



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LA ACTIVIDAD FISICA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
EN RATAS CON SÍNDROME METABÓLICO INDUCIDO CON DIETA
ALTA EN HIDRATOS DE CARBONO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

KAREN DANIELA GARCÍA TAVERA

CDMX

2018





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Luz Del Carmen Castellanos Román

VOCAL: Argelia Sánchez Chinchillas

SECRETARIO: Karla Guadalupe Carvajal Aguilera

1er. SUPLENTE: Tania Gómez Sierra

2° SUPLENTE: Sara Margarita Garza Aguilar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA, TORRE DE INVESTIGACIÓN, 2° PISO, LABORATORIO DE NUTRICIÓN EXPERIMENTAL.

INSURGENTES SUR 3700 LETRA C, COL INSURGENTES CUICUILCO 04530 DEL COYOACÁN, CIUDAD DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

Karla Guadalupe Carvajal Aguilera _____

SUSTENTANTE:

Karen Daniela García Tavera _____

ÍNDICE

Resumen.....	1
1.0 Introducción.....	3
1.1 Síndrome metabólico.....	3
1.2 Obesidad.....	4
1.3 Actividad Física.....	5
ANTECEDENTES.....	7
2.0 MARCO TEÓRICO.....	11
2.1 Definición de Síndrome metabólico.....	11
2.2 Obesidad y SM	12
2.3 Impacto del Síndrome Metabólico en el mundo.....	12
2.4 El impacto del síndrome metabólico en México.....	13
2.5 Factores causantes del síndrome metabólico	14
2.6 Músculo esquelético y contracción muscular.....	15
2.6.1 Morfología.....	15
2.6.2 Proteínas contráctiles	18
2.6.3 Contracción muscular	20
2.7 Tipos de fibras musculares y características metabólicas del músculo	22
2.8 Músculo Sóleo y músculo extensor largo de los dedos (EDL)	23
2.9 Estrés oxidativo (EOx) y medición del estado oxidante.....	25
2.10 La cinasa dependiente de AMP (AMPK).....	30
2.11 Estructura de la AMPK y activación	30
2.13 AMPK en músculo esquelético	33
3.0 JUSTIFICACIÓN.....	35
4.0 HIPÓTESIS	36
5.0 OBJETIVOS	37

5.1 OBJETIVOS GENERALES	37
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	37
6.0 METODOLOGÍA.....	38
6.1 Resumen del procedimiento experimental.....	38
6.2 Obtención y validación del síndrome metabólico ratas	39
6.3 Formación de los grupos experimentales	40
6.4 Prueba de tolerancia a la glucosa antes y después del protocolo de actividad física	40
6.5 Aclimatación, prueba de esfuerzo y protocolo de actividad física	40
6.5.1 Aclimatación.....	41
6.5.2 Prueba de esfuerzo.....	41
6.5.3 Protocolo de actividad física	41
6.6 Aislamiento de músculo sóleo y EDL	43
6.7 Protocolo de activación de la AMPK mediante estimulación eléctrica sobre el músculo sóleo y EDL aislado	44
6.8 Lisis de tejido y extracción de proteína	46
6.9 Determinación del contenido de proteína por método de Lowry	47
6.10 Ensayos de Western Blot (WB) y revelado por quimioluminiscencia	47
6.11 Evaluación de la actividad enzimática (enzimas de EOX)	49
6.11.1 Catalasa (CAT).....	49
6.11.2 Glutación Peroxidasa (GPx).....	50
6.11.3 Superóxido dismutasa (SOD).....	51
6.11.4 Carga antioxidante (ABTS)	51
6.12 Análisis estadístico	52
7.0 RESULTADOS.....	53
7.1 Efecto de la actividad física en el peso corporal y ganancia de peso	53

7.2 Evaluación del SM y el efecto de la actividad física sobre parámetros bioquímicos y somatométricos.....	56
7.3 Resultados de la prueba de esfuerzo realizada al grupo SM + EXER antes y después de las 8 semanas de actividad física.....	58
7.4 Resultados de la actividad física sobre la respuesta a la activación aguda in vitro de AMPK por contracción en músculo EDL y sóleo.....	60
7.5 Efecto del ejercicio sobre el EOx, mediante ensayos de actividad enzimática (CAT, GR, SOD, ABTS).....	66
7.5.1 CAT.....	66
7.5.2 Glutación Reductasa (GR).....	67
7.5.3 SOD.....	68
7.5.4 Carga antioxidante ABTS.....	71
8.0 Discusión.....	72
8.1 Efecto de la actividad física en el peso corporal y ganancia de peso.....	72
8.2 Evaluación del SM y el efecto de la actividad física.....	72
8.3 Resultados de la prueba de esfuerzo realizada al grupo SM + EXER antes y después de las 8 semanas de actividad física.....	73
8.4 Resultados de la actividad física sobre la respuesta a la activación aguda de AMPK por contracción en músculo EDL y sóleo.....	73
8.5 Efecto del ejercicio sobre el EOx, mediante ensayos de actividad enzimática (CAT, GR, SOD, ABTS).....	75
8.5.1 CAT.....	75
8.5.2 GR.....	75
8.5.3 SOD.....	76
8.5.4 Carga antioxidante medida con ABTS.....	76
9.0 Conclusiones.....	78
10.0 PERSPECTIVAS.....	79
11.0 BIBLIOGRAFÍA.....	80

12.0 APÉNDICE86

0.1 LISTADO DE ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

ACC: Acetil-CoA carboxilasa

AF: Actividad física

AMP: Monofosfato de adenina

AMPK: Cinasa dependiente de AMP

ASP: Proteína estimuladora de acilación

ATP: Trifosfato de adenina

CAT: Catalasa

CBS: Cistationina- β -sintasa

CFTR: Regulador transmembranal de la fibrosis quística

cm: centímetros

DK: Dominio con la actividad cinasa

dL: decilitros

DR: Dominio autorregulador

DT2: Diabetes tipo 2

ECV: Enfermedad cardiovascular

EDL: Músculo extensor largo de los dedos

EF2: Factor de elongación 2

eNOS: sintasa endotelial de óxido nítrico

FAS: Sintasa de ácidos grasos

G6Pasa: Glucosa-6-fosfatasa

GBD: Dominio de unión a glucógeno

GLUT4: Transportador de glucosa

GPAT: Glicerol-3-fosfato acetiltransferasa

GPx: Glutación Peroxidasa

GS: Glucógeno sintasa

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HMGR: 3-hidroxi-metilglutaril-CoA

HSL: hormona sensible a lipasa

IL-6: Interleucina 6

IRS1: sustrato receptor de insulina

KIS: Dominio de secuencia de interacción cinasa

ME: Músculo esquelético

mg: miligramos

mTOR: Blanco de rapamicina en mamíferos

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAI-1: inhibidor del activador de palminógeno

PE: Prueba de esfuerzo

PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxicinasa

PFK2: fosfofructosacinasa 2

RI: Resistencia a la insulina

SM: Síndrome metabólico

SNF1-ASC: Dominio de asociación con el complejo SnF1

SOD: Súper óxido dismutasa

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

μ g: microgramos

μ L: microlitros

μ U: microunidades

ABREVIATURAS CORRESPONDIENTES A LOS GRUPOS EXPERIMENTALES

SM SIN EXER : Ratas con síndrome metabólico sin realización de ejercicio

SM + EXER: Ratas con síndrome metabólico sometidas a ejercicio

0.2 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización general del músculo esquelético

Figura 2. Organización estructural de la fibra muscular

Figura 3. Sarcómeros en estados funcionales

Figura 4. Representación de la miosina II

Figura 5. Representación de la disposición de actina, tropomiosina y las tres subunidades de troponina (I, C y T)

Figura 6. Ciclo de la contracción muscular

Figura 7. A) Localización del músculo EDL en humano y B) Localización del músculo sóleo en humano

Figura 8. Representación del desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes

Figura 9. Representación de la acción de las enzimas antioxidantes, Donde **GSH** representa el monómero reducido de glutati6n, **GSSG** representa a glutati6n oxidada, **GR** glutati6n reductasa, **GPx** glutati6n peroxidasa

Figura 10. Blancos de AMPK

Figura 11. Estructura de la AMPK vista desde dos 6ngulos

Figura 12. Diagrama de metodología y tratamiento utilizados durante el protocolo de investigaci6n

Figura 13. Esquema general del protocolo de actividad f6sica aplicado al grupo de SM + EXER durante 8 semanas (semana 17-25)

Figura 14. A) Material quir6rgico utilizado para la disecci6n de los m6sculos, B) recipiente donde fueron colocados los m6sculos extra6dos

Figura 15. Representaci6n del m6sculo aislado y sujetado dentro del recipiente con base de silic6n

Figura 16. Representación del músculo colocado en la cámara de estimulación eléctrica inmerso en amortiguador de Krebs burbujeándose con carbógeno

Figura 17. Aparatos utilizados para realizar el protocolo de estimulación eléctrica, A) Estimulador GRASS S88, B) Unidad de estímulo de aislamiento GRASS SIU5, C) Cámara de estimulación eléctrica

Figura 18. Efecto de la actividad física en el peso corporal y ganancia de peso

Figura 19. Resultados de la prueba de tolerancia a la glucosa realizada a ambos grupos experimentales

Figura 20. Comparación del efecto de la AF sobre la capacidad física de los animales

Figura 21. Resultados del análisis densitométrico del efecto de la actividad física y estímulo eléctrico (contracción) sobre la fosforilación de AMPK en músculo EDL

Figura 21.1 Imagen representativa de los ensayos de western blot del músculo EDL extraídos de las ratas de los dos grupos experimentales; con y sin la aplicación de estímulo eléctrico (contracción) definidos por los signos (+) y (—) respectivamente

Figura 22. Resultados del análisis densitométrico del efecto de la actividad física y estímulo eléctrico (contracción) sobre la fosforilación de AMPK en músculo sóleo

Figura 22.1 Imagen representativa de los ensayos de western blot del músculo sóleo extraídos de las ratas de los dos grupos experimentales; con y sin la aplicación de estímulo eléctrico (contracción) definidos por los signos (+) y (—) respectivamente

Figura 23. Resultados de la evaluación de la actividad enzimática CAT en tejido muscular (músculo sóleo y EDL), en reposo

Figura 24. Resultados de la evaluación de la actividad enzimática GPx en tejido muscular (músculo sóleo y EDL), en reposo

Figura 25. Resultados de la evaluación de la actividad enzimática SOD total en tejido muscular (músculo sóleo y EDL), en reposo

Figura 26. Resultados de la evaluación de la actividad enzimática SOD citosólica en tejido muscular (músculo sóleo y EDL), en reposo

Figura 27. Resultados de la evaluación de la actividad enzimática SOD mitocondrial en tejido muscular (músculo sóleo y EDL), en reposo

Figura 28. Resultados de la evaluación de la carga antioxidante (ABTS) en tejido muscular (músculo sóleo y EDL), en reposo

0.3 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Definiciones del SM de acuerdo a diferentes Organizaciones de salud

Tabla 2. Clasificación de los tipos de fibras en el músculo esquelético y sus principales características metabólicas

Tabla 3. Distribución de las diferentes isoformas de la AMPK del músculo EDL y sóleo en roedor

Tabla 4. Condiciones de estímulo eléctrico aplicadas al músculo sóleo y EDL

Tabla 5. Valores promedio del peso corporal a las 16 semanas de tratamiento, peso corporal al final del tratamiento dietario y actividad física (25 semanas)

Tabla 6. Resultados de los parámetros medidos en sangre (glucosa, triglicéridos e insulina), en diferentes etapas del tratamiento grupo SM + EXER y al final del tratamiento SM SIN EXER, también se muestran los resultados del tejido adiposo de ambos grupos experimentales.

Resumen

El síndrome metabólico (SM) se diagnostica por la presencia de obesidad abdominal, el incremento en la presión sanguínea, elevados niveles de glucosa y triglicéridos en sangre, y bajos niveles de colesterol de baja densidad c-HDL de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS)

La prevalencia del SM ha aumentado globalmente, y es debido al consumo excesivo de dietas hiperenergéticas (elevadas en azúcar y grasa), y la reducción de la actividad física.

El objetivo de este trabajo fue determinar si la actividad física en ratas con SM, tiene un efecto sobre la activación de la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK) y el estrés oxidativo (EOx), y con ello la mejora del SM. Con este fin se propusieron dos grupos experimentales; a ambos grupos se les ministró sacarosa al 30% en su agua para beber *ad libitum*. El grupo uno lo conformó aquellas ratas que no realizaron actividad física (SM SIN EXER) n=5, y el grupo dos correspondió a las ratas que realizaron actividad física de la semana 17-25 (SM + EXER) n=5.

En este proyecto se realizó una curva de ganancia de peso corporal semanal de las ratas de cada grupo experimental. Se aplicaron los protocolos de activación física a las ratas y estimulación eléctrica sobre los músculos sóleo y el músculo extensor largo de los dedos (EDL), con el fin de determinar el efecto del ejercicio sobre la ganancia de peso y la activación de la AMPK.

Se realizó también, una prueba de tolerancia a la glucosa vía oral, se determinaron parámetros bioquímicos (glucosa, triglicéridos e insulina), se cuantificó proteína por método de Lowry, se realizaron ensayos de Western-blot para cuantificar la cantidad de AMPK fosforilado (p-AMPK), AMPK total y actina de los músculos sóleo y EDL de las ratas con y sin aplicación de actividad física con y sin estímulo eléctrico (contracción).

Finalmente se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión reductasa y súper óxido dismutasa) y la carga antioxidante (ABTS).

Ante la inducción del SM mediante la ministración de sacarosa al 30% en el agua para beber en ambos grupos experimentales, se observaron cambios notables en la ganancia de peso corporal, en los niveles de triglicéridos, glucosa e insulina en sangre, validando a su vez el desarrollo del síndrome metabólico. El grupo que no realizó actividad física (AF) durante 8 semanas (SM SIN EXER), tuvo una ganancia de peso significativamente mayor en comparación al grupo que si realizó AF (SM + EXER). En los niveles de glucosa, triglicéridos e insulina, se observó que no hay una mejoría.

También se observó que la fosforilación de AMPK aumentó con la realización de ejercicio y la aplicación de estímulo eléctrico (contracción).

Respecto a las enzimas antioxidantes hay una mayor actividad de la enzima catalasa (CAT), pero en la actividad de las enzimas GPx, SOD total, citosólica y mitocondrial no hay diferencias significativas.

Finalmente, en la carga antioxidante se observa que el grupo SM+ EXER presenta una actividad oxidante mayor con respecto a los demás grupos, este resultado puede relacionarse a que los animales generaron un mayor estrés oxidativo en respuesta al SM y la AF.

1.0 Introducción

1.1 Síndrome metabólico

El síndrome metabólico es un conjunto de factores de riesgo para la diabetes tipo dos (DT2) y las enfermedades cardiovasculares (ECV), teniendo como factor común la resistencia a la insulina (RI) e hiperinsulinismo, dando como resultado la asociación con trastornos en el metabolismo de los carbohidratos y lípidos [1].

Desde un principio se ha puesto en evidencia la existencia de múltiples factores de riesgo asociados al SM. Se han encontrado informes históricos en donde se describen las bases anatómicas de muchas enfermedades (1761, *De Sedibus et Causis Morborum per Anatomen Indagatis*), en donde Morgani hace una asociación entre la obesidad abdominal, metabolismo anormal y aterosclerosis [2].

En 1923 Kylin describe la presencia de hipertensión, hiperglicemia y la acumulación de ácido úrico en las articulaciones que provocan artritis. En 1947 Vague asocia la obesidad con ciertas anormalidades metabólicas. Pero es hasta 1988, cuando Gerald Reaven describe el SM, o “Síndrome X”, y lo define como el conjunto de alteraciones en la homeostasis de la glucosa, la insulina, los bajos niveles del colesterol HDL y la presión arterial elevada [3].

Reaven *et al* postularon que la resistencia a la insulina es el factor común del síndrome X, sugiriendo que las alteraciones presentes en el metabolismo de la insulina tienen como consecuencia un factor de riesgo cardiovascular [3].

Diez años después la Organización Mundial de la Salud (OMS), introduce el término síndrome metabólico como una enfermedad que se puede diagnosticar mediante criterios definidos.

En un informe del 2001 realizado por el Panel III de Tratamiento del Adulto (ATP III por sus siglas en inglés Adult Treatment Panel III), se hace uso del término SM, convirtiéndose en la definición más utilizada.

Los estudios realizados sobre la prevalencia del SM en nuestro país reportados por el ATP III, e IDF indican que los adultos mayores de 20 años presentan el SM en un 36.8% para el ATP III, y 49.8% para la IDF, siendo las mujeres las más afectadas, debido a que tienen un mayor porcentaje de obesidad, [4].

1.2 Obesidad

La Organización Mundial de la salud (OMS), define a la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud [4].

De acuerdo a la definición de la OMS, un IMC igual o superior a 25 kg/m² determina sobrepeso y un IMC igual o superior a 30 kg/m² determina obesidad, [4]. En las ratas la obesidad se determina por la relación del tamaño de la tibia y la grasa abdominal [5].

La obesidad y las comorbilidades asociadas a ella como la resistencia a la insulina (RI), las dislipidemias, DT2 y ECV, constituyen actualmente el mayor problema de salud pública en el mundo. Los datos arrojados en el 2014 mencionan que, más de 1900 millones de adultos de 19 años o más tenían sobrepeso, de los cuales más de 600 millones eran obesos, y aseguraba que alrededor del 13% de la población adulta mundial (un 11% de los hombres y un 15% mujeres) eran obesos. Asimismo, se estima que alrededor de 41 millones de niños menores de 5 años tienen sobrepeso u obesidad, [4].

A nivel mundial la prevalencia de la obesidad (entre 1980 y 2008) se ha duplicado a más de quinientos millones de personas [4].

La causa principal del sobre peso y la obesidad es un desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas, debido a un aumento en la ingesta de alimentos de alto contenido energético, ricos en grasa y azúcar, esto aunado a una disminución en la actividad física [4].

Las consecuencias más comunes de la obesidad para la salud son: 1) ECV; 2) DT2; 3) trastornos del aparato locomotor principalmente osteoartritis; 4) algunos cánceres (endometrio, mama, ovarios, próstata, hígado, vesícula biliar, riñones y colon).

1.3 Actividad Física

La OMS define actividad física como cualquier movimiento corporal producto de los músculos esqueléticos que exija gasto de energía, [4].

La inactividad física representa el cuarto factor de riesgo en lo que respecta a la mortalidad mundial (6% de las muertes registradas en todo el mundo). Se estima que la inactividad física es la causa principal de aproximadamente un 21%-25% de los cánceres de mama y colon y el 27% de los casos de diabetes, [4].

Realizar actividad física de manera regular:

- Reduce el riesgo de hipertensión, cardiopatía coronaria, diabetes, cáncer de mama y colon.
- Aumenta las concentraciones de colesterol HDL.
- Disminuye las concentraciones de proteína C reactiva en el organismo. Esta proteína es un indicador de la inflamación, concentraciones altas de proteína C indican un mayor riesgo de sufrir enfermedad coronaria [6].
- Disminuye el sobrepeso y obesidad cuando se combina con una alimentación sana y balanceada.
- Mejora la salud ósea y funcional.
- Es fundamental para el equilibrio calórico y control de peso.
- Mejora el control glucémico, posiblemente debido a que el efecto de contracción muscular es similar al de la insulina, ya que desplaza la glucosa desde el plasma al interior de la célula [7].

La actividad física no debe confundirse con el ejercicio. Se entiende por ejercicio a una variedad de actividad física planificada, estructurada, repetitiva, con un objetivo relacionado con la mejora o el mantenimiento de uno o más componentes de la aptitud física. La actividad física abarca el ejercicio; pero también otras actividades como son: labores domésticas, formas de transporte activas, actividades recreativas, [8].

ANTECEDENTES

Hoy en día, la humanidad enfrenta uno de los más grandes problemas de salud: la obesidad, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (ECV), ya que estos desórdenes metabólicos crónicos, representan la principal causa de mortalidad a nivel mundial, disminuyen la calidad de vida de quien lo padece, así mismo, afectan severamente a la población económicamente activa, debido a que se invierte una cantidad considerable de dinero para tratar las complicaciones crónicas que conllevan [9].

El conjunto de estos desórdenes metabólicos crónicos se conoce como SM, cuyas consecuencias representan el 60% de las causas mortalidad a nivel mundial así mismo sus complicaciones cardiovasculares representan la primera causa de muerte [9].

El síndrome metabólico es considerado como una enfermedad multifactorial ya que es el resultado de la interacción de distintos factores como son: 1) factores metabólicos; 2) factores genéticos; 3) factores ambientales, y 4) malos hábitos alimenticios [10].

Dentro de los diferentes factores causantes del SM hay dos principales: 1) La resistencia a la insulina (RI); que se refiere al momento en que las células del cuerpo se vuelven menos sensibles y, eventualmente, resistentes a la insulina. En cada tejido se presentan diferentes niveles de afectación, por ejemplo, en músculo esquelético se altera la captación de glucosa estimulada por insulina, en páncreas se deja de producir suficiente insulina por lo que hay un aumento de glucosa en sangre, dicha alteración es diagnosticada como DT2. 2) La obesidad que se define como la acumulación anormal de masa grasa en el cuerpo, y guarda una estrecha relación con la resistencia a la insulina (RI). A esta enfermedad se le atribuye tener altos niveles de colesterol en sangre, bajos niveles de c-HDL e hiperglicemia [2].

Independientemente de los diferentes factores causante del SM, el denominador común es un desequilibrio en la producción y utilización de energía a nivel celular, obtenida principalmente por oxidación metabólica de hidratos de carbono y lípidos, [9].

En diferentes estudios se ha comprobado que el SM y la RI alteran diferentes vías de señalización siendo de principal estudio la vía de la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK) la cual actúa como un sensor metabólico regulando el metabolismo de lípidos y glucosa [11].

La activación de la AMPK depende en gran medida del nivel de energía, por ejemplo, durante la realización de ejercicio la proporción ATP/AMP cambia, ya que aumentan los niveles de AMP, lo que eventualmente conlleva a la activación de la enzima.

Se ha estudiado que la desregulación de la AMPK juega un papel importante en la RI y el síndrome metabólico. Así mismo se han propuesto estrategias que pueden ser aprovechadas para la prevención y tratamiento del SM teniendo como blanco a la AMPK [11].

El ejercicio ha mostrado tener efectos sobre la activación de esta enzima, dicho efecto se ve reflejado en la disminución de diferentes enfermedades asociadas al SM ejemplo son: DT2, hipertensión, aterosclerosis, algunos canceres, ECV ya que reduce la RI.

En un estudio realizado con roedores, los cuales fueron puestos a correr sobre una banda sin fin. Se demostró que esta intervención incrementa la expresión de 3 enzimas que regulan a AMPK que son: LKB1, CAMKK β y SIRT1, y eventualmente activa la óxido nítrico sintasa (eNOS) enzima que se ha demostrado que protege contra la aterogénesis en animales experimentales [12].

Así mismo se han publicado numerosos estudios que indican una estrecha relación entre las enfermedades implicadas en la patogénesis del SM y el estrés oxidativo (EOx). Ejemplo es: la hiperglicemia crónica que, causa EOx en tejidos propensos a complicaciones de pacientes con DT2.

Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para generar energía liberan radicales libres (RL) y en las células existen sistemas de defensa que neutralizan a estas moléculas, como las enzimas antioxidantes (Catalasa (CAT), Super óxido dismutasa (SOD) y Glutación Peroxidasa (GPx)). Tanto los RL como los antioxidantes se encuentran en equilibrio; cuando hay un exceso de RL y superan la barrera antioxidante se llega al EOx.

Los productos nitrosilados u oxidados del ataque de radicales libres, disminuyen la actividad biológica de macromoléculas, lo que lleva a la disminución en el metabolismo energético, señalización celular, transporte y otras funciones principales, [13].

El ejercicio posee un rol controversial en la producción de RL. El ejercicio físico agudo, es decir extenuante, el cual está asociado con el incremento en la generación de RL, debido principalmente al incremento en el consumo de oxígeno [14]. El ejercicio extenuante causa EOx en personas sedentarias. Realizar ejercicio de intensidad moderada, podría prevenir diversas patologías debido a la peroxidación lipídica, disminución del daño muscular y elevación del sistema antioxidante [15].

En condiciones normales los roedores sometidos a una rutina de ejercicio no presentan alteraciones en los parámetros bioquímicos. Sin embargo hay mejores adaptaciones al ejercicio en las ratas sanas, en comparación con aquellas que padecen alguna alteración causada por el SM.

Así mismo existe un balance entre las especies antioxidante y oxidantes en animales sanos, por lo que no se genera un EOx, en comparación con la ratas que padecen SM ya que hay un exceso de especies oxidantes, las cuales causan daños a macromoléculas (hidratos de carbono, lípidos proteínas y ácidos nucleicos), que se asocia con el desarrollo de diversas enfermedades sobre todo en aquellas que conllevan un proceso inflamatorio, como la diabetes, artritis, enfermedades cardiovasculares entre otras [16, 17].

Modelo de SM inducido por consumo de sacarosa

El modelo de SM en ratas se ha convertido en uno de los principales objetos de estudio, debido a que actualmente, la obesidad y el SM se han convertido en una pandemia. Como ya se ha mencionado, los principales factores causantes de la obesidad y el SM son un aumento en el consumo energético y una disminución de la actividad física [9].

La inducción del SM en ratas se logra por medio de una dieta alta en hidratos de carbono o grasas o la combinación de ambas. En este estudio se realizó mediante una dieta alta en hidratos de carbono, ya que el consumo excesivo y prolongado de hidratos de carbono causa almacenamiento de ácidos grasos en el tejido adiposo y se asocia con la ganancia de peso, con el aumento de triglicéridos en sangre y RI.

El modelo de SM inducido por consumo de sacarosa se realizó mediante la ministración de sacarosa al 30% en el agua para beber *ad libitum* [9].

En este proyecto no se requirió el uso de ratas sanas, ya que se evaluó el efecto de la actividad física sobre el SM y EOx, en un modelo de SM inducido por una dieta alta en hidratos de carbono, con el fin de demostrar que la actividad física puede ser una alternativa de tratamiento y así mejorar las complicaciones crónicas que conllevan el SM.

2.0 MARCO TEÓRICO

2.1 Definición de Síndrome metabólico

El síndrome metabólico (SM) es un trastorno multicomponente caracterizado por: obesidad, resistencia a la insulina (RI), dislipidemia e hipertensión, y a su vez se asocia al riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2 (DM2), y enfermedades cardiovasculares, [1].

MEDICIÓN CLÍNICA	OMS 3 o más factores	EGIR 2 o más de factores	ATP III 3 o más factores	AHA/NHLBI 3 o más factores	IDF 2 o más de factores
INSULINO RESISTENCIA	GAA, TGA, DM tipo 2 o disminución de la sensibilidad a la insulina	Insulina plasmática > percentil 75	No	No	No
OBESIDAD	IMC > 30 y/o relación cintura cadera > 0.9 en varones y > 0.85 en mujeres	Cintura ≥ 95 cm en varones y ≥ 80 cm en mujeres	Cintura ≥ 102 cm en varones y ≥ 88 cm en mujeres	Cintura ≥ 102 cm en varones y ≥ 88 cm en mujeres	Cintura ≥ del umbral definido para cada grupo étnico
DISLIPIDEMIAS	TG ≥ 150 mg/dL y/o HDL < 35 mg/dL en varones o < 39 mg/dL en mujeres	TG ≥ 150 mg/dL y/o HDL < 35 mg/dL en varones o < 39 mg/dL en mujeres	TG ≥ 150 mg/dL	TG ≥ 150 mg/dL	TG ≥ 150 mg/dL
			o HDL < 40 mg/dL en varones o < 50 mg/dL en mujeres	o HDL < 40 mg/dL en varones o < 50 mg/dL en mujeres	o HDL < 40 mg/dL en varones o < 50 mg/dL en mujeres
PRESIÓN ARTERIAL	≥ 140/90 mm Hg	≥ 140/90 mm Hg	≥ 130/85 mm Hg	≥ 130/85 mm Hg	≥ 130/85 mm Hg*
GLUCEMIA		GAA, TGA o DM tipo 2	Glucemia en ayunas > 110 mg/dL	Glucemia en ayunas > 110 mg/dL	Glucemia en ayunas > 110 mg/dL
OTROS	Micro albuminuria				

Tabla 1. Definiciones del SM de acuerdo a diferentes Organizaciones de salud; EGIR, Grupo Europeo para el estudio de la resistencia a la insulina; ATP III, Panel del Tratamiento para Adulto III, AHA/NHLBI, Sociedad Americana de Corazón/ Instituto Nacional del corazón, Pulmón y Sangre; IDF, Federación Internacional de Diabetes; GAA, Glucosa alterada en ayunas; TGA, Tolerancia a la glucosa Alterada [9].

2.2 Obesidad y SM

La obesidad es el factor principal causante para el desarrollo del SM, lo que implica una alteración en el metabolismo de la glucosa, modificaciones del patrón lipídico (aumento de triglicéridos y descenso en los valores de colesterol HDL), hipertensión arterial, desarrollo de DM2 entre otros [18].

En las últimas décadas la obesidad ha crecido de manera acelerada alcanzando proporciones epidémicas a partir de 1998 y, desde esa fecha, se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública en el mundo. La OMS ha estimado que más de 2.8 millones de personas mueren cada año en todo el mundo a causa del sobrepeso y la obesidad [19].

Las prevalencias de sobrepeso y obesidad son mayores en el continente americano (62% de sobrepeso en ambos sexos y 26% de obesidad), y menores en el sur de Asia (14% de sobrepeso en ambos sexos, y 3% de obesidad) [20].

La prevalencia del SM a nivel mundial se ubica entre un 15%-40%, y varía según el género, edad, etnia, y criterio: Criterio OMS: 35.3%, ATP III 20.2%, y EGIR 24% [10].

2.3 Impacto del Síndrome Metabólico en el mundo

El SM se está convirtiendo en uno de los principales problemas de salud pública, lo cual está asociado con incremento de 5 veces en la prevalencia de DM2 y de 2 a 3 veces en ECV [21, 22]. Debido a todos los factores que conforman al SM se ha considerado como un elemento importante en la epidemia actual de diabetes y de ECV. Las ECV también son un problema de salud pública importante. En todo el mundo 16.7 millones de muertes se deben a enfermedades cardiovasculares [23].

El actual aumento de la obesidad y el SM llevará a una nueva epidemia de ECV a nivel mundial. La razón de esta posible epidemia no está del todo establecida; se asocian factores medioambientales, cambios en el estilo de vida, dietas con alto aporte calórico y disminución de la actividad física [18].

Se sabe que dentro de todos los factores causantes del SM el origen étnico es uno ellos, en Estados Unidos se demostró que el SM se desarrolla según las diferentes etnias por lo que la ATP-III y la IDF determinaron que la prevalencia del SM es la siguiente: hombres blancos la prevalencia del SM es de 35% (IDF 46%), en hombres afroamericanos es de 21.6% (IDF 24.2%), en el caso de la mujeres se observó que aquellas de origen mexicano tienen la mayor prevalencia de SM con un 37.8% (39.2%), respecto a las mujeres blancas (33.7% y 33.8% IDF) y las afroamericanas (36.9% y 35.8% IDF) [22].

2.4 El impacto del síndrome metabólico en México

La DT2 y las ECV son la principal causa de mortalidad en nuestro país, y son factores de riesgo para desarrollar SM.

Desde el año 2000, la DT2 en México es la primera causa de muerte entre las mujeres y la segunda entre los hombres [23]. En 2010, esta enfermedad causó cerca de 83000 muertes en el país [24].

Las ECV causan también la mayoría de los decesos en el país considerándose a las cardiopatías isquémicas como el padecimiento más letal, afectan principalmente a personas mayores de 40 años y con más frecuencia en hombres, en un 65%.

De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) el 68.5% de los mexicanos tiene problemas de obesidad y sobrepeso, el 58% padece DT2, 21% de dislipidemia y el 43.2% padece hipertensión arterial [24]. A nivel mundial México se posiciona en primer lugar en obesidad infantil y el segundo en adultos.

Conforme a la Encuesta Nacional de la Salud y Nutrición realizada en el año 2012, se encontró que la población mexicana mayor de 20 años presenta una prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad del 71.28% (48.6 millones de personas), esto significa que 7 de cada 10 mexicanos sufren de sobrepeso u obesidad, asimismo se observó que la prevalencia de DM2 era del 11% y de un 30% para la hipertensión [6,23].

2.5 Factores causantes del síndrome metabólico

Los factores de mayor riesgo del SM se relacionan con la RI y con el aumento del tejido adiposo (en particular el incremento de la grasa visceral abdominal), estos factores son consecuencia del consumo de dietas con alto contenido energético e inactividad física. La disminución de la sensibilidad a la insulina conlleva a un menor ingreso de glucosa al músculo y tejido graso, teniendo como consecuencia la hiperglucemia que estimula a las células beta-pancreáticas a producir más insulina dando como resultado el agotamiento de éstas [25]. Las alteraciones inducidas por obesidad y ECV, son también factores involucrados con el SM. El tejido adiposo secreta proteínas denominadas adipocinas, entre ellas destaca la adiponectina (proteína involucrada en la sensibilidad de la insulina), PAI-1, ASP, TNF- α , IL-6 y resistina [26].

Uno de los principales efectos de las adipocinas, es la homeostasis metabólica ya sea sensibilizando o desensibilizando la acción de la insulina en los diferentes tejidos blanco lo que se conoce como resistencia a la insulina. La obesidad se caracteriza por un aumento desmesurado de la adiposidad, lo que conlleva al incremento de las adipocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, resistina), y un decremento de las adipocinas antiinflamatorias (adiponectina), las cuales modifican la sensibilidad a la insulina, desencadenando la arteriosclerosis y otras complicaciones vasculares [26].

La adiponectina es una adipocina antiinflamatoria producida por los adipocitos, se encarga de la regulación del balance energético y del metabolismo del tejido adiposo periférico. El mecanismo por el cual media la sensibilidad a la insulina parece estar relacionado con el aumento de la oxidación de ácidos grasos y la utilización de glucosa vía activación de AMPK [26,27].

2.6 Músculo esquelético y contracción muscular

El músculo esquelético (ME) comprende a la gran masa de la musculatura somática; funciona bajo el control voluntario ya que se encuentra inervado por el sistema nervioso somático; está constituido por largas células multinucleadas (células musculares) y es el responsable directo de que el organismo y todos sus componentes tengan movilidad. Las células musculares tienen la capacidad de convertir la energía química en energía mecánica, función requerida para llevar a cabo el proceso de contracción [28].

2.6.1 Morfología

El ME está constituido por fibras musculares individuales, que son los ladrillos del sistema muscular. Casi todos los músculos esqueléticos comienzan y terminan en tendones, estando las fibras musculares dispuestas en paralelo entre los extremos tendinosos, de modo que la fuerza de contracción de las unidades es aditiva (Figura 1) [29].

Cada fibra muscular es una célula con varios núcleos, es alargada, cilíndrica y se encuentra rodeada por una membrana celular denominada sarcolema. Las fibras musculares están hechas de miofibrillas, y se dividen en filamentos individuales. Estos filamentos están constituidos por proteínas contráctiles (Figura 1) [29].

Los diferentes componentes de las fibras musculares causan diferencias en los índices de refracción formando estrías que se ubican de forma transversa y son características del ME. Estas zonas son identificadas por letras y se denominan bandas.

La banda clara I está dividida por la línea oscura Z, y la banda oscura A que contiene en el centro a la banda H más clara. Una línea transversa M se observa en medio de la banda H, y esta línea más las áreas claras angostas a cada lado de ella, a veces son llamadas la zona pseudo-H. El área entre dos líneas Z adyacentes se denomina sarcómero. (Figura 1) [30].

Las estriaciones forman filamentos delgados y gruesos. Los filamentos gruesos, están hechos de miosina, tienen un diámetro aproximadamente del doble que los filamentos delgados y están alineados para formar las bandas A. Los filamentos delgados están constituidos por actina, tropomiosina y troponina, y forman las bandas I [30].

Las bandas más claras H, en el centro de las bandas A, son las regiones donde los filamentos delgados no se superponen a los gruesos cuando el músculo está relajado. Cuando se contrae ocurre un deslizamiento de los filamentos delgados sobre los gruesos (Figura 2) [30].

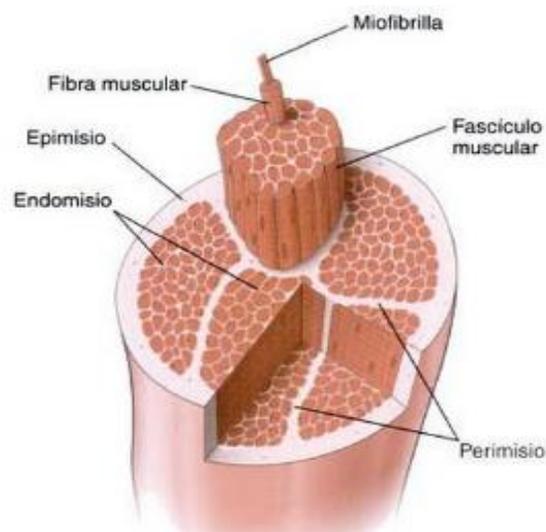


Figura 1. Organización general del músculo esquelético. Esta representación esquemática muestra la organización general del músculo esquelético y su relación con el tejido conectivo circundante [31].

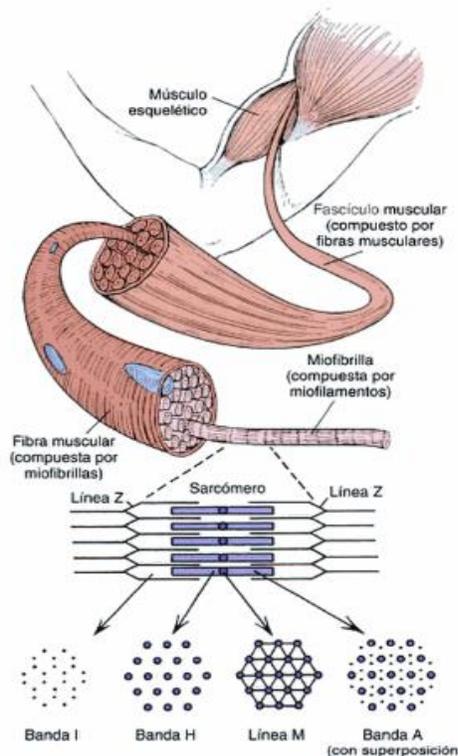


Figura 2. Organización estructural de una fibra muscular. Los filamentos se organizan de tal forma que imparten a la miofibrilla y a la fibra un aspecto estriado (formación de bandas). La unidad funcional de la miofibrilla es el sarcómero, que se extiende desde una línea Z hasta la siguiente banda [30].

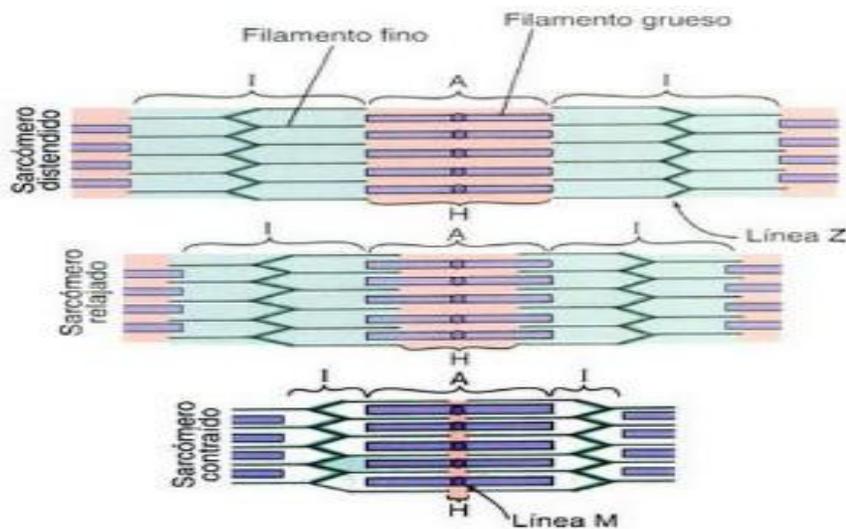


Figura 3. Sarcómeros en estados funcionales diferentes. En estado relajado (diagrama del medio) el entrecruzamiento de los filamentos delgados y gruesos no es completa; las bandas H e I son relativamente anchas [30].

El mecanismo contráctil del ME depende de las proteínas miosina (peso molecular 46kDa), actina (peso molecular 43kDa), tropomiosina (peso molecular 70kDa) y troponina. Esta última está formada por tres subunidades troponina I, troponina T y troponina C. las tres subunidades tienen pesos moleculares que van de 18-35 kDa.

2.6.2 Proteínas contráctiles

La miosina es una proteína compleja que se une a la actina. En las células epiteliales del intestino, en el ojo y probablemente en otros órganos, presenta una sola cabeza sin cola (miosina I), mientras que en el músculo esquelético presenta una cola con dos cabezas (miosina II) [30].

La miosina II está formada por dos cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras. Las cadenas ligeras y las porciones terminales N de las cadenas pesadas se combinan para formar las cabezas globulares (figura 6). Esta cabeza globular posee dos sitios de fijación específicos, uno para el ATP y el otro para la actina. También presenta actividad de ATPasa y motora. Las moléculas de miosina de la fibra muscular, se agrupan cola con cola para formar los filamentos gruesos de miosina. Las cabezas globulares de los filamentos de miosina establecen puentes cruzados entre los filamentos gruesos y delgados [30].

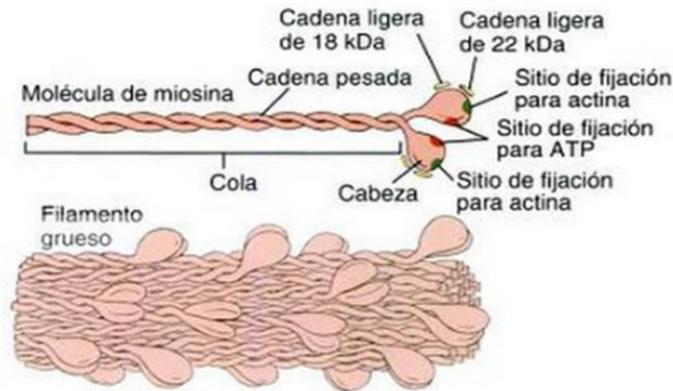


Figura 4. Representación de la miosina II, una proteína de 510 kDa, está compuesta por dos cadenas polipeptídicas pesadas (222kDa cada una) y cuatro cadenas ligeras que son de dos tipos: cadena esencial (18 kDa) y la cadena reguladora (22kDa), Las moléculas de miosina de la fibra muscular, se agrupan cola con cola para formar los filamentos gruesos de miosina [30].

Actina G; es una molécula pequeña (42 kDa) se polimeriza para formar una hélice bicatenaria, denominado filamento de actina F. estos filamentos de actina son polares; todas las moléculas de actina G están orientadas en el mismo sentido. El extremo “plus” de cada filamento está unido a la línea Z por α -actinina, mientras que el extremo “minus” se extiende hacia la línea M. Cada molécula de actina G del filamento delgado tiene un sitio de unión a la miosina (figura 5) [30].

Tropomiosina; es una proteína de 64kDa, compuesta por una hélice doble de dos polipéptidos. Forma filamentos largos que se ubican en el surco que se encuentra entre las dos cadenas de actina F. En el músculo en reposo la tropomiosina y su proteína reguladora (complejo de troponina), ocultan el sitio de unión a la miosina que hay en la actina (figura 7).

Troponina, las moléculas de troponina están localizadas en intervalos a lo largo de las moléculas de tropomiosina. Consiste en un complejo de tres subunidades globulares. Cada molécula de tropomiosina posee un complejo de troponina; La troponina C (TnC) es la subunidad más pequeña de complejo (18kDa) y su función es de fijar Ca^{2+} , lo cual es esencial para que inicie la contracción. La troponina T (TnT), es una subunidad de 30kDa, se une a la tropomiosina y ancla el complejo de la troponina. La

troponina I (TnI) también es de 30kDa se une a la actina e inhibe la interacción actina-miosina (Figura 5) [30].

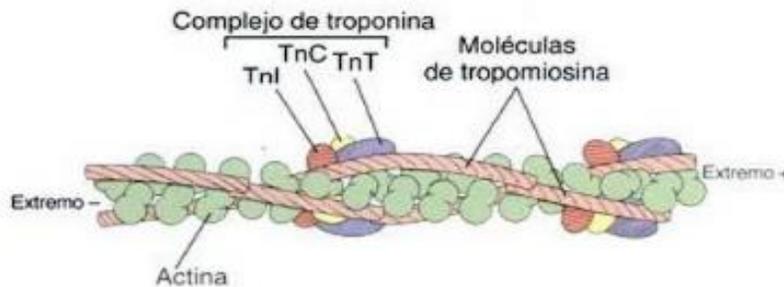


Figura 5. Representación de la disposición de actina, tropomiosina y las tres subunidades de troponina (I, C y T) [30].

2.6.3 Contracción muscular

La contracción muscular es el proceso mediante el cual se realiza el acortamiento de los elementos contráctiles en el músculo, implica el deslizamiento de los filamentos delgados sobre los gruesos. El deslizamiento durante la contracción muscular es producto de la ruptura y generación de los enlaces cruzados entre la actina y miosina [30].

La fuente energética inmediata para la contracción muscular es el ATP. La hidrólisis de los enlaces fosfato de alta energía de esta molécula esta catalizada por la adenosíntrifosfatasa (ATPasa) situada en las cabezas de miosina donde hacen contacto con la actina.

El proceso de contracción muscular, que se describe a continuación es el más aceptado [31]:

- 1) La transmisión del impulso nervioso activa a la fibra esquelética, provocando una despolarización del sarcolema, y consecuente liberación de iones calcio de las cisternas del retículo sarcoplásmico (RS), aumentándose la concentración de calcio intracelular (Fig.6-A)

- 2) Se lleva a cabo la unión de los iones calcio a la troponina C, causando un cambio de conformación del complejo de troponina, que conlleva al movimiento de la molécula de tropomiosina, dejando libre el sitio de unión para la miosina, en la actina (Fig.6-B)
- 3) La unión miosina-actina marca el inicio de proceso de contracción muscular, debido a que la unión induce la liberación de ADP + Pi de la cabeza de miosina II (Fig.6-C)
- 4) Debido al cambio conformacional de la cabeza de miosina, ésta es capaz de desplazar al filamento delgado de actina aproximadamente 10nm hacia la banda H (Fig.6-D)
- 5) El cambio conformacional de la cabeza de miosina II, hace posible la unión del ATP mediante la ATPasa (Fig.6-E)
- 6) Lo anterior conduce a un nuevo cambio conformacional del sitio de unión de la actina, que provoca la separación de los filamentos. Posteriormente se hidroliza el ATP y con la energía liberada es posible que la miosina recupere su conformación inicial (Fig.6-F).

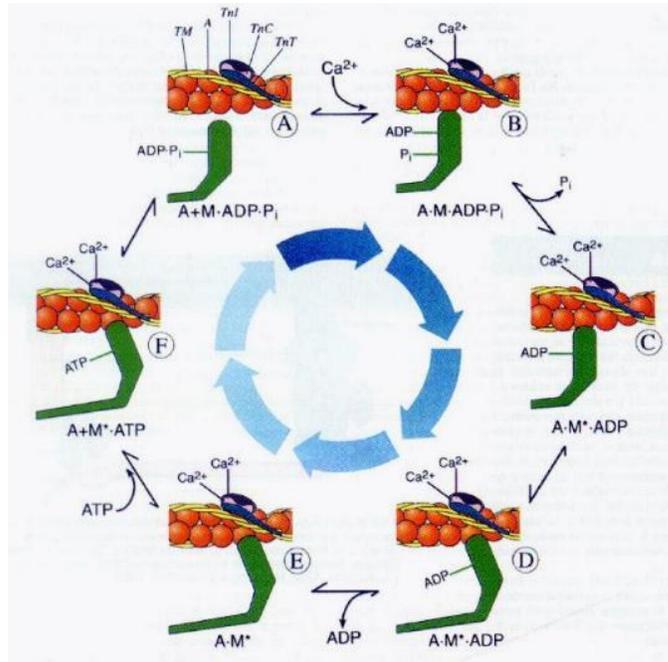


Figura 6. Ciclo de la contracción muscular; la hidrólisis del ATP permite que se lleve a cabo la unión y separación de actina-miosina, por lo que el ATP separa la cabeza de miosina del filamento delgado y le da energía a la contracción [31]

2.7 Tipos de fibras musculares y características metabólicas del músculo

Las fibras musculares esqueléticas se clasifican en tres tipos: las fibras tipo I (oxidativas lentas), las fibras tipo IIa (glucolíticas oxidativas rápidas) y las fibras de tipo IIb (glucolíticas rápidas) (Tabla 1) [31].

2.7.1 Características metabólicas del músculo sóleo y EDL

El músculo sóleo y EDL, son dos tipos de músculo representativos de dos tipos de metabolismo (oxidativo y glucolítico), y tipo de fibra (contracción lenta y rápida). Una de las diferencias funcionales más grandes del metabolismo oxidativo y glucolítico es que el glucolítico genera ATP a través de una corta vía entre sustratos (por ejemplo, glucosa) mientras que en el oxidativo, la vía entre el sustrato (por ejemplo, glucosa) y el ATP constituye de más pasos en la reacción (por ejemplo, glucólisis más ciclo tricarboxílico, además del transporte de electrones) y corresponde a un proceso más largo. Consecuentemente, los músculos esqueléticos de acción rápida son

compuestos predominantemente de fibras blancas glucolíticas mientras que los músculos de acción lenta, generalmente son rojos y oxidativos [31].

Característica	Tipo I	Tipo IIA	Tipo IIB
Otros nombres	Oxidante lento; rojo	Oxidante rápido; rojo	Glucolítico rápido; blanco
Actividad de ATPasa isoenzima miosina	Lenta	Rápida	Rápida
Capacidad de bombeo de Ca ²⁺ del retículo sarcoplásmico	Moderada	Alta	Alta
Diámetro	Moderado	Corto	Largo
Capacidad de glucólisis	Moderada	Alta	Alta
Capacidad de oxidación (se correlaciona con el número de mitocondrias, densidad capilar y contenido de mioglobina)	Alta	Alta	Baja

Tabla 2. Clasificación de los tipos de fibras en el músculo esquelético y sus principales características metabólicas [31].

2.8 Músculo Sóleo y músculo extensor largo de los dedos (EDL)

Tanto en el humano como en la rata, el músculo EDL se encuentra entre el *Tibialis* anterior y los músculos *Peroneus* sobre las caras anteriores de la fíbula y de la tibia. El tendón proximal del EDL se origina en el cóndilo lateral de la tibia, en el asta anterior de la fíbula y en la membrana interósea (figura 7). El músculo pasa por debajo de los ligamentos crurales cruzados y transversos en compañía del peroneo anterior y se divide en cuatro partes que recorren el dorso del pie, y que a cada una

de las cuales se inserta en las falanges medias distales de los dedos del pie excepto el dedo gordo [32,33].

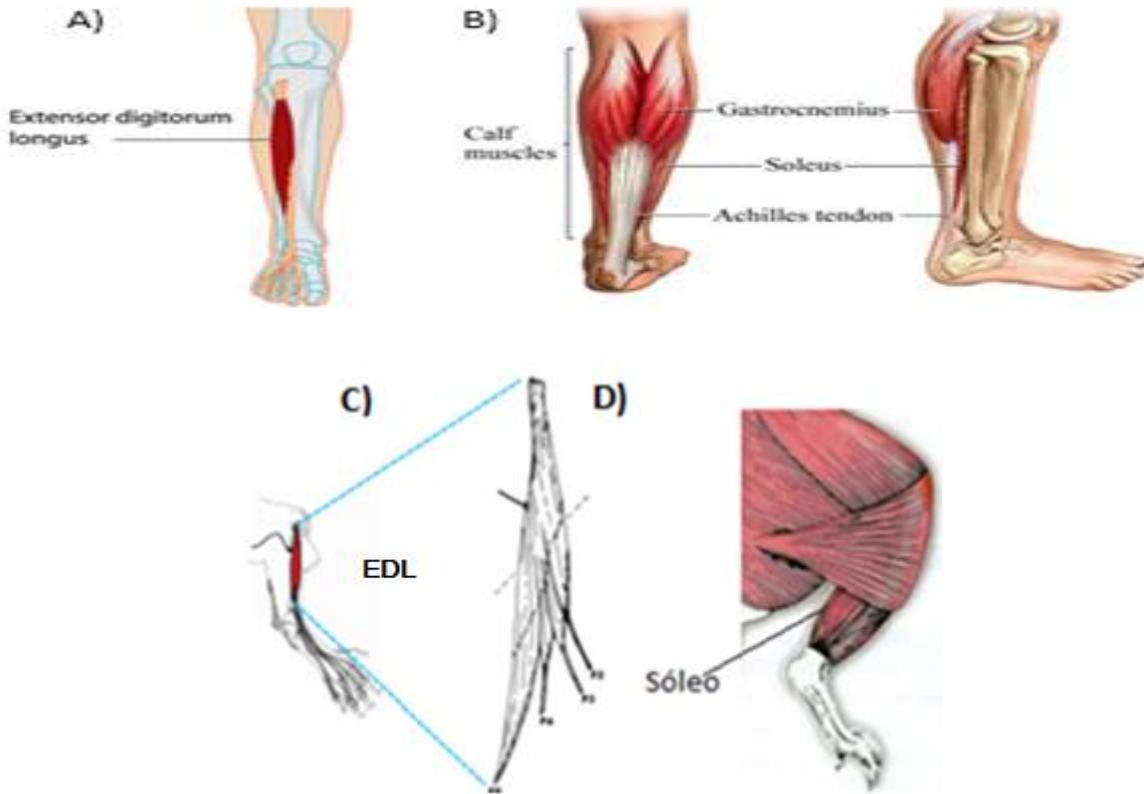


Figura 7. A) Localización del músculo EDL en humano y B) Localización del músculo sóleo en humano C) Localización músculo EDL en rata, D) Localización músculo sóleo en rata.

Tiene la función de producir extensión simultánea de los dedos del pie excepto la del dedo gordo, se considera de metabolismo glucolítico, de contracción rápida y tipo de fibras IIb.

El músculo sóleo se encuentra por debajo de los músculos *Gastrocnemius* (gemelos) por la parte posterior de la Fíbula y de la *Tibia* (figura 9). El tendón proximal del sóleo se origina en la superficie proximal posterior de la *Tibia* y en la parte proximal posterior de la cabeza de la Fíbula. El sóleo y los *Gastrocnemius* forman una estructura que se conoce como “*triceps surae*” que se convierte en el tendón

Calcaneal (Achilles), el cual se inserta en la parte posterior del hueso *Calcaneus* [32,33]. Su función es de mantener la postura del cuerpo.

El músculo sóleo se caracteriza por tener el mayor contenido de fibras de contracción lenta, por lo que su metabolismo es de tipo oxidativo.

2.9 Estrés oxidativo (EOx) y medición del estado oxidante

El EOx se refiere al desequilibrio entre los niveles de agentes oxidantes y antioxidantes, estando a favor el nivel de los oxidantes en células y tejidos. Este desequilibrio causa la modificación de lípidos, proteínas y ADN. Estas modificaciones o daños en dichas moléculas, se conoce como daño oxidativo. Las especies oxidantes son aquellas que causan o promueven la oxidación y se entiende por antioxidantes a las moléculas que inhiben la oxidación y la formación de especies oxidantes (Figura 8) [16,17].

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, otorgándoles una configuración altamente reactiva o inestable a las moléculas [16].

En términos de reactividad con macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas y lípidos), el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) es el más reactivo y el tiempo de vida de estas especies presentes en los constituyentes biológicos es extremadamente corto. Por ejemplo, el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) reacciona rápidamente con otra molécula de superóxido (auto reacción de dismutación), para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Por otro lado, el tiempo de vida media del H_2O_2 puede ser de meses, siempre y cuando, se proteja de la luz y de la contaminación por trazas de metales. H_2O_2 es rápidamente utilizado por enzimas antioxidantes como: catalasa, glutatión peroxidasa (Figura 9) [16].



Figura 8. Representación del desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes, propiciando la oxidación de biomoléculas y/o por alteración de la homeostasis dando como resultado al padecimiento de enfermedades crónicas [17].

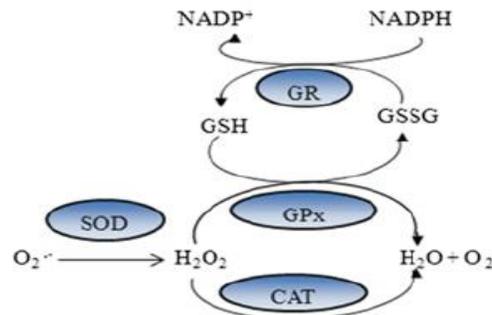


Figura 9. Representación de la acción de las enzimas antioxidantes [17]. Donde **GSH** representa el monómero reducido de glutatión, **GSSG** representa la forma oxidada de glutatión, **GR** glutatión reductasa, **GPx** glutatión peroxidasa.

El oxígeno singlete ($\cdot\text{O}_2$) reacciona rápidamente con los grupos de cisteína e histidina presentes en las proteínas, con lípidos insaturados y con algunos ácidos nucleicos.

Las ERO se forman durante una gran variedad de procesos metabólicos y son requeridas para la señalización celular. Durante el metabolismo se producen moléculas tóxicas que pueden causar daño estructural y funcional a las células. Las ERO o las especies reactivas del nitrógeno (ERN), tales como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y óxido nítrico (NO) entre otras juegan un papel importante en la fisiología y patología celular [17].

El EOx puede deberse a: 1) la disminución de los niveles de antioxidantes o enzimas antioxidantes; 2) defectos en la expresión de genes antioxidantes [10].

La reducción de los antioxidantes (vitaminas E, C y D flavonoides y carotenoides) y micronutrientes (Hierro, Cobre, Zinc, Selenio), los cuales son necesarios para el correcto funcionamiento de enzimas antioxidantes (catalasa, súper óxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR), da como resultado la acumulación de especies oxidantes (radicales libres y ERO) [10].

El EOx se asocia con el desarrollo de diversas enfermedades sobre todo en aquellas que conllevan un proceso inflamatorio, como la diabetes, artritis y ECV, entre otras [10]

Medición del estado oxidante

El daño ocasionado por el EOx, se determina mediante dos métodos: directos e indirectos. Entre los se encuentra la medición de la concentración de agentes oxidantes, lo cual resulta poco viable debido al costo, y por su corta vida media, por lo que la determinación indirecta es la mejor opción [34].

Métodos indirectos:

1. Determinación de productos terminales de la acción oxidante sobre biomoléculas; las EROs inducen en las proteínas la acumulación de grupos carbonilos, que pueden ser evaluados después de la condensación con 2-4 dinitrofenilhidrazina (2,4-DNFH), comúnmente utilizado para evaluar la oxidación de proteínas celulares. Algunos ejemplos son: medición de

compuestos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico, medición de otros aldehídos procedentes también de la lipoperoxidación, medición de hidrocarburos volátiles en el aire expirado y medición de compuestos fluorescentes de la lipoperoxidación [34].

2. Medición de la concentración de antioxidantes; en diferentes estudios muestran que los niveles de antioxidantes pueden disminuir o aumentar por diferentes enfermedades, por lo que al monitorearlos pueden resultar como marcadores de enfermedades [34].
3. Medición del estado antioxidante; expresa el balance dinámico entre el sistema antioxidante y los oxidantes. Por ejemplo, la evaluación de las enzimas de EOX (catalasa, súper óxido dismutasa y glutatión peroxidasa) [34].

3.1 Enzimas de estrés oxidativo

Las enzimas antioxidantes celulares más estudiadas son:

➤ Catalasa (CAT):

La CAT, cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno, se expresa en células aeróbicas de mamíferos y no mamíferos conteniendo el sistema citocromo. La actividad de catalasa varía de tejido en tejido por ejemplo: se ha observado actividad alta en el hígado y en el riñón, mientras que el tejido conectivo presenta una actividad baja. La presencia de catalasa en los peroxisomas de células de mamíferos promueve la mejora del daño causado por el EOX, se logra catalizando el metabolismo de peróxido [34].



➤ Súper óxido dismutasa (SOD)

La súper óxido dismutasa cataliza la conversión del anión súper óxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y oxígeno (O_2). El H_2O_2 subsecuentemente se convierte en agua mediante la catalasa. SOD es la enzima más importante en el sistema de defensa antioxidante. Se han identificado tres isoenzimas de SOD en mamíferos, las cuales son: la forma citosólica de SOD que incluye Zinc y Cobre (CuZn-SOD), La forma mitocondrial que contiene Manganeseo (Mn-SOD), y la SOD extracelular (EC-SOD) [15].



➤ Glutación peroxidasa (GPx):

La GPx es un tetrámero con 4 subunidades idénticas de peso molecular de 84kDa. Esta enzima requiere Selenio como cofactor y contiene un residuo aminoácido de selenocisteína en su sitio activo en cada monómero que participa en el mecanismo. La GPx se ha encontrado en células de mamíferos y previene la peroxidación lipídica de la membrana celular mediante el consumo de peróxido libre en la célula. La enzima cataliza las siguientes reacciones [34].



Donde **GSH** representa el monómero reducido de glutación, **GSSG** representa la forma oxidada de glutación, **GR** glutación reductasa, **GPx** glutación peroxidasa.

2.10 La cinasa dependiente de AMP (AMPK)

La mayoría de los procesos celulares que consumen energía lo hacen impulsados por el paso de ATP a ADP. En condiciones de estrés metabólico, la relación ADP/ATP incrementa. Lo que provoca un cambio conformacional en AMPK y la hace susceptible a ser fosforilada (figura 10) por ejemplo: durante el ejercicio, la isquemia y también la diabetes, en donde, a pesar de haber glucosa en la sangre, ésta no puede entrar a la célula y por lo tanto la célula resiente la falta de energía. Una vez activada, la AMPK fosforila un gran número de proteínas provocando que se apaguen ciertas vías anabólicas que consumen energía como la biosíntesis de macromoléculas, crecimiento y proliferación celular, mientras que enciende las vías que producen ATP como la glucólisis y la oxidación de ácidos grasos (figura 11). Por esta razón se considera a AMPK como un regulador maestro del metabolismo energético, debido a la cantidad de vías que regula e inhibe a partir de su activación. Se puede activar mediante diferentes estímulos: pueden ser químicos, medicamentos como metformina y el ribonucleótido 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AICAR) o físicos como ejercicio, estimulación eléctrica e hipoxia [11,12].

2.11 Estructura de la AMPK y activación

La AMPK es un complejo heterotrímico que consiste en una subunidad catalítica (α) y dos subunidades regulatorias (β , γ). Se ha identificado que cada subunidad tiene diferentes isoformas: dos isoformas de la α ($\alpha 1$ y $\alpha 2$), dos de la subunidad β ($\beta 1$ y $\beta 2$) y tres de la subunidad γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$). Las subunidades catalíticas de AMPK contienen un dominio de cinasa de residuos de Serina y Treonina (Ser/Thr) en el extremo amino (N-terminal). Cuando el residuo de Treonina 172 (Thr 172) que se encuentra en el asa de activación es fosforilado por cinasas río arriba, ocasiona que la actividad del complejo incremente hasta más de 100 veces (figura 12) [35].

La subunidad β contiene tres dominios: hacia el N-terminal un dominio de unión a glucógeno (GBD, Glucogen Binding domain), el dominio de secuencia de interacción cinasa KIS (Kinase Interacting Sequence), y el dominio de asociación con el complejo SnF1ASC (Association with SnF1 Complex) en el extremo C-terminal. Mediante el

dominio KIS es posible la unión a la subunidad α mientras que la subunidad γ une al ASC, por lo que esta subunidad constituye la base del complejo, permitiendo la interacción entre las tres subunidades. Finalmente, la subunidad γ está formada básicamente por dos dominios Bateman, constituidos a su vez por cuatro CBS (cistationina β sintasa), los cuales pueden unir ligandos que contengan adenosina, como AMP, ATP o S-Adenosilmetionina, por lo que se considera que la subunidad γ está monitoreando el contenido celular de ATP y AMP [35].

Durante situaciones de estrés energético el AMP se une directamente a las repeticiones en tándem del dominio CBS en la subunidad γ de AMPK, lo que provoca un cambio conformacional que expone Thr 172 [36, 37]. Se considera que la unión de AMP a la subunidad γ evita la desfosforilación en la subunidad α [36].

La AMPK es activada cuando se fosforila por acción de una o más AMPK cinasas (AMPKKs), en el residuo Treonina 172 de la subunidad α (Thr1729), por ejemplo, la cinasa de hígado b1 (LKB1), la cinasa dependiente de calmodulina (CaMKK α) y (CaMMK β) y la cinasa activada por el factor de crecimiento transformante β - (TGF)- β [35].

En tejido muscular, tanto el ejercicio como el estímulo eléctrico son factores estresantes metabólicos que pueden activar a AMPK. Se ha encontrado que contracciones musculares de alta intensidad activan preferentemente a heterotrímeros que contienen la isoforma catalítica α 1; mientras que los conformados por la isoforma α 2 son activados por ejercicios de baja intensidad [11].

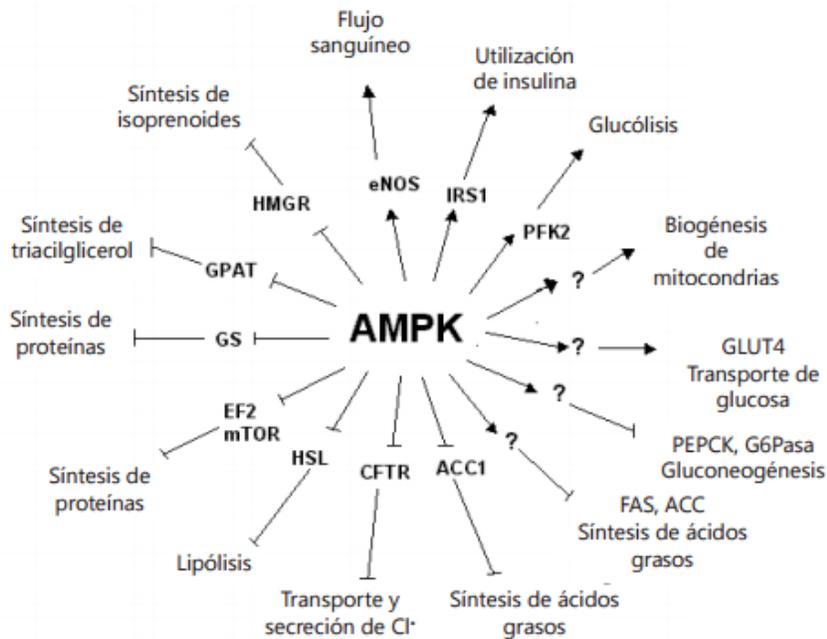


Figura 10. Blancos de AMPK. Las proteínas y procesos activados por AMPK se indican con una flecha, mientras que los inhibidos se indican con una flecha sin punta. Cuando el efecto es causado por un cambio en la expresión genética se indica con un signo de interrogación, debido a que no se conoce el factor de transcripción sobre el que actúa AMPK (adaptado de la referencia 35).

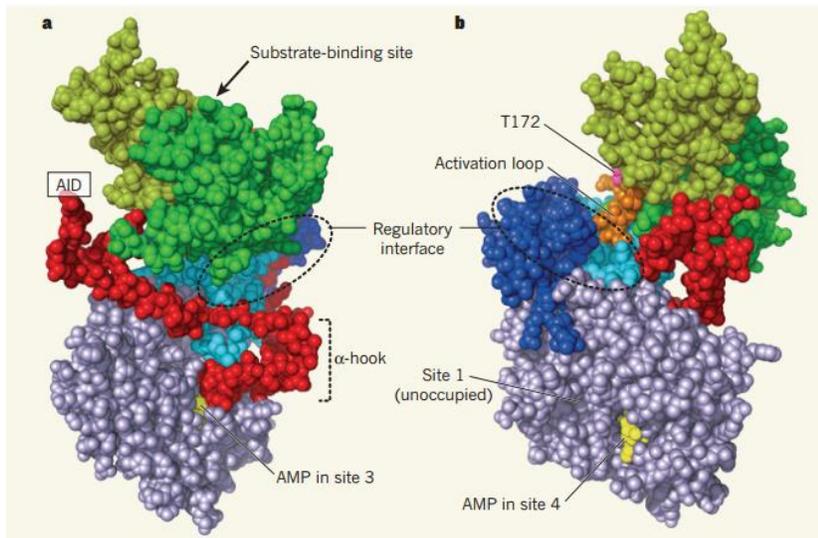


Figura 11. Estructura de la AMPK vista desde dos ángulos. (a) en verde claro y oscuro se muestra la subunidad catalítica, el extremo carboxilo terminal de esta subunidad se muestra en color azul marino y el azul claro corresponde a la subunidad β . En color rojo se marca un péptido de unión que contiene una estructura llamada α -hook, la cual interactúa con AMP (color amarillo) en la subunidad γ (color morado) específicamente en el sitio 3 de unión a AMP (b) la asa de activación se marca en color naranja dentro de la subunidad α . La treonina 172 se marca en color rosa [38].

2.13 AMPK en músculo esquelético

El músculo esquelético es caracterizado por un aumento en la renovación de energía en respuesta a la contracción y el ejercicio. Para alimentar la producción de ATP en el músculo durante el proceso de contracción, las reservas de hidratos de carbono provenientes de la glucosa en plasma y el glucógeno del músculo, así como también los lípidos provenientes del plasma y triglicéridos intramusculares, son oxidados [39].

La habilidad del músculo esquelético para producir ATP depende del contenido y actividad de los organelos y las proteínas responsables del procesamiento de sustratos oxidación y producción de ATP.

Específicamente durante el ejercicio las alteraciones en mensajeros citosólicos (Ca^{2+} , AMP libre, P_i , creatina, H^+ , intermediarios lipídicos), están asociados con la activación de varias cascadas de señalización y un rápido incremento en el consumo y movilización intracelular de la glucosa y ácidos grasos. Simultáneamente, las vías de señalización que provocan la transcripción de genes que codifican para proteínas metabólicas son iniciadas. Estas alteraciones quizá cambien la capacidad metabólica del músculo en periodos después del ejercicio, y se verá particularmente manifestado si estas vías son repetidamente activadas durante la actividad física regular [40].

Existen evidencias que indican que la contracción y el ejercicio activan AMPK (estimulación eléctrica), en una forma dependiente de la intensidad y de la duración. Se ha demostrado, por ejemplo, que en un periodo de ejercicio (entre 30s y 120 min) aumenta la actividad de la AMPK en humanos. Se ha demostrado que durante el ejercicio se lleva a cabo activación de la subunidad α_2 de la AMPK [41].

En roedores las isoformas α_1 y α_2 de la AMPK son activadas durante el proceso de contracción/ejercicio, en humanos se ha demostrado que hay una mayor sensibilidad en la isoforma α_2 -AMPK, por lo tanto, hay una mejor respuesta en la activación en comparación con α_1 -AMPK (Tabla 12) [40]

Aparentemente la expresión de las diferentes isoformas de la AMPK varía entre el tipo de fibra muscular (roja oxidativa o blanca glucolítica), ejemplo en el músculo de roedor las isoformas $\alpha 1$, $\gamma 1$ y las β -isoformas están distribuidas uniformemente entre el tipo de fibra roja y blanca, mientras que las isoformas $\alpha 1$, $\gamma 2$ y $\gamma 3$ su contenido es alto en fibras blancas [41].

	EDL, %	Soleus, %
$\alpha 2\beta 2\gamma 1$	70	60
$\alpha 2\beta 2\gamma 3$	20	<2
$\alpha 1\beta 2\gamma 1$	<5	20
$\alpha 2\beta 1\gamma 1$	<3	10
$\alpha 1\beta 1\gamma 1$	<2	<8

Tabla 3. Distribución de las diferentes isoformas de la AMPK del músculo EDL y sóleo en roedor [33].

3.0 JUSTIFICACIÓN

El SM ha tomado importancia en los últimos años, siendo en la actualidad una epidemia en materia de salud, debido al creciente número de personas con sobrepeso y obesidad, su asociación con la diabetes y el riesgo cardiovascular. Se estima que alrededor del 20 al 25% de la población adulta tiene SM, lo que conlleva a presentar doble riesgo de muerte, se triplica el riesgo de un evento cardiovascular y 5 veces el riesgo en desarrollar diabetes mellitus tipo 2 [24].

El SM se considera una enfermedad crónica metabólica que conlleva a un desbalance de los sistemas reguladores de la homeostasis energética. Resulta importante estudiar la biología fundamental del balance energético, particularmente en un sistema clave de control de las enzimas que modulan la homeostasis energética celular como la cinasa dependiente de AMP (AMPK) [39].

Se propone investigar los efectos del ejercicio sobre la vía de señalización de la AMPK, y el EOX, evaluando su activación y actividad enzimática respectivamente. Lo cual ayudaría a comprender el papel de la AMPK como regulador energético y la participación de su desregulación en el desarrollo de síndrome metabólico.

4.0 HIPÓTESIS

Si se someten a las ratas Wistar que tienen SM a realizar actividad física de manera regular, habrá un incremento en la fosforilación de la AMPK, y por consecuencia una mejora de las alteraciones impuestas por la enfermedad como lo vía de la AMPK y los sistemas antioxidantes.

5.0 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVOS GENERALES

Determinar si la actividad física en ratas con SM tiene un efecto sobre la activación de la AMPK y el EOx, y con ello la mejora del SM.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Ministran una dieta alta en hidratos de carbono (sacarosa al 30%), para inducir síndrome metabólico en ratas Wistar
2. Aplicar el protocolo de actividad física en animales con SM, durante 8 semanas mediante el uso de la banda sin fin, con el objetivo de lograr la activación crónica de AMPK.
3. Realizar una curva de tolerancia a la glucosa oral en un modelo de SM inducido por dieta alta en hidratos de carbono, para evaluar la respuesta al ejercicio sobre la RI.
4. Analizar los parámetros bioquímicos (glucosa y triglicéridos) en ambos grupos experimentales para observar el efecto de la actividad física en un modelo de SM inducido por una dieta alta en hidratos de carbono.
5. Evaluar la fosforilación de AMPK en respuesta al ejercicio e inducida por estímulo eléctrico *in vitro* mediante ensayos de Western Blot.
6. Evaluar el EOx en ratas con SM sin y con aplicación de ejercicio mediante ensayos de actividad enzimática.

6.0 METODOLOGÍA

6.1 Resumen del procedimiento experimental

En el siguiente diagrama se muestra un resumen de las metodologías y tratamiento utilizados (Figura 12).

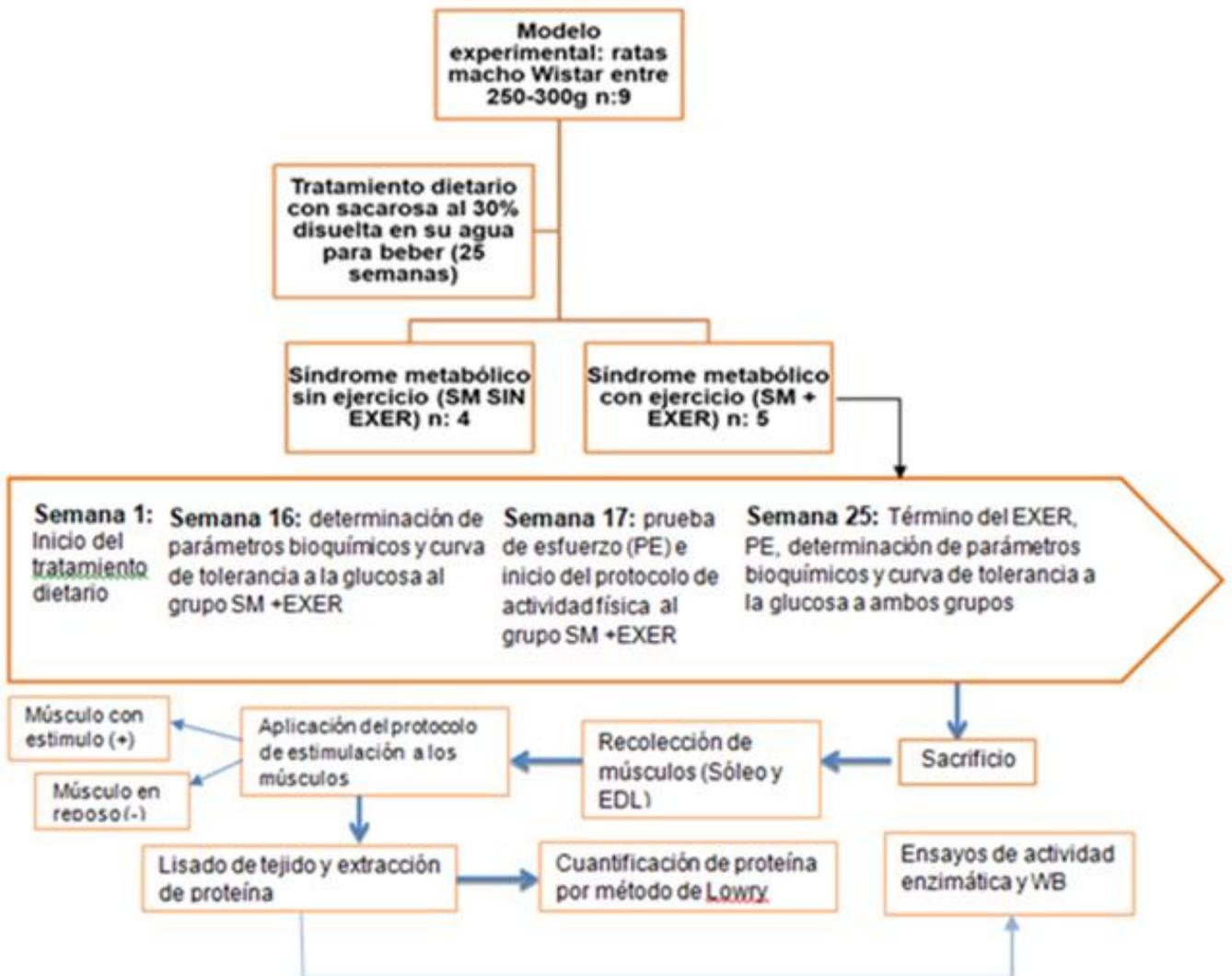


Figura 12. Diagrama de la metodología y tratamiento utilizados durante el protocolo de investigación. El tratamiento utilizado fue sacarosa al 30% en su agua para beber.

6.2 Obtención y validación del síndrome metabólico ratas

El SM en roedor se indujo en 9 ratas macho Wistar con un peso inicial entre 250-300 g, a través de una dieta alta en hidratos de carbono que consistió en 30% de sacarosa en el agua de beber y una dieta sólida de pellet marca Rodent Lab Chow 5008 *ad libitum* durante un periodo de 25 semanas.

Los animales permanecieron en un bioterio de barrera con periodos de luz oscuridad de 12 h c/u, temperatura de 18-22 °C y humedad relativa de 40-50 %. El protocolo y uso de los animales fue aprobado por el comité de investigación del Instituto Nacional de Pediatría, y el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) (Registro INP 2017/21).

Para la validación del síndrome metabólico en animales, existe una relación directa con la evaluación de biomarcadores como glucosa y triglicéridos en ayunas (biomarcadores en sangre), la sangre se obtuvo de la punta de la cola de las ratas con 5 horas de ayuno y se analizó mediante el uso de equipos comerciales. Se empleó el equipo Optium Xceed Abbott ® para medir la glucosa en sangre y el equipo Accutrend GCT Roche ® para medir los triglicéridos, la metodología empleada una vez obtenida la muestra de sangre fue la sugerida por el proveedor.

Además de los biomarcadores en sangre, se registraron los pesos de las ratas al comienzo de cada tratamiento, al concluir el mismo y al momento del sacrificio, así mismo la grasa peritoneal de todos los animales sacrificados, se diseccionó, pesó y conservó en congelación a -68°C envuelto en papel aluminio previamente etiquetado. También se obtuvieron registros de la longitud de la tibia izquierda de cada uno de los animales al momento del sacrificio, la cual fue medida con un calibrador tipo vernier.

También se determinó la concentración de insulina en suero en ambos grupos experimentales a las 16 y 25 semanas de tratamiento, se realizó mediante el uso del Kit Rat Insulin ELISA de ALPCO No. de catálogo 80-INSRT-E01, E10, la metodología utilizada fue la sugerida por el proveedor.

6.3 Formación de los grupos experimentales

Una vez validado el síndrome metabólico a las 9 ratas macho Wistar; se dividieron en 2 grupos; el grupo síndrome metabólico sin realización de ejercicio (SM SIN EXER) n=4; y el grupo síndrome metabólico sometidas a ejercicio (SM + EXER) n=5; ambos grupos continuaron con dieta alta en hidratos de carbono después de las 16 semanas de tratamiento para la obtención del SM; la duración total fue de 25 semanas.

6.4 Prueba de tolerancia a la glucosa antes y después del protocolo de actividad física

Después de 16 semanas de tratamiento dietario, al grupo SM + EXER se le realizó la Prueba de tolerancia a la glucosa, para ello, se mantuvieron en ayuno durante 5 h. Se ministró una solución de glucosa al 50 % vía oral a una dosis de glucosa de 2 g/kg pc. Se midió el valor basal de la concentración de glucosa en sangre, realizando una pequeña incisión en la punta de la cola de los animales previo a la administración oral de glucosa (valor considerado como tiempo cero). Posterior a la administración, se midió la concentración de glucosa en sangre con el mismo procedimiento durante los siguientes intervalos de tiempo: 15 min, 30 min, 60 min, 120 min y 180 min. La concentración de glucosa en sangre se determinó utilizando un glucómetro Optium Xceed Abbott ®; tiras reactivas FreeStyle Optium Abbott, Uk, y el análisis para la prueba se llevó a cabo calculando el área bajo la curva para glucosa en sangre (AUC) para las 3 horas del tiempo de la prueba. Al término del protocolo de actividad física y después de realizar la prueba de esfuerzo (semana 25), del grupo SM + EXER se le realizó nuevamente la prueba de tolerancia a la glucosa, así mismo al grupo SM SIN EXER a las 25 semanas de tratamiento dietario.

6.5 Aclimatación, prueba de esfuerzo y protocolo de actividad física

Para llevar a cabo el protocolo de actividad física fue necesario el uso de, y el equipo de calorimetría que se compone del analizador de gases LE 405 Panlab Harvard Apparatus y un suministrador de aire y cambiador Panlab Harvard Apparatus.

6.5.1 Aclimatación

Antes de dar inicio al protocolo de actividad física, en la semana 16, las ratas del grupo SM + EXER, fueron sometidas a un periodo de aclimatación sobre la banda sin fin (Treadmill) Panlab Harvard Apparatus durante una semana, consistió en ponerla a la rata a caminar en la banda sin fin a una velocidad de 12 cm/s durante 15 min (Figura 13).

6.5.2 Prueba de esfuerzo

Posteriormente en la semana 17 se les realizó una prueba de esfuerzo con el fin de conocer la capacidad física inicial de las ratas. Antes de dar inicio a la prueba se colocaba a la rata en la banda sin movimiento durante 15 minutos para medir su actividad física basal, después la rata realizaba un calentamiento a una velocidad de 12 cm/s durante 5 min, al término del calentamiento daba inicio la prueba la cual consistió en aumentar la velocidad 5 cm/s cada 3 min sin inclinación, hasta que la rata se agotaba, se declaraba que la rata se había agotado cuando se acostaba por más de 20 s en la rejilla ubicada al final de la banda, esta rejilla les daba una descarga eléctrica de 0.6 mA, con el propósito de motivar a la rata a seguir caminando (Figura 13). Durante todo el tiempo se midió el consumo de O₂ y la producción de CO₂, para evaluar la tasa metabólica mediante el uso del analizador de gases LE 405 Panlab Harvard Apparatus y un suministrador de aire y cambiador Panlab Harvard Apparatus.

6.5.3 Protocolo de actividad física

Una vez realizada la prueba de esfuerzo, se dio inicio con el protocolo de actividad física. El protocolo consistió en: poner a las ratas a correr a una velocidad de 20 cm/ s a una inclinación de la banda de 10°, una vez al día, 5 días por semana, durante 8 semanas (semana 17-25). Al término de las 8 semanas se les realizó nuevamente una prueba de esfuerzo (Figura 13). El protocolo de actividad física se determinó previamente realizando un estudio piloto comparativo entre dos protocolos de AF la variante utilizada fue la inclinación, al término de las 8 semanas se realizaron ensayos de Western-Blot para evaluar la respuesta de los dos protocolos, se observó un mayor

incremento en la fosforilación de AMPK, en los músculos de las ratas que se sometieron a una inclinación de 10°.

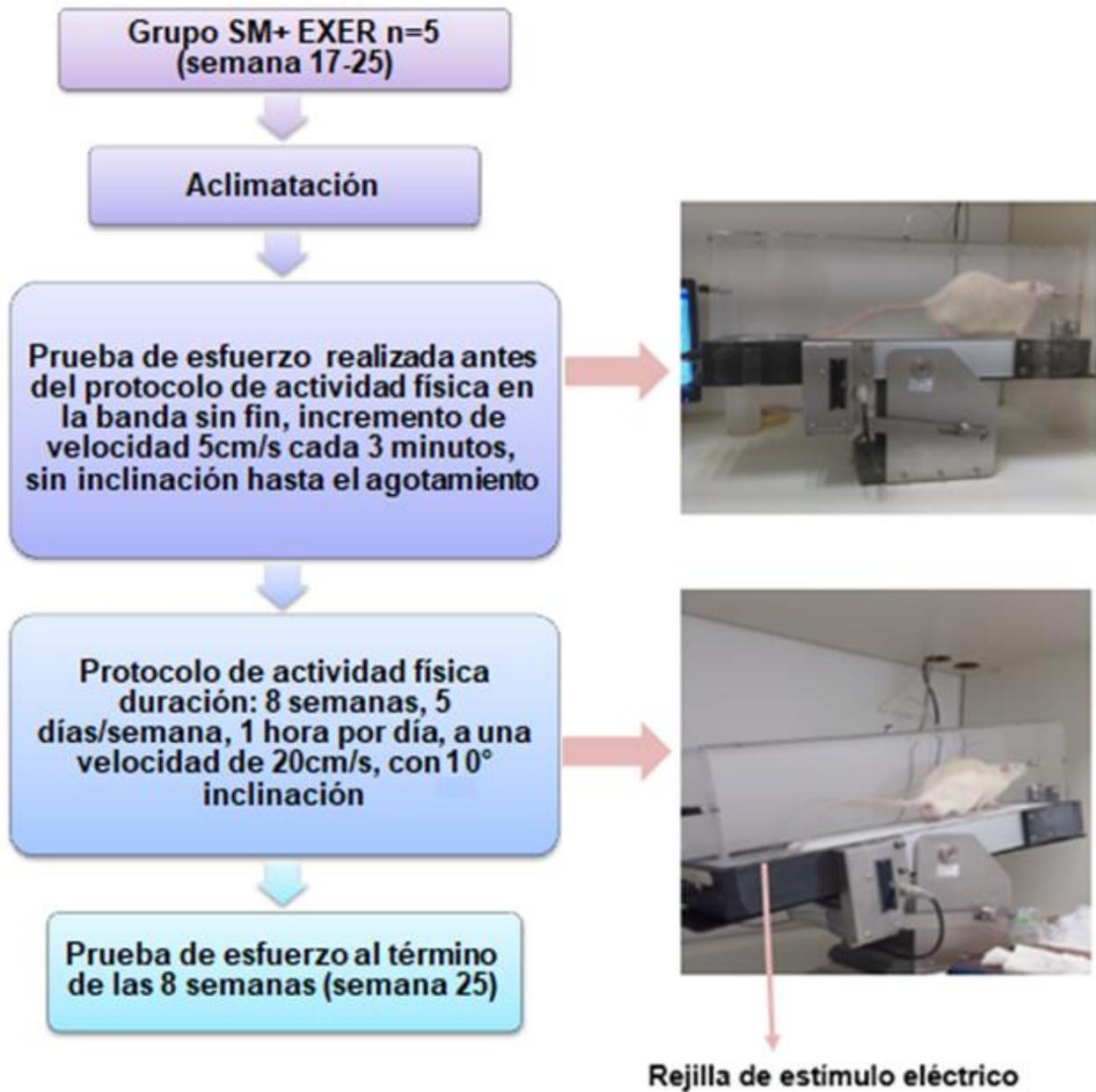


Figura 13. Esquema general del protocolo de actividad física aplicado al grupo de SM + EXER durante 8 semanas (semana 17-25).

6.6 Aislamiento de músculo sóleo y EDL

Teniendo en cuenta la localización anatómica de los músculos se realizó la disección de la siguiente manera:

Los animales se anestesiaron con 0.8 mL de pentobarbital vía intraperitoneal (0.5 mL/kg de peso corporal) previo al sacrificio. Después se colocó a la rata en posición de tendido ventral para tener acceso a la cara exterior de las patas posteriores, se estiró la pata de la rata, se le aplicó solución salina, se le retiró el exceso de pelo, para después colocar la punta de la tijeras iris de punta recta justo por debajo del tendón de Aquiles, hasta atravesar la piel, se sujetó con las pinzas homeostáticas el tendón y se comenzó a cortar los lados posteriores, se cortó el tendón distal y se estiró hasta dejar expuesto el músculo sóleo, una vez ubicado el músculo sóleo se anudó, se extrajo, se pesó, y finalmente se colocó en un recipiente que contenía amortiguador esencial de Ringer Krebs (ver apéndice), burbujeando con carbógeno (95% O₂/ 5%CO₂) (Figura 14).

La disección del músculo EDL se realizó de la siguiente manera: Se colocó a la rata de lado para dejar expuesta la parte lateral. Se cortó la piel con las tijeras curvas de punta roma a la altura de la rótula dejando expuestos un par de tendones que se insertan en el cóndilo lateral de la tibia, una vez ubicado el tendón más proximal a la rodilla, se anudó, se cortaron los tendones distales, se tensó con cuidado el músculo desde el hilo hasta que éste se separó de la pierna, una vez extraído, se le realizó el mismo tratamiento que al músculo sóleo.

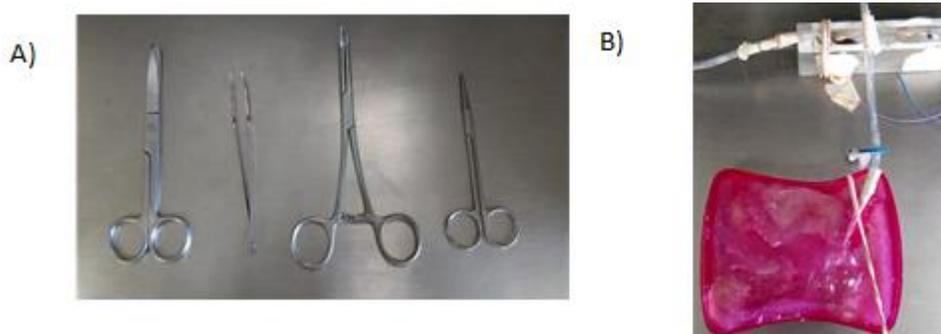


Figura 14. A) Material quirúrgico utilizado para la disección de los músculos, B) recipiente donde fueron colocados los músculos extraídos.

6.7 Protocolo de activación de la AMPK mediante estimulación eléctrica sobre el músculo sóleo y EDL aislado

Una vez que se tienen los músculos sóleos y EDL's en un recipiente con base de silicón con amortiguador Krebs y burbujeándose con carbógeno; la función de la base de silicón sirvió de apoyo para poder realizar los nudos tipo gasa en los extremos de los tendones con ayuda de las agujas (figura 15).

De los cuatro músculos extraídos de cada una de las ratas, se tomaron dos (un sóleo y un EDL), como músculos controles de los que recibieron el estímulo eléctrico, por lo que los controles fueron anudados de ambos extremos de los tendones y se dejaron en reposo (Figura 15).



Figura 15. Representación del músculo aislado y sujetado dentro del recipiente con base de silicón y sumergidos en Krebs.

Para la colocación del músculo en la cámara de estimulación se realizaron nudos en forma de gasa y se ataron en cada uno de los extremos de la cámara. Y se estiró el músculo (para determinar que tanto debido estirarse el músculo se multiplicó por 1.3 veces la longitud del músculo en media relajación, medida con una regla) (Figura 16).

El protocolo de estimulación eléctrica se realizó mediante el uso de un estimulador GRASS S88 (Figura 17 A), una unidad de estímulo de aislamiento GRASS SIU5 (Figura 17 B), y una cámara de estimulación eléctrica (Figura 17 C).

Cada músculo recibió el siguiente tren de estimulación (ver condiciones en la Tabla 4).

Parámetros	Sóleo	EDL
Voltaje (V)	60	60
Frecuencia(Hertz)	30	50
Duración del estímulo eléctrico (ms)	350	600
Pausa	0.01	0.01
Velocidad del tren	0.3	0.1
Tétanos/min	18	6

Tabla 4. Condiciones de estimulación eléctrica aplicadas al músculo sóleo y EDL.

Tanto los músculos en reposo como los estimulados se encontraban inmersos en amortiguador de Krebs y burbujeándose con carbógeno, y cada 10 min se reemplazaba el amortiguador con una pipeta de transferencia tres veces.

Una vez finalizados los protocolos de estimulación eléctrica los músculos se congelaban en nitrógeno líquido, se colocaban en tubos previamente etiquetados, y se almacenaron a -80°C.



Figura 16. Representación del músculo colocado en la cámara de estimulación eléctrica inmerso en amortiguador de Krebs burbujeándose con carbógeno.

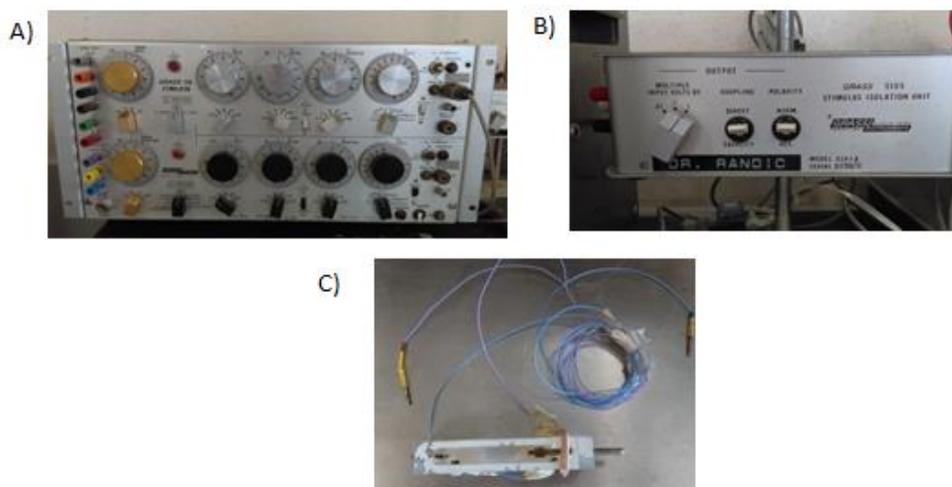


Figura 17. Aparatos utilizados para realizar el protocolo de estimulación eléctrica, A) Estimulador GRASS S88, B) Unidad de estímulo de aislamiento GRASS SIU5, C) Cámara de estimulación eléctrica.

6.8 Lisis de tejido y extracción de proteína

Para la extracción de proteína celular fue necesario realizar la lisis del tejido muscular. Para llevar a cabo dicho procedimiento, se preparó la cantidad necesaria de amortiguador de lisis base (por cada 100 mg de tejido se adicionaban 600 μ L Amortiguador de lisis base + inhibidores, ver apéndice), la composición del amortiguador de lisis base era la siguiente: HEPES 50 mM, KCL 50 mM, EDTA 1 mM, β -Glicerolfosfato 5 mM, TRITON X100 0.10%, NaF 5 mM, NaPPi 1 mM, posteriormente se le adicionaban los siguientes inhibidores, DTT 1M, PMSF 0.1 M, Na₃VO₄ 0.1M, NaF 1 M, NaPPi 0.25 M y finalmente el cóctel de inhibidores de proteasas Complete Tablet, mini marca Roche (una tableta por cada 10 mL de Amortiguador de lisis base + inhibidores). Una vez preparado el amortiguador de lisis,

se realizó la homogeneización se pesó aproximadamente 80 mg. de tejido (se conservó el tejido congelado en todo momento usando nitrógeno líquido), se lisó el tejido en ciclos de 7 s a una potencia intermedia usando un politrón de vástago a 4 °C, después de haber lisado el tejido se dio un vortéx ligero cada 10min, por un periodo de 30 min, y se mantuvieron las muestras a 4°C.

Transcurridos los 30 min, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm/40 min/4 °C. Terminando la centrifugación el sobrenadante se recuperó y se determinó la cantidad de proteína.

6.9 Determinación del contenido de proteína por método de Lowry

La determinación de proteína soluble se realizó utilizando el método cuantitativo de Lowry y los datos de absorbancia se interpolaron en una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) con concentraciones en un intervalo de 0 a 50 µg/µL.

Para la muestra se utilizan: 5 µL de la muestra diluida 1:2 + 47 µL de agua grado I + 100 µL de Deoxicolato de sodio al 0.4% (DOC) + 1mL de Reactivo de Lowry se mezclaba el contenido de cada tubo y se dejaba reposar 10 min, finalmente se adicionaron 100 µL de reactivo de Folin diluido 1:1, se mezcló el contenido de cada tubo, se dejó reposar 30 min, transcurrido ese tiempo, las muestras se leyeron a 580nm en el espectrofotómetro (Cary 100 de Varian) contra un blanco de agua.

6.10 Ensayos de Western Blot (WB) y revelado por quimioluminiscencia

Para el análisis de proteínas por WB se utilizaron geles de poliacrilamida-SDS de 15 pozos de 1 mm de ancho al 10% y 4% gel separador y concentrador respectivamente, la concentración de los geles varía dependiendo del peso molecular de la proteína de interés.

Las muestras por analizar se ajustaron a la misma cantidad de proteína (40 µg), y se les adicionó el amortiguador de carga 2x que contiene 20% de mercaptoentanol para separar las proteínas, PMSF y EDTA para impedir la proteólisis, posteriormente se

hirvieron por 5 min a 95 °C. Las muestras se cargaron en el gel para la separación de proteínas por peso molecular en la cámara de electroforesis.

Una vez terminada la electroforesis, se llevó a cabo la transferencia de los geles, para eso, se utilizaron membranas de PVDF (Polivinilidenodifluoruro), activadas previamente con metanol durante 5 min y posteriormente 5 min en agua.

Los geles se colocaron en un recipiente que contenía 250 mL de amortiguador de transferencia 1X, posteriormente se realizó la transferencia por el método semi-húmedo durante 50min, usando una cámara de transferencia Trans-Blot ®, de Bio-Rad a un amperaje constante de 300 mA. Al finalizar la transferencia la membrana se tiñó con Rojo de Ponceau para verificar la transferencia y el gel se tiñó con Azul de Coomassie.

Una vez que se transfirió, y se destiñó con PBS-Tween 0.1% (PBS-T 0.1%), la membrana se bloqueó con leche en polvo libre de grasa al 5% disuelta en PBS-T 0.1 % durante 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente; transcurrido el tiempo de bloqueo la membrana se incubó en el anticuerpo primario de interés (p-AMPK, AMPK-t, actina) utilizando una dilución 1:1000 para p- AMPK y AMPK-t y en el caso de actina 1:20000, se diluyó con leche al 3% en PBS-T 0.1% (ver apéndice). Los anticuerpos p-AMPK y AMPK-t se dejaban incubando toda la noche a 4 °C y para la actina se incubaba durante 1 hora. Posteriormente se realizaron 3 lavados por 10 min con PBS-T 0.1% se incubó en el anticuerpo secundario, durante una hora y finalmente se realizaron 3X10 min lavados y se reveló. Al día siguiente se retiró el anticuerpo primario (p-AMPK y AMPK-t) y se realizaron 3 lavados de 10 minutos c/u con PBS-T 0.1%. Una vez que se realizaron los lavados se proseguía con la incubación en el anticuerpo secundario correspondiente (HRP-conejo), a una dilución 1:1000 en leche al 3% con PBS-T 0.1%, durante 2 horas, en agitación constante a temperatura ambiente, concluido con el tiempo de incubación, se realizaban 3 lavados de 10 min con PBS-T 0.1%.

Para el revelado de la membrana se agregó una solución de sustrato de luminol y peróxido de hidrógeno 1:1 por 3 minutos en la oscuridad; transcurridos los 3 minutos,

se reveló por quimioluminiscencia en un fotodocumentador (Bio-Rad) y se guardaron las imágenes.

Las bandas de las proteínas reconocidas por el anticuerpo fueron analizadas por densitometría en el programa de Quantity One normalizando los datos con actina.

6.11 Evaluación de la actividad enzimática (enzimas de EOX)

A partir de la lisis del tejido muscular en reposo, se determinó la actividad de las enzimas de EOX: catalasa (CAT), súper óxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR), y el ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)

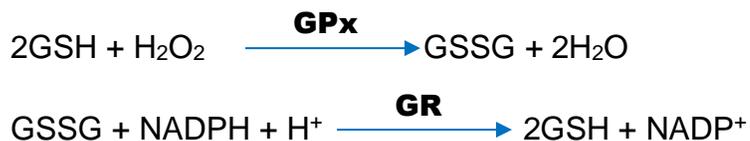
6.11.1 Catalasa (CAT)

La actividad de catalasa se evaluó mediante el uso del kit: Catalase Fluorometric Detectiton Kit, Enzo Cat No: ADI-907-027, el procedimiento se realizó de acuerdo a lo indicado en el inserto. De los lisados musculares en reposo, se realizó una dilución 1:20 utilizando PBS 1X. Posteriormente se realizó la curva de estándares de CAT con concentraciones que iban de 0-4 Unidades/ μL . Una vez preparada la curva se agregaron 50 μL de cada estándar en los pozos correspondientes. Así mismo se agregaron 50 μL de las muestras previamente diluidas en cada pozo, por duplicado. Después de agregar las diluciones de la curva y las muestras se adicionaron 50 μL de peróxido de hidrógeno 40 μM en todos los pozos. Se dejó la placa incubando durante una hora a temperatura ambiente, en un cuarto oscuro. Transcurrida la hora se adicionó 100 μL del cóctel de reacción (reactivo de detección + peroxidasa de rábano 100x + amortiguador de reacción 1X). Se incubó una vez más bajo las mismas condiciones durante 15 min. Al término del tiempo de incubación, se leyó la placa mediante el uso de un espectrofotómetro de placa para detectar fluorescencia, se usó una longitud de onda de excitación de 530–570 nm con una emisión de 590-600 nm (analito: Oxired). Los resultados se expresaron en $\text{nM H}_2\text{O}_2/\text{min}/\mu\text{g}$ Proteína.



6.11.2 Glutación Peroxidasa (GPx)

La actividad de la enzima GPx se evaluó en una reacción acoplada a la GR utilizando el kit: Glutathione Reductase Activity kit, Enzo Cat No. ADI-900-159, el procedimiento se realizó de acuerdo con lo indicado en el inserto. De los lisados musculares en reposo, se realizó una dilución 1:20 utilizando amortiguador GR 1X. Posteriormente se realizó la curva de estándares con concentraciones que iban de 0-0.0005 Unidades/ μL de acuerdo con el procedimiento mencionado en el inserto del Kit. Una vez preparada la curva se agregaron 50 μL de cada estándar en los pozos correspondientes. Así mismo se agregaron 50 μL de las muestras diluidas en cada pozo, por duplicado. Después se añadió 100 μL del Master Mix (Amortiguador GR 10X + GSSG + agua grado II) en cada pozo. Posteriormente para dar inicio a la reacción se añadió 50 μL de una solución de NADPH en todos los pozos usando la pipeta multicanal, después la placa se agitó oscilatoriamente durante 10 s antes de iniciar la lectura. Para leer la placa se hizo uso de un espectrofotómetro de placa, utilizando la longitud de onda de excitación de 365 nm y una emisión de 440 nm, se leyó durante 10 min, una lectura por minuto, en total se realizaron 10 lecturas de la placa. Lo detectado por el espectrofotómetro fue la disminución en la fluorescencia debido al consumo de NADPH. Los resultados fueron expresados en nmol/min/ μg Proteína.



Donde GSH representa el monómero reducido de glutación y GSSG representa la forma oxidada del glutación.

6.11.3 Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la enzima se evaluó mediante el uso del kit: SOD activity, Enzo Cat No.: ADI-900-157, el procedimiento se realizó de acuerdo a lo indicado en el inserto. De los lisados musculares en reposo, se realizó una dilución 1:20 usando el amortiguador SOD 1X. Posteriormente se realizó la curva de estándares de SOD con concentraciones que iban de 0-10 Unidades/ μL de acuerdo al procedimiento mencionado en el inserto. Antes de agregar los estándares y las muestras diluidas en los pozos correspondientes se añadió 25 μL de amortiguador SOD 1X (50 Unidades/ μL) que fue la referencia. Posteriormente se añadieron 25 μL de cada uno de los estándares en los pozos correspondientes, después se añadieron 25 μL de las muestras diluidas 1:20 tanto la referencia como los estándares y las muestras se añadieron por duplicado. Seguidamente se agregaron 150 μL del Master mix (Enzima SOD 10X + Xantina oxidasa + agua grado II) en todos los pozos. Para dar inicio a la reacción enzimática, se añadió 25 μL de solución de Xantina diluida 1:10 con amortiguador SOD 1 X en todos los pozos usando la multicanal. Una vez agregada la solución de Xantina, la placa se agitó oscilatoriamente durante 10s, transcurrido ese tiempo se leyó la absorbancia a 450 nm usando el espectrofotómetro de placa, durante 10 min, 10 lecturas por minuto. Los resultados se expresaron en U/ μg Proteína.



6.11.4 Carga antioxidante (ABTS)

El radical ABTS se genera a partir de su precursor el ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), cuando éste reacciona con radicales hidroxilos (OH^\bullet), que son generados por la reacción del H_2O_2 con la peroxidasa. El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde-azulado, estable y con un espectrofotómetro de absorción en el UV- visible a una longitud de onda de 405-414 nm.

Para llevar a cabo la reacción fue necesario preparar las siguientes soluciones: amortiguador de fosfatos ($\text{PO}_4\text{HNa}\cdot\text{H}_2\text{O} + \text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$) 30 mM a pH 7.0, ABTS 20 μM , peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 200 μM , 5 μL de peroxidasa (1:10) diluida en amortiguador de fosfatos. Una vez preparadas las soluciones, se preparó el amortiguador de reacción (Amortiguador de fosfatos + H_2O_2 + ABTS). Para realizar las lecturas, en cada celda de cuarzo se añadió 1.5 mL de amortiguador de reacción + 5 μL de la muestra + 6 μL de peroxidasa 1:10), se leyó a 420nm en el espectrofotómetro (Cary 100 de Varian). Las lecturas se expresaron como porcentaje de inhibición de la peroxidasa. Los resultados fueron expresados en nmol/min/ μg Proteína.

6.12 Análisis estadístico

Los valores mostrados en cada una de las tablas están expresados como la media \pm el error estándar. Los datos de los gráficos de peso corporal en diferentes etapas del tratamiento, la curva de tolerancia a la glucosa, parámetros bioquímicos, los ensayos de Western Blot, y la actividad enzimática, fueron evaluados por la prueba de t de Student para lo cual se consideró diferencia significativa cuando se obtuvo un valor de $p < 0.05$

7.0 RESULTADOS

7.1 Efecto de la actividad física en el peso corporal y ganancia de peso

Durante 25 semanas de tratamiento dietario y 8 semanas de actividad física (grupo SM+ EXER, semana 17-25), se registró y se graficó el peso semanal de los 9 animales correspondientes a cada uno de los grupos utilizados: (SM SIN EXER n: 4) y (SM + EXER n: 5).

A continuación, se muestra el gráfico lineal de peso corporal y de ganancia de peso corporal a lo largo de las 25 semanas de cada uno de los grupos experimentales (Figura 18); así como el gráfico comparativo por columnas del peso corporal a las 16 semanas de tratamiento y del peso corporal al final del tratamiento dietario y actividad física. Finalmente, se muestran los valores promedio de peso corporal a las 16 semanas de tratamiento, peso corporal final y ganancia de peso final de las ratas (Tabla 5).

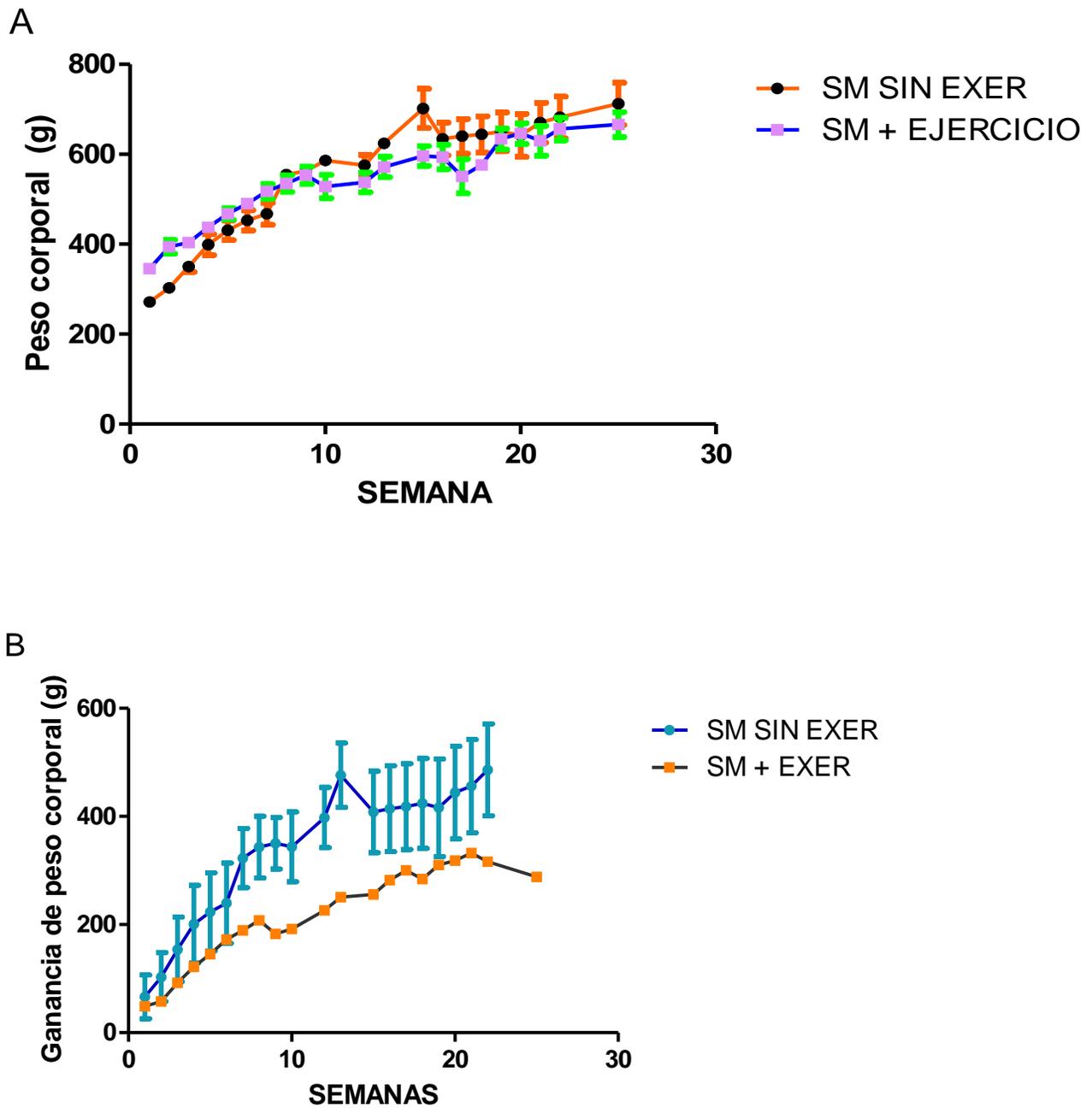


Figura 18. Efecto de la actividad física en el peso corporal y ganancia de peso. **A.** Gráfico lineal de peso corporal (g) **B.** Gráfico lineal de ganancia de peso corporal (g). n=5 para cada grupo experimental. Semana 1-16 desarrollo de síndrome metabólico (SM), semana 17-25 aplicación del protocolo de activación física al grupo SM +EXER, duración total del tratamiento dietario 25 semanas. SM SIN EXER: ratas con síndrome metabólico sin realización de ejercicio n=4 SM + EXER: Ratas con síndrome metabólico sometidas a ejercicio n=5

Grupo experimental	Peso corporal inicial	Peso corporal a las 16 semanas de tratamiento dietario (g)	Peso corporal final (25 semanas) (g)	Ganancia de peso corporal final (25 semanas) (g)
SM SIN EXER N= 5	282.3±2.21	640±38.5	712.0±46.8	*440.5±11.14
SM + EXER N=5	345.5±4.12	551.12±38.3	666.00±27.85	320.5±17.34

Tabla 5. Valores promedio del peso corporal inicial, a las 16 semanas de tratamiento, peso al final del tratamiento dietario y actividad física (25 semanas), y la ganancia de peso corporal final (25 semanas). Se utilizó como método estadístico la prueba t de student $p < 0.05$, * $p: 0.0366$ SM SIN EXER vs SM +EXER.

En la figura 18 A, se observa un comportamiento similar en el crecimiento de ambas curvas durante las 25 semanas de tratamiento dietario; en el caso del grupo de SM + EXER se presenta un comportamiento casi constante durante las 8 semanas de actividad física (semana 17-25). Estadísticamente no hay diferencia significativa en el peso corporal de las ratas entre ambos grupos experimentales a lo largo de las 25 semanas, debido a que el peso inicial de las ratas fue diferente. En la figura 18 B, se muestra la ganancia de peso corporal de ambos grupos experimentales, se observa que el grupo SM SIN EXER presenta una ganancia de peso corporal mayor respecto al grupo de SM + EXER, siendo significativamente diferentes.

En la Tabla 5, se muestra el promedio del peso corporal de ambos grupos experimentales y la ganancia de peso corporal; se observa que el grupo SM SIN EXER presenta una diferencia significativa en la ganancia de peso corporal respecto al grupo SM + EXER al término de las 25 semanas ($p: 0.0366$).

7.2 Evaluación del SM y el efecto de la actividad física sobre parámetros bioquímicos y somatométricos

A continuación, se muestran los resultados de los parámetros bioquímicos (glucosa, triglicéridos e insulina) medidos en sangre en ambos grupos experimentales (Tabla 6), asimismo se muestran los resultados de la prueba de tolerancia a la glucosa (Figura 20). También se muestran los resultados del tejido adiposo, para evaluar el desarrollo del SM durante las 25 semanas de tratamiento con sacarosa al 30%.

Variable	SM + EXER (-) (16 semanas de tratamiento dietario)	SM SIN EXER (25 semanas de tratamiento dietario)	SM + EXER (25 semanas de tratamiento dietario + 8 semanas de AF*)
% GRASA ABDOMINAL (RESPECTO AL PESO)	-	5.1±1.8	5.7±1.4
% GRASA ABDOMINAL (RESPECTO AL TAMAÑO DE TIBIA)	-	11.04±1.95	9.4±2.41
TRIGLICÉRIDOS (mg/dL)	318.6±26.01	437.2±21.9	326.8±30.39
GLUCOSA (mmol/L)	6.5±0.78	5.1±0.94	6.5±1.7
INSULINA mUI/mL	4.1±0.99	5.1±2.6	4.0±0.78
ÍNDICE HOMA	1.2±0.18	1.2±0.56	1.2±0.19

*AF: Actividad física

Tabla 6. Resultados de los parámetros medidos en sangre (glucosa, triglicéridos e insulina), en diferentes etapas del tratamiento grupo SM + EXER y al final del tratamiento SM SIN EXER, también se muestran los resultados del tejido adiposo de ambos grupos experimentales. HOMA (Homeostasis Model Assessment, por sus siglas en inglés), Es un modelo homeostático, utilizado para evaluar los niveles de insulina en ayunas con tolerancia normal a la glucosa. $HOMA = (insulina \text{ mUI/mL} * Glucosa \text{ mmol/L}) / 22.5$. Un elevado índice HOMA significa una baja sensibilidad a la insulina [10]. Se utilizó como método estadístico la prueba t de student $p < 0.05$. SM SIN EXER: Ratas con síndrome metabólico sin realización de ejercicio $n=4$; SM + EXER: Ratas con síndrome metabólico sometidas a ejercicio $n=5$

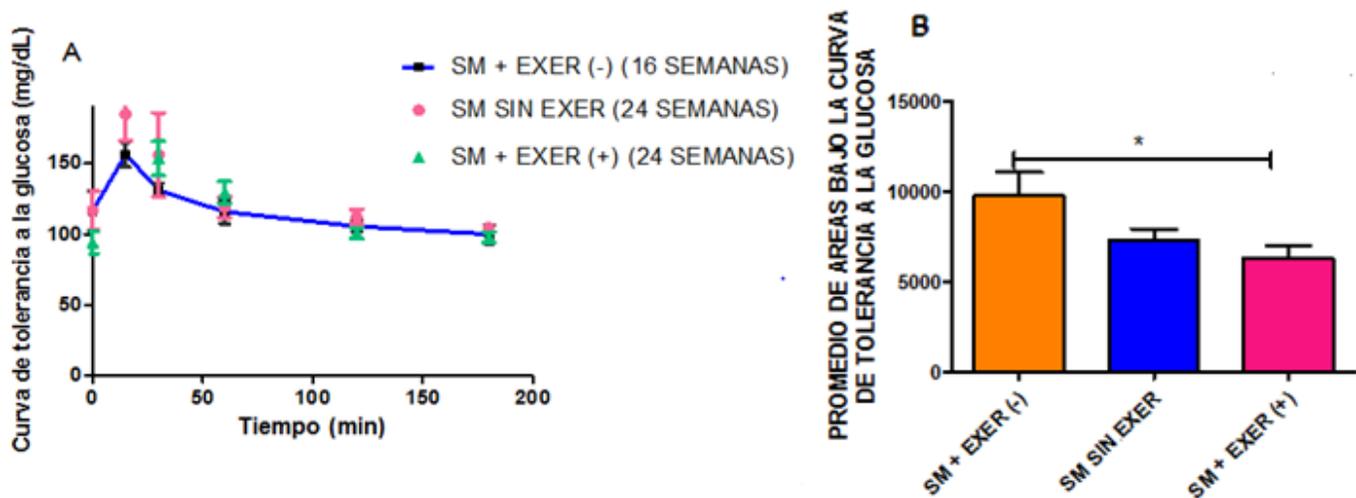


Figura 19. Resultados de la prueba de tolerancia a la glucosa realizada a ambos grupos experimentales. El caso del grupo SM + EXER se realizó la prueba antes y después de la aplicación del protocolo de AF. A. Grafico lineal de la concentración de glucosa en sangre (mg/dL) de los animales experimentales durante las 3h de la prueba. B. Grafico en columnas de la comparación del área bajo la curva de tolerancia a la glucosa. Se utilizó como método estadístico la prueba t de student $p < 0.05$, SM SIN EXER: Ratas con síndrome metabólico sin realización de ejercicio $n=4$; SM + EXER: Ratas con síndrome metabólico sometidas a ejercicio $n=5$

Durante 25 semanas las ratas de ambos grupos experimentales fueron sometidas a una dieta alta en hidratos de carbono, lo que provocó el desarrollo del síndrome metabólico (SM). El caso del grupo del SM + EXER una vez establecido el SM, en un periodo estimado de 16 semanas, se les aplicó el protocolo de actividad física (semana 17-25). En la tabla 6 se muestran los resultados de los parámetros utilizados para la evaluación del SM, se observa que hay un incremento considerable de grasa abdominal, así como niveles atípicos de triglicéridos en sangre. Respecto a los valores de glucosa, insulina, índice HOMA y los resultados obtenidos en la prueba de tolerancia a la glucosa, son consistentes con un estado de resistencia a insulina.

En el porcentaje de grasa abdominal se observa que la relación peso de grasa/longitud de la tibia no son significativamente diferentes entre ambos grupos experimentales, se esperaría que el porcentaje de grasa abdominal en el grupo SM + EXER fuera menor en comparación al grupo que no realizó AF. Se sabe que la realización de ejercicio intenso incrementa la oxidación de ácidos grasos. En este

trabajo no se observa un efecto modulador sobre porcentaje de grasa abdominal como era de esperarse y puede relacionarse a la intensidad de la actividad física, que fue insuficiente, aunado a que tampoco se hizo algún tipo de restricción energética durante la realización del protocolo de AF, ya que se continuó con una dieta alta en hidratos de carbono hasta completar las 25 semanas. Este mismo efecto se ve reflejado en la concentración de triglicéridos en sangre, ya que los valores entre ambos grupos experimentales no son significativamente diferentes, ni tampoco se observa un efecto modulador de la AF en el grupo SM + EXER ya que aparentemente se mantiene la concentración de triglicéridos en sangre, sin llegar a parámetros de ratas sanas, como era de esperarse (≥ 150 mg/dL).

En la medición de insulina en sangre se observa que no hay diferencia significativa entre los grupos experimentales; se observa que las concentraciones de insulina logran mantener en parámetros normales los valores de glucosa. La realización de actividad física podría llegar a mantener valores adecuados de insulina manteniendo normalizados los valores de glucosa.

En la curva de tolerancia a la glucosa se muestra que hay diferencia significativa $p=0.0106$ SM + EXER (-) vs SM + EXER, por lo que hay un mejoramiento del transporte de glucosa, relacionado también a un mayor consumo durante la actividad física efectuada.

7.3 Resultados de la prueba de esfuerzo realizada al grupo SM + EXER antes y después de las 8 semanas de actividad física

A las 16 semanas del tratamiento con sacarosa al 30% al grupo SM + EXER se le realizó una prueba de esfuerzo (PE) (semana 17), antes de aplicar el protocolo de AF. Al término de las 8 semanas de la AF (semana 17-25) se les realizó nuevamente una prueba de esfuerzo.

En la figura 20 se muestran los gráficos comparativos por columnas de los resultados de los diferentes parámetros medidos durante la prueba (distancia, tiempo, velocidad, VO_2 máximo alcanzados durante la PE), antes y después de las 8 semanas de AF.

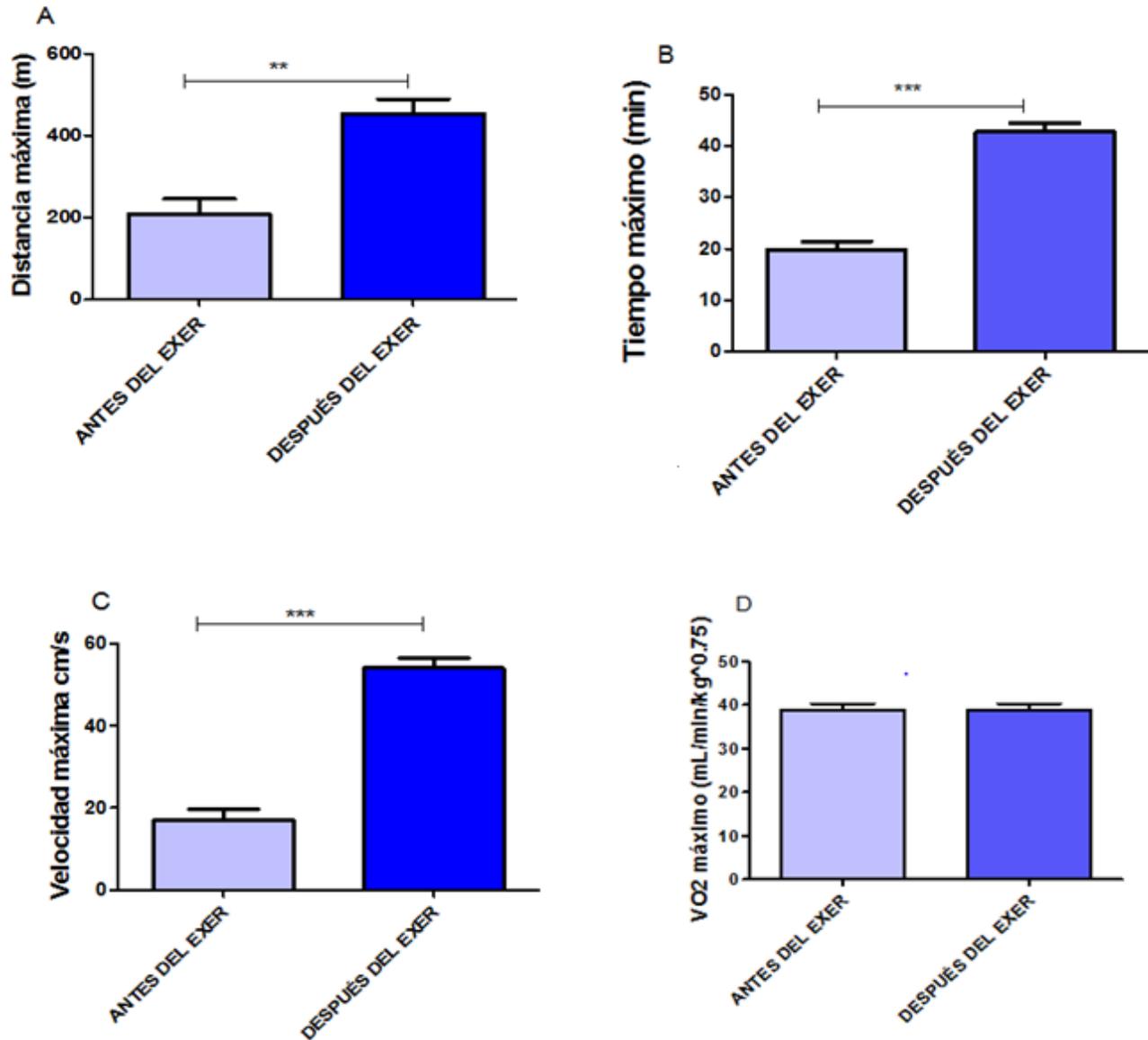


Figura 20. Comparación del efecto de la AF sobre la capacidad física de los animales. ****A.** Distancia máxima (m) alcanzada durante la PE, **p: 0.001 antes de la AF vs después de la AF, *****B.** Tiempo máximo (min) alcanzado durante la PE, **p: 0.0005 antes del ejercicio vs después del ejercicio, *****C.** Velocidad máxima alcanzada durante la PE, ***p: 0.0001 antes de la AF vs después de la AF, **D.** Vo₂ máximo alcanzado durante la PE. Se utilizó como método estadístico prueba t de student. p<0.05 SM + EXER: Ratas con síndrome metabólico sometidas a ejercicio n=5

En la figura 20-A se compara la distancia máxima alcanzada por los animales durante la prueba de esfuerzo (PE), aplicada antes y después de la AF. Se observa que al final del protocolo de AF las ratas recorren una mayor distancia, este mismo comportamiento se observa en el tiempo, y la velocidad (Figura 20-B y 20-C), ya que

en ambos parámetros las ratas soportan un mayor tiempo corriendo en la banda y responden mejor al incremento de velocidad durante la PE aplicada al término de las 8 semanas de AF. Respecto al consumo máximo de oxígeno (VO_2), no se presenta diferencia significativa, se esperaría que el VO_2 disminuyera al término de las 8 semanas de la AF, pero este se mantiene por lo que las ratas consumen aparentemente la misma cantidad de oxígeno que al inicio del protocolo, pero recorren una mayor distancia, soportan mayor tiempo y velocidad en la banda, por lo que evidentemente hay una mejoría en la capacidad física de las ratas al término de las 8 semanas de AF.

7.4 Resultados de la actividad física sobre la respuesta a la activación aguda *in vitro* de AMPK por contracción en músculo EDL y sóleo

El objetivo de someter a los músculos aislados de las ratas a una estimulación eléctrica fue evaluar la respuesta a la activación aguda *in vitro* de AMPK, por contracción en músculo EDL y sóleo aislados de las ratas pertenecientes a cada uno de los grupos experimentales (SM SIN EXER y SM + EXER); con y sin la aplicación de estímulo eléctrico (contracción) definidos por los signos (+) y (-) respectivamente. El protocolo consistió en colocar a los músculos aislados EDL y sóleo en una cámara de estimulación eléctrica que a su vez, se encontraban inmersos en amortiguador esencial de Krebs, burbujeándose con carbógeno. Los músculos que no recibieron estímulo (-), se colocaron en un recipiente con amortiguador de Krebs y burbujeándose con carbógeno y permanecieron en reposo hasta el término del tren de estimulación de su contraparte.

Se analizó la activación de AMPK mediante ensayos de western blot, las membranas usadas para cada uno de los ensayos se incubaron con diferentes anticuerpos primarios (p-AMPK, AMPK-T y actina).

En las Figuras 21 y 22, se muestran los resultados del análisis de densitometría (fosforilación relativa y absoluta) realizado a la proteína reconocida por el anticuerpo p-AMPK, en el músculo EDL y sóleo respectivamente. Se entiende por fosforilación relativa al análisis entre la p-AMPK en relación con la AMPK contenida en músculo, la cual se fosforiló en respuesta al ejercicio y la contracción. La fosforilación absoluta indica la cantidad de AMPK que se fosforiló en relación con el contenido total de la proteína que hay en el músculo, se hace con referencia a la actina, la cual es una proteína utilizada como control de carga.

En la Figura 21.1 y 21.2 se muestra a la proteína p-AMPK la cual se reconoció a una única banda de peso de 62 kDa aproximadamente.

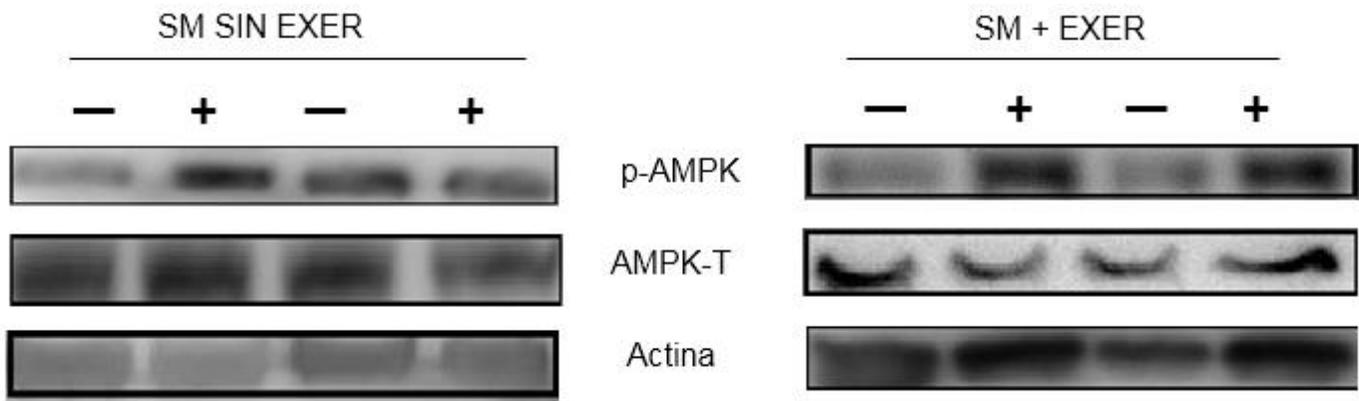
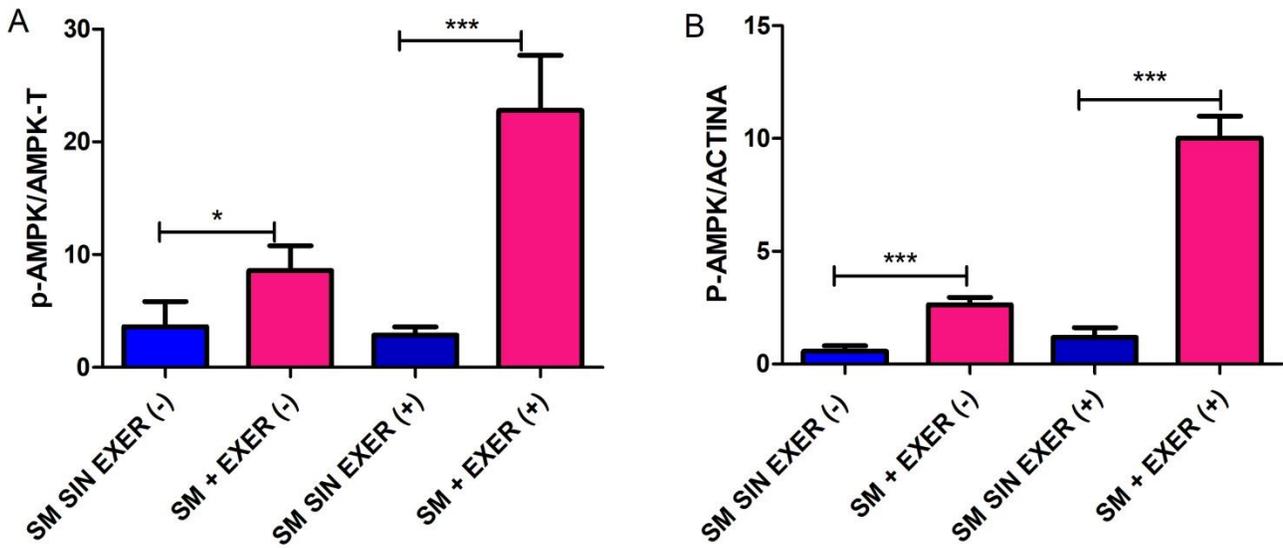


Figura 21.1 Imagen representativa de los ensayos de western blot banda de la proteína reconocida peso molecular aproximado de 62kDa, del músculo EDL extraídos de las ratas de los dos grupos experimentales; con y sin la aplicación de estímulo eléctrico (contracción) definidos por los signos (+) y (-) respectivamente. P-AMPK (1:1000), AMPK-T (1:1000), Actina (1:20000)



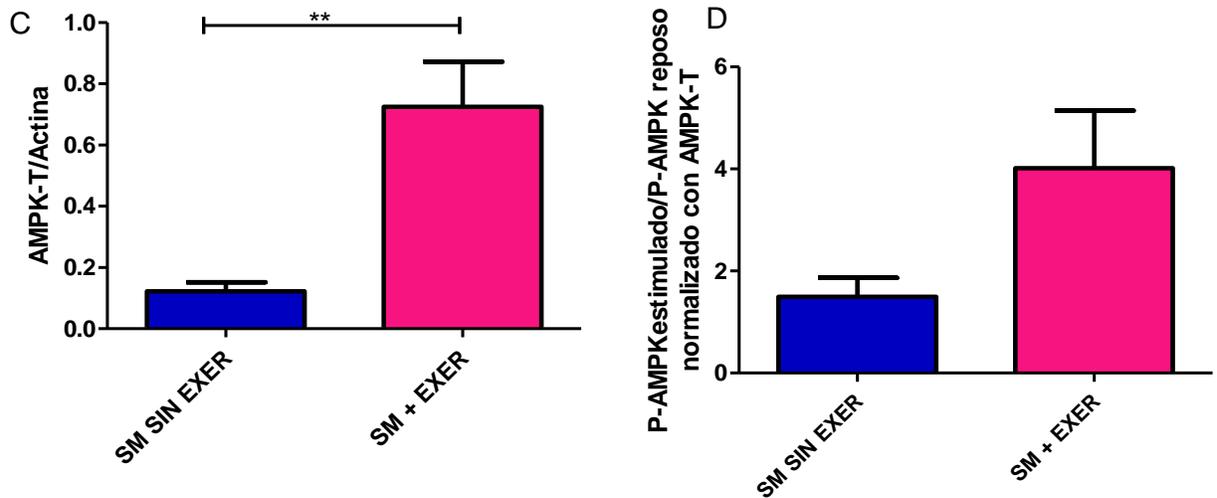


Figura 21. Resultados del análisis densitométrico del efecto de la actividad física y estímulo eléctrico (contracción) sobre la fosforilación de AMPK en músculo EDL. A. Fosforilación en reposo (basal) relativa del músculo EDL (-) y fosforilación relativa en respuesta a la contracción (+); *p: 0.0242 SM sin exer (-) vs SM+Exer (-), ***p: 0.0005 SM sin exer (+) vs SM+Exer (+); B. Fosforilación en reposo absoluta del músculo EDL y fosforilación absoluta en respuesta a la contracción; ***p: 0.0002 SM sin exer (-) vs SM+Exer (-), ***p: < 0.0001 SM sin exer (+) vs SM+Exer (+); C. Expresión de AMPK en músculo EDL; **p: 0.0038 SM sin exer vs SM+Exer; D. Aumento de la fosforilación de AMPK en músculo EDL en respuesta a la contracción; NS: no existe diferencia significativa p: 0.1833 SM sin exer vs SM+Exer. Se utilizó la prueba t de student. SM SIN EXER= ratas con síndrome metabólico sin realización de ejercicio n=4; SM +EXER: Ratas con síndrome metabólico sometidas a ejercicio n=5

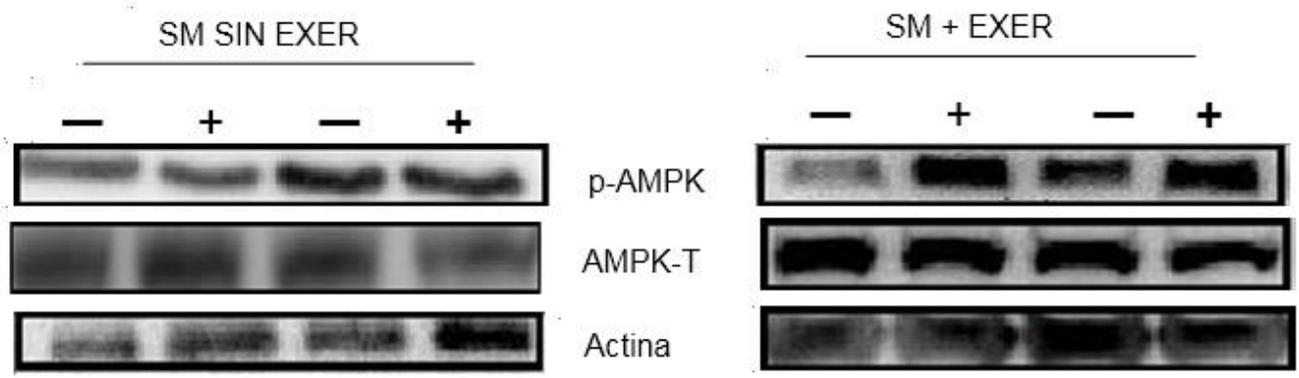


Figura 22.1 Imagen representativa de los ensayos de western blot del músculo sóleo extraídos de las ratas de los dos grupos experimentales; con y sin la aplicación de estímulo eléctrico (contracción) definidos por los signos (+) y (-) respectivamente. P-AMPK (1:1000), AMPK-T (1:1000), Actina (1:20000)

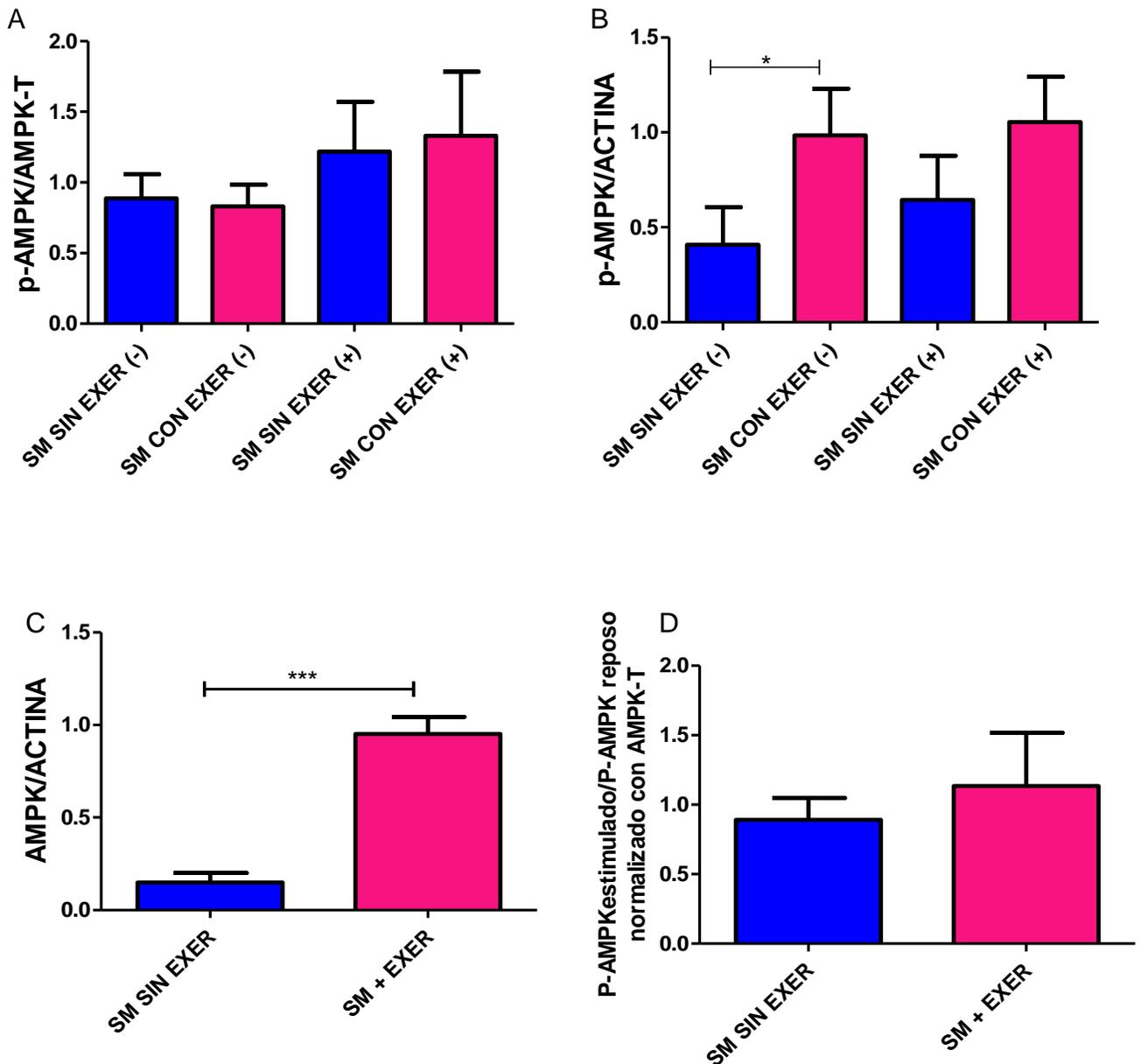


Figura 22. Resultados del análisis densitométrico del efecto de la actividad física y estímulo eléctrico (contracción) sobre la fosforilación de AMPK en músculo sóleo, A. Fosforilación en reposo (basal) relativa del músculo sóleo(-) y fosforilación relativa en respuesta a la contracción (+); no se presentó diferencia significativa p: 0.3961, SM sin exer (-)vs SM+Exer (-),no se presentó diferencia significativa p: 0.4236, SM sin exer (+)vs SM+Exer (+); B. Fosforilación en reposo absoluta del músculo sóleo y fosforilación absoluta en respuesta a la contracción; *p: 0.0411 SM sin exer (-) vs SM+Exer (-), no se presentó diferencia significativa p: 0.1273 SM sin exer (+) vs SM+Exer (+); C. Expresión de AMPK en músculo sóleo; ***p: <0.0001 SM sin exer vs SM+Exer; D. Aumento de la fosforilación de AMPK en músculo EDL en respuesta a la contracción; NS: no existe diferencia significativa p: 0.2511 SM sin Exer vs SM+Exer. Se utilizó como método estadístico prueba t de student p<0.05. SM SIN EXER= ratas con síndrome metabólico sin realización de ejercicio n=4; SM + EXER: Ratas con síndrome metabólico sometidas a ejercicio n=5

En las Figuras 21.1 y 22.1 se muestran las imágenes del WB, se observa que, en las muestras estimuladas eléctricamente de ambos músculos, tuvieron una mayor intensidad en la banda marcada con un signo (+), en comparación a las que se mantuvieron en reposo (-), por lo que la proteína AMPK con un peso aproximado de 62kDa se fosforila más en las muestras de SM + EXER, lo mismo ocurre en las estimuladas eléctricamente (contracción).

En las Figuras 21 y 22 se muestran los resultados del análisis de densitometría realizado a la proteína reconocida por el anticuerpo p-AMPK, en el músculo EDL, se observa que hay diferencia significativa en la fosforilación relativa (21 A) y absoluta (21 B) de AMPK en el grupo de SM + EXER, lo mismo sucede en aquellas muestras que fueron estimuladas eléctricamente (contracción).

Por otro lado, en el músculo sóleo no se presenta diferencia significativa en la fosforilación relativa tanto en respuesta al estímulo eléctrico (contracción) como en reposo (basal), entre ambos grupos experimentales, en la fosforilación en reposo absoluta se encontró diferencia significativa entre ambos grupos experimentales, $p=0.0411$.

Respecto a la expresión de AMPK (Figura 21-C) en el músculo EDL, si hay diferencia significativa entre los dos grupos experimentales (SM SIN EXER y SM + EXER), $p=0.0038$, en cuanto al aumento en la fosforilación (Figura 21-D), no se encontró diferencia significativa entre ambos grupos experimentales. De igual manera la expresión de AMPK en músculo sóleo (Figura 22-C), es significativamente diferente entre ambos grupos experimentales $p= <0.0001$. Por otro lado, el aumento de la fosforilación (Figura 22-D) no se encontró diferencia significativa entre ambos grupos experimentales.

7.5 Efecto del ejercicio sobre el EOX, mediante ensayos de actividad enzimática (CAT, GR, SOD, ABTS)

7.5.1 CAT

A continuación, se muestran los resultados de la evaluación de la actividad enzimática CAT medida en el tejido muscular en reposo de los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales (Control, SM SIN EXER, SM + EXER) (Figura 23).

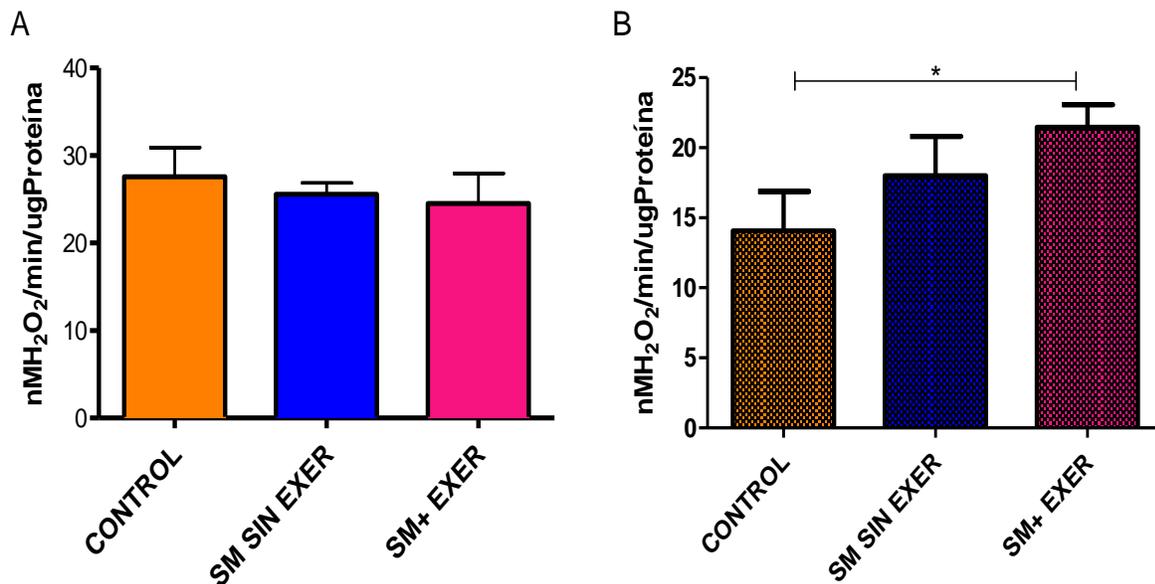


Figura 23. Resultados de la evaluación de la actividad enzimática en tejido muscular (músculo sóleo y EDL), en reposo. A. Actividad enzimática de CAT en músculo sóleo de los tres grupos experimentales, no se presentó diferencia significativa entre los tres grupos experimentales; p: 0.500 Control vs SM sin exer, p: 0.420 Control vs SM+Exer, p: 0.155 SM sin exer vs SM + exer. B. Actividad enzimática de CAT en músculo EDL de los tres grupos experimentales, p: 0.210 Control vs SM sin exer, *p: 0.047 Control vs SM + exer, p: 0.274 SM sin exer vs SM +exer. Se utilizó como método estadístico prueba t de student $p < 0.05$. SM SIN EXER= ratas con síndrome metabólico sin realización de ejercicio n=4; SM + EXER: Ratas con síndrome metabólico sometidas a ejercicio n=5

En la figura 23 se muestran los resultados de la evaluación de la actividad enzimática CAT en tejido muscular. En el músculo sóleo no se encontró diferencia significativa entre los grupos experimentales (23-A), y en el músculo EDL (23-B) se observa que hay diferencia significativa entre el grupo control y el grupo SM + EXER, $p = 0.047$ vs $p = 0.05$.

7.5.2 Glutación Reductasa (GR)

A continuación, se muestran los resultados de la evaluación de la actividad enzimática GR medida en el tejido muscular en reposo de los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales (Figura 24).

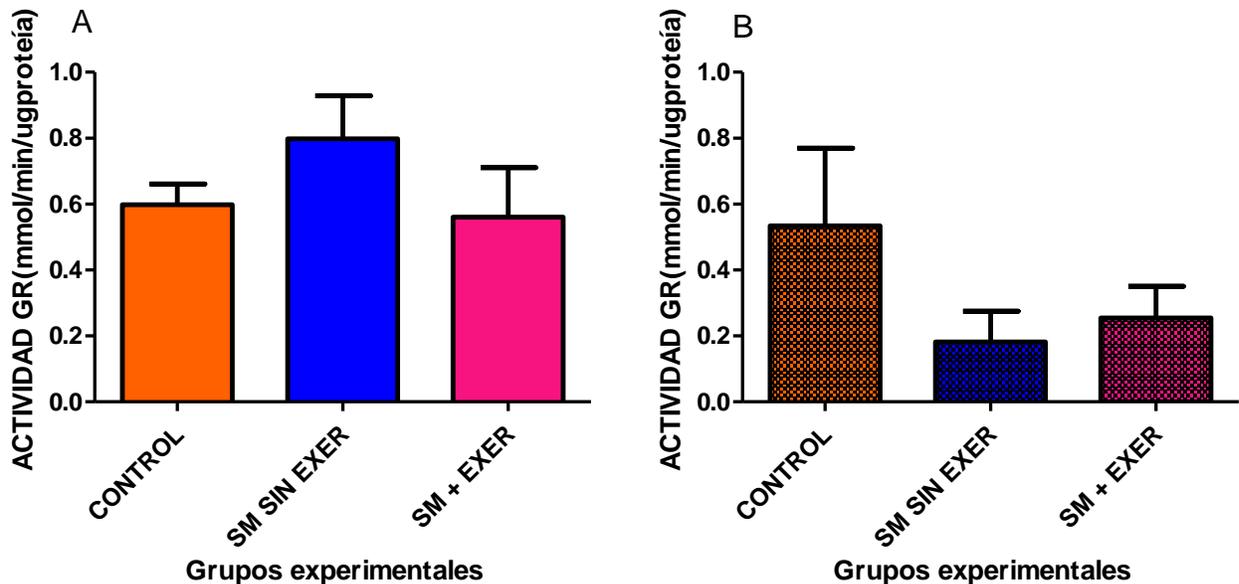


Figura 24. Resultados de la evaluación de la actividad enzimática en tejido muscular (músculo sóleo y EDL), en reposo. A. Actividad enzimática de GPx en músculo sóleo de los tres grupos experimentales, no se presentó diferencia significativa entre los tres grupos experimentales; p: 0.2857 Control vs SM sin exer, p: 0.3125 Control vs SM+Exer, p: 0.4735 SM sin exer vs SM + exer. B. Actividad enzimática de GPx en músculo EDL de los tres grupos experimentales, no se presentó diferencia significativa entre los tres grupos experimentales; p: 0.1964 Control vs SM sin exer, p: 0.2317 Control vs SM+Exer, p: 0.1573 SM sin exer vs SM + exer. Se utilizó como método estadístico prueba t de student, $p < 0.05$. SM SIN EXER= ratas con síndrome metabólico sin realización de ejercicio n=4; SM + EXER: Ratas con síndrome metabólico sometidas a ejercicio n=5

En la figura 24 A y B se muestran los resultados de la actividad enzimática de GPX medida en sóleo y EDL respectivamente, se observa que no hay diferencias significativas entre los tres grupos experimentales de ambos músculos.

7.5.3 SOD

A continuación, se presentan los resultados de la evaluación de la actividad enzimática de SOD total (Figura 25), la actividad SOD citosólica (Figura 26) y la SOD mitocondrial (Figura 27), medida en el tejido muscular en reposo de los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales.

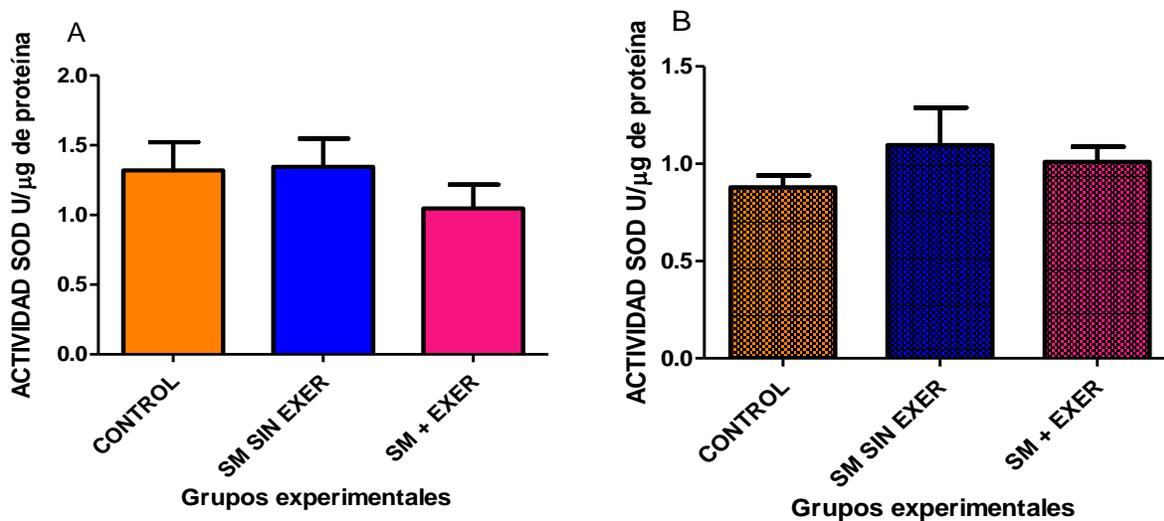


Figura 25. Resultados de la evaluación de la actividad enzimática en tejido muscular (músculo sóleo y EDL), en reposo. A. Actividad enzimática de SOD total en músculo sóleo de los tres grupos experimentales, no se presentó diferencia significativa entre los tres grupos experimentales; $p: 0.3452$ Control vs SM sin exer, $p: 0.0754$ Control vs SM+Exer, $p: 0.1377$ SM sin exer vs SM + exer. B. Actividad enzimática de SOD total en músculo EDL de los tres grupos experimentales, no se presentó diferencia significativa entre los tres grupos experimentales; $p: 0.2738$ Control vs SM sin exer, $p: 0.1111$ Control vs SM+Exer, $p: 0.3138$ SM sin exer vs SM + exer. Se utilizó como método estadístico prueba t de student, $p < 0.05$. SM SIN EXER= ratas con síndrome metabólico sin realización de ejercicio $n=4$; SM + EXER: Ratas con síndrome metabólico sometidas a ejercicio $n=5$

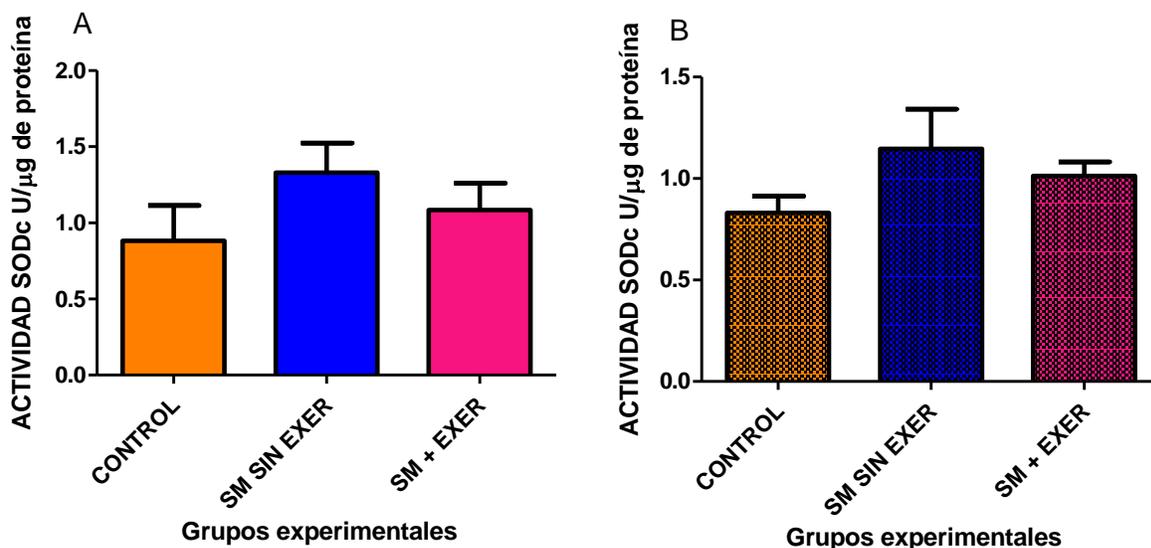


Figura 26. Resultados de la evaluación de la actividad enzimática en tejido muscular (músculo sóleo y EDL), en reposo. A. Actividad enzimática de SOD citosólica en músculo sóleo de los tres grupos experimentales, no se presentó diferencia significativa entre los tres grupos experimentales; p: 0.1548 Control vs SM sin exer, p: 0.4200 Control vs SM+Exer, p: 0.2738 SM sin exer vs SM + exer. B. Actividad enzimática de SOD citosólica en músculo EDL de los tres grupos experimentales, no se presentó diferencia significativa entre los tres grupos experimentales; p: 0.1548 Control vs SM sin exer, p: 0.0754 Control vs SM+Exer, p: 0.4206 SM sin exer vs SM + exer. Se utilizó como método estadístico prueba t de student, $p < 0.05$. SM SIN EXER= ratas con síndrome metabólico sin realización de ejercicio n=4; SM + EXER: Ratas con síndrome metabólico sometidas a ejercicio n=5

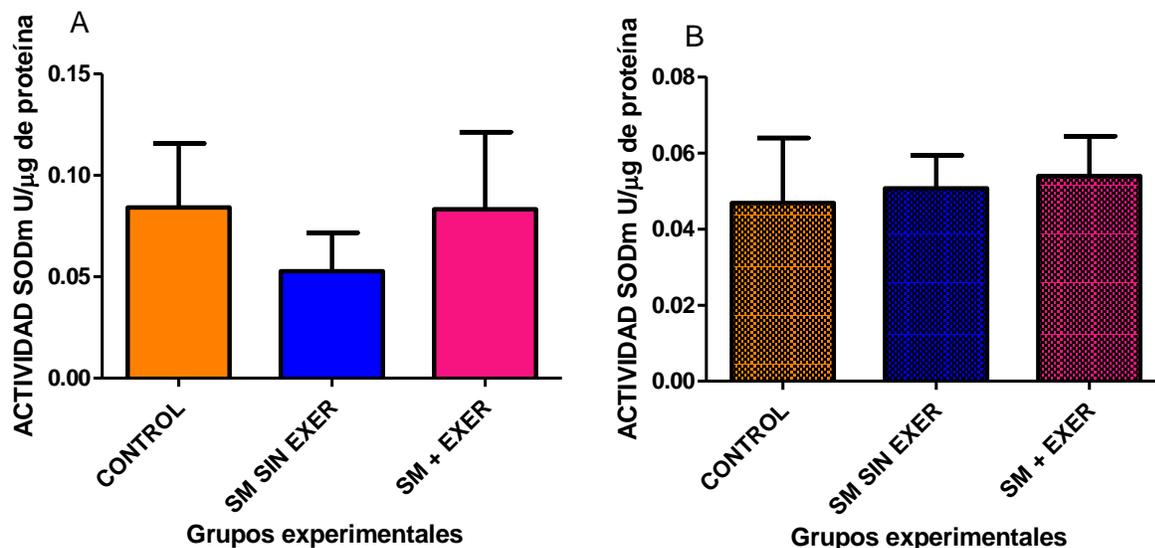


Figura 27. Resultados de la evaluación de la actividad enzimática en tejido muscular (músculo sóleo y EDL), en reposo. A. Actividad enzimática de SOD mitocondrial en músculo sóleo de los tres grupos experimentales, no se presentó diferencia significativa entre los tres grupos experimentales; p: 0.2857 Control vs SM sin exer, p: 0.5000 Control vs SM+Exer, p: 0.3452 SM sin exer vs SM + exer. B. Actividad enzimática de SOD mitocondrial en músculo EDL de los tres grupos experimentales, no se presentó diferencia significativa entre los tres grupos experimentales; p: 0.4429 Control vs SM sin exer, p: 0.4524 Control vs SM+Exer, p: 0.500 SM sin exer vs SM + exer. Se utilizó como método estadístico prueba t de student, $p < 0.05$. SM SIN EXER= ratas con síndrome metabólico sin realización de ejercicio n=4; SM + EXER: Ratas con síndrome metabólico sometidas a ejercicio n=5

En las figuras 25, 26, 27 se muestran los resultados de la actividad enzimática de SOD total, citosólica y mitocondrial (SODt, SODc, y SODm), respectivamente.

No se encontró diferencia significativa entre los grupos experimentales en ninguno de los ensayos realizados de SOD (SODt, SODc, y SODm).

7.5.4 Carga antioxidante ABTS

A continuación, se muestran los resultados de la carga antioxidante ABTS medida en ambos músculos (sóleo y EDL), en reposo, de los 3 grupos experimentales (Figura 28).

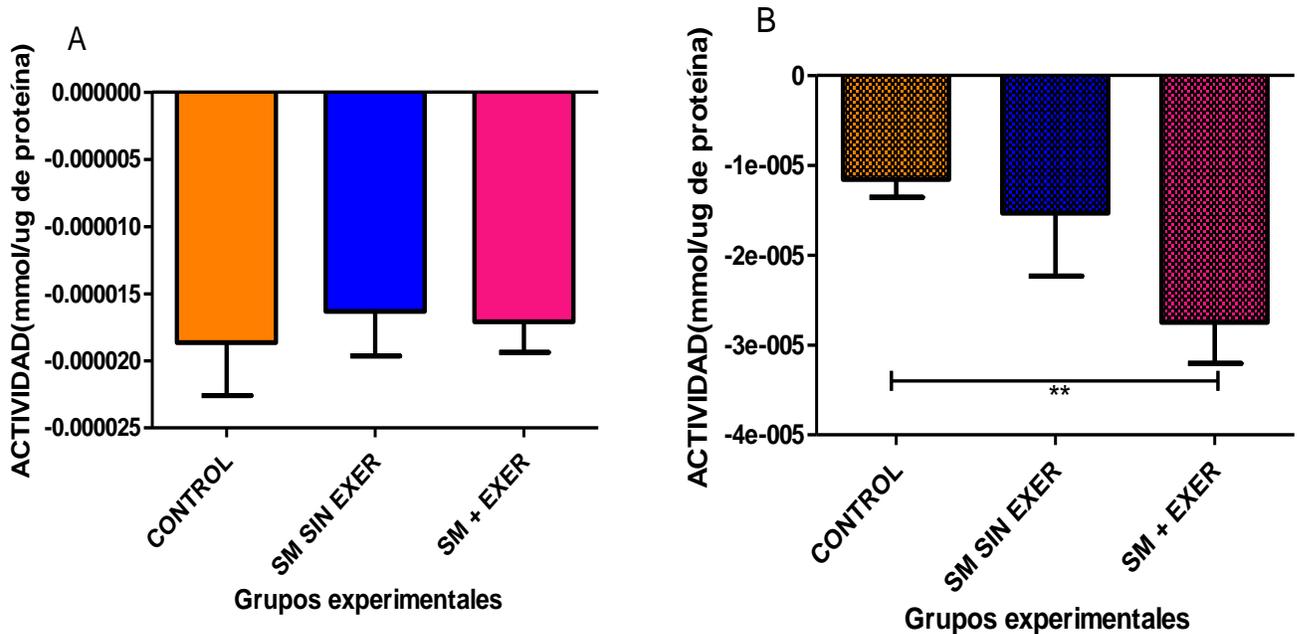


Figura 28. Resultados de la carga antioxidante ABTS medida en ambos músculos (sóleo y EDL) en reposo de los 3 grupos experimentales. A. Actividad medida en músculo sóleo en reposo. No se presentó diferencia significativa entre ninguno de los tres grupos experimentales p: 0.333 CONTROL vs SM SIN EXER, p: 0.3726 CONTROL vs SM + EXER, p: 0.4251 SM SIN EXER vs SM + EXER. B. Actividad medida en músculo EDL en reposo eléctricamente (contracción) no se encontró diferencia significativa (NS) p: 0.2738 grupo Control vs SM SIN EXER, **p: 0.0040 grupo Control vs SM + EXER, NS p: 0.111 SM SIN EXER vs SM + EXER. Se utilizó como método estadístico prueba t de student, $p < 0.05$. SM SIN EXER= ratas con síndrome metabólico sin realización de ejercicio n=4; SM + EXER: Ratas con síndrome metabólico sometidas a ejercicio n=5

En la figura 28-A se muestran los resultados de la carga antioxidante medida en músculo sóleo, observamos que no existe diferencia significativa entre los tres grupos experimentales, por otro lado, en el músculo EDL (Figura 28-B), se observa que son significativamente diferentes el grupo control vs SM + EXER $p=0.0040$.

8.0 Discusión

8.1 Efecto de la actividad física en el peso corporal y ganancia de peso

En un estudio conducido por Smyers y col. (2016), se evaluó el efecto del ejercicio durante restricción energética. Observó que las ratas a las que les sometió a actividad física y se les aplicó restricción energética tuvo una reducción de peso significativa en comparación con el grupo de ratas que no realizaron actividad física

En el presente trabajo se encontró, que la ganancia de peso corporal fue menor en el grupo de SM + EXER, esta diferencia se debió a la realización de actividad física durante 8 semanas.

8.2 Evaluación del SM y el efecto de la actividad física

El ejercicio, así como la insulina aumentan el transporte de glucosa, pero en condiciones patológicas como la RI y la DT2, el transporte de glucosa mediado por la insulina está disminuido, [42,43].

El índice HOMA permite estimar el nivel de resistencia a la insulina, en el trabajo original de Matthews se refiere a valores de índice 1.0 como normales, valores superiores a 3.0 se considera resistencia a la insulina. En este trabajo se obtuvo que todos los valores se encuentran en índices normales; tampoco hay diferencia significativa entre los valores antes y después de la AF. Este resultado puede relacionarse con la edad de las ratas, ya que en algunos artículos se menciona que las ratas de edad avanzada pueden presentar una disminución en los valores de glucosa e insulina.

De acuerdo con Holloszy J.O. [39], la mayor consecuencia metabólica de las adaptaciones en músculo durante el ejercicio es la disminución de utilización del glucógeno músculo y glucosa en sangre, y una mayor dependencia de la oxidación de grasa [43]. En este trabajo se encontró que hay una disminución en la resistencia a la insulina, debido a que durante el ejercicio aumenta el transporte de glucosa, así como su consumo.

8.3 Resultados de la prueba de esfuerzo realizada al grupo SM + EXER antes y después de las 8 semanas de actividad física.

Ya A. Hill (1927) formuló el concepto de consumo máximo de oxígeno como medida cuantitativa de la potencia aeróbica. Como es sabido, el consumo de O₂ durante la actividad física aumenta proporcionalmente a su potencia. Dentro de algunos límites individuales de sus valores (potencia crítica), el consumo máximo de oxígeno (VO₂) ya no se incrementa ni siquiera cuando se eleva la potencia de carga [42]. En este trabajo se encontró que el volumen máximo consumido (VO₂) de las ratas evaluado en la PE al término de las 8 semanas de actividad física ya no aumenta en comparación a los valores iniciales antes de la aplicación de la AF, manteniéndose constante, a pesar de que la distancia y velocidad que resisten las ratas incrementa, por lo que al final del protocolo de actividad física las ratas adquieren una mejor respuesta al ejercicio.

De acuerdo con J. O. Holloszy, realizar ejercicio regular induce mejores adaptaciones en músculo esquelético, incluye: incrementos en el contenido mitocondrial y una mejor capacidad respiratoria en las fibras musculares [39]. En los resultados de la prueba de esfuerzo realizada a las ratas del grupo SM + EXER, después de la AF durante 8 semanas, se observó una mejor adaptación al ejercicio, lo que puede relacionarse a que hubo una mejora en la capacidad respiratoria en las ratas del grupo SM + EXER.

8.4 Resultados de la actividad física sobre la respuesta a la activación aguda de AMPK por contracción en músculo EDL y sóleo

Existen evidencias que indican que la contracción (estimulación eléctrica) y el ejercicio activan AMPK, en una forma dependiente de la intensidad y de la duración. Se ha demostrado, por ejemplo, que en un periodo de ejercicio (entre 30s y 120 min) aumenta la actividad de la AMPK en humanos. Se ha demostrado que durante el ejercicio se lleva a cabo activación de la subunidad alfa-2 de la AMPK, [41]

En roedores las isoformas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la AMPK son activadas durante el proceso de contracción/ejercicio, en humanos se ha demostrado que hay una mayor sensibilidad en la isoforma $\alpha 2$ -AMPK, por lo tanto, hay una mejor respuesta en la activación en

comparación con α 1-AMPK, [41].

La estimulación de la AMPK por contracción o ejercicio parece estar mediada por cambios en la relación AMP: ATP, que resulta del aumento energético impuesto por el ejercicio o la contracción. Durante estos procesos, el ATP es rápidamente utilizado para cubrir las necesidades energéticas de la contracción muscular. Adicionalmente, durante la contracción se liberan mensajeros citsólicos, como Ca^{2+} que pueden activar indirectamente a la AMPK al aumentar el potencial de regeneración de energía [39].

Aparentemente la expresión de las diferentes isoformas de la AMPK varía entre el tipo de fibra muscular (roja oxidativa o blanca glucolítica), ejemplo en el músculo de roedor las isoformas α 1, γ 1 y las β -isoformas están distribuidas uniformemente entre el tipo de fibra roja y blanca, mientras que las isoformas α 1, γ 2 y γ 3 su contenido es alto en fibras blancas, [41,42,43].

En este trabajo se observó un incremento en la fosforilación de la AMPK en las ratas que realizaron ejercicio, debido a que, durante el proceso de contracción, hay un desbalance en la proporción ATP: AMP, lo que conlleva a la activación de la AMPK.

Por otro lado, músculo EDL presentó mayor número de diferencias en la fosforilación de AMPK, en comparación al músculo sóleo; la diferencia puede atribuirse al tipo de fibra muscular predominante en cada músculo, el EDL presenta un mayor contenido de fibras de contracción rápidas, de metabolismo glucolítico (fibras blancas), mientras que el sóleo presenta un mayor contenido de fibras de contracción lenta, de metabolismo oxidativo (fibras rojas).

8.5 Efecto del ejercicio sobre el EOx, mediante ensayos de actividad enzimática (CAT, GR, SOD, ABTS)

8.5.1 CAT

El EOx, se refiere al desequilibrio entre los niveles de agentes oxidantes y antioxidantes, estando a favor el nivel de los oxidantes en células y tejidos.

El ejercicio posee un rol controversial en la producción de RL. El ejercicio físico agudo, es decir extenuante, está asociado con el incremento en la generación de RL, principalmente debido al incremento en el consumo de oxígeno [44,45]. El ejercicio extenuante causa EOx en personas sedentarias. Realizar ejercicio regular podría prevenir diversas patologías debido a la peroxidación lipídica, disminución del daño muscular y elevación del sistema antioxidante [45].

En un estudio realizado por E. Benavides [46], y colaboradores, evaluaron el efecto del ejercicio moderado y continuo frente al EOx inducido en *Rattus norvegicus* Wistar. Utilizaron 32 ratas Wistar de un mes de vida y las dividieron en 4 grupos: A: Control; B: inducido a estrés; C: inducido estrés y sometido a ejercicio moderado y continuo; D: sometido a ejercicio físico moderado y continuo. En su estudio observaron que el grupo B presentó una actividad de CAT menor en comparación al control, donde el grupo C logró una mejoría notable debido a la acción del ejercicio moderado y continuo.

En el presente estudio se encontró que el músculo sóleo mantiene una actividad enzimática de CAT semejante en los tres grupos, y puede relacionarse al metabolismo oxidativo en músculo sóleo, en comparación con el EDL cuyo metabolismo es glucolítico, donde se observa una mejoría en la actividad enzimática de CAT.

8.5.2 GR

En un estudio conducido por JI L.L y colaboradores, en el cual evaluaron la actividad de la GR y las enzimas antioxidantes (CATy SOD) en respuesta al tipo de fibra e intensidad de ejercicio, en diferentes tipos de músculo esquelético de ratas sanas. Con

dicho fin sometieron a los animales a diferentes intensidades de ejercicio, posteriormente realizaron la disección de tres diferentes músculos (sóleo, músculo vasto lateral y superficial), con el fin de evaluar el efecto del ejercicio en tres diferentes tipos de metabolismo y fibra muscular. Observaron que la actividad de la GR se ve incrementada en el músculo sóleo en comparación a los músculos vasto lateral y superficial. Por otro lado, observaron que el ejercicio a diferentes intensidades provoca un incremento significativo en las enzimas GPx, GR y CAT en el músculo vasto lateral, pero no causa el mismo efecto en el músculo sóleo. En este estudio concluyen que el músculo vasto lateral que es de tipo glucolítico y fibras de contracción rápida; es más vulnerable al daño generado por los radicales libres durante el ejercicio, [47].

En este proyecto no se encontraron diferencias significativas entre el tipo de músculo, aunque se observa una mayor actividad del glutatión reductasa (GR) en músculo sóleo en comparación al EDL obteniéndose el mismo resultado al estudio conducido por JI L.L y colaboradores.

8.5.3 SOD

Hitomi [15], realizó un estudio donde evaluó el incremento de la expresión extra celular de la SOD en músculo esquelético en respuesta al ejercicio agudo en ratones macho C57BL/6J, menciona que durante un entrenamiento de resistencia la actividad de SOD aumenta en músculo esquelético.

En este proyecto no se encontraron diferencias significativas entre los grupos control y el ejercitado, puede relacionarse con la intensidad del ejercicio, ya que, al ser un protocolo de aplicación de actividad física, la intensidad del trabajo realizado por las ratas fue de poca intensidad.

8.5.4 Carga antioxidante medida con ABTS

En un estudio llevado a cabo por Y. Sun [47], y colaboradores, donde evaluaron el EOx generado por el ejercicio en ratones C57/BL6, los cuales nadaron hasta agotarse, observaron que la capacidad antioxidante disminuía respecto al control, y eso es debido a que durante la aplicación de un ejercicio intenso aumenta la liberación de radicales libres.

La generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERONs) durante el ejercicio depende en gran medida de los requerimientos energéticos, el consumo de oxígeno, y el estrés fisiológico impuesto, [47.48].

Los niveles de ERONs varían de acuerdo a la duración e intensidad de ejercicio, durante un ejercicio de baja intensidad y duración, la capacidad antioxidante es lo suficiente fuerte para combatir la producción de ERONs, disminuyendo esa capacidad conforme aumenta la intensidad y duración del ejercicio [47].

En ese estudio observaron que los valores de ABTS disminuyen en respuesta al ejercicio impuesto a los ratones, pero que a comparación con otros protocolos donde a los animales se les somete a correr sobre una banda sin fin promoviendo el movimiento mediante la aplicación de descargas eléctricas, factor que consideran importante en el aumento de ERONs ya que genera un estrés adicional a los animales por lo que hay una disminución significativamente mayor.

En este trabajo se encontró que no hay cambios significativos en la capacidad antioxidante medida en el músculo sóleo, por lo que puede atribuirse a diferentes factores como son: tipo fibras (contracción lenta) y metabolismo (oxidativo), ya que los requerimientos energéticos durante la aplicación de ejercicio son menores en comparación al músculo EDL donde las contracciones son más rápidas, por lo que los requerimientos de energía aumentan. En la figura 28-B se observa que la capacidad antioxidante es menor en los músculos de ratas que realizaron actividad física en comparación a los músculos de las ratas con SM.

9.0 Conclusiones

La ministración de sacarosa al 30% disuelta en el agua para beber de las ratas, provocó el desarrollo del SM, esto se validó con las alteraciones presentadas en los valores obtenidos en la determinación de parámetros bioquímicos medidos en sangre y somatométricos.

Por otro lado la realización de actividad física en ratas con SM inducido por una dieta alta en hidratos de carbono (sacarosa al 30% en su agua para beber), no se observa una mejoría en los parámetros bioquímicos, pero si hay una menor ganancia de peso, así mismo se observa incremento en la fosforilación de AMPK en respuesta al ejercicio.

Por último, no se observó una mejoría en el nivel de EOx en el tejido estudiado, generado durante las complicaciones crónicas que conlleva el SM.

10.0 PERSPECTIVAS

- Aplicación de ejercicio intenso y restricción calórica, en ratas con síndrome metabólica, con el fin de observar cambios significativos en parámetros bioquímicos, capacidad física y EOx.
- Determinar el efecto de la actividad física sobre la expresión del factor NFR2 el cual está implicado en regeneración muscular y regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas antioxidantes, mediante su unión a una secuencia específica del ADN conocida como ARE (de sus siglas en inglés: "Antioxidant Response Element").

11.0 BIBLIOGRAFÍA

1. L. Packer, and H. Sies, (2008). Metabolic Syndrome. En L. Packer, and H. Sies, Oxidative Stress and Inflammatory Mechanisms in Obesity, diabetes and the Metabolic Syndrome New York: Taylor and Francis Group LLC (5-10).
2. G. Alberti, P. Zimmet, and J. Shaw, (2006). The IDF consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome. Diabetic Medicine, 4-6.
3. C. Pineda, (2008). Síndrome metabólico: definición, historia, criterios. Colombia Médica, 96-106.
4. Obesidad y sobrepeso, nota descriptiva octubre 2017, ver en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
5. E. L. B. Novelli, Y S Diniz, C M Galhardi, G M X Ebaid . (2006 March 14). Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. Laboratory Animals Ltd. Laboratory Animals, 41, 111-119.
6. National Heart, Lung and Blood Institute. (28 de Diciembre de 2015). Obtenido de Beneficios de la actividad física : <https://www.nhlbi.nih.gov/health-spanish/health-topics/temas/phys/benefits>
7. C. A. Aguilar, M. Hernández, J. Hernández, (2015). “Epidemiología de la diabetes mellitus en México”, en Aguilar C.A. et al (eds), Acciones para enfrentar a la diabetes. Documento de postura. Academia Nacional de Medicina de México, México.
8. Definición de Actividad Física tomado de: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/pa/es/>
9. K. Aguilera, L. Castillo, V. Farfán, M. Ávila, (2017). Modelos animales de síndrome metabólico y diabetes. En Temas selectos en Neurobiología Molecular e Integrativa (89-91). México: Anahuac Mayab.

10. K. Figueroa, (2013). Evaluación de la Resistencia a la insulina y activación de la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK) en hepatocitos de rata con síndrome metabólico (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México
11. N. C. Ruderman, (2013). AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *The journal of clinical investigation* , 2764-2772.
12. J. N. Nielsen, K. J. Mustard, D. A. Graham, H. Yu , C. S. MacDonald, H. Pilegaard, L. J. Goodyear, D. G. Hardie, E. A. Richter, J. F. Wojtaszewski (2003) 5'-AMP-activated protein kinase activity and subunit expression in exercise-trained human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 94: 631-641.
13. D. Harman, (1992). Free radical theory of aging. *Mutation Research/DNAging*, 257-266.
14. D. M. Carrizo (1998). Efectos fisiopatológicos del óxido nítrico y su relación con el estrés oxidativo. *medicina*, 367-373.
15. Y. Hitomi, S. Watanabe, T. Kizaki, T. Sakurai, T. Takemasa, (2008), Acute exercise increases expression of extracellular superoxide dismutase in skeletal muscle and the aorta, *Redox Report*, 13, 213-216.
16. Díaz A. (2002). RADICALES LIBRES. Agosto 16, 2016, de UNAM Sitio web: http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/p_estudios/apuntes_bioquimica/Unidad_12.pdf
17. B. Kalyanaraman (2013), Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biology*, 244-257, 2013

18. E. A. Leal, S. García, (2011), Obesidad, síndrome metabólico y su impacto en las enfermedades cardiovasculares, *Revista Biomedica* 22:103-115
19. Definición de obesidad tomado de: Global Health Observatory (GHO) data http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/bmi_text/en/].
20. Prevalencia del sobrepeso y obesidad tomado de: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/bmi_text/en/].
21. P. Zimmet, G. Alberti, M. Serrano M. (2005), Una nueva definición mundial del síndrome metabólico propuesta por la Federación Internacional de Diabetes: fundamento y resultados. *Revista Española de Cardiología*, 1371-6
22. K. B. Barbosa, J. Bressan, M. A. Zulet, (2008). Influence of dietary intake on plasma biomarkers of oxidative stress in humans. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 3, 259-280.
23. R. Ahima, (2016), *Metabolic Syndrome a comprehensive textbook*, Philadelphia, PA, USA, Springer Reference, pp 3,101,14.
24. J. Zaldivar, J. Soriano, (2014), Síndrome metabólico: Una epidemia en la actualidad. *Revista Médica de Honduras*, Vol 82, 121-125.
25. F. Sánchez, R. García, F. Alarcón, M. Cruz, (2005). Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. *Gaceta médica de México*, 505-512.
26. G. M. Reaven, Banting lecture (1998): role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988; 37: 1595-607.

- 27.D. Voet and J.E Voet, (2014). Biochemistry, chapter 27 Metabolism Homeostasis: Regulation of appetite, Energy Expenditure, and body weight, pages 1088-1101. John Willis and Sons, Inc, 4th edition
- 28.J. Sepúlveda, (2014). Tejido muscular . En S. J., Texto de Atlas Histología, Biología celular y tisular (págs. 119-130). Nuevo León : Mc Graw Hill education
- 29.W., G. (1992). Tejido excitable . En G. W., Fisiología Médica (págs. 56-60). San Francisco: Manual Moderno.
- 30.M. Ross, y W. Pawlina, (2007). Músculo esquelético. En M. Ross, y W. Pawlina, Histología, Texto y Atlas color con biología celular y molecular (págs. 305-314). Madrid España: Panamericana.
- 31.Bioquímica de músculo: <https://themedicalbiochemistrypage.org/es/muscle-sp.php>
- 32.A. Biel, (2010). Trail guide to the body. Fourth edition. Edit books of Discovery. Boulder CO.
- 33.E. Rodríguez, (2013). Los efectos del Carazolol sobre las propiedades mecánicas del músculo esquelético (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México
- 34.L. Soto, L. Gastell, J. Alejo, (2000). Métodos para medir el daño oxidativo. Revista Cubana Militar, 29(3):192-198
- 35.S. Iñiguez, P. Coutiño, (2008), La AMPK y la Homeostasis Energética, Facultad de medicina publicaciones: REB 27(1):3-8
- 36.D. G. Hardie, J. W. Scott, D. A Pan, E. R. Hudson, (2003), Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. Federation of European Biochemical Societies letters 548, 113-120

37. D. G. Hardie, F. A. Ross, and S. A. Hawley, (2012), AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell biology*, 13:251-262.
38. D. G. Hardie, (2011), Signal Transduction: How cells sense energy. *Nature Reviews Molecular Cell biology*, 472(7342): 176-177.
39. J. O. Holloszy, E. F. Coyle, (1984). Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *Journal of Applied Physiology*, 56, 831-838.
40. B. Braun, C. Sharoff, S. Chipkin, F. Beaudoin, (2004). Effects of insulin resistance on substrate utilization during exercise in overweight women, *Journal of Applied Physiology*, 97, 991-997.
41. S. Jørgensen, E. Richter, F. Wojtaszewski, (2006), Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. *Journal of Applied Physiology*, 574.1, 17-32.
42. T. J. Wilkin, D Voss, (2004), Metabolic syndrome: maladaptation to a modern world, *Journal of the Royal Society of Medicine*, 97(11):511-520.
43. A. Yadav, P. Jyoti, S. K Jain, J. Bhattacharjee, (2011), Correlation of adiponectin and petin with insulin resistance: a pilot study in healthy north Indian population. *Indian Journal of Clinical Biochemistry: IJCB.*; 26, 193-6
44. J. Wilmore y D. Costill, (2004). *Obesidad, diabetes y actividad física* . En J. Wilmore, y D. Costill, *Fisiología del esfuerzo y del deporte*, Barcelona: Paidotribo.664-683

45. D. M. Gwinn, D. Shackelford, D. Egan, M. Mihaylova, A. Mery, D. Vazquez, (2008), AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular Cell.*, 30:214-226.
46. E. Benavides, C. Cabrer, O. Ahumada, E. Robles, (2010), Efecto del ejercicio moderado y continuo frente al estrés oxidativo inducido en *Rattus norvegicus* Wistar, *Ciencia e Investigación*, 131(1), 19-22.
47. Y. Sun, D. Cui, Z. Zhang, T. Zhang, (2016) Attenuated Oxidative Stress following acute exhaustive swimming exercise was accompanied with modified gene expression Profiles of apoptosis in the Skeletal Muscle of mice, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-7.
48. S. Mahjoub, J. Roudsain, (2012) Role of oxidative stress in pathogenesis of metabolic síndrome, *Caspian Journal of Internal Medicine*, Winter, 3, 386-396.

12.0 APÉNDICE

11.1 Amortiguadores

Amortiguador esencial de Ringer Krebs

Reactivo	Concentración mM	Cantidad (g) para 1L de Amortiguador
NaCl	135	7.89
KCl	5	0.373
MgCl ₂	1	0.095
NaHCO ₃	15	1.26
Na ₂ HPO ₄	1	0.142
Glucosa	11	1.92
*CaCl ₂	2.5	1.25(mL) de un stock de 1mM
Piruvato de sodio	2	0.22

*Antes de añadir el CaCl₂ se burbujea con Carbógeno durante 15 min, se debe añadir lentamente.

Una vez añadido el CaCl₂ se ajusta el pH a 7.4 y se afora a 1L.

Amortiguador de lisis base

Reactivo	Producto	Peso molecular (g/mol)	Concentración mM	Cantidad en mg para 500 mL de amortiguador de lisis base
HEPES	Sigma-T1503	238.3	50	5.9575
KCl	/	74.75	50	1.8687
EDTA	Sigma-E005	292.2	1	0.1461
EGTA	Sigma-E 4378	380.11	1	0.1901

B-Glicerol fosfato	Sigma 50020	306.11	5	0.7652
TRITON X100	Sigma X 100		10%	500uL

Aforar a 500mL con agua grado II y ajustar pH a 7.4.

Inhibidores adicionados al amortiguador de lisis base

Inhibidor	Concentración del stock (M)	Cantidad en uL para 1mL de amortiguador de lisis base
DDT	1	2
PMSF	0.1	2
Ortovanadato	0.5	2
NaF	1	50
Nappi	0.25	20

Una vez añadidos los inhibidores se agrega 1 pastilla de MiNi-C-complete de Roche (se disuelve 1 pastilla por cada 10mL de amortiguador de lisis base + inhibidores)

Amortiguadores y soluciones utilizados en los ensayos de Western Blot

Amortiguador de corrida 5X	15g Tris base 5g SDS 5g Glicina Aforar a 1l con H ₂ O grado II Ajustar pH:8.3 con HCL
Amortiguador de corrida 1X	150mL Amortiguador de corrida 5X llevar a 750mL con H ₂ O grado II

Amortiguador de Transferencia 5X	15g Glicina 15g de Tris base Aforar a 1L con H ₂ O grado II
Amortiguador de Transferencia 1X	50mL de Amortiguador de transferencia 5X 50mL de metanol 150 mL de H ₂ O grado II
PBS 10X	82g NaCL 13g PO ₄ HNa ₂ 1.76g PO ₄ H ₂ Na Aforar a 1L con H ₂ O grado II y ajustar pH: 7.6
PBS-TWEEN 0.1% (PBS-T0.1%)	100mL PBS10X 1 mL de Tween 20 llevar a 1L con H ₂ O grado II

Soluciones de anticuerpos primarios, todos los anticuerpos fueron diluidas con Leche al 3% en PBS-T 0.1%

Anticuerpo	Concentración
p-AMPK	1:1000
AMPK-t	1:1000
Actina	1:20000

Soluciones de anticuerpos secundarios, todos los anticuerpos fueron diluidas con Leche al 3% en PBS-T 0.1%

Anticuerpo	Concentración
Anti-anti conejo (p-AMPK y AMPK)	1:2000
Anti-anti conejo (actina)	1:20000

11.2 Equipos utilizados

Espectrofotómetro Sistemas UV-Vis y UV-Vis-NIR CARY 100 UV-Vis

Lector de placas Modulus Microplate Turner Biosystems

Cámara de electroforesis: PowerPac HC BIORAD

Cámara de transferencia

Fotodocumentador y análisis de densitometría: Chemidoc BIORAD

Banda sin fin (Treadmill) Panlab Harvard Apparatus

Analizador de gases LE 405 Panlab Harvard Apparatus

Suministrador de aire y cambiador Panlab Harvard Apparatus