilidad. Las mujeres hipoestrogénicas con poca actividad física y mala alimentación son más susceptibles a desarrollar obesidad y sobrepeso³¹. Aún no queda bien establecido por qué algunas mujeres son más vulnerables a una ganancia de masa corporal más rápida al iniciarse la menopausia. Sin embargo, se han relacionado factores sociales, socioeconómicos, genéticos e historial reproductivo a esta ganancia ponderal³².

3.1 Incidencia

La incidencia de obesidad y sobrepeso en las mujeres a alcanzado proporciones epidémicas y el hipoestrogenismo juega un papel muy importante en su aparición³³. La prevalencia mundial de obesidad en las mujeres se registró desde 1980 por la OMS señalando que en ese año el 5% de hombres y el 8% de las mujeres tenían sobrepeso³⁴. Actualmente esta tendencia aumentó de manera importante, ya que cerca de 200 millones de hombres y 300 millones de mujeres mayores de 30 años presentan obesidad y sobrepeso. En todas las regiones de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), la obesidad es más frecuente en mujeres que en hombres mayores de 30 años. En México, de 1988 a 2012, el sobrepeso en mujeres de 20 a 49 años se incrementó de 25 a 35% y la obesidad de 9.5 a 35.2%³⁵. Con estos datos encontramos una clara asociación del hipoestrogenismo con el aumento del peso corporal y masa grasa^{37,38}.

3.2. Principales patologías.

Como se mencionó anteriormente, los estrógenos juegan un papel muy importante en la regulación vascular y su disminución puede incrementar el riesgo de ECV. Por otra parte, la relación de estas enfermedades con la obesidad se basa en un complejo sistema multifactorial en el que intervienen la actividad del sistema nervioso parasimpático, resistencia a la insulina, resistencia a la leptina, hiperactividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona y disminución de la actividad del péptido natriurético, entre otros factores. Es por eso que ambos factores, obesidad e hipoestrogenismo, resaltan la alta prevalencia de HTA y ECV en las mujeres.

De acuerdo con la OMS en su estudio *The global status report on noncommunicable diseases* en el 2010, las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo. En 2008 fallecieron por esta causa 17,3 millones de personas, lo cual representa un 30 % de los decesos registrados. Según datos del INEGI las mujeres presentan mayor frecuencia de ECV, principalmente enfermedades cerebrovasculares, isquemia del corazón e hipertensión arterial ⁴⁰ (Figura 6).

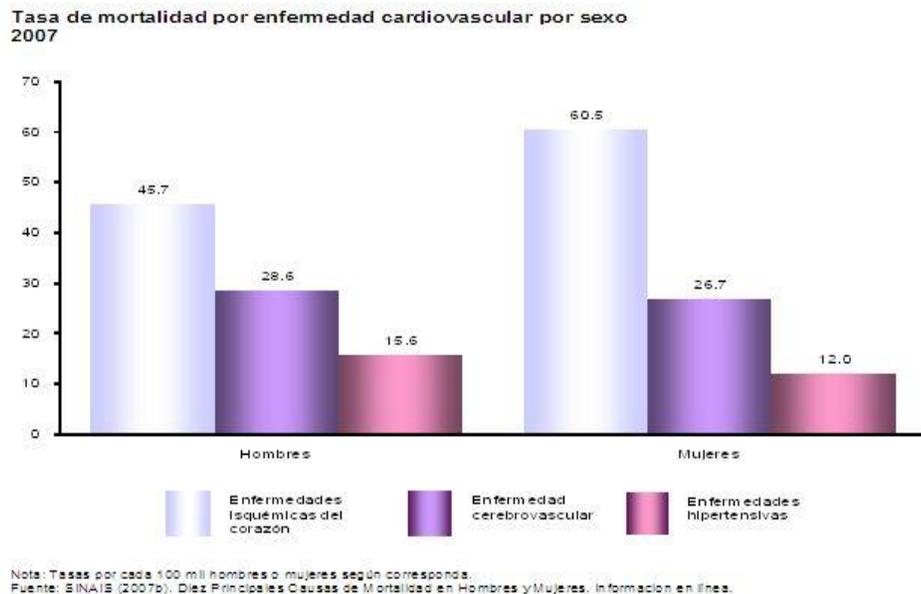


Figura 6. Gráfico de tasas de mortalidad en México por ECV. Tomado de: Base de datos INEGI. México 2007.

En otros estudios se demostró que el riesgo de enfermedades coronarias en mujeres de 65 a 74 años con IMC superior a 29 (sobrepeso, según la OMS), aumentó un 50% con respecto a las de IMC inferior a 21^{30, 38}.

4. Terapia De Reemplazo Hormonal

Cuando se reportó de manera contundente la importancia de los estrógenos en el organismo, se han realizado diversos estudios para evaluar los beneficios de las hormonas sintéticas, mostrando resultados controvertidos sobre sus efectos. En el 2002 su uso quedó suspendido tras las publicaciones de *Woman's Health Initiative* (WHI) por parte del Instituto Nacional de Salud (NIH) en Estados Unidos. El programa de investigación evaluó los efectos de las hormonas en dos estudios: el uso de estrógenos más progestina (PemproTM) en mujeres con matriz y el uso de estrógeno (PremarinTM) en mujeres sin matriz. En ambos estudios se eligieron mujeres hipoestrogénicas de 50 a 79 años al azar, con un grupo control (placebo). El estudio demostró que el uso de PemproTM incrementaba el riesgo de cáncer de mama, infarto cerebrovascular, infarto al miocardio, trombos en sangre e incontinencia urinaria. Además el estudio indicó que el tratamiento duplicaba el riesgo de demencia, incluida Alzheimer en mujeres mayores de 65 años^{41,42}.

Los resultados con respecto a PremarinTM mostraron que hay aumento significativo en la trombosis cerebral y aparición de trombos en sangre. Por otra parte, el riesgo de cáncer de mama disminuyó con respecto a aquellas administradas con placebo⁴³.

Un estudio de grandes proporciones se realizó en el Reino Unido por la Universidad de Oxford en el 2001, llamado *The Million Woman Study*, en donde se examinaron aleatoriamente a 1 129 025 mujeres premenopáusicas y menopáusicas. Los resultados mostraron mayor incidencia de cáncer mamario en las mujeres menopáusicas tratadas con estrógeno más progestina. En las mujeres que se medicaron sólo con estrógenos el riesgo no incrementó cuando el uso comenzó 5 años después de la menopausia, pero el riesgo incrementó significativamente cuando la terapia inició antes o poco después de la menopausia⁴⁴.

Sin embargo, los estudios a corto plazo indican que los beneficios de la TRH predominan en la protección ósea (además de bochorno, sudoración, fatiga entre otros), ya que reduce entre un 30 a 40% la osteoporosis en mujeres mayores de 60 años, además disminuye la concentración de LDLc e incrementa las HDLc, aunque la relación de estas dos lipoproteínas son indicadores en la aparición de ECV no existe evidencia clara que demuestre si la TRH disminuye eventos cardiovasculares. La evidencia epidemiológica aún no es clara ⁴⁵.

Por estas razones se requiere estudiar e implementar nuevas terapias alternativas que permitan la disminución de las patologías relacionadas con el hipoprogesteronismo y la obesidad.

5. Alternativa a las TRH: ejercicio y extracto natural de *Lycopersicum esculentum*

Actualmente para el tratamiento de la obesidad se han sugerido cambios en la dieta y aumento en la actividad física como parte de una terapia alternativa o bien para complementar una terapia de tipo farmacológica (Tabla 3).

Se han realizado múltiples estudios en relación al ejercicio, demostrando disminución en la tasa de mortalidad, el riesgo cardiovascular, diabetes, cáncer, IMC e hipertensión arterial lo que indica una mejora de la actividad endotelial y perfil lipídico en la obesidad.

Tratamiento de la obesidad	Grados de IMC				
	25-26.9	27-29.9	30-34.9	35-39.9	≥40
Dieta y actividad física	Con comorbilidades	Con comorbilidades	+	+	+
Terapia farmacológica		Con comorbilidades	+	+	+
Cirugía			Con comorbilidades		

Tabla 3. Terapias adecuadas para diferentes IMC, tomando en cuenta la existencia de comorbilidades. El símbolo “+” indica el uso del tratamiento indicado independientemente de comorbilidad. Tomado de: National Institute of Health Publication 2000.

5.1 Ejercicio

Uno de los principales factores para la aparición de la obesidad es el sedentarismo. Para relacionar la obesidad con los factores de riesgo CV, Castello Branco en el 2009, estudió a 467 mujeres chilenas y detectó alta prevalencia del sedentarismo como factor de riesgo CV ⁴⁶.

De acuerdo con la *European Food Information Council* (EUFIC) el ejercicio puede dividirse en tres tipos dependiendo el efecto que acusan en el cuerpo: a) ejercicio aeróbico, como el ciclismo, caminar, correr, éstos aumentan la resistencia cardiovascular; b) ejercicio anaeróbico, como hacer pesas, aumentan la fuerza del músculo a corto plazo; c) ejercicios de flexibilidad, que mejoran la capacidad del músculo y las articulaciones ⁷⁶. El ejercicio puede ser un método efectivo para la prevención y la disminución de la acumulación de la grasa corporal e incrementar la capacidad cardiorespiratoria en mujeres posmenopáusicas ^{47,48}. En un estudio aleatorio con mujeres postmenopáusicas, se demostró que existe una disminución significativa de grasa abdominal y subcutánea cuando se incrementa la duración del ejercicio ⁴⁹.

Hay nuevos estudios que relacionan la actividad física con la pérdida de masa grasa y la prevención del aumento de peso. El ejercicio aeróbico sólo, sin modificación en la dieta, ha demostrado producir pérdida de peso, pero en general es muy poco si no se combina con restricción calórica. En estudios con dieta y actividad física, por separado y combinada, se encontró que la pérdida de peso conseguida en el grupo físicamente activo fue significativamente menor que el alcanzado en la dieta por si sola y en el grupo de dieta más ejercicio ^{50,51,52}.

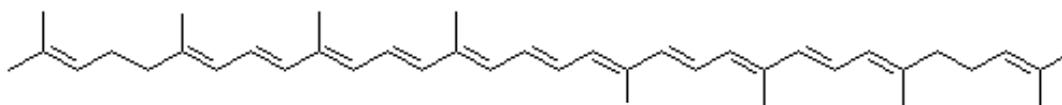
En general el control y disminución de peso involucran múltiples estrategias y técnicas que incluyen una dieta baja en calorías (1000-1200 Kcal/día) y actividad física (30-45 min de moderada intensidad) que pueden ser acompañadas por una terapia farmacológica ⁵³. El ejercicio también impacta de manera positiva en la función cardiovascular a través de la mejora de parámetros como la presión arterial diastólica, sistólica, media y frecuencia cardíaca; es decir, la práctica del ejercicio aeróbico es una

medida eficaz para la prevención y el control de la hipertensión arterial (HTA) pues reduce unos 10 mmHg la presión sistólica y 8 mmHg la diastólica, lo cual lleva a los autores a concluir que el ejercicio aeróbico es recomendable para la población hipertensa en general ⁷⁸.

Estudios actuales relacionados con el estrés oxidativo, demuestran que el ejercicio disminuye significativamente los niveles de EROs en ratas con elevado estrés oxidativo en el cerebro, esto sugiere que el ejercicio físico puede disminuir los niveles de EROs y con ello enfermedades relacionadas ⁵⁴.

5.2. *Lycopersicum esculentum*

El jitomate o tomate rojo (*Lycopersicum esculentum*) está compuesto de agua principalmente 90-95%, también de hidratos de carbono 4%, proteínas 0.5-1%, vitaminas A, C, B₁, B₂ y niacina, folatos (vitamina B₉) y carotenoides 5-6% (de los cuales el 65% es de licopeno, cerca de 3-5mg de licopeno por 100g de material crudo), aunque esto depende de la especie, condiciones ambientales, tipo de fertilización, estación del año, etc. El licopeno es un carotenoide con mayor poder antioxidante que el β -caroteno (*in vitro*) y representa aproximadamente el 80-90% de los carotenoides que se encuentran en el tomate rojo. La estructura molecular de este fitoquímico (hidrocarburo de 40 átomos de carbono unidos por dobles enlaces conjugados) (Figura 8), constituye la base molecular para la síntesis de otros carotenoides y le confiere propiedades antioxidantes en el organismo ⁶¹.



Lycopeno

Peso molecular: 536.89

Fórmula molecular: C₄₀H₅₆

Composición molecular: C 89.49% H 10.51%

Figura 8. Estructura del licopeno, peso y fórmula molecular. Carotenoide de cadena abierta. Tomado de: Leffingwell J.2001.

El licopeno también se encuentra en sandías, pimientos rojos, etc; ya que es el principal componente responsable de su característico color rojo ⁵⁵. Este carotenoide se encuentra distribuido ampliamente en el organismo, en la sangre (0.22-1.06nmol/mL) y tejidos como hígado, riñón, glándulas renales, testículos, ovarios y próstata. La distribución del licopeno en el organismo comienza una vez consumido el alimento, éste es incorporado dentro de las micelas de los lípidos dietarios y absorbido por la mucosa intestinal por difusión pasiva para integrarse a los quilomicrones y ser liberado al sistema linfático. El licopeno es transportado por las lipoproteínas dentro del plasma para la distribución a los diferentes órganos ⁵⁶. El tomate fresco proporciona el 90% del licopeno necesario para el organismo ya que es un micronutriente no sintetizado por el organismo ⁶⁰.

Los metabolitos del licopeno tales como 2,6-ciclicopen-1,5-diol, se han encontrado en suero, pulmones, hígado, colon, piel y próstata de humanos, por eso se debe tener en cuenta que, aunque los modelos de cultivos celulares permiten evaluar los eventos moleculares y celulares modulados por los compuestos fitoquímicos, los productos de degradación del licopeno en el organismo podrían ser los que tengan el efecto biológico ⁶⁰.

5.2.1 Mecanismos biológicos del licopeno

Se ha asociado la alta incidencia de enfermedades CV, principalmente coronarias, a la baja concentración de licopeno encontrado en el suero sanguíneo de hombres ^{55,57,58}. Además, estudios longitudinales como el Monitoreo Multinacional de Tendencias y Determinantes en enfermedades cardiovasculares demuestran la asociación inversa entre la ingesta de antioxidantes con la manifestación de isquemia cardiaca ⁷³.

El licopeno ha demostrado tener actividad antioxidante, aumento en la comunicación intercelular por uniones nexus, inactivación e inhibición de la señalización de andrógenos, antiproliferación de células cancerígenas, actividad antimetastásica en líneas celulares ^{56,58,59}.

También se ha demostrado tener efecto hipocolestorémico *in vivo* e *in vitro* en donde se observó una disminución en la síntesis de colesterol de los macrófagos hasta en un 73%. Este estudio sugiere que el licopeno inhibe la síntesis mediante la inhibición celular de la HMGCoA reductasa, enzima limitante en la síntesis del colesterol. Además, en un estudio clínico, el tratamiento con extracto de tomate (cápsulas que contenían 15mg de licopeno) demostró reducción considerable en la presión sistólica (de 144mmHg a 134mmHg) en pacientes con hipertensión grado 1⁵⁸. Otro estudio demostró que el consumo de jugo de tomate en 106 mujeres con obesidad o sobrepeso, durante 20 días, redujo los niveles de mediadores inflamatorios circulantes (IL-8 y TNF α) y por lo tanto disminuir el riesgo de ECV⁵⁹.

El mecanismo antioxidante aún no está bien establecido, sin embargo se ha encontrado que el licopeno puede regular el sistema de elementos de respuesta antioxidante (antioxidant response element, ARE) en líneas celulares a través de la expresión de proteínas incluyendo: epóxido hidrolasa-1 (EPXH-1), superóxido dismutasa-1 (SOD), catalasa (CAT) y la proteína de unión de metal transferrina, además de COX-2 e iNOS. En consecuencia el licopeno disminuye la modificación oxidativa de las LDL las cuales son captadas por los macrófagos para convertirse en células espumosas que forman la placa aterosclerótica⁵⁵. Otros estudios más actuales sugieren que el efecto antiaterogénico del licopeno sobre el organismo involucra diversas vías antioxidantes como son: modular factores de transcripción como el Nrf2 o factor nuclear derivado de eritroide cuya función es estimular la producción de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, EPXH-1); estimular la expresión de NADPH oxidasa, disminución en la producción de ON e iNOS *in vitro*⁶⁰. Incluso, los metabolitos del licopeno en particular el ácido apo-10-licopenóico, ha demostrado inducir la expresión de enzimas mediadas por el factor de transcripción Nfr 2, como la glutathion S-transferasas, la quinona óxido reductasa -1, e incrementa los niveles de glutathion intracelular en células bronquiales. Estos efectos van acompañados de la disminución de ROS y el daño oxidativo⁶¹.

El uso de licopeno también puede ser usado como agente terapéutico para el cáncer de próstata, cáncer de mama, endometrio y pulmón en cultivos de células y tejidos animales e in vivo en ratas ⁵⁷ (Figura 9).

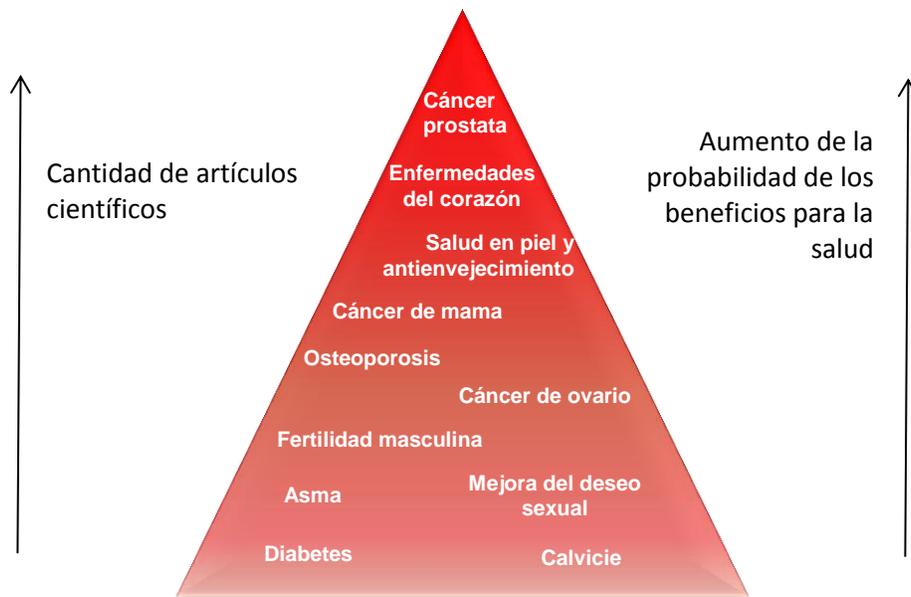


Figura 9. Principales mecanismos biológicos del licopeno y su importancia en investigaciones. Tomado de: Valensa. 2008.

La idea de la ingesta de compuestos naturales como un tratamiento puede ofrecer un amplio medio de bajo costo para reducir riesgos de eventos CV ⁵⁸.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La disminución hormonal, la obesidad y el sedentarismo son responsables directos en la aparición de enfermedades metabólicas y cardiovasculares. Tomando en cuenta que las modificaciones en la dieta así como el ejercicio no son suficientes para disminuir el peso corporal, se recurre a la terapia farmacológica la cual trae consigo efectos adversos perjudiciales para la salud. Por esta razón es importante buscar alternativas de origen natural que aunadas al ejercicio disminuyan el peso corporal así como los múltiples factores que intervienen en el deterioro metabólico. El uso de fitofármacos de origen natural y el ejercicio pareciera ser una buena elección. El tomate, por su alto contenido en antioxidantes, podría ser una buena alternativa terapéutica. Por lo anterior, es importante analizar si la administración del extracto lipídico de tomate combinado con el ejercicio aeróbico disminuye alteraciones ocasionadas por el sedentarismo, la obesidad y el hipoestrogenismo en ratas obesas hipoestrogénicas.

III. HIPÓTESIS

La ingesta del extracto lipídico de *Lycopersicum esculentum* aunado con el ejercicio disminuirán las alteraciones en los parámetros que se presentan en un estado de hipoestrogenismo y obesidad tales como PAM, colesterol, glucosa, triglicéridos, LDLc en suero sanguíneo y estrés oxidativo en ratas hembras Wistar inducidas obesas por una dieta alta en carbohidratos.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del extracto lipídico de *Lycopersicum esculentum* y el ejercicio a nivel bioquímico y cardiovascular, en ratas Wistar hipoestrogénicas y obesas inducidas por una ingesta alta en sacarosa.

A. Objetivos particulares

1. Inducir el hipoestrogenismo en ratas de 2 meses por medio de ovariectomía.
2. Provocar obesidad mediante una dieta alta en carbohidratos.
3. Medir la presión arterial media mediante el método pletismográfico después del tratamiento.
4. Administrar el extracto y someter a ejercicio en caminadora a las ratas Wistar Ov-Ob a diario por cuatro semanas.
5. Durante la administración del extracto y el régimen de ejercicio registrar a diario:
 - 5.1 Consumo de líquido/alimento (alimento seco).
 - 5.2 Ganancia de peso (g).
6. Determinar niveles séricos de colesterol, HDLc, LDLc, triglicéridos, glucosa en suero sanguíneo.
7. Determinar niveles de marcadores de estrés oxidativo en aorta (óxido nítrico y malondialdehído) por método colorimétrico.
8. Analizar los resultados obtenidos y concluir con base en los resultados.

V. MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

A. Fármacos y reactivos.

- Ácido acético concentrado
- Ácido tiobarbitúrico
- Agua desionizada
- Azúcar refinada comercial
- Baytril (enrofloxacina), solución inyectable al 10%
- Butanol
- Cloruro de potasio (lentejas)
- Kit para la determinación cuantitativa colorimétrica Spinreact[®]
 - Glucosa
 - Triglicéridos
 - HDLc
 - LDLc
 - Colesterol total
- Alimento estándar Lab Diet 5008
- Matacresa en aerosol Pfizer[®]
- Piridina
- Polvo de jitomate LABYZET[®]

B. Material

- Cepos de acrílico
- Cánula de administración oral para animales
- Matraz Erlenmeyer
- Embudo Buchner
- Matraz Kitazato
- Micropipetas de 100-1000 μ L, 10-100 μ L, 0.2-10 μ L
- Tubos de ensayo de 10mL

C. Equipo

- Balanza analítica SARTORIUS[®] T2101.
- Sonicador BRANSON[®] 3210
- Plancha de agitación y calentamiento BENCHMARCK[®]
- Vortex VORTEX-GENIE[®] 2
- Caminadora Panlab HARVARD APPARATUS[®] LE 8710
- Pletismógrafo Panlab HARVARD APPARATUS[®] LE 5002
- Micro homogenizador PRO CIENTIFIC[®] PRO200
- Centrífuga
- Espectrofotómetro MERCK[®] Microlab 100

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

A. Tipo de estudio

Experimental, Transversal, prospectivo y comparativo.

B. Población

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar de 2 meses de edad de 200-250g de peso, las cuales se sometieron a cirugía para la extracción de ambos ovarios para inducir el hipuestrogenismo. Después de 3 semanas de estabilización se someten a dieta hipercalórica con sacarosa al 30% en el agua de beber por 14 semanas para inducir la obesidad.

Las ratas se mantuvieron en el bioterio del departamento de farmacobiología del CINVESTAV sede sur, colocadas en jaulas individuales a temperatura constante de 22 ± 2 °C con humedad del 50%, bajo ciclos de luz-oscuridad (12/12h). Se les administró alimento estándar Lab Diet 5008 y agua ad libitum con azúcar refinada al 30%p/v (modelo de obesidad).

Todos los experimentos se realizaron siguiendo las especificaciones técnicas de la NOM-062-ZOO-1999. Para el ejercicio se siguieron las recomendaciones de la guía para el diseño de protocolos de ejercicio en animales ⁶⁵.

C. Grupos experimentales

Los animales se dividieron de forma aleatoria en cuatro grupos experimentales.

GRUPO 1. Ovariectomizadas-obesas-vehículo-sedentarias: aceite de maíz (vehículo) vía oral.

GRUPO2. Ovariectomizadas-obesas-extracto-sedentarias: extracto lipídico de polvo de jitomate 25% p/v (2mg/Kg) v.o.

GRUPO 3. Ovariectomizadas-obesas-vehículo-ejercicio: ejercicio aeróbico en caminadora.

GRUPO 4. Ovariectomizadas-obesas-extracto-ejercicio: extracto lipídico de tomate y ejercicio aeróbico.

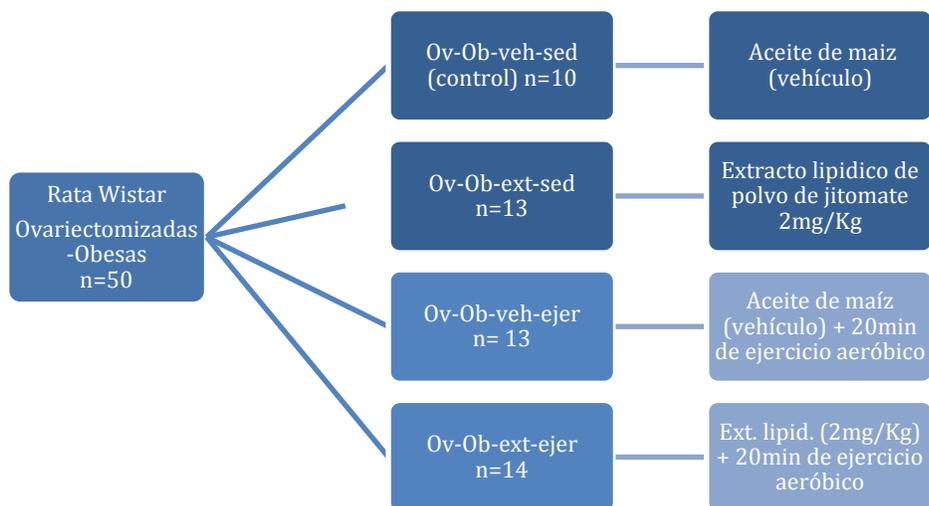


Figura 10. Esquema general de trabajo mostrando los grupos experimentales y el número de ratas por cada grupo.

D. Criterios

Criterios de inclusión: ratas ovariectomizadas que hayan cumplido las 14 semanas de dieta hipercalórica.

Criterios de exclusión: rata con alguna afección en huesos, músculo o piel (puede deberse a la obesidad), que le impidan el movimiento.

Criterios de eliminación: deceso de alguna rata durante el tratamiento.

VII. MÉTODO

A. Ovariectomía

Ratas de 2 meses se sometieron a cirugía para la extirpación bilateral de los ovarios (ovariectomía) con la finalidad de propiciar hipoenestrogenismo en los animales experimentales.

Los animales fueron anestesiados con una combinación de Ketamina (50mg/Kg) y Xilazina (10mg/Kg) por vía intramuscular, el cual debe prepararse el mismo día de uso. Se realizó una incisión (en el área pélvica rasurada) de aproximadamente 1.5cm en la piel seguido de otra incisión de 0.5 cm del músculo, ambas de manera transversal. Se expusieron los oviductos de cada lado y se ligaron con hilo de nylon. Posteriormente se extirparon ambos ovarios cortándolos por arriba de la ligadura y se sutura el músculo con hilo de seda de 3 ceros y la piel con hilo de nylon. Se limpió la herida con solución de yodo 2% y se administró por vía i.m. antibiótico enrofloxacina al 10% (1.5mg/Kg). Finalmente se colocaron las ratas en cajas de acrílico con una lámpara hasta su recuperación.

B. Registro de la presión arterial media y frecuencia cardiaca

Se utilizó el método pletismográfico de aire, que utiliza la técnica esfingomanométrica, la cual nos permite detectar cambios de volumen sanguíneo. El aparato consiste de un manguito con una membrana, que se infla con capacidad de 0.2 litros de aire, un sensor y la unidad de control en donde un transductor de presión interna mide constantemente la presión corriente aplicada al brazalete mostrando de forma automática la presión sistólica, diastólica y media calculada.

Antes de la toma de presión arterial se someten a las ratas a entrenamiento para evitar en la mayor medida posible variaciones por los movimientos de los animales. Para ello se colocaron a los animales en los cepos de acrílico 15 min, tres veces por día, una semana antes de la medición con la menor agresividad posible para que se habitúen a las condiciones necesarias de registro.

Por lo menos dos horas antes de la toma de presión se limitó el alimento y agua a los animales. Posteriormente se colocaron en los cepos y en un hueco caliente, para favorecer la vasodilatación de la arteria caudal. Se les colocó el manguito a unos 2 o 3cm del final de la cola y se presiona el botón de accionamiento para la toma de presión. Se insufla el manguito de aire para obstruir el paso de la sangre, cuando comienza a desinflarse la membrana del manguito, la re-aparición de las pulsaciones corresponden a la presión sistólica y posteriormente aparece la presión diastólica. La PAM y a FC son calculadas por el equipo.

C. Ejercicio en caminadora

El aparato Treadmill control Harvard® LE8710 consiste de una banda de cinco carriles con velocidad e inclinación ajustable, un software y la unidad de control. Una vez que se administró el extracto de tomate o el vehículo, se sometieron a las ratas a ejercicio en caminadora por 20 minutos, la primera semana a una velocidad de 10cm/s, la segunda 20cm/s, la tercera 25cm/s, la cuarta 30cm/s. Las últimas dos semanas se alternaban con 5 min de descanso cada 10min.

Tratamiento			
Duración (semanas)			
1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
Velocidad (cm/20min)			
10 cm/s	20 cm/s	25 cm/s	30 cm/s

Tabla 4. Velocidades y tiempo en caminadora al que se sometieron las ratas para el experimento.

D. Preparación del extracto lipídico de jitomate.

Se pesó la cantidad considerada de polvo de jitomate para una concentración de 25%p/v utilizando como diluyente aceite de maíz. La suspensión se colocó en sonicador por 30min. Posteriormente se filtró a vacío con embudo Büchner (papel filtro #1). El

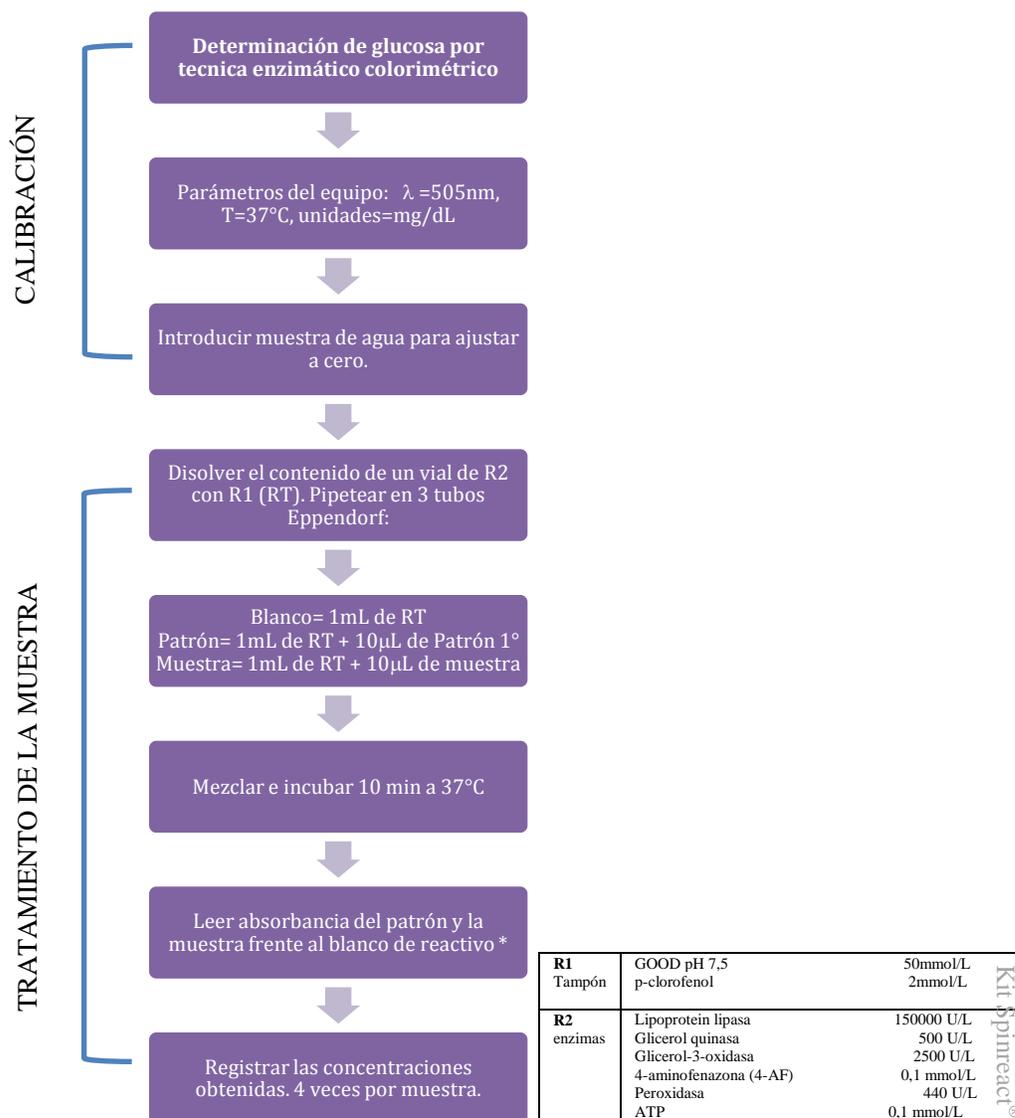
filtrado se recolectó en un matraz Erlenmeyer forrado de papel aluminio, y se almacenó en refrigeración a 4°C. El preparado no debe usarse más de una semana desde su preparación.

E. Método general de recolección y conservación de muestra

La muestra de sangre se obtuvo por decapitación, esto se realizó cuidadosamente para evitar la hemólisis por estrés mecánico. La sangre de cada animal fue recolectada en un tubo de ensaye. Transcurridos 10min, para la coagulación de la sangre, se separó el suero sanguíneo mediante centrifugación durante 5 min a 3000rpm. El sobrenadante se extrajo con una micropipeta de 1000µl y se almacenaron en tubos Eppendorf a -70°C en el Revco™. Las muestras se analizaron el día posterior a su recolección.

F. Determinación cuantitativa de parámetros bioquímicos en suero sanguíneo.

a. Glucosa



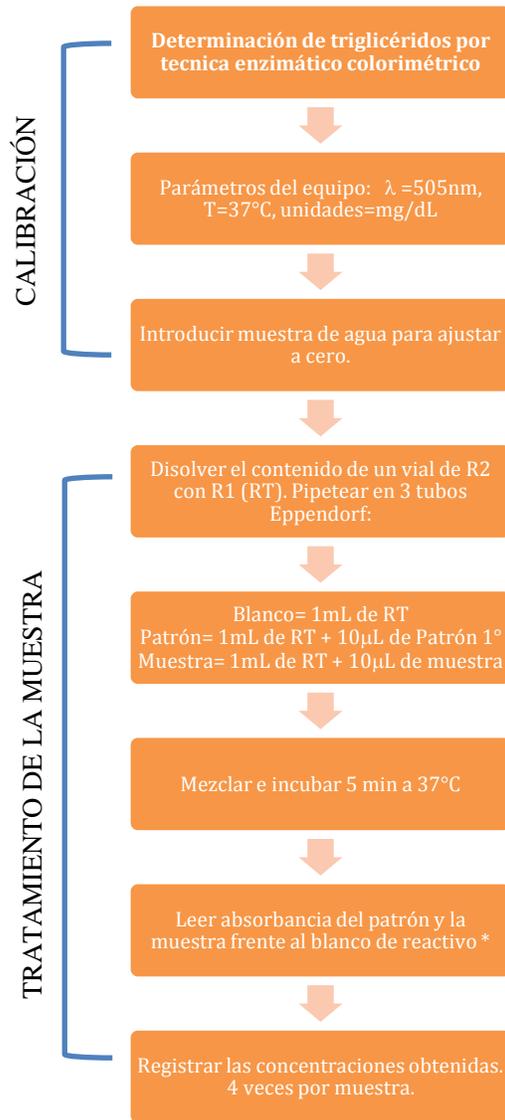
*La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada.

Reacciones involucradas



La glucosa oxidasa cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol ampirona en presencia de peroxidasa.

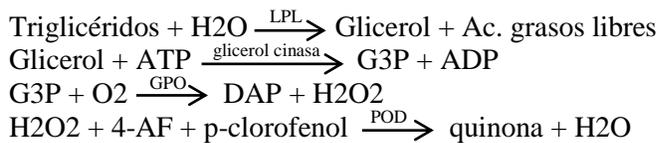
b. Triglicéridos



R1 Tampón	TRIS pH 7,4 Fenol	92mmol/L 0.3mmol/L	Kit Spinreact®
R2 enzimas	Glucosa oxidasa (GOD) 4-aminofenazona (4-AF) Peroxidasa	15000 U/L 2,6mmol/L 1000 U/L	

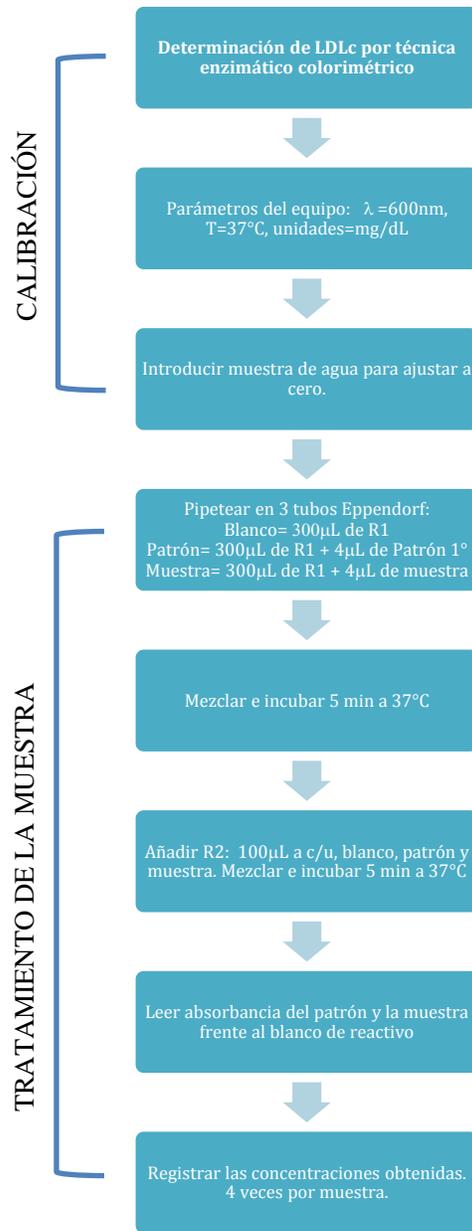
*El color es estable como mínimo 30 minutos

Reacciones involucradas



Los triglicéridos incubados con lipoproteinlipasas (LPL), liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerolcínasa GK para producir glicerol 3 fosfato G3P y adenosina-5-difosfato ADP. El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato DAP y peróxido de hidrógeno H₂O₂ por GPO. Al final el peróxido de hidrógeno reacciona con 4-aminofenazona 4-AF y p-clorofenol, reacción catalizada por POD, dando una coloración roja.

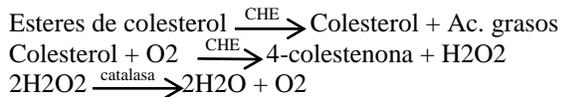
c. Colesterol LDL



Reacciones involucradas

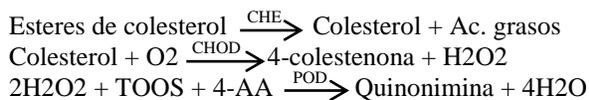
Es una determinación directa enzimática colorimétrica, sin necesidad de pretratamiento o centrifugado de la muestra. Esta determinación se realiza en dos etapas:

1.- Eliminación de lipoproteínas no-LDL

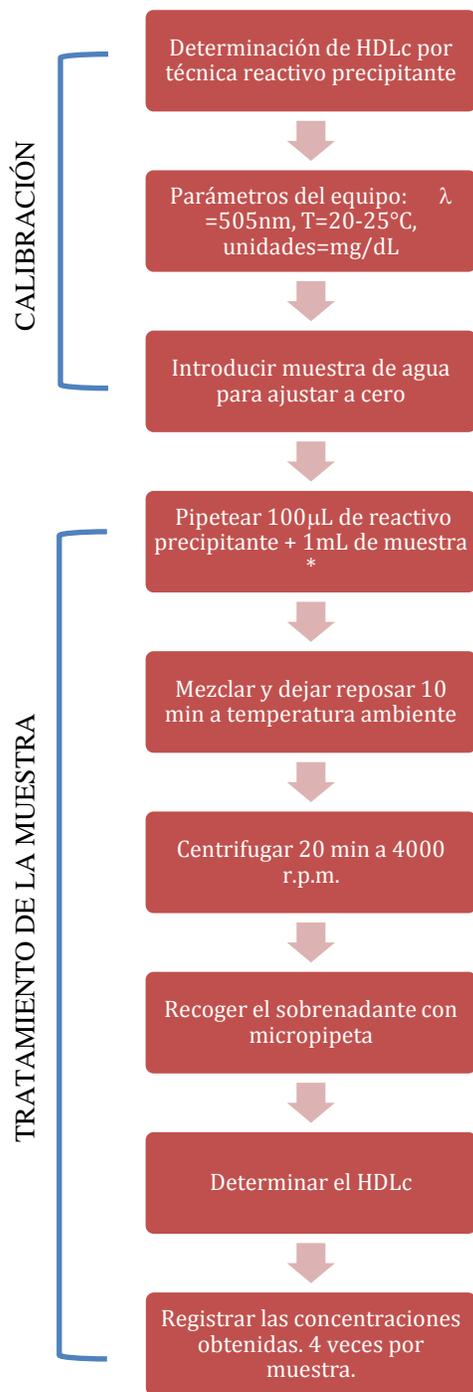


R1 enzimas	PIPES pH 7,0 (20°C)	50mmol/L
	Colesterol esterasa (CHE)	≥600U/L
	Colesterol oxidasa (CHOD)	≥500U/L
	Catalasa	≥600KU/L
	N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3- metilalanina (TOOS)	2mmol/L
R2 enzimas	PIPES pH 7,0	50mmol/L
	4-aminoantipirina (4-AA)	2mmol/L
	Peroxidasa	≥4U/L

2.- Medición de LDLc



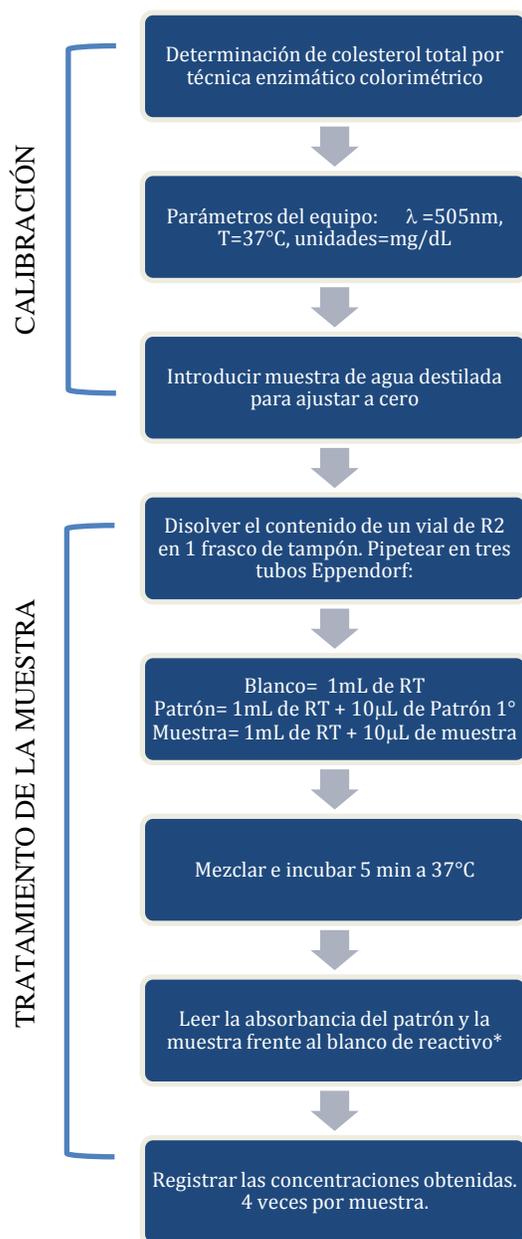
d. Colesterol HDL



* La medición de HDLc se realiza mediante la precipitación de LDL y VLDL. La precipitación se lleva a cabo con fosfotungstato en presencia de iones magnesio.

Reactivo precipitante	Ácido fosfotúngstico	14mmol/L
	Cloruro magnésico	2mmol/L

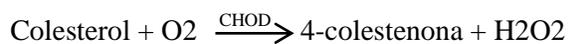
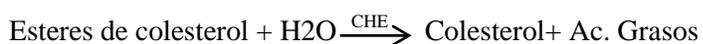
e. Colesterol total



R1 Tampón	PIPES pH 6,9 Fenol	90mmol/L 26mmol/L
R2 enzimas	Colesterol esterasa Colesterol oxidasa 4-aminofenazona (4-AF) Peroxidasa	30 U/L 300 U/L 0,4 mmol/L 1250 U/L

* El color es estable como mínimo 60 minutos

Reacciones involucradas



G. Determinación de marcadores de estrés oxidativo por métodos colorimétricos

a. Medición de malondialdehído en aorta

➤ Principio del método

La lipoperoxidación representa un mecanismo importante para el daño tisular asociado a enfermedades CV y al envejecimiento. Este mecanismo provoca daño oxidativo a los lípidos mediado por especies reactivas de oxígeno, del cual el malondialdehído es el producto de degradación más significativo.

El método más utilizado para la determinación de MDA es el de reacción con ácido tiobarbitúrico, que bajo condiciones de bajo pH y alta temperatura da lugar a un aducto MDA-TBA cromógeno que es detectable por espectrofotometría.

➤ Condiciones del equipo

Espectrofotómetro *Microlab 100* (Merck®), ajustado a cero con agua destilada a una longitud de onda a 532nm.

➤ Muestra

Las muestras de aortas se pesaron en balanza analítica y se registraron en la bitácora. La muestra se suspendió en 9mL de solución buffer y se homogenizó con el microhomogenizador PRO200.

➤ Soluciones

- Solución acuosa de ácido tiobarbitúrico 0.8%p/v
- Solución acuosa de KCl 2%
- Solución de ácido acético 20% v/v ajustado a pH 3.5 con NaOH
- Mezcla de n-butanol/piridina 15:1 v/v

➤ **Procedimiento:**

En tubos de ensaye de 10mLde capacidad se añadieron respectivamente 40μL de muestra homogénea y 40 μL de agua destilada (blanco). Posteriormente se añadió a cada tubo las siguientes cantidades de reactivos:

1. 1.5mL de ácido acético ajustado a pH 3.5
2. 1.5mL de solución TBA
3. 0.6mL de agua destilada

Los tubos se colocaron en un baño María a 95°C por 60min. Pasando este tiempo se añadieron 1mL de solución de KCl 2% más 5mL de mezcla butanol-piridina 15:1 v/v y se agitó en vórtex. Inmediatamente se centrifugó a 2000rpm por 10min. Finalmente se tomó el sobrenadante y se lee en espectrofotómetro a 532nm.

Los cálculos se realizaron usando el coeficiente de extinción molar el cual es:

$$\xi = 1.54 \times 10^{-5} \text{M/cm.}$$

$$\text{Concentración} = \xi \times 1 / \text{Abs}_{532\text{nm}}$$

b. Determinación de nitritos totales por reacción de Griess, en aorta

➤ **Principio del método**

El óxido nítrico es un importante modulador de múltiples procesos fisiológicos (relajación del musculo liso) y patológicos. El ON se forma a partir de la L-arginina catalizada por diversas isoenzimas denominadas sintasa de óxido nítrico (NOS). En la vasculatura la enzima responsable es la eNOS.

El aumento de la producción o desequilibrio en el control de EROS conduce a una reducción en la bioactividad del ON. El ·ON formado reacciona con el oxígeno molecular y ROS para formar iones nitritos y nitratos. La reacción de Griess se utiliza para

detectar la concentración de nitritos totales en una muestra, para ello la reducción de nitratos a nitritos se realiza mediante un metal como el cadmio o el vanadio. La reacción implica la formación de un cromóforo por diazotización de sulfanilamida con nitrito ácido seguido de un acoplamiento de una amina bicíclica como la N-(1-naftil)-etilendiamina (NEDD).

➤ **Condiciones del equipo**

Espectrofotómetro ajustado a cero con agua destilada a una longitud de onda a 540nm

➤ **Muestra**

Las muestras de aortas se pesaron en balanza analítica y se registraron en la bitácora. La muestra se suspendió en 9mL de solución buffer y se homogenizó con el microhomogenizador *PRO200*. Posteriormente las muestras fueron desnaturalizadas usando ácido tricloroacético al 20% con posterior centrifugación y lavados con solución salina.

➤ **Soluciones**

- Stock de NaNO_2 200 μM : 0.345mg de NaNO_2 en 25mL de agua destilada. Se realizaron diluciones sucesivas para hacer una curva de calibración con intervalos logarítmicos hasta tener como mínimo 6.25 μM (l.i detección). Esto será utilizado como estándar para medir la linealidad del método y extrapolar en la curva las concentraciones de las muestras.
- Stock de sulfanilamina 2% en HCl 5%: Disolver 1g de sulfanilamina en 25mL de agua. Añadir lentamente y resbalando por las paredes 6.74mL de HCl conc. Aforar a 50mL
- Stock de N-(1-naftil)-etilendiamina 0.1%: Disolver 0.005g de NEDD en 50mL de agua.
- Solución saturada de VCl_3 : Disolver 800mg de cloruro de vanadio en 50mL de agua destilada.

➤ **Procedimiento:**

Se colocaron en un tubo de 15mL, 400µL de muestra y los reactivos en el siguiente orden:

- 1.- 400µL de sln. saturada de VCl_3
- 2.-200µL de SULF al 2% en HCl 5%.
- 3.- 200µL de NEED 0.1%

Se incubaron los tubos 45min a 37°C y se leyeron en el espectro a 540nm por triplicado. Primero realizando la lectura del estándar y posteriormente de la muestra.

VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se presentan como la media \pm el error estándar. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente para verificar normalidad de los grupos con prueba de Shapiro-Wilkins. Posteriormente se analizaron con ANOVA de 1 y 2 vías, y un análisis de comparación múltiple de Tukey. Las diferencias entre las medias fueron consideradas estadísticamente significativas con valores de $p < 0.001$.

IX. RESULTADOS

A. Comparación visual del modelo de obesidad

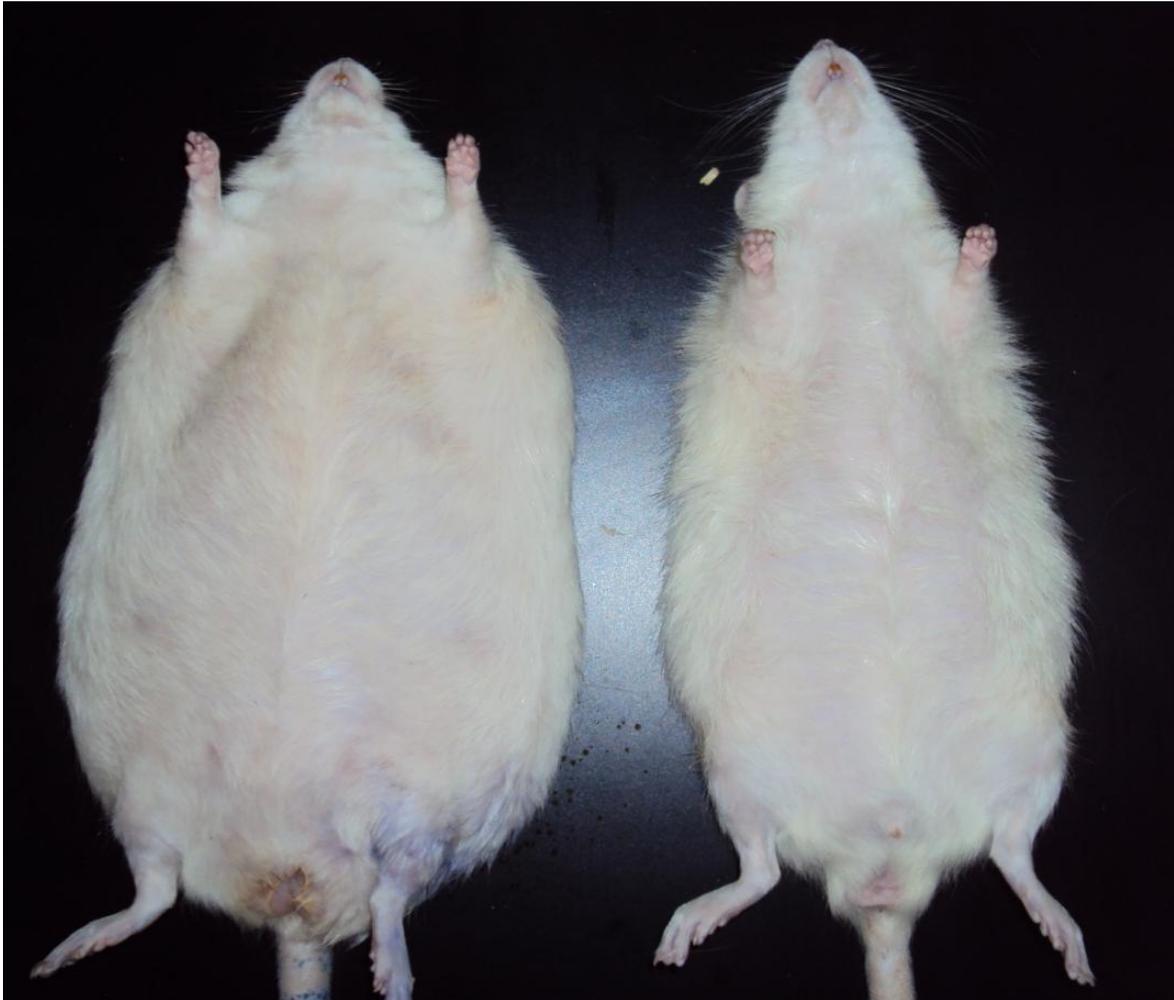


Figura 11. Comparación de una rata con normopeso 230g (derecha) y con obesidad 610g (izquierda)

B. Peso corporal

Se evaluó el peso corporal de los animales al finalizar las 14 semanas de dieta hipercalórica, y durante el tratamiento. Los grupos Ov-Ob-ext-ejer y Ov-Ob-veh-ejer mostraron una disminución de peso estadísticamente significativo con respecto al grupo vehículo-sedentarias ($F_{(3,96)}=49.89$, $p<0.001$ ANOVA de dos vías).

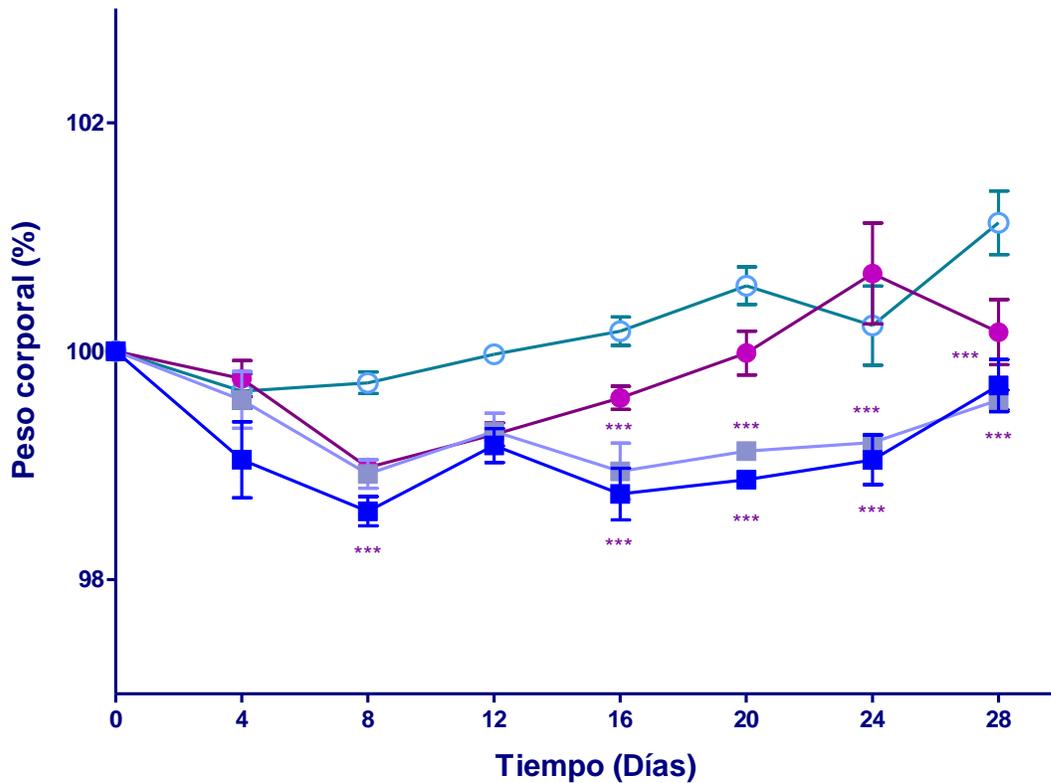


Figura 12. Variación del peso corporal durante el tratamiento. Ov-Ob-veh-sed (○, n=10), Ov-Ob-ext-sed (●, n=13), Ov-Ob-veh-ejer (■, n=14), Ov-Ob-ext-ejer (■, n=13). Cada punto representa la media \pm E.E.M. ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Tukey. *** $p<0.001$ vs Ov-Ob-veh-sed.

C. Efecto del tratamiento sobre consumo de líquido y alimento

Se evaluó el efecto del tratamiento sobre la cantidad de líquido y alimento consumido, mostrando incremento significativo del grupo Ov-Ob-veh-ejer con respecto a los grupos vehículo-sedentarias, extracto-sedentarias y extracto-ejercicio ($F_{(3,29)} = 8.65$, $p < 0.001$, ANOVA de 1 vía) en la cantidad de líquido consumido (Figura 13). Por otro lado se observó disminución significativa en el consumo de alimento estándar Lab Diet 5008 del grupo Ov-Ob-ext-ejer ($F_{(3,29)} = 8.22$, $p < 0.001$, ANOVA de 1 vía) (Figura 14).

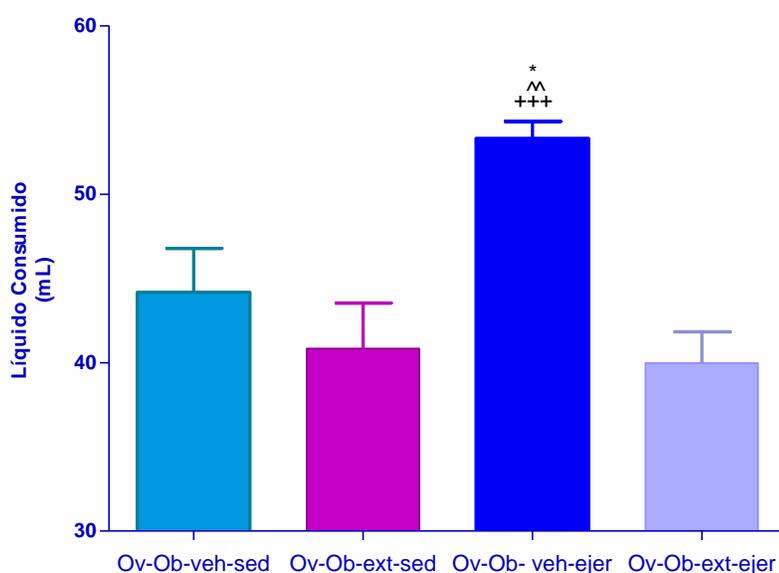


Figura 13. Líquido consumido (dieta hipercalórica) durante el tratamiento. Ov-Ob-veh-sed (■, n=9), Ov-Ob-ext-sed (■, n=10), Ov-Ob-veh-ejer (■, n=12), Ov-Ob-ext-ejer (■, n=13). Cada barra representa la media \pm E.E.M. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey. * $p < 0.001$ vs Ov-Ob-veh-sed. ^ $p < 0.001$ vs Ov-Ob-ext-sed. +++ $p < 0.001$ vs Ov-Ob-ext-ejer.

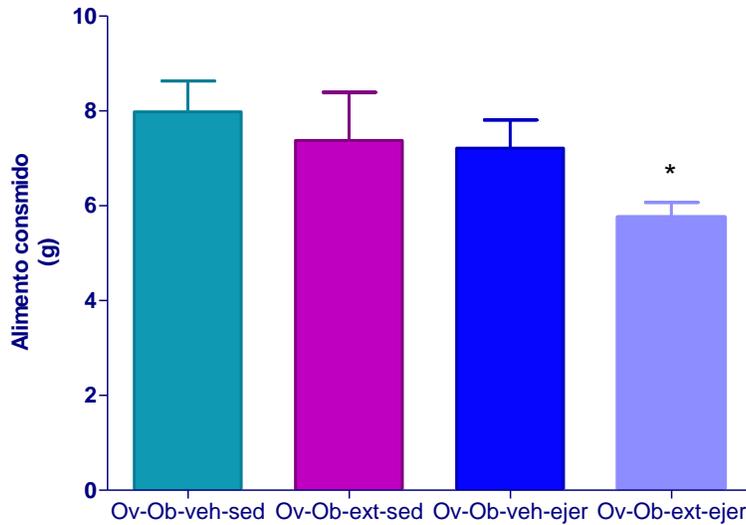
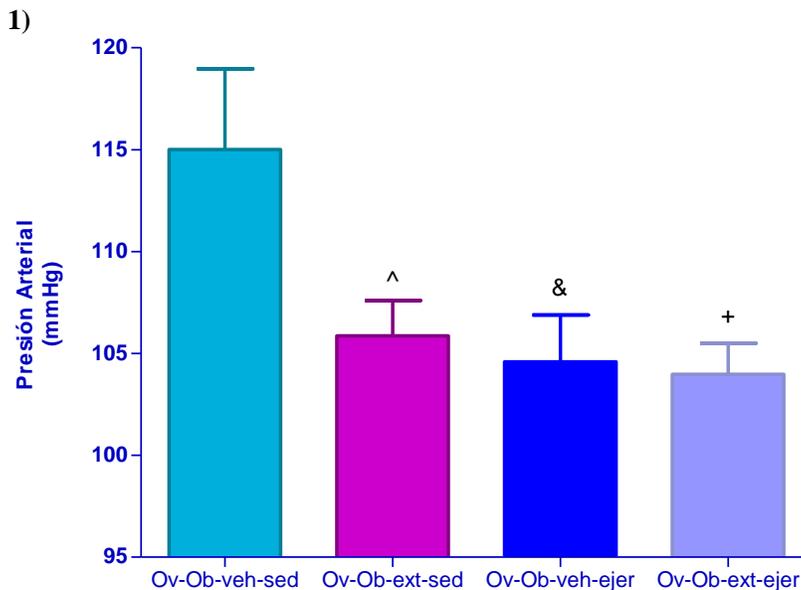


Figura 14. Alimento consumido durante el tratamiento. Ov-Ob-veh-sed (■, n=9), Ov-Ob-ext-sed (■, n=10), Ov-Ob-veh-ejer (■ n=12), Ov-Ob-ext-ejer (■ n=13). Cada barra representa la media ± E.E.M. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey. *p<0.001 vs Ov-Ob-veh-sed.

D. Frecuencia cardiaca y presión arterial media

Después del tratamiento se registró la presión arterial media (PAM) y frecuencia cardiaca (FC), observándose diferencia significativa en la PAM (Figura 15) ($F_{(3,29)} = 4.035$, $p < 0.001$, ANOVA de 1 vía) de los grupos Ov-Ob-ext-sed, Ov-Ob-veh-ejer, Ov-Ob-ext-ejer con respecto al grupo Ov-Ob-veh-sed (115.0 ± 3.95). En cuanto a la FC no se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos.



2)

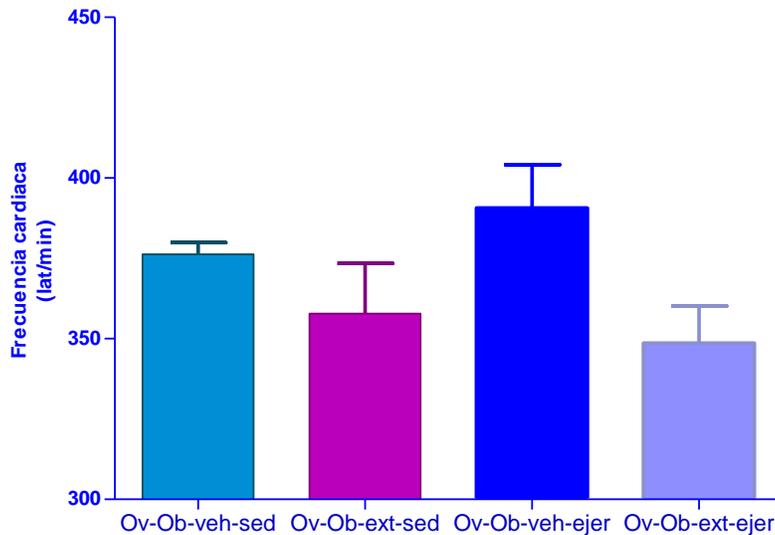


Figura 15. Efecto del tratamiento sobre: **1)** presión arterial media (mmHg) y **2)** frecuencia cardiaca (lat/min) antes y después del tratamiento. Ov-Ob-veh-sed (■, n=9), Ov-Ob-ext-sed (■, n=10), Ov-Ob-veh-ejer (■, n=12), Ov-Ob-ext-ejer (■, n=13). Cada barra representa la media \pm E.E.M. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey. ^,*,& p<0.001 vs Ov-Ob-veh-sed.

E. Efecto del tratamiento sobre parámetros bioquímicos: glucosa, triglicéridos, colesterol total, HDLc, LDLc.

Entre los principales parámetros de análisis bioquímico-clínicos de interés en la evaluación de la obesidad y enfermedades relacionadas, podemos encontrar a la glucosa, colesterol ligado a lipoproteínas de alta (HDL) y baja densidad (LDL), triglicéridos, entre otros. Estos parámetros fueron cuantificados en el suero sanguíneo de los animales una vez concluido el tratamiento. En cuanto a la glucosa se observó que la concentración del grupo Ov-Ob-veh-ejer (91.13 ± 2.4) es significativamente menor ($F_{(3, 23)} = 18.21$, $p < 0.001$. ANOVA de 1 vía) en comparación con los demás grupos (Figura16).

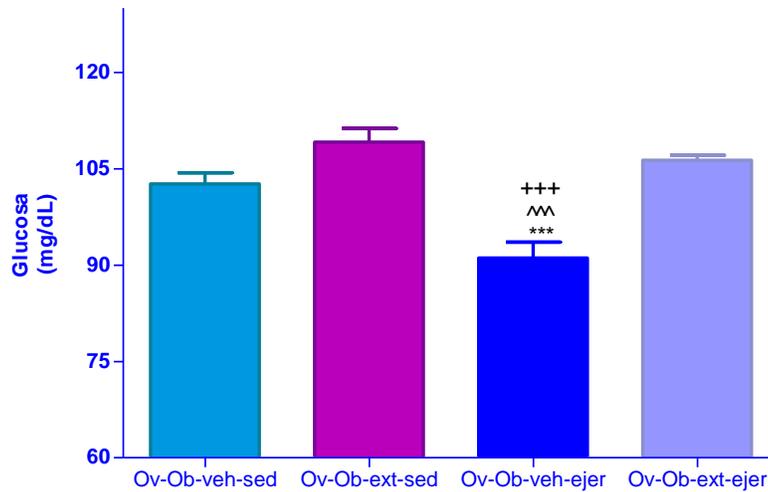


Figura 16. Glucosa sérica (mg/dL). Ov-Ob-veh-sed (■, n=9), Ov-Ob-ext-sed (■, n=10), Ov-Ob-veh-ejer (■, n=12), Ov-Ob-ext-ejer (■, n=13). Cada barra representa la media ± E.E.M. ANOVA de una vía. +++p<0.001 vs Ov-Ob-veh-sed. ^^p<0.001 vs Ov-Ob-ext-sed. ***p<0.001 vs Ov-Ob-ext-ejer.

Los niveles de triglicéridos fueron significativamente elevados en los grupos Ov-Ob-veh-ejer (118.1 ± 6.0) y Ov-Ob-ext-ejer (121.0 ± 6.5) contra el grupo Ov-Ob-veh-sed (Figura17) ($F_{(3,23)}= 6.308$, $p<0.001$. ANOVA de 1 vía).

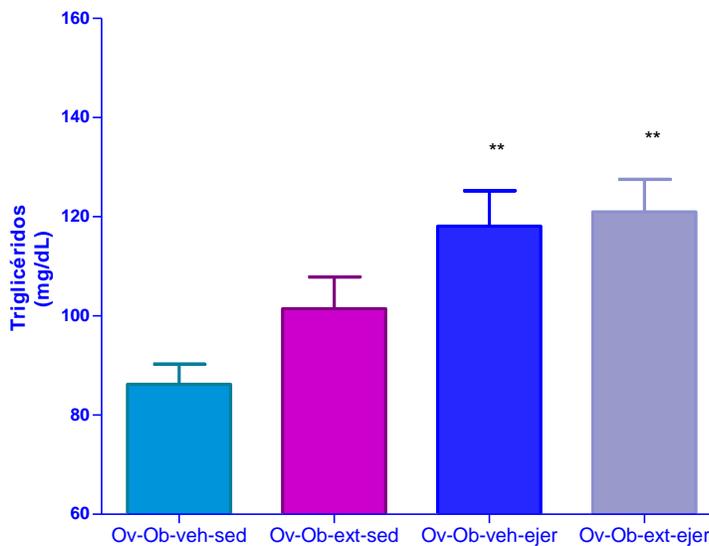


Figura 17. Triglicéridos en suero (mg/dL). Ov-Ob-veh-sed (■, n=9), Ov-Ob-ext-sed (■, n=10), Ov-Ob-veh-ejer (■, n=12), Ov-Ob-ext-ejer (■, n=13). Cada barra representa la media ± E.E.M. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey. **p<0.001 vs Ov-Ob-veh-sed.

Los resultados en la concentración de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDLc) sérico son significativamente más elevados en los grupos Ov-Ob-veh-ejer (40.89 ± 1.63) y Ov-Ob-ext-ejer (40.28 ± 1.87) con respecto al grupo Ov-Ob-veh-sed (32 ± 2.15) y Ov-Ob-ext-sed (30.36 ± 1.379) (Figura 18).

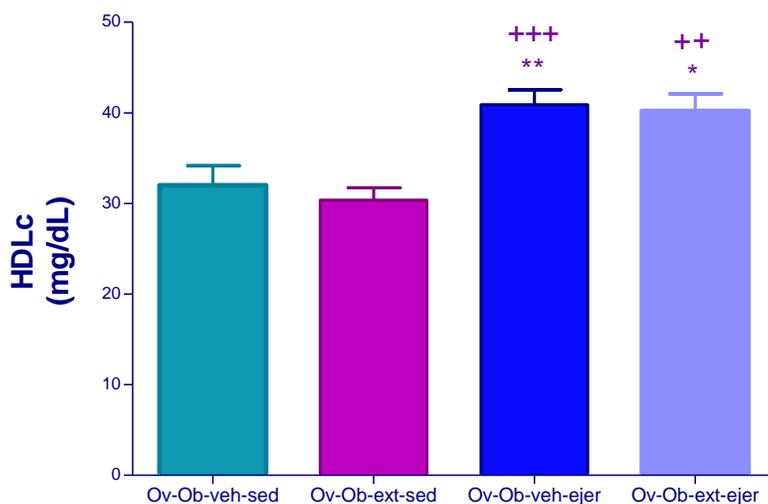


Figura 18. HDLc en suero (mg/dL). Ov-Ob-veh-sed (■, n=9), Ov-Ob-ext-sed (■, n=10), Ov-Ob-veh-ejer (■, n=12), Ov-Ob-ext-ejer (■, n=13). Cada barra representa la media ± E.E.M. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey. *, **p<0.001 vs Ov-Ob-veh-sed. **, ***p<0.001 vs Ov-Ob-ext-sed.

En cuanto a los niveles séricos de colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad (LDLc), el grupo Ov-Ob-veh-ejer (45 ± 2.1) y Ov-Ob-ext-ejer (36.81 ± 1.84) fueron más elevados ($F_{(3,23)} = 6.547$, $p < 0.001$. ANOVA de 1 vía) en comparación con el grupo Ov-Ob-veh-sed y el grupo de sólo ejercicio (7.53 ± 2.08 , 56.8 ± 4.02 y 36.6 ± 2.73 respectivamente) (Figura 19).

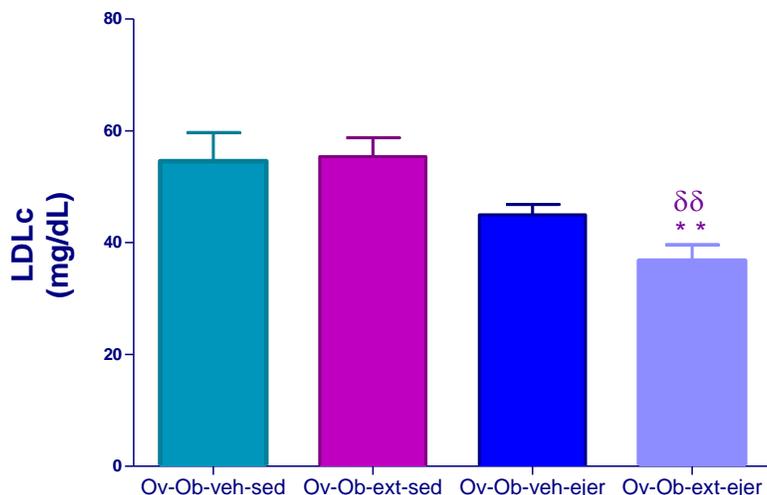


Figura 19. LDLc en suero (mg/dL). Ov-Ob-veh-sed (■, n=9), Ov-Ob-ext-sed (■, n=10), Ov-Ob-veh-ejer (■, n=12), Ov-Ob-ext-ejer (■, n=13). Cada barra representa la media \pm E.E.M. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey. ** $p < 0.001$ vs Ov-Ob-veh-sed, $\delta\delta$ $p < 0.001$ vs Ov-Ob-ext-sed.

El colesterol total en suero del grupo tratado con vehículo-ejercicio fue significativamente mayor (99.01 ± 3.36) con respecto a los grupos Ov-Ob-ext-sed y Ov-Ob-veh-sed (78.00 ± 2.90 y 74.18 ± 3.77) (Figura 20).

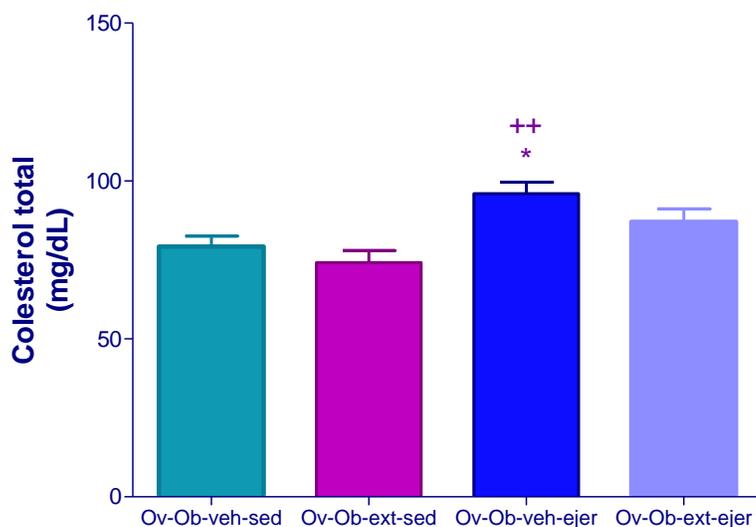


Figura 20. Colesterol total en suero (mg/dL). Ov-Ob-veh-sed (■, n=9), Ov-Ob-ext-sed (■, n=10), Ov-Ob-veh-ejer (■, n=12), Ov-Ob-ext-ejer (■, n=13). Cada barra representa la media \pm E.E.M. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey. * $p < 0.001$ vs Ov-Ob-veh-sed, ++ $p < 0.001$ vs Ov-Ob-ext-sed.

F. Efecto del tratamiento sobre marcadores de estrés oxidativo en aorta: malondialdehído (MDA) y nitritos totales (NT)

En los niveles de MDA en aorta del grupo Ov-Ob-veh-ejer y Ov-Ob-ext-ejer (1.22 ± 0.13 y 1.54 ± 0.03) hay diferencia significativa ($F_{(3,10)} = 28.33$, $p < 0.001$. ANOVA de 1 vía) con respecto al grupo Ov-Ob-veh-sed (4.20 ± 1.02) (Figura 21).

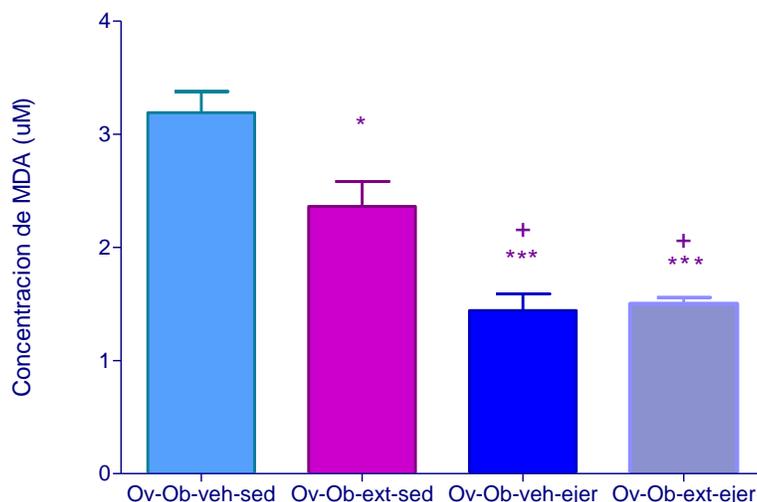


Figura 21. Niveles de MDA (uM) en un segmento de la aorta media. Ov-Ob-veh-sed (■, n=5), Ov-Ob-ext-sed (■, n=6), Ov-Ob-veh-ejer (■, n=5), Ov-Ob-ext-ejer (■, n=6). Cada barra representa la media \pm E.E.M. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey. *, *** $p < 0.001$ vs Ov-Ob-veh-sed, + $p < 0.001$ vs Ov-Ob-ext-sed.

Los niveles de nitritos totales de los grupos Ov-Ob-ext-sed (21.19 ± 0.51) y Ov-Ob-ext-ejer (18.40 ± 1.47) son significativamente menor con respecto al grupo Ov-Ob-veh-sed (26.57 ± 1.00). Es decir existe una disminución considerable de niveles de nitritos (NO_2^-) en el grupo en donde se combina el extracto con el ejercicio. También se observa diferencia estadística del grupo Ov-Ob-veh-ejer (23.25 ± 0.82) comparado con el grupo de Ov-Ob-ext-ejer (3.61 ± 1.47) (Figura 22).

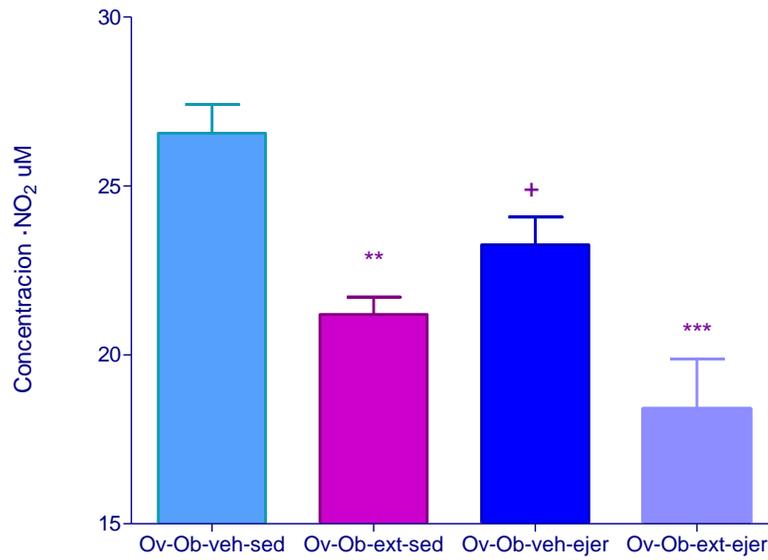


Figura 22. Niveles de nitritos totales (uM) en un segmento de la aorta media. Ov-Ob-veh-sed (■, n=5), Ov-Ob-ext-sed (■, n=6), Ov-Ob-veh-ejer (■, n=5), Ov-Ob-ext-ejer (■, n=6). Cada barra representa la media \pm E.E.M. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey. **, ***p<0.001 vs Ov-Ob-veh-sed, +p<0.001 vs Ov-Ob-ext-ejer.

X. DISCUSIÓN

Sin duda el modelo de hipoestrogenismo y obesidad inducida por dieta hipercalórica produce un aumento en la masa grasa y con ello posibles afecciones cardiovasculares, lo que nos permite observar los efectos producidos del extracto y el ejercicio sobre estos estados.

Utilizar modelos animales para el estudio de mecanismos involucrados en la patogénesis de la obesidad es de suma importancia. Existen los que involucran dietas hipocalóricas (lípidos, carbohidratos o ambas) y los modificados genéticamente. Por otro lado, el modelo de hipoestrogenismo por ovariectomía se utiliza para observar el impacto de los estrógenos en acciones no reproductivas, como la fisiopatología vascular⁶².

A. Efecto del tratamiento sobre el peso corporal.

De acuerdo con lo reportado en la literatura, la disminución de niveles circulantes de estrógenos se relaciona con un aumento de la masa grasa (principalmente abdominal) en ratas y en humanos^{65,66}. Actualmente la guía para la evaluación y tratamiento de la obesidad del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos, aprueba y sugiere el ejercicio como tratamiento para la obesidad incluyendo comorbilidades. En diversos estudios se ha demostrado que la pérdida de peso es mayor en los grupos donde se combina dieta con ejercicio (hasta 10% de pérdida de peso) en comparación con los que solo hacen ejercicio y/o solo dieta^{50,63,64}.

Nuestros resultados mostraron que los grupos sometidos a ejercicio (extracto-ejercicio y vehículo-ejercicio) tienen un porcentaje de masa significativamente menor ($p < 0.001$) con respecto al grupo vehículo-sedentarias a partir del octavo día de tratamiento. Sin embargo, no podemos asegurar que el tratamiento produzca una disminución de peso considerable pues la reducción en gramos es mínima (alrededor de 2 g). Actualmente no se ha comprobado que el extracto de tomate o bien el licopeno disminuya la grasa corporal, por el contrario, el ejercicio sí ha demostrado reducción de peso considerable⁸².

B. Efecto del tratamiento sobre el consumo de alimento.

En ciertos estudios se ha demostrado que con el consumo de disoluciones al 32% con sacarosa, se adquiere mayor peso por caloría consumida que en los animales que consumen únicamente dieta estándar, después de 50 días^{65,67}.

Además, en este modelo de dieta hipercalórica con sacarosa se observan disminuciones en el consumo de sólidos, es decir su dieta estándar, esto se debe a que el consumo de sacarosa disminuye la ingesta temporal de sólidos indicando que las calorías consumidas provienen en mayor parte de la disolución de sacarosa (4Kcal/g sacarosa)^{66,68}. En cuanto al ejercicio, existen estudios que indican que la ingesta de alimento sólido disminuye significativamente ($p < 0.001$) en el grupo de ratas que fueron sometidas a ejercicio (6m/min) durante 2 semanas, así como disminución en la ganancia de peso⁶⁹. Es por eso que en nuestro estudio el consumo de líquido es mayor que el de sólidos.

Ahora bien, nuestros resultados, muestran una disminución en el consumo de líquido ($p < 0.001$) y alimento sólido por el grupo Ov-Ob-ext-ejer en comparación con los demás grupos, sin embargo en el grupo Ov-Ob-veh-ejer no se observa esta tendencia, pues el consumo de líquido fue significativamente mayor ($p < 0.001$) que el resto de los grupos. Esto se debe al gasto energético que se lleva a cabo al realizar ejercicio y por tanto el organismo intenta recuperarse con la ingesta de líquido con la fuente primaria de energía, la glucosa.

C. Efecto del tratamiento sobre la presión arterial media.

Los estudios realizados con licopeno demuestran disminución de PAM y parámetros bioquímicos tales como glucosa y colesterol en personas y ratas con obesidad. Además la práctica del ejercicio aeróbico ha demostrado disminución considerable en la presión arterial en personas hipertensas con y sin obesidad^{51,77}.

Nuestros resultados muestran una disminución significativa ($p < 0.001$) de la PAM en los grupos Ov-Ob-ext-sed y Ov-Ob-ext-ejer. Esto se debe al mecanismo antioxidante del licopeno contenido en el extracto ya que el aumento de las EROs generan disfunción endotelial promoviendo la aterosclerosis⁷², y por consecuencia aumento en la PAM. También se ha observado en diversos estudios que el consumo de extracto de jitomate incrementa la cantidad de ON, un vasodilatador, así como de enzimas antioxidantes como la SOD y la disminución de otros marcadores de atrofia vascular como sICAM-1 y sVCAM-1, que se refleja con una mejora en la PAM^{83, 84}.

D. Efecto del tratamiento sobre parámetros bioquímicos

En la obesidad, cuando hay un exceso en la ingesta de calorías (dietas hipercalóricas) se promueve la lipogénesis para sintetizar ácidos grasos (AG) a partir de la glucosa. Los AG son almacenados de primer orden en el músculo, si la síntesis es mayor son liberados al torrente sanguíneo (que se detectan como triglicéridos, colesterol total y LDLc) y se unen a proteínas para ser trasladadas al TA para su almacenamiento⁷¹. Además el aumento en la ingesta de sacarosa conlleva a la resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, que se caracteriza por presentar un cuadro de hipertrigliceridemia en ayuno, disminución de HDLc, aumento de LDLc pequeñas y densas, incremento de ácidos grasos esterificados y por supuesto un incremento en los niveles de glucosa. Todos estos mecanismos contribuyen a la hipertensión, que se manifiesta como un incremento en la FC y PAM.

Nuestros resultados mostraron una disminución en la concentración de glucosa del grupo Ov-Ob-veh-ejer comparado con los demás grupos, esto se debe al incremento del gasto energético que involucra el ejercicio, por lo tanto la glucosa, al ser fuente primaria de síntesis de energía en las células, los niveles de glucosa disminuyen.

Durante la obesidad es muy común encontrar un hígado graso, esta patología se conoce como esteatosis hepática y se caracteriza por presentar gotas lipídicas (principalmente triglicéridos) en los hepatocitos, provocando disfunción hepática. Uno de los efectos conocidos del extracto de jitomate o bien de licopeno es la reducción de esas gotas lipídicas hasta prácticamente desaparecer. Estudios sugieren que el licopeno reduce el almacenamiento de lípidos vía microRNA mediante el control de las

proteínas de unión de ácidos grasos (FABP7) inducido por el ácido esteárico en líneas celulares Hepa 1-6, estos triglicéridos son expulsados al torrente sanguíneo para ser oxidados vía FGF21. También hay evidencias que muestran que el licopeno promueve la inducción de factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) que promueve a su vez la oxidación de ácidos grasos y la cetogénesis. Esta vía se activa cuando hay un exceso en la producción de AcCoA que es un producto de degradación de los ácidos grasos. El mecanismo por el cual el licopeno promueve la inducción de FGF21 se debe a la unión de los metabolitos del licopeno (apo-10-licopenal) al receptor de ácido retinoico RAR ⁷³. Es por eso que los niveles de triglicéridos del grupo de Ov-Ob-ext-ejer son más elevados ya que muy probablemente la esteatosis hepática en este grupo haya disminuido tras el tratamiento.

Algunos estudios demuestran que los sujetos sometidos a ejercicio reducen la concentración de colesterol y triglicéridos en el suero en comparación con sujetos sedentarios. Sin embargo esto aún es conflictivo ya que no necesariamente en todos los pacientes o sujetos experimentales con obesidad y/o comorbilidades puede verse alterados estos parámetros ⁴⁸.

Las lipoproteínas juegan un papel muy importante en el metabolismo lipídico, las LDL son portadoras principales de colesterol en la sangre, estas son responsables de llevar el colesterol del hígado a su diana, las HDLc se encargan del transporte contrario del colesterol desde las células que se encuentran en la periferia hasta el hígado. Esta es la razón por la que se considera a las HDLc como las lipoproteínas que reducen el riesgo de aterosclerosis o enfermedad cardiovascular, mientras que las LDLc elevadas se involucran con la aparición de aterosclerosis ⁷⁹. Nuestros resultados indican un aumento en la concentración de HDLc en los grupos con ejercicio, lo cual es un indicativo de buena salud cardiovascular, sin embargo no se puede concluir que no exista hipertensión o alguna otra patología cardiovascular.

Estudios en donde involucra el ejercicio aeróbico en sujetos que han disminuido de peso y aún practican ejercicio (70Km/semana) se ha observado un aumento en las HDLc que aquellos sin actividad física, independientemente de la concentración inicial de HDLc. Sin embargo, aún no está claro cómo es que el ejercicio induce la elevación

de las HDLc⁷⁸. La reducción en los niveles de LDLc puede deberse a la disminución de la síntesis como resultado de los cambios de adaptación en el metabolismo de lípidos de membrana durante el ejercicio⁸⁵.

E. Efecto del tratamiento sobre los marcadores de estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es una de las principales causas de patologías tales como hipertensión y enfermedades cardiovasculares. Las moléculas que participan en el daño oxidativo de los tejidos son las especies reactivas de oxígeno (EROs) las cuales afectan de manera directa a moléculas como proteínas, lípidos y DNA; entre otras. Durante el hipoestrogenismo y la obesidad, estas EROs afectan el funcionamiento vascular alterando a los lípidos, la expresión de las enzimas involucradas en la actividad vascular normal e inactivación del óxido nítrico⁷⁵.

Es por eso que nosotros cuantificamos dos marcadores de estrés oxidativo en aortas de las ratas como son el malondialdehído (subproducto de la peroxidación lipídica) y los niveles de nitritos totales (producto de la acción de las ROS sobre el ON). Muchos autores han citado el ejercicio y el estrés oxidativo, sin embargo este campo aún es controversial ya que el ejercicio es un conjunto de mecanismos que involucran el gasto energético y no se ha podido hallar un mecanismo que explique la reducción de los radicales. Probablemente esta reducción de niveles de ROS sea uno de los mecanismos por los que el ejercicio disminuye el riesgo de ECV en humanos y roedores.

Existen diversos estudios en los que se evalúan diferentes marcadores de estrés oxidativo en aorta de ratas y suero u orina de humanos, no todos los resultados demuestran disminuciones en estos marcadores. En los estudios donde se cuantifica MDA y Nitritos totales en ratas bajo diferentes niveles de ejercicio demuestran que existe una disminución en estos marcadores (hasta 17Km/hr)⁸⁰. En otro estudio con mujeres postmenopausicas se encontró que el ejercicio moderado (45min/día)

disminuyó niveles de F2 Isoprostano (prostaglandina que se produce por la peroxidación del ácido araquidónico) otro marcador de estrés oxidativo⁸¹.

En cuanto al licopeno y sus metabolitos encontramos más estudios concisos en donde predomina su efecto antioxidante, debido a la regulación en la expresión de genes involucrados en el estrés oxidativo^{57,60}. De hecho los modelos de ratas son considerados muy pobres en la absorción de carotenoides, sin embargo estos modelos son necesarios para investigar el efecto del jitomate/licopeno. En diversos estudios, los niveles de Nitritos disminuyen tras el uso de extractos lipídicos y acuosos del jitomate *Lycopersicon esculentum*, al igual que los de MDA en diversos tejidos (hígado, riñón, células endoteliales, aortas y cerebro principalmente)^{76,61}.

Nuestros resultados son parecidos, disminuyeron los niveles de MDA en las aortas del grupo al que sólo se administró (v.o.) el extracto; sin embargo, una disminución más significativa ocurre en el grupo con ambos tratamientos (extracto-ejercicio). Esto nos indica una probable sinergia en el tratamiento para la reducción de la peroxidación lipídica en mujeres con ambas patologías. Aunque para poder aceptar esta hipótesis se deben realizar otras pruebas, principalmente de expresión de genes antes mencionados.

El óxido nítrico es un importante vasodilatador producido por las células endoteliales y se utiliza como biomarcador indirecto de la función endotelial. Las ROS reaccionan con éstas moléculas formando iones nitritos y nitratos que afectan indirectamente la función vascular. Al igual que en los niveles de MDA, los niveles de nitritos totales disminuyeron en el grupo donde solo recibieron extracto en comparación con el que solo recibió vehículo, pero la disminución más significativa ($p < 0.001$) fue en el grupo con extracto más el ejercicio. Esto demuestra que el efecto antioxidante es mayor cuando se combina el ejercicio con el extracto lipídico de jitomate.

El incremento en los niveles de nitritos totales del grupo vehículo-ejercicio se debe probablemente al aumento del gasto cardiaco y la consecuente elevación de la función vascular en las ratas sometidas a ejercicio.

Se determinó la concentración de estos dos parámetros en aorta para acercarnos a el efecto del tratamiento sobre este tejido ya que la detección en plasma puede ser un poco menos “efectiva” ya que el transcurso en el torrente sanguíneo podría reaccionar con otras proteínas.

XI. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este experimento nos muestran que la combinación de ejercicio y el extracto lipídico de *Lycopersicum esculentum*, disminuye la concentración de los marcadores de estrés oxidativo en aortas. También disminuye la concentración sanguínea de colesterol LDL, y aumenta los de HDL, lo cual es un indicativo de buena salud cardiovascular. Es decir, el tratamiento puede impactar de manera positiva en los síntomas metabólicos que se presentan generalmente en las personas con obesidad y con hipoestrogenismo.

Sin embargo se necesitan incluir grupos control (control-control, control OV, control Ob) y otras pruebas para poder respaldar de manera contundente este hecho. Por ejemplo se podrían incluir pruebas para la expresión de genes tales como, eNOS, iNOS y superóxido dismutasa, TNF α , Cit P450, activador de proteínas AP-1; etc (regulados por el licopeno). También podríamos incluir medición de insulina, reactividad en aortas y comparar la microarquitectura de las aortas y tejido adiposo entre los grupos.

XII. REFERENCIAS

1. Kahn B, Flier J. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106 (4): 473-481.
2. Redinger RN. The pathophysiology of obesity and its clinical manifestation. *Gastroenterol and hepatol.* 2007;11 (3):856-863.
3. Kantartzis K, Machann J, Schick F, Ritting K, Michicao F, Stefan F. Effect of a lifestyle intervention in metabolically benign and malignant obesity. *Diabetología.* 2011;54(4): 864-868.
4. Yu JH, Kim MS. Molecular mechanism of appetite regulation. *Diabetes Metab J* 2012;36(6):391-398.
5. Bouchard C. Gene-environment interactions in the etiology of obesity: defining the fundamentals. *Obesity.* 2008: suppl 3: S5-S10.
6. Kahn B, Flier J. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106(4):473-481
7. Martyn JA, Kaneki M, Yasuhara S. Obesity-induced insulin resistance and hyperglycemia: etiologic factors and molecular mechanism. *Anesthesiology* 2008; 109(1): 137-148.
8. Kotchen T. Obesity-related hypertension: epidemiology, pathophysiology and clinical management. *Am J Hypertension.* 2010; 23(11): 1170-1178.
9. Koolman J. Bioquímica humana; texto y atlas. 4ª ed. Alemania: Editorial Medica Panamericana; 2012. P. 300-74.
10. Pacheco J: Premature ovarian failure. *An Fac med.* 2010;71(3):191-200.
11. Canto de Cetina T, Polanco-Reyes L. Climaterio y menopausia. Las consecuencias biológicas y clínicas del fallo ovárico. *Rev* 1996; 7:227-236.
12. Altchek A, Deligdisch L, Kase N, editors. Diagnosis a management of ovarian disorders. 2ª ed. *Elsevier Science USA*, 2003.
13. American College of obstetricians and gynecologists Committee on Gynecologic Practice. ACOG Committee Opinion No. 420, November 2008: hormone therapy and heart disease. *Obstet Gynecol.* 2008; 112:1189-1192.
14. Col NF, Fairfield KM, Ewan-Whyte C, Miller H. Menopause in the clinic. *Ann Intern Med.* 2009; 150: ITC4-1-ITC4-15.

15. Thomas M Devlin. Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas. USA: Editorial Reverté; 2006p. 470-477.
16. Brozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T. Molecular basis of agonism and antagonism in the estrogen receptor. *Nature*. 1997 Oct 16; 389(6652):753-8.
17. Miller MV, Duckles PS. Molecular action of estrogens: functional implications. *Pharmacol Rev* 2008;60:210-241.
18. Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics: Estrogens and progestins. 11^a ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2010. cap. 57.
19. Gómez A. Menopausia. Salud genitourinaria. *Offarm*. septiembre-octubre 2010; 29(05).
20. Pérez CS, Duran M, Echarren V, Lopez-Farre A: Menopausia y enfermedad cardiovascular. *Hipertensión y riesgo vascular* 2001; 18 (05); 31:1-2.
21. Cernadas MR, Sánchez de Miguel L, García-Durán M, González- Fernández F, Millas IA. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circulation Research*. 1998;83(3):279-86.
22. Meli R, Pacilio M, Raso GM, Esposito E, Coppola A. Estrogen and Raloxifene modulate leptin and its receptor in hypothalamus and adipose tissue from ovariectomized rats. *Endocrinology*. 2000; 145(7): 3115-3121.
23. Connor E. Sex difference in coronary heart disease. Why are women so superior. The 1995 Ancel Keys Lecture. *Circulation*. 1997; 95(1): 252-64.
24. Moriarty K, Kim KH, Bender JR. Minireview: estrogen receptor-mediated rapid signaling. *Endocrinology*. 2006;147(12):5557-5563.
25. Yanira F, Mendoza-Fernandez V, Lemini C. Mecanismos de acción de los efectos protectores de los estrógenos sobre el sistema cardiovascular. Revista de la facultad de medicina UNAM. 2003; 46(3):101-108.
26. Porkai L, Porkai-Tratai K, Parjesi P, Simpkins JW. Mechanistic insights into the direct antioxidant effect of estrogens. *Drug development research* 2006. 66:118-125.
27. Porkai-TRatai K, Perjesi P, Rivera-Portalatin N, Simpkins JW: Mechanistic investigation on the antioxidant neuroprotective estrogen derivative. *Steroids* 2008; 73: 280-288.

28. Stirone C, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V. Estrogen increased mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Mol Pharmacol*. 2005. 68:959-965.
29. Jiabin Guo, Diana NK, James H, John HW, Duckles PS. Estrogen-receptor mediated protection of cerebral endothelial cell viability and mitochondrial function after ischemic insult in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010; 30(3):545-554.
30. Abadal T. Riesgo cardiovascular en la menopausia: mito, paradoja o realidad. Importancia de las observaciones clínicas frente a la interpretación de los datos estadísticos. *Rev Esp Cardiol* 1999;52(7): 463-6.
31. Alameda HC, Olivar RJ, Pavon I. Obesidad y menopausia. *Nutrición hospitalaria* 2006;21(6): 633-637.
32. Wing RR, Matthews A, Kuller LH, Meilahn EN, Platinga PL. Weight gain at the time of menopause. *ARCH Intern Med* 1991; 151: 97-102.
33. Lovejoy JC. The menopause and obesity. *Prim Care Clin Office Pract* 2003; 30: 317-25.
34. The North American Menopause Society (NAMS): Menopause Guidebook. United States of America 7th. 2012.
35. Organización Mundial de la Salud. Infobase. WHO Infobase Global. Data for saving life, 2008.
36. Dictamen de la comisión de salud sobre el punto de acuerdo que exhorta al titular del ejecutivo federal a implementar acciones contra la obesidad. Disponible en: http://sil.gobernacion.gob.mx/Archivos/Documentos/2013/11/asun_3033596_2013_1105_1383668265.pdf
37. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in Obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA* 2010, 303:235-241.
38. Gravena A, Brischiliari S, Lopes T, Agnolo C, Carvalho M. Excess weight and abdominal obesity in postmenopausal Brazilian woman: a population-based study. *BMC Women's Health*. 2013, 13:46.
39. Thoth MJ, Tchernof A, Sites CK. Effect of menopausal status on body composition and abdominal fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24:226-31.

40. Estadísticas a propósito del día mundial del corazón [actualizado: 25 sept 2014; citado: 28 abril 2014]. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2009/corazon09.asp?c=2740&ep=21>
41. Pastore LM, Carter RA, Hulka BS, Wells E. Self-reported symptoms in postmenopausal women of Women's Health Initiative. *Maturitas*. 2004; 49: 292-303.
42. Shumaker SA, Legault C, Rapp SR, et al. Estrogen plus progestin and the incidence on dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women the Women's Health Initiative Memory study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003;289(20):2651-2662
43. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risk and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal result from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002 ;288(3):321-333.
44. Beral V, Reeves G, Bull D, Verde J: Breast cancer risk in relation to the interval between menopause and starting hormone therapy: the Million Woman Study Collaborators. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:296-305.
45. Esquivel A. Beneficios y riesgos a corto y largo plazo de la TRH. Estado actual. *Fármacos* 2009.
46. Ros C, Castello-Branco C. Obesidad y menopausia. *Tendencias en medicina* 2009. 50-63.
47. Pronk NP, Wing RR. Physical activity and long term maintenance of weight loss. *Obes Res*. 1994;2:587-599.
48. Asikainen T, Miilunpalo S, Oja P, Rinne M, Pasanen M, et al. Walking trials in postmenopausal women: effect of one vs two daily bouts on aerobic fitness. *Scand J Med Sci Sports Exerc* 1993;31:1307-1312.
49. Irwin MI, Yasui Y, Ulrich CM, Bowen D, et al. Effect of exercise on total and intra-abdominal body fat in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003 ; 289(3):323-330.
50. Lee I, Djousse L, Sesso HD, Wang L, Buring JE. Physical activity and weight gain prevention. *JAMA* 2010; 303:1173-1179.

51. Hagan RD, Upton SJ, Wong L, Whittam J. The effects of aerobic conditioning and/or caloric restriction on overweight men and women. *Med Sci Sports Exerc.* 1986;18: 87-94.
52. Edward R, Laskowsky MD. The roll of exercise in the treatment of obesity. *PM and R.* 2012; 11(4):840-844.
53. The Practical Guide: Identification, evaluation treatment of overweight and obesity in adults. October 2000, NIH publications 00-4084. 24-29.
54. Salim S, Sarraj N, Taneja M, Saha K, Tejada-Simon MV, Chugh G. Moderate treadmill exercise prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior rats. *Behav Brain Res* 2010; 208: 545-552.
55. Karppi J, Laukkanen JA, Makikallio TH, Kurl S. Low serum lycopene and B-carotene increase risk of acute myocardial infraction in men. *Eur J Public Health.* 2011; 1-5
56. Waliszewski KN, Blasco G. Propiedades nutraceuticas del licopeno. *Salud Pública de Méx* 2010;52:254-265.
57. Rissanen TH, Voutilainen S, Nyyssonen K, Lakka TA et al. Low serum lycopene concentration is associated with an excess incidence on acute coronary events and stroke: the Skuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Br J Nutr* 2001; 85:749-754.
58. Willcox BJ, Crub JD and Rodriguez BL. Antioxidant in cardiovascular health and disease: Key lessons from epidemiologic studies. *Am J Card.* 2008;101:75D-86D.
59. Ghavipour M, Saedisomeolia A, Djalali M, Sotoudeh G. Tomato juice consumption reduces systemic inflammation in overweight and obese females. *Br J Nutr* 2012;1-5.
60. Palozza P, Catalano A, Simone R, Cittadini A. Lycopene as a guardian of redox signaling. *Acta Biochim Pol* 2012;59(1):21-25.
61. Vitale A, Bernatene E, Pomilio A. Acta bioquímica del licopeno. *Bioquímica clínica* 2000; 44(2): 195-238.
62. American Physiological Society. Resource Book of the Design of Animal Exercise Protocols. February 2006.
63. Molsiri K, Khemapech S, Patumraj S, Siriviriyayakul P. Preventive mechanism of genisteína on coronary dysfunction in ovariectomized rats: an isolate arrested

- heart model. *J Cardiovasc Pharma*. 2003; 42(3): 329-338.
64. Jakicic J, Otto A. Treatment and prevention of obesity: What is the role of exercise? *Nut Rev*. 2006; 64(2): S57-S61.
65. Wing RR, Epstein L, Paternostro-Bayles M, Kriska A, Nowalk M and Gooding W. Exercise in a behavioural weight control programme for obese patient with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diab*. 1998;31:902-909.
66. Tchernof A, Poehlman ET, Despres JP. Body fat distribution, the menopause transition, and hormone replacement therapy. *Diab Metab*. 2000; 26: 12-20.
67. Arjmandi B, Alekel L, Hollis B, Amin D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Guo P, Kukreja S. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr*. 1996; 126(1): 161-167.
68. Kanarek RB, Orthen-Gambill N. Differential effects of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate-induced obesity in rats. *J Nutr*. 1982; 112: 1546-1554.
69. Morris KL, Namey TC, Zemel MB. Effects of dietary carbohydrate on the development of obesity in heterozygous Zucker rats. *J Nutr Biochem*. 2003; 14(1): 32-9.
70. Katch V, Martin R and Martin J. Effect of exercise food consumption in the male rat. *Am J Clinic Nutr*. 1979; 32:1401-1407.
71. Sowers M, Wildman R, Mancuso P, Eyvazzadeh A, Karvonen-Gutierrez C, Rillamas-Sun E, Jannausch M. Change in adipocytokines and ghrelin with menopause. *Maturitas*. 2008; 59(2): 149-57.
72. Newbold R, Padilla-Banks E, Jefferson W, Heindel J. Effects of endocrine disruptors on obesity. *Int J Androl*. 2008; 31: 201-208.
73. Riccioni G, Bucciarelli T, D'Orazio N, Palumbo N, Corradi F, Pennelli A, Bazzano LA. Plasma antioxidants and asymptomatic carotid atherosclerotic disease. *Ann Nutr Metab*. 2008;53(2):86-90.
74. Ahuja K, Ashton E, Ball M. Effects of a high monounsaturated fat, tomato-rich diet on serum levels of lycopene. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57:832-84.
75. Kloner R, Przyklenk K, Whittaker P. Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. *JAMA* 1989;80:1115-1127.
76. Markovits N, Amotz A and Levy Y. The effect of tomato-derived lycopene on low carotenoids and enhanced systemic inflammation and oxidation in severe obesity.

Isr Med Assoc. 2009;11(10):598-601.

77. Tipos de ejercicio [Internet]. Bruselas: Bélgica.EUFIC; 2014 [citado el 2014 sep 10]. Disponible en : <http://www.eufic.org/article/es/expid/tipos-ejercicio/>
78. Carbayo J, Pardo J, Moncayo-González C, López J, Chávarri M. Cambios en la presión arterial y la frecuencia cardiaca inducidos por la práctica y cese de ejercicio físico moderado en jóvenes normotensos. *Ater* 2002;14(01):9-16.
79. Huttenen J, Esko M, Voutilainen E, Enholm C, Hietanen E, Penttila I, Sittonen O, Rauramaa R. Effect of moderate physical exercise on serum lipoproteins. *Circ* 1979 60:1220-1229.
80. Jenkins R. Exercise and oxidative stress methodology: a critique. *Am J Clin Nutr* 2000;72(suppl): 670S-4S
81. Campbell P, Gross M, Potter J, Schmitz K, Duggan C, Mc Tiernan A, Ulrich C. Effect of exercise on oxidative stress: A 12-month randomized, controlled trial. *Med Sci Sports Exer* 2010;42(8): 1448-1453.
82. MacQueen A. Exercise Aspect of Obesity Treatment. *The Ochner J* 2009;9: 140-143.
83. Gitenay D, Lyan B, Rambeau M, Mazur A, Rock E. Comparison of lycopene and tomato effects on biomarkers of oxidative stress in vitamin E deficient rats. *Eur J Nutr* 2007;46:468-475.
84. Kim J, Paik K, Kim Y, Park H, Lee H, Jang Y, Lee JH. Effects of lycopene supplementation on oxidative stress and markers of endothelial function in healthy men. *Ather* 2011;215: 189-195.
85. Narayan K, McMullen J, Butler D, Wakefield T, Calhoun W. Effect of exercise on tissue lipids and serum lipoproteins of rats fed two levels of fat. *J Nut* 1974: 581-587.