



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

Facultad de Ciencias

**“Expresión génica de TLR4, TLR9 e IL1 $\beta$  en tejido  
hepático y muscular de ratas Sprague Dawley bajo un  
estímulo de dieta y ejercicio”.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**B I Ó L O G O**  
P R E S E N T A:  
**ALEJANDRO GÓMEZ ALCALÁ.**

Director de tesis: Dr. Aarón Domínguez López.

**2010**





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.

Tantas decepciones, tantos problemas, y tantos contratiempos para lograr este escrito que ya olvide como era la vida antes de esto..... en fin, abuelo Praxedis sé que sigues conmigo..... este último empujón va por ti..... Gracias por no dejarme nunca y seguir a mi lado.....

## **Agradecimientos.**

Deseo dar las gracias primero que nada al Dr. Aarón Domínguez López por su enorme apoyo en todo lo referente a este escrito; por facilitarme trabajar en las instalaciones del laboratorio de Gastroenterología del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ), también por haberme ofrecido su valiosa amistad y por mostrarme y ofrecerme su gran calidad humana como formador de profesionales comprometidos con este país.

Por otro lado quiero agradecer a mis demás sinodales, el Dr. Manuel Miranda Anaya, el Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez, el M. en C. Alfonso José Vilchis Peluyera, y finalmente a la Dra. Gertrudis Hortensia Gonzáles Gómez; gracias a todos por el tiempo dedicado al análisis y revisión de esta tesis y sus valiosas observaciones y comentarios.

Agradezco también a mis amigos y compañeros del laboratorio: Rubí, Leo, Fabi, Jorge, Nallely, Liz, a mi gran amiga Alicia y una especial mención a Marlen y Eliud por su enorme apoyo.

## **Mas agradecimientos!!!**

Quiero agradecer también a mis padres que trataron de entender mi trabajo y el largo proceso que implicado la terminación de este escrito; al Dr. Jesús Larios Cuevas y a la Lic. Margarita Mena Zamorano por su enorme apoyo, por supuesto también a todo el personal de las empresas SAMEX y HPA por su compañerismo, A mi gran amigo del CIENI el Dr. Joel Vázquez Pérez... gracias chavo!! y a todos mis demás amigos, tantos y tan complicado citar a todos y cada uno sin mencionar su incalculable apoyo moral; finalmente a Dios que me ha dado paciencia para terminar este gran proyecto .....

## Hoja de Datos del jurado

### 1. Datos del alumno

Gómez  
Alcalá  
Alejandro  
55 28 27 01 15  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología

### 2. Datos del tutor

Dr.  
Aarón  
Domínguez  
López

### 3. Datos del sinodal 1

Dr.  
René de Jesús  
Cárdenas  
Vázquez

### 4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Manuel  
Miranda  
Anaya

### 5. Datos del sinodal 3

Dra.  
Gertrudis  
Hortensia  
González  
Gómez

### 6. Datos del sinodal 4

M. en C.  
Alfonso José  
Vilchis  
Peluyera

### 7. Datos del trabajo escrito

Expresión génica de TLR4, TLR9 e IL1 $\beta$  en tejido hepático y muscular de ratas Sprague  
Dawley bajo un estímulo de dieta y ejercicio  
90 p  
2011

## Resumen

En este trabajo se estudió el cambio de expresión génica que presentan 2 receptores tipo Toll (TLRs): TLR4 y TLR9, así como la citocina Interleucina 1b (IL1b) como resultado de estímulos de dieta y/o ejercicio. Recientemente diversos autores han descrito que TLR4 no solo se expresa como resultado de la interacción con su ligando natural el lipopolisacárido (LPS) proveniente de las bacterias, sino que también se expresa al interactuar con ácidos grasos libres; un fenómeno similar sucede con TLR9 ya que no sólo se expresa como respuesta a la interacción de su ligando natural que es el DNA uncatenario proveniente de virus sino que también se expresa como resultado de la interacción con DNA fragmentado o basura proveniente de ruptura celular. La unión de TLR9 con su ligando induce la producción de interleucina 1b (IL-1b). IL-1b es una citocina producida por macrófagos y es un importante mediador de la respuesta inflamatoria; se encuentra involucrada en una diversidad de procesos celulares incluyendo la proliferación celular, diferenciación y apoptosis. La actividad de los TLRs está relacionada con el proceso inflamatorio y este proceso a su vez está estrechamente relacionado con la obesidad. En este trabajo se analizó la expresión de TLR4, TLR9 e IL1b en tejido hepático y muscular de ratas de la cepa Sprague Dawley sometidas a estímulos de dieta y ejercicio. Para el gen TLR4 en tejido hepático observamos una sobreexpresión con diferencias significativa el grupo Dieta Control (DC) y el grupo de Dieta Grasa (DG) con una  $p = 0.001$ ; también encontramos subexpresión génica al comparar el grupo DG contra el grupo Dieta Grasa Ejercicio Leve (DGEL)  $p = 0.001$ ; por otro lado hallamos subexpresión del grupo DG contra el grupo Dieta Grasa Ejercicio Intenso (DGEi) con una  $p = 0.046$ . Respecto a la expresión génica de TLR9 en tejido hepático hallamos una sobreexpresión significativa entre DC y DGEi de  $p = 0.036$ . Finalmente, observamos para IL1b una sobreexpresión de DGEi respecto a DG

de  $p=0.036$ . Además de las expresiones génicas obtenidas como respuesta a los diferentes estímulos; también se observó una correlación entre la expresión del gen TLR9 e IL1B de  $p=0.036$  en tejido hepático. Respecto a la expresión de los genes en músculo solo se encontró una sobreexpresión de DGEi sobre DGEL del gen TLR9 con una  $p=0.005$ .

Con base en los resultados obtenidos se pudo determinar que la expresión génica de TLR9 e IL-1b se encuentran abatidas en presencia de dieta grasa, y su expresión aumenta cuando existe un estímulo de ejercicio intenso. Los resultados permiten concluir que en presencia de hígado graso el ejercicio leve permite disminuir la expresión de TLR4 como parte de un efecto antiinflamatorio, y debe evitar el ejercicio ya que este estímulo aumenta la expresión de TLR9 e IL-1b como parte de un posible proceso apoptótico.

## **Abstract**

In this work we studied the change in gene expression of 2 Toll Like Receptors (TLRs), TLR4 and TLR9, as well as the cytokine interleukin 1b (IL1b) as a result of stimulation of diet and /or exercise. Recently, several authors have reported that TLR4 is expressed not only as a result of interaction with its natural ligand lipopolysaccharide (LPS) from bacteria, but is also expressed in interaction with free fatty acids, a similar phenomenon happens because TLR9 not only expressed in response to the interaction of its natural ligand the DNA one strand from viruses but is also expressed as a result of interaction with fragmented DNA or “trash DNA” from cell disruption. Binding of TLR9 with its ligand induces the production of interleukin 1B (IL-1b). IL-1b is a cytokine produced by macrophages and is an important mediator of the inflammatory response is involved in a variety of cellular processes including cell proliferation, differentiation and apoptosis. The activity of TLRs is related to the inflammatory process and this process is in turn closely linked to obesity. In this paper we analyzed the expression of TLR4, TLR9 and IL1b in liver tissue and muscle of Sprague Dawley rats subjected to diet and exercise stimuli. For the TLR4 gene in liver tissue differences observed significant gene overexpression diet group control (DC) and fat diet group (DG) with  $p = 0.001$ ; also find gene subexpression by comparing the fat diet group (DG) group against the fat diet group with Exercise Mild (DGEL)  $p = 0.001$ , on the other hand we find gene subexpression of DG group against the fat diet group with intense exercise (DGEi) with  $p = 0.046$ . Regarding TLR9 gene expression in liver tissue we found a significant overexpression relationship between DC and DGEi

of  $p = 0.036$ . Finally, we observed for IL1b overexpression of DGEi about DG of  $p = 0.036$ . In addition to the gene expression obtained in response to different stimuli, we also observed a correlation between gene expression of TLR9 and IL1B of  $p = 0.036$  in liver tissue. Regarding the expression of genes in muscle we was only found overexpression of DGEi over DGEL of the gene TLR9 with  $p = 0.005$ .

Based on the results it was determined that the gene expression of TLR9 and IL-1b are shot down in the presence of dietary fat, and its expression increases when a stimulus of intense exercise. The results suggest that in presence of fatty liver the mild exercise can decrease the expression of TLR4 as part of an anti-inflammatory effect, so it is recommended to avoid strenuous exercise because this stimulus increases the expression of TLR9 and IL-1b as part of a possible apoptotic process.

## Índice

|  |    |
|--|----|
| Agradecimientos.....   | 3  |
| Resumen.....   | 5  |
| Abstract.....  | 7  |
| Índice.....  | 9  |
| Cuadro de abreviaturas.....  | 11 |
| Marco teórico.....   | 13 |
| - Los estímulos ambientales, ejercicio y/o dieta modulan la expresión génica.....    | 13 |
| - Sistema inmunitario innato.....  | 18 |
| - Receptores tipo Toll (TLRs).....   | 19 |
| o Interacción TLR con los patógenos (mecánica del proceso).....                      | 26 |
| o Señalización.....  | 27 |
| o Señalización a detalle.....  | 28 |
| o Localización cromosómica.....  | 30 |
| - Antecedentes de los TLRs en ejercicio y dieta.....                                 | 31 |
| - Citocinas.....   | 33 |
| o Las citocinas en el proceso de inflamación .....                                   | 35 |
| Planteamiento del problema y justificación.....                                      | 36 |
| Hipótesis.....   | 40 |
| Objetivos.....   | 41 |
| - General.....   | 41 |
| - Específicos.....   | 41 |
| Metodología.....   | 42 |
| - Tipo de estudio.....   | 42 |
| - Ratas Sprague Dawley.....  | 42 |
| o Dieta.....   | 42 |
| o Fase de reconocimiento al estímulo de ejercicio.....                               | 43 |
| o Fase de adaptación al estímulo de ejercicio.....                                   | 44 |
| o Ejercicio (leve e intenso).....  | 44 |
| - Toma de muestras (Biopsia de hígado y músculo) en las ratas.....                   | 45 |
| - Corte por Criostato y tinción con rojo oleoso.....                                 | 45 |
| - Extracción de RNA total por la técnica de trizol de tejido hepático y muscular.... | 47 |

|  |    |
|--|----|
| - Electroforesis en gel de agarosa.....  | 48 |
| - Amplificación de cDNA (Transcriptor first strand cDNA synthesis Kit).....                  | 49 |
| - PCR tiempo real (Amplificación de cDNA a partir del kit Light Cyclor – Taqman Master)..... | 52 |
| o Amplificación del cDNA.....  | 52 |
| Resultados.....  | 57 |
| - Tinción de tejido con rojo oleoso.....   | 57 |
| - Cuantificación de RNA total.....   | 58 |
| - Electroforesis en Gel de Agarosa.....  | 58 |
| - Expresión relativa de los genes mediante PCR tiempo real .....                             | 59 |
| o Curvas de amplificación de PCR tiempo real.....  | 59 |
| o Gráficas de expresión relativa.....  | 60 |
| o Análisis estadístico.....  | 62 |
| Discusión.....   | 64 |
| Conclusión.....  | 79 |
| Literatura consultada.....   | 81 |
| Anexo I.....   | 87 |
| Anexo II.....  | 89 |

| <b>Cuadro de abreviaturas</b>                                |                     |
|--|---------------------|
| <b>Frase</b>   | <b>Abreviatura</b>  |
| Receptores tipo Toll   | TLRs                |
| Interleucina 1b  | IL1b                |
| Lipopolisacárido   | LPS                 |
| Ácido desoxirribonucleico                                    | DNA                 |
| Receptore tipo Toll 4  | TLR4                |
| Receptore tipo Toll 9  | TLR9                |
| Dieta control  | DC                  |
| Dieta Grasa  | DG                  |
| Ejercicio Leve   | EL                  |
| Ejercicio intenso  | Ei                  |
| Ácido ribonucleico   | RNA                 |
| Ácido desoxirribonucleico complementario                     | cDNA                |
| Reacción en cadena de la polimerasa                          | PCR                 |
| Tasa de trabajo o consumo máximo de oxígeno                  | VO2 max             |
| Factores de Riesgo Coronario en América del Sur              | FRICAS              |
| Células asesinas o “natural killer”                          | NK                  |
| Patrones moleculares asociados a patógenos                   | PAMPs               |
| Interleucina 1   | IL1                 |
| Dominio Toll- Receptor de interleucina 1                     | Toll/IL-1R o<br>TIR |
| Regiones ricas en leucina                                    | LRRs                |
| Células dendríticas  | DCs                 |
| Factor nuclear kappa B                                       | NF-κB               |
| Proteína de diferenciación mieloide 88                       | MyD 88              |
| Adaptador de dominio contenedor de la proteína TIR           | TIRAP               |
| Interferon Beta  | IFNβ                |
| Adaptador del contenedor de dominio de TIR inducido por IFNβ | TRIF                |
| Interleucina 8   | IL8                 |
| Factor de necrosis tumoral alfa                              | TNF-α               |
| Interleucina 12  | IL12                |
| Peptidoglicanos  | PGNs                |
| Ácido ribonucleico de doble cadena                           | dsRNA               |
| Proteínas de choque térmico                                  | HSPs                |
| Proteína de choque térmico 60                                | HSP60               |
| Virus de inmunodeficiencia humana del tipo 1                 | VIH-1               |
| Virus de la estomatitis vesicular                            | VSV                 |
| Ácidos ribonucleicos pequeños de interferencia               | siRNAs              |

| <b>Cuadro de abreviaturas</b>                       |                    |
|---|--------------------|
| <b>Frase</b>  | <b>Abreviatura</b> |
| Factor activador de linfocitos                      | LAF                |
| Cinasa asociada al receptor de IL1                  | IRAK               |
| Proteína del tipo adaptadora de MyD88               | Mai                |
| Proteína intercalante de Toll                       | Tollip             |
| Cinasa asociada al receptor de IL1 4                | IRAK4              |
| Proteína activada por mitógeno 3 cinasa             | MAP3K              |
| Factor 6 asociado al receptor de necrosis tumoral   | TRAF6              |
| Complejo inhibidor de cinasa KB                     | IKK                |
| Molécula adaptadora relacionada a TRIF              | TRAM               |
| Factor 3 regulador del interferon                   | IRF-3              |
| Interleucina 10                                     | IL10               |
| Rango máximo de trabajo                             | RTM                |
| Citometria de Flujo                                 | FACS               |
| Células presentadoras de antígenos                  | APCs               |
| Receptore tipo Toll 2                               | TLR2               |
| Ácidos grasos no esterificados (o no esterificados) | NEFAs              |
| Optima cutting Tissue                               | OCT                |
| Revoluciones por minuto                             | RPM                |
| Dietil dirocarbonato                                | DEPC               |
| Enfermedad del hígado graso no alcohólico           | NALDF              |

## **Marco teórico.**

### **Los estímulos ambientales, ejercicio y/o dieta modulan la expresión génica.**

A lo largo de la historia se ha mencionado infinidad de veces lo importante que es llevar una buena alimentación y realizar ejercicio físico para tener salud; los griegos y los romanos ya practicaban regímenes que asociaban el ejercicio físico con las restricciones alimenticias para mantener una buena salud. En el siglo V A.C. el célebre Hipócrates conocido como el padre de la medicina aconsejaba a los obesos permanecer desnudos el mayor tiempo posible, no bañarse, dormir en una cama dura, hacer ejercicios o trabajos que requiriesen el uso de la fuerza, no comer hasta que los venciera el cansancio, consumir platos ricos en grasas y con condimentos grasos a fin de saciarse con poca comida, no beber antes de las comidas salvo un poco de vino diluido y no muy frío, comer una sola vez al día, etc.; Heródicus en esa misma época consideraba que la mala salud se debía a una mala alimentación y a la falta de actividad física por lo que recomendaba dieta estricta y actividad física continua, él sugirió incluso curar enfermedades a través del ejercicio intenso. No fue sino hasta el renacimiento que se retomó el tema ejercicio-salud; Claudius Galeno (131-201 D.C.) resaltaba la importancia de la opinión del médico en relación a la realización de actividades físicas, recomendaba juegos de pelotas por ser menos peligrosos, también consideraba importante el masaje deportivo; sus observaciones sistemáticas y profundas permitieron desarrollar alternativas de tratamiento a lesiones por esto es considerado el padre de la medicina deportiva. Avicena (780-1037 D.C.) recomendaba ejercicios terapéuticos, incluso para pacientes convalecientes de varias enfermedades febriles. Posteriormente en 1530 empezaron a surgir los primeros escritos relacionados con la medicina del deporte entre ellos el más notable fue la obra de Hieronymus Mercurialis, el “libro de arte gymnastica” (Hebbelinck, M. et al., 1984; Jokl, E. et al., 1964; Consultado en internet: [http://www.bago.com/cardired/Ejercicio\\_salud/Ejercicio\\_salud.asp#INICIO](http://www.bago.com/cardired/Ejercicio_salud/Ejercicio_salud.asp#INICIO)). Siglos más tarde (1840-1940) se empezó a estructurar la valoración del desempeño físico durante el ejercicio así como valores de aptitud física; con la llegada de la segunda guerra mundial se tomó importancia en la valoración de condiciones antropométricas ligadas a la eficiencia física y a la salud; se implementaron las medidas antropométricas, el test de

fuerza, test cardio-vasculares, test de actividad atlética test de habilidades de conocimiento, entre otros. Además de implementarse poco a poco el estudio sistematizado del deporte y su repercusión en la salud, el avance tecnológico comenzó a hacerse presente desde 1883 con la llegada de los primeros ergómetros de manivela (diseñados por Speck). También surgieron eventos médicos especializados en la salud y el deporte como el primer congreso internacional de medicina del deporte que se celebró en St. Moritz en 1928 (Hebbelinck, M. et al., 1984; Jokl, E. et al., 1964; Barbany I. et al., 2002; Consultado en internet: [http://www.bago.com/cardired/Ejercicio\\_salud/Ejercicio\\_salud.asp#INICIO](http://www.bago.com/cardired/Ejercicio_salud/Ejercicio_salud.asp#INICIO))

Durante la segunda mitad del siglo XX una multitud de investigaciones lograron asociar que la actividad física así como el ejercicio incidían directamente en la salud de las personas; Jeremy Morris realizó un estudio entre los empleados públicos de Londres; él observó durante mucho tiempo a los choferes de ómnibus y comparó sus evoluciones médicas con la de los guardas, que vendían los boletos y caminaban permanentemente por el vehículo subiendo y bajando las escaleras. Encontró que los choferes, que estaban siempre sentados, tuvieron un 35% más de infartos de miocardio que los guardas. En Estados Unidos, el Dr. Paffenbarger siguió durante más de treinta años la evolución de los alumnos de la Universidad de Harvard y comprobó que aquellos que seguían realizando ejercicios físicos después de su período de estudiante tuvieron una vida más prolongada, con cerca de un 40% menos de infartos que los ex-alumnos sedentarios (Consultado en internet: [http://www.bago.com/cardired/Ejercicio\\_salud/Ejercicio\\_salud.asp#INICIO](http://www.bago.com/cardired/Ejercicio_salud/Ejercicio_salud.asp#INICIO)).

Con el paso de los años surgieron herramientas mecánicas que aumentaron la eficiencia de la medición de la actividad física; pero no fue sino hasta 1964 que Wasserman y McIlroy (Wasserman D. et al., 1989) asentaron una de las bases teóricas más importantes en el análisis de las medidas de esfuerzo; ellos implementaron el concepto de “tasa de trabajo o consumo máximo de oxígeno” ( $VO_2$  max) con la cual se calcula la acidosis metabólica asociada al intercambio gaseoso; poco después, en 1967, Wasserman redefine el  $VO_2$  como “la intensidad de ejercicio o trabajo físico a partir del cual comienza a aumentar de forma progresiva la concentración de lactato en sangre” (Barbany I. et al., 2002).

La década del 70 fue pródiga en investigaciones sobre los efectos del ejercicio físico en la salud. La Cooper Clinic, de Texas, lideró proyectos de investigación que fueron cambiando los hábitos de millones de personas hacia una vida más activa y promovieron programas de prevención en salud pública donde el ejercicio ocupaba un lugar destacado. Con base en estos estudios que relacionan el ejercicio con la salud así como la medicina con el deporte, en Estados Unidos en este mismo periodo (los años 70's) surgió el término "Kinesiología"; este término se refiere al estudio científico del movimiento del cuerpo humano; un par de años más tarde (1977), surgió otro término "Kinesiogenómica", éste además de englobar el anterior también estudia la genómica implicada en el movimiento del cuerpo humano así como la función y respuesta de los diversos órganos al movimiento de éste. También en los 70's investigadores entre los cuales destacan Vassilis Klissouras, Paavo y Claude Bouchard empezaron a realizar investigación completamente enfocada al deporte y el ejercicio en relación con la genética del ser humano (Wackerhage H. et al., 2009; Consultado en internet: [http://www.bago.com/cardired/Ejercicio\\_salud/Ejercicio\\_salud.asp#INICIO](http://www.bago.com/cardired/Ejercicio_salud/Ejercicio_salud.asp#INICIO); Paterno A. C. 2003; Bouchard C. et al., 1997; Roth S. et al., 2007).

En cuanto a la relación ejercicio – salud, en Argentina entre los años 1989 y 1994, el estudio "Factores de Riesgo Coronario en América del Sur" (FRICAS) pudo demostrar que el nivel de sedentarismo estaba estrechamente relacionado con la incidencia de personas que habían sufrido un infarto de miocardio (Consultado en internet: [http://www.bago.com/cardired/Ejercicio\\_salud/Ejercicio\\_salud.asp#INICIO](http://www.bago.com/cardired/Ejercicio_salud/Ejercicio_salud.asp#INICIO); Paterno A. C. 2003).

La variedad de estudios que establecieron la asociación íntima entre actividad física y salud cardiovascular llevó a la Asociación Americana del Corazón a declarar al sedentarismo como un factor de riesgo mayor para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Se han comprobado también que existen efectos benéficos del ejercicio sobre la conservación de la densidad del tejido óseo y la importancia de ésta en el desarrollo de osteoporosis. Es parte de la medicina del deporte actual el tratamiento de diferentes dolores

articulares y musculares por sesiones especiales de ejercicios, así como una vida activa para prevenir la aparición de este tipo de molestias (Consultado en internet: [http://www.bago.com/cardired/Ejercicio\\_salud/Ejercicio\\_salud.asp#INICIO](http://www.bago.com/cardired/Ejercicio_salud/Ejercicio_salud.asp#INICIO)).

Los estudios de aquéllos años comenzaron a mostrar a nivel genético – molecular el beneficio evidente del ejercicio como agente modulador de la progresión en el desarrollo de patologías; la progresión de la diabetes fue uno de los primeros fenómenos en los cuales se estudió el efecto del ejercicio como agente terapéutico; estudios a finales de los años ochenta y principios de los años noventa como el de Wasserman en 1989 dan los primeros pasos acerca de cómo estímulos de dieta y/o ejercicio provocan señalización molecular distinta a la normal, así como cambios de expresión génica (Solomon P. et al., 2008; Marzetti E. et al., 2008; Leidy H. et al., 2007; Nandean K. et al., 2006; Sousa e Silva T. et al., 2010; Lockard M. et al., 2010; Silva RA. et al., 2010; Yasari S. et al., 2010; Sakurai T. et al., 2008; Lewis G. et al., 2010; Wasserman D. et al., 1989).

También hoy en día se relacionan los trastornos venosos de las piernas con el grado de actividad física; y esta se ha vuelto una de las más importantes y probadas formas de tratamiento. A nivel inmunológico existe una relación positiva entre la eficiencia del sistema inmunológico y la actividad física. Varios estudios epidemiológicos han expuesto la menor prevalencia de diferentes formas de cáncer entre las personas físicamente activas. Por ejemplo existen diversos estudios que concluyen que las mujeres que realizan ejercicios físicos en forma regular tienen menor incidencia de tumores de mama y útero (Consultado en internet: [http://www.bago.com/cardired/Ejercicio\\_salud/Ejercicio\\_salud.asp#INICIO](http://www.bago.com/cardired/Ejercicio_salud/Ejercicio_salud.asp#INICIO)).

Como resultado de estas investigaciones basadas en la relación ejercicio – genes, en 1997 surgió el primer texto escrito por Bouchard (Bouchard et al., 1997) en el cual se explica de manera introductoria lo la relación del ejercicio/deporte con la genética; con este tipo de estudios se comenzaron a aplicar los conocimientos genéticos directamente con el desarrollo de fuerza muscular así como de resistencia en los atletas de alto rendimiento y se reforzaron los ahora muy bien conocidos suplementos alimenticios (Wackerhage H. et al., 2009; Bouchard C. et al., 1997; Roth S. et al., 2007).

Estos estudios empezaron a mostrar que la variación de cualquier ejercicio ya sea en intensidad así como tiempo tienen un efecto directo en la tasa de trabajo o consumo máximo de oxígeno ( $VO_2$  max) y cómo éste se encuentra relacionado en “la capacidad de carga” durante un periodo de entrenamiento. Este tipo de estudios también mostró por primera vez evidencia de que polimorfismos en un gen específico se encuentran asociados a un mayor porcentaje de desarrollo de fibras musculares. Ya para entonces se había establecido ampliamente que la actividad física se encontraba directamente relacionada con el grado de morbidez de un individuo, por lo que se empezaron a establecer protocolos en los cuales se aplicaba un estímulo de ejercicio a pacientes para observar los beneficios del ejercicio y la dieta en el desarrollo de enfermedades (Consultado en internet: [http://www.bago.com/cardired/Ejercicio\\_salud/Ejercicio\\_salud.asp#INICIO](http://www.bago.com/cardired/Ejercicio_salud/Ejercicio_salud.asp#INICIO); humano (Wackerhage H. et al., 2009; Paterno A. C. 2003; Bouchard C. et al., 1997; Roth S. et al., 2007; Barbany I. et al., 2002).

Gracias a todos los estudios realizados en los últimos 40 años (1970 – 2010) ahora se asocia el efecto terapéutico de la dieta y/o el ejercicio con gran número de patologías como son diabetes, obesidad, inflamación exacerbada y/o crónica así como estrés oxidativo, sólo por dar unos cuantos ejemplos (Marzetti E. et al., 2008; Leidy HJ. et al., 2007; Nandean KJ. et al., 2006; Sousa e Silva T. et al., 2010; Silva RA. et al., 2010; Sakurai T. et al., 2008).

Estudios como los de Gleeson (Gleeson et al., 2007) han mostrado que el ejercicio moderado se encuentra asociado con una disminución en la incidencia de infecciones comparado con las personas que no hacen ejercicio; también mostró que el ejercicio intenso causa un efecto inmunodepresor; de manera que se ha encontrado una clara asociación entre el ejercicio y una repercusión en la reacción inmune. Algunos autores como Booth, Craig, Ebbeling, Fischer, Francaux y Gleeson han descrito que dependiendo de la intensidad y la duración del ejercicio se promueve una modulación en la respuesta inmune en general (Booth et al 2010; Craig et al., 2005; Ebbeling et al., 1989; Fischer et al., 2006; Francaux et al., 2009; Gleeson et al., 2007). Se ha estudiado particularmente en los atletas de alto rendimiento el cómo su sistema inmune responde a estímulos de ejercicio. En otros estudios se han observado diversos fenómenos entre los que se

encuentran proliferación linfocítica alterada, presentación de antígenos también alterada y patrones de inflamación distintos (con estímulos de ejercicio intenso se ha visto el incremento de citocinas proinflamatorias y por ende inflamación aumentada; por el contrario bajo estímulos de ejercicio leve se ha observado una disminución en la inflamación respecto al control). Por todo esto se ha concluido que el ejercicio tiene un efecto positivo o negativo en la regulación de la respuesta inmune, dependiendo de la intensidad y el tipo de ejercicio (Gleeson et al., 2007).

### **Sistema Inmunitario Innato**

El sistema inmunitario innato forma la primera línea de defensa de la respuesta inmune; este sistema se activa cuando se detecta un patógeno dentro del organismo, al detectarse la presencia de un patógeno responde rápidamente mediante un mecanismo común frente a cualquier tipo de patógenos, sin importar su naturaleza; la activación de este mecanismo consiste en el reconocimiento de estructuras y/o componentes que son comunes en una gran mayoría de grupos de microorganismos (Janeway et al., 2002). Es importante señalar que el sistema innato no tiene memoria antigénica por lo cual es limitado e incapaz de reconocer particularidades entre sustancias y/o patógenos y no varía la intensidad de su respuesta aunque se repita la infección más de una vez; el sistema inmune innato está constituido por:

1. Barreras físicas y químicas (piel, mucosas, productos antimicrobianos), las cuales impiden la invasión y proliferación de patógenos (agente extraño) y se producen localmente.
2. Proteínas sanguíneas (por ejemplo, las que conforman el sistema del complemento), responsables del proceso de inflamación. El sistema del complemento funciona como un mecanismo amplificador de la respuesta inmune.
3. Sistema fagocitario (neutrófilos, macrófagos), importante sistema efector, fundamental para la respuesta contra bacterias.

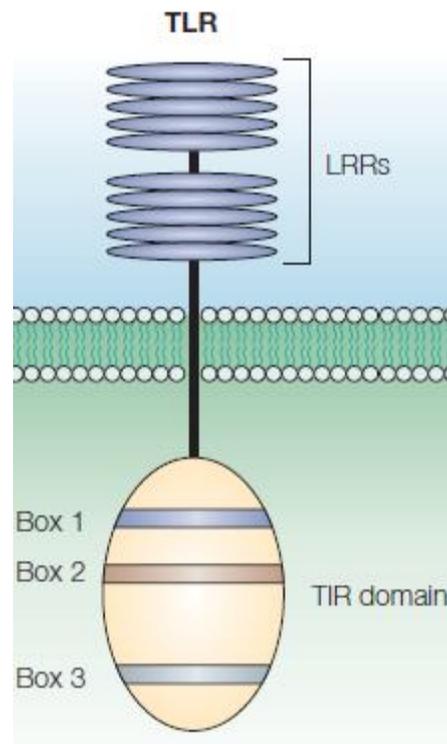
4. Células asesinas o “natural killer” (NK), importantes en la vigilancia inmunológica.
5. Citocinas, regulan y coordinan actividades celulares.

Una pieza clave en la respuesta del sistema innato son los receptores, estos son el mecanismo mediante el cual las células responden y reconocen el antígeno; los más importantes en la respuesta innata son los receptores tipo toll (TLRs) (Janeway et al., 2002).

### **Receptores tipo Toll (TLRs).**

Para que activar el funcionamiento del sistema innato se debe de producir un reconocimiento entre las células y el patógeno; este reconocimiento se inicia mediante la unión del patógeno con receptores pertenecientes a una familia de receptores celulares llamados "Toll" (Toll-like receptors o TLRs por sus siglas en inglés), los cuales se encuentran ubicados tanto en la membrana como en el interior de las células. Los TLRs se encuentran principalmente en mucosas y diversas células repartidas dentro del organismo; la mayoría de éstos se ubican específicamente en la membrana plasmática, la excepción son TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 que se encuentran localizados intracelularmente (Akira et al., 2004, Kawai et al., 2006). Los TLRs logran el reconocimiento detectando, ya sea sustancias secretadas por los microorganismos agresores, o reconociendo estructuras propias de ellos. Los TLRs interactúan con los patógenos dependiendo del tipo o la clase de agente infeccioso, esto se realiza mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs); los PAMPs activan la respuesta inmune innata que es mediada por las células del sistema inmune del hospedero (Cook et al., 2004; Sánchez et al., 2004; Bautista et al., 2005; Lai et al., 2008).

Estructuralmente los TLRs tienen un dominio de 200 aminoácidos altamente conservado en la región citoplásmica conocido como “dominio Toll- Receptor de interleucina 1” (Toll/IL-1R o bien TIR), la denominación “/IL-1” proviene de los miembros de la familia de receptores de interleucina-1 que fueron descritos antes y también cuentan con ese dominio, y por esto se clasifican dentro de la gran superfamilia TIR; este dominio se caracteriza por la presencia de 3 regiones homólogas (conocidas como caja 1, caja 2 y caja 3), que son cruciales en la señalización. Los TLRs cuentan también con una prolongación en la porción extracelular la cual consta de repeticiones en tandem de regiones ricas en leucina (LRRs) (Cook et al., 2004; Akira et al., 2004) (Fig. 1).

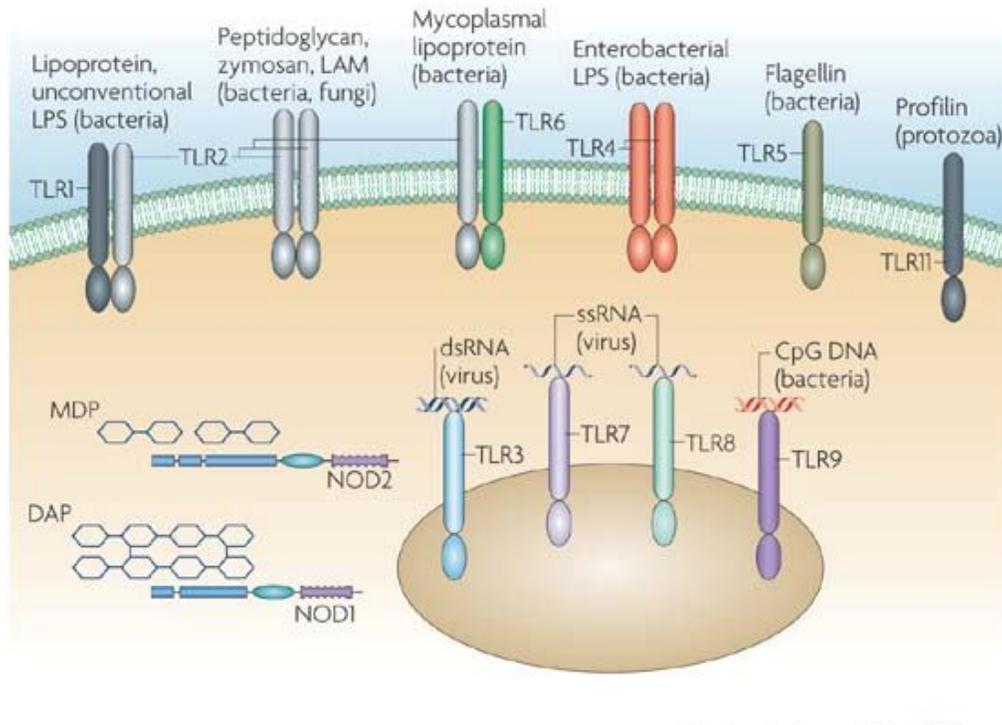


**Figura 1. Estructura básica de los receptores TLRs (tomado parcialmente de Akira et al., 2004).**

Todos los miembros de la superfamilia TIR incluidos los TLRs además de tener un dominio de gran semejanza estructural poseen mecanismos de transducción semejantes con mediadores secundarios comunes. Los TLRs se catalogan por número dependiendo del tipo

de sustancia y/u organismo que reconocen; son responsables del reconocimiento y activación de respuestas a productos microbianos tales como lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicano, flagelina y motivos de ADN bacterianos de tipo CpG. En distintos TLR se producen diversos patrones de expresión. Algunos actúan como homodímeros, aunque también pueden actuar en forma de heterodímeros (Akira et al., 2004; Bautista et al., 2005).

La eficiencia de los TLRs hacia patógenos se debe a que reconocen moléculas importantes para la supervivencia de las bacterias (generalmente son sustancias ampliamente conservadas y constitutivas del patógeno), virus, hongos y parásitos (Fig. 2 y tabla 1).



**Figura 2. Receptores TLR y sus ligandos en humano (tomado de Kaufmann et al., 2007).**

Actualmente se han descrito trece tipos diferentes de TLRs; de TLR1 a TLR10 se encuentran tanto en humano como en el ratón; TLR11, TLR11/12 y TLR13 sólo se han descrito en ratón aunque se propone que TLR10 es un pseudogene (Kawai et. al 2006). Prácticamente los 13 TLRs que se conocen (Figura 2) brindan protección al organismo contra la mayoría de los patógenos. El amplio rango de reconocimiento que tienen los TLRs se debe también a la habilidad que tienen de formar heterodímeros entre diferentes

clases de TLR; por ejemplo el dímero TLR2-TLR6 reconoce y responde a las lipoproteínas diacetiladas mientras que cada receptor solo tiene una actividad distinta; otro ejemplo es el dímero TLR2-TLR1, el cual reconoce las lipoproteínas triacetiladas (Kawai et al., 2006).

| Receptor | Ligando   | Origen del ligando               |
|----------|---|----------------------------------|
| TLR1     | Triacyl lipopéptidos  | Bacteria y mycobacteria          |
|          | Factores solubles   | <i>Neisseria meningitidis</i>    |
| TLR2     | Lipoprotein/lipopéptidos  | Diversos patógenos               |
|          | Peptidoglicanos   | Bacterias gram positivas         |
|          | Acido lipotenoico   | Bacterias gram positivas         |
|          | Lipoarabinomanano   | Mycobacteria                     |
|          | Fenol-soluble modulina  | <i>Staphylococcus epidemidis</i> |
|          | Glicoinositolfosfolipidos   | <i>Trypanosoma cruzi</i>         |
|          | Glucolípidos  | <i>Treponema maltophilum</i>     |
|          | Porinas   | <i>Neisseria</i>                 |
|          | Lipopolisacáridos atípicos  | <i>Leptospira interrogans</i>    |
|          | Lipopolisacáridos atípicos  | <i>Porphyromonas gingivalis</i>  |
| Zymosan  | Hongos  |                                  |
| HSP70    | Huesped   |                                  |
| TLR3     | RNA de doble cadena   | Virus                            |
| TLR4     | Lipopolisacáridos   |                                  |
|          | Lipopolisacáridos atípicos  | Bacterias gram negativas         |
|          | Taxol   | Plantas                          |
|          | Proteínas de fusión   | Virus sincicial respiratorio     |
|          | Proteínas de cubierta   | Virus tumor-mamario en ratón     |
|          | HSP60   | <i>Chlamydia pneumoniae</i>      |
| HSP70    | Origen de el ligando huésped  |                                  |
|          | Secuencias repetidas del extra dominio A de fibronectina del tipo 3 | Huésped                          |
| TLR5     | Flagelina   | Bacterias                        |
| TLR6     | Diacil lipopéptidos   | <i>Mycoplasma</i>                |
|          | Acido lipotenoico   | Bacterias gram positivas         |
|          | Zymosan   | Hongos                           |

**Tabla 1. Los receptores TLR su reconocimiento y su ligando (tomado parcialmente de Akira et. al 2004 y de Kawai et al., 2006).**

| Receptor | Ligando                | Origen del ligando     |
|----------|------------------------|------------------------|
| TLR7     | Imidazoquinolina       | Compuestos sintéticos  |
|          | Loxoriina              | Compuestos sintéticos  |
|          | Bropirimina            | Compuestos sintéticos  |
|          | RNA de cadena sencilla | Virus                  |
| TLR8     | Imidazoquinolina       | Compuestos sintéticos  |
|          | RNA de cadena sencilla | Virus                  |
| TLR9     | CpG contenido en DNA   | Bacteria y virus       |
| TLR10    | No descrito            | No descrito            |
| TLR11    | No descrito            | Bacteria uropatogénica |

**Tabla 1 (continuación).**

Los TLRs se encuentran principalmente en células epiteliales del intestino, linfocitos que se encuentran entre las células epiteliales, células del mesénquima subepitelial, macrófagos y células dendríticas (Cook et al., 2004). El descubrimiento de los TLRs comenzó cuando un grupo alemán descubrió unos receptores en la mosca *Drosophila*, este grupo observó que funcionaban como un método de defensa contra las infecciones por hongos y los llamó receptores Toll. Más tarde, en el año 1997, R. Medzhitov y C. Janeway de la Universidad de Yale reconocieron unos receptores similares pero esta vez en humanos y los llamaron receptores tipo Toll (TLRs) (Janeway et al., 2002).

El Doctor Shizuo Akira de la Universidad de Osaka en Japón, trabajando con ratas genéticamente modificadas pudo demostrar que si se bloquea alguna de las señales proteicas intermedias (citocinas) en la señalización de los TLRs, el TLR no tiene respuesta a la detección del producto microbiano o patógeno en cuestión, lo que sugiere que las proteínas asociadas al TLR podrían ser un buen blanco para buscar terapias antiinflamatorias o inmunoreguladoras (Akira et. al 2004).

La maduración de las células dendríticas (DCs) también conocidas como células presentadoras de antígeno profesionales, puede o no ser dependiente de la activación de los TLRs.

Estudios con varios TLRs demuestran que éstos activan la vía del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), este factor de transcripción regula la expresión de citocinas a través de varias moléculas incluyendo la proteína de diferenciación mieloide 88 (MyD88), el adaptador de dominio contenedor de la proteína TIR (TIRAP/Mai) y el adaptador del contenedor de dominio de TIR inducido por IFN $\beta$  (TRIF). La activación de la vía del NF- $\kappa$ B conduce a la iniciación de la respuesta adaptativa inmune por la producción de citocinas inflamatorias tales como la interleucina 1 y 8 (IL-1, IL-8), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , IL-12), y la inducción de moléculas de coestimulación, tales como la CD80, CD86 y CD40 (Akira et. al., 2004).

Gracias a los conocimientos actuales que se tienen sobre la señalización, se puede manipular parcialmente las respuestas dependientes de los TLRs y así bloquear un poco los estragos generados por enfermedades autoinmunes o dependientes de una señalización defectuosa de los TLRs. El reconocimiento que logran los TLRs es muy variado y se da mediante alguno de los 13 TLRs que se conocen (Akira et. al., 2004; Takeda et al., 2003):

**TLR1:** Cuando TLR1 coopera con TLR2 ambos se unen a peptidoglicanos bacterianos; lipopéptidos y lipoproteínas de bacterias gram positivas así como a lipopéptidos micoplasmáticos; TLR1 reconoce la lipoproteína de la superficie externa (OspA) de la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*.

**TLR2:** Fundamental para el reconocimiento de una variedad de PAMPs, entre los que destacan las lipoproteínas microbianas (por ejemplo el ácido lipoico); los lipopéptidos bacterianos, los peptidoglicanos (PGNs). TLR2 se asocia también con TLR1 para formar heterodímeros, aunque no se conoce el ligando para el par TLR2/TLR1; esta unión provoca la activación de señales intracelulares, principalmente hacia la transferencia de un factor de transcripción, el  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B).

**TLR3:** Reconoce el ácido ribonucleico (RNA) de doble cadena (dsRNA) viral; en humanos TLR3 se expresa únicamente en células dendríticas mieloideas.

**TLR4:** Fue el primer receptor conocido; induce genes de varias citocinas inflamatorias y de varias moléculas de estimulación, reconoce lipopolisacáridos (LPS), los cuales son glicolípidos que se encuentran específicamente en las paredes celulares de las bacterias gram-negativas. Se ha visto que el TLR4 reconoce algunas proteínas de choque térmico (HSPs) entre las cuales figura la proteína de choque térmico 60 (HSP60); también se sabe que la activación de células dendríticas por ácido hialurónico está mediada por TLR4; también tiene la capacidad de reconocer fibrinógenos los cuales inducen la producción de quimiocinas (mediada por patógenos).

**TLR5:** Reconoce la flagelina la cual es la proteína que conforma los cilios de las bacterias; se identificó inicialmente la interacción con la bacteria *Listeria monocytogenes*.

**TLR6:** Se une al zymosan producido por los hongos, reconoce peptidoglicanos bacterianos; también se asocian con los TLR2, y mediante esta unión reconoce lipopéptidos micoplasmáticos y lipoproteínas diacetiladas.

**TLR7:** Se une a una sola hebra del RNA viral por ejemplo la cadena sencilla resultante del virus de inmunodeficiencia humana del tipo 1 (VIH-1). TLR7 también reconoce el virus de la estomatitis vesicular (VSV) y el virus de la influenza; además reconoce ciertos RNAs pequeños de interferencia (siRNAs); las imidazoquinolinas (producto sintético); y algunos análogos de guanosina como es el caso de loxoribina y bropirimina.

**TLR8:** Se une también a RNA viral de cadena sencilla y también reconoce las imidazoquinolinas

**TLR9:** Se une al CpG DNA no metilado que se encuentra en bacterias y virus también reconoce el pigmento de la malaria, la hemozoina.

**TLR10:** Está filogenéticamente relacionado con el TLR1 y TLR6. Se desconoce cuál es el ligando de este receptor que se expresa preferentemente en linfocitos B de tejidos inmunitarios, como bazo, nódulos linfáticos y timo.

**TLR11:** Reconoce componentes de bacterias uropatógenas y también una la molécula del tipo “profilin-like” que se encuentra en un protozooario parásito, el *Toxoplasma gondii*.

#### Interacción TLRs con los patógenos (mecánica del proceso)

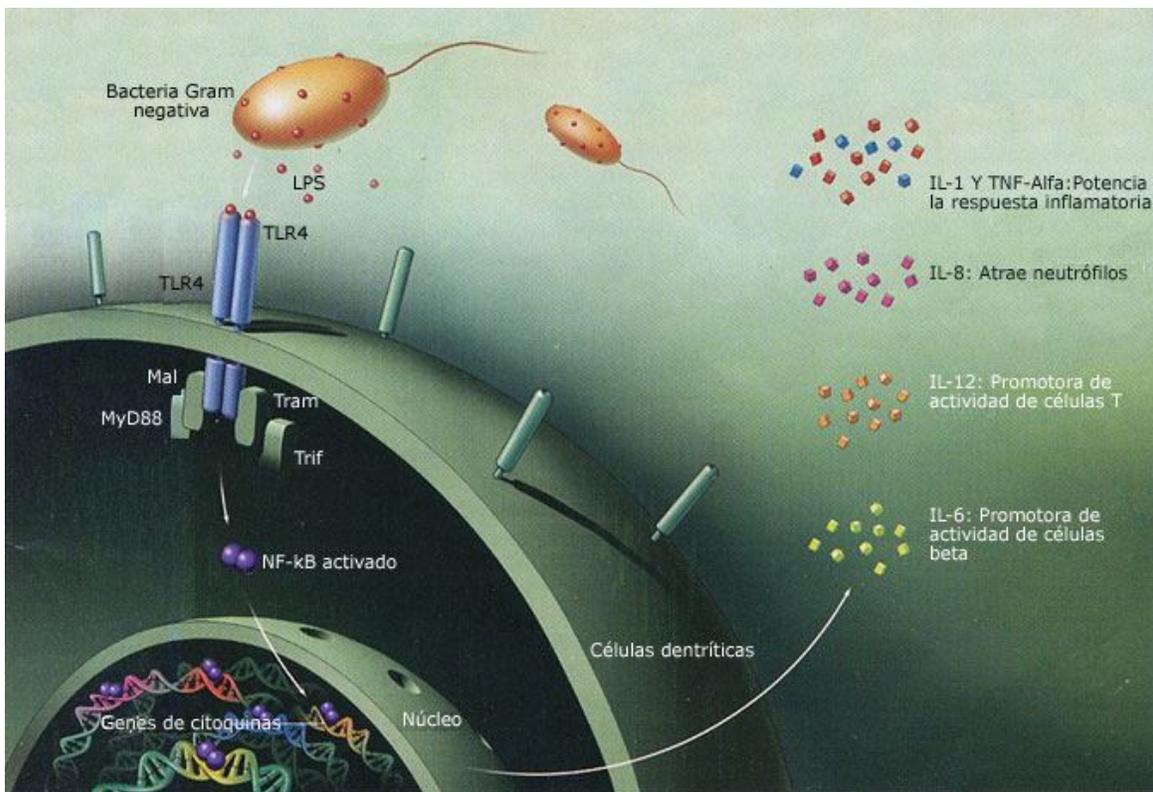
La mecánica que se desencadena cuando los TLRs, ubicados en la superficie de las células patrulleras, (dendríticas y macrófagos), reconocen al agresor (Takeda et al., 2003; Bautista et al., 2005) es la siguiente:

- Se pone en marcha en el interior celular todo un mecanismo de ataque en el cual se comienzan a producir una gama de citocinas (proteínas mensajeras y de señalización).
- Las citocinas son secretadas al torrente circulatorio, éstas a su vez reclutan más macrófagos así como más células dendríticas, además de otras células inmunológicas; todo este agregado celular forma un conjunto extremadamente eficiente que ataca al microorganismo o patógeno en cuestión.
- Al mismo tiempo que estas citocinas están siendo liberadas por las células antes mencionadas todo el conjunto de procesos antes descritos produce los síntomas clásicos de infección entre los cuales se incluyen la fiebre y síntomas característicos de resfriado; estos síntomas son inducidos por acción del factor activador de los linfocitos (LAF), la interleucina-1 (IL-1) producida por los monocitos y los macrófagos preferentemente; aunque también se incluyen las células endoteliales vasculares y las células mesangiales renales. La interleucina (IL-1) se une sus receptores específicos en el hipotálamo anterior donde estimula la síntesis local de prostaglandinas, siendo la E la responsable principal de la elevación térmica.

Posterior al ataque producido por el sistema inmune los macrófagos y las células dendríticas que han destruido al patógeno, presentan componentes de él en su superficie, indicando que está presente un agente causal de enfermedad, lo cual activa a los linfocitos

B y los linfocitos T (componentes importantes en la respuesta del sistema inmune adaptativo), y estos inician el ataque contra invasor de manera específica (Bautista et al., 2005; Abbas et al., 2007).

Es importante recalcar que gracias a la señalización promovida por los TLRs, los linfocitos B y los linfocitos T llegan a comprometerse o reclutarse; sin esta interacción el organismo es incapaz de desarrollar la respuesta total, además de que tampoco tendría la capacidad de generar memoria contra las infecciones (Figura 3) (Bautista et al., 2005; Abbas et al., 2007; O'Neill L. et al., 2005).



**Figura 3. Unión de un patógeno a los TLRs y producción de citocinas como respuesta (cascadas de señalización) (O'Neill L. et al., 2005).**

### Señalización

La especificidad de los TLRs se ve fuertemente influenciada por varias proteínas adaptadoras como MD-2 y CD-14 las cuales llegan a formar un complejo con el TLR4 en

respuesta a los LPS (Akira et. al., 2004; Kawai et al., 2006).

La señalización de los TLRs consiste al menos en dos diferentes caminos; uno MyD88 dependiente que finaliza en la producción de citocinas proinflamatorias y uno MyD88 independiente el cual está asociado con la estimulación de IFN- $\beta$  y la maduración de células dendríticas (componentes de memoria por parte del sistema adaptativo) (Akira et. al., 2004).

La señalización dependiente de MyD88 es un camino común para todos los TLRs (Akira et. al., 2004; Kawai et al., 2006) y se da de la siguiente manera: generalmente los TLRs reclutan a la proteína adaptadora MyD88 vía la TIR; posteriormente ésta activa a IRAK-1 por fosforilación. Mientras se mantiene el complejo MYD88-TLR, IRAK-1 se asocia temporalmente con el “factor 6 asociado al receptor de necrosis tumoral” (TRAF6); mediante esta última asociación se da la activación de NF- $\kappa$ B que a su vez induce la producción de proteínas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-1 y IL-12 (Akira et. al., 2004; Kawai et al., 2006).

#### Señalización a detalle...

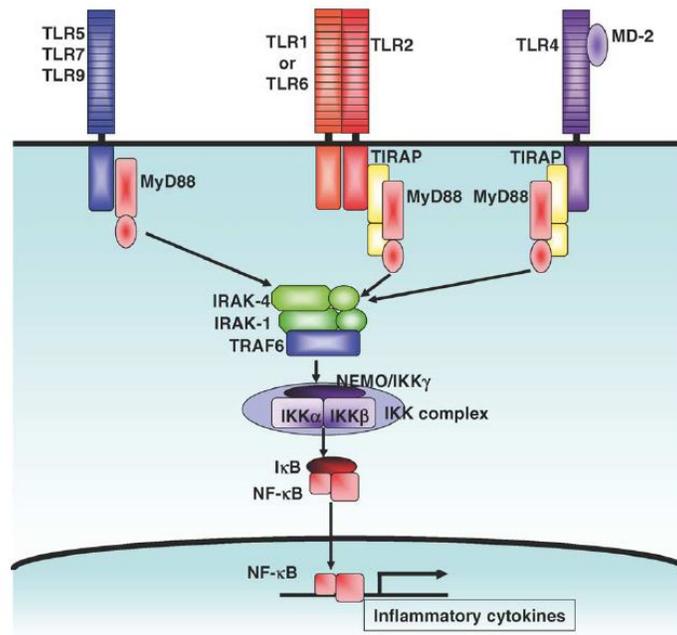
La señalización intracelular (figura 4) se inicia con la unión del dominio intracelular de los TLRs, llamado “dominio Toll- receptor de interleucina 1” (TIR) a una cinasa asociada, la cinasa asociada al receptor de IL1 (IRAK); este proceso requiere dos proteínas de adaptación, la proteína de diferenciación mieloide 88 (MyD88) y el adaptador de dominio contenedor de la proteína TIR (TIRAP), llamada también proteína del tipo adaptadora de MyD88 (Mai) (Akira et. al., 2004; Kawai et al., 2006). El proceso de señalización intracelular puede inhibirse por una la unión de una tercera proteína llamada proteína intercalante de Toll (Tollip) (Akira et. al., 2004; Kawai et al., 2006).

Posterior a la unión MyD88 - TIRAP se produce un proceso de fosforilación y se da una asociación con la proteína IRAK4; ésta se asocia nuevamente con el “factor 6 asociado al receptor de necrosis tumoral” (TRAF6). Esta unión activa, mediante ubiquitinación a una

cinasa perteneciente a la familia de las cinasas, la proteína activada por mitógeno 3 cinasa (MAP3K), la “cinasa activada vía TLR1 por factor de crecimiento tumoral beta” (TAK1); posteriormente mediante una fosforilación TAK1 activa el “complejo inhibidor de cinasa KB” (IKK) el cual libera sus dímeros  $IKK\alpha$  e  $IKK\beta$ . Posterior a la liberación de sus dímeros se da una fosforilación lo cual transforma uno de los dímeros IKK a  $I\kappa B$ ; este se une a un complejo dimérico de NF- $\kappa B$  y provoca una proteólisis la cual libera las moléculas NF- $\kappa B$  y con esto se hacen activos. Estos últimos se traslocan al núcleo donde se hacen activos; promoviéndose transcripción y traducción de un RNAm cuyo producto traduce a su vez la producción de citocinas y otras moléculas efectoras como TNF- $\alpha$ , IL-1 y IL-12 o IFN $\beta$  (Akira et. al., 2004; Kawai et al., 2006; Takeda et. al., 2004).

Los LPS bacterianos por sí solos son capaces de activar la vía NF $\kappa B$  y las MAPKs.

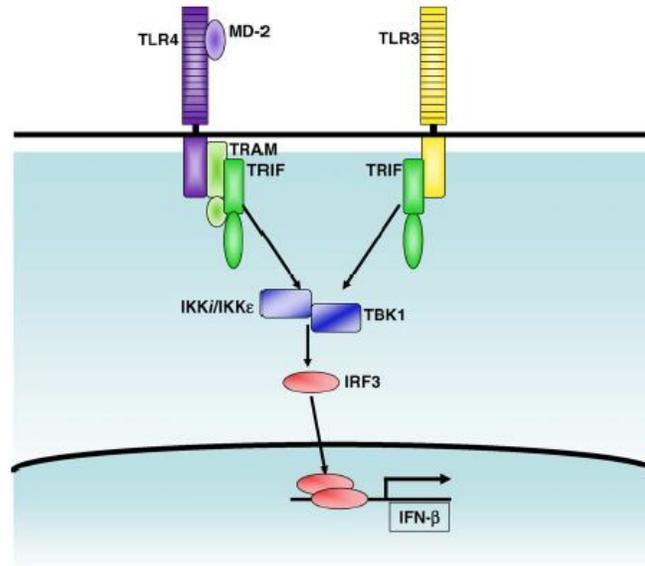
La señalización independiente de MyD88 se da de la siguiente manera (figura 5):



**Figura 4. Vía de señalización dependiente de la proteína adaptadora MyD88 (tomado de Takeda et. al., 2004).**

LPS hace contacto los receptores TLR4 o TLR3 de macrófagos o CD y esto provoca la activación de la molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM); TRAM a su vez se une con TRIF, se une a un complejo atípico (trímero) de IKKs formando  $IKKi/IKK\epsilon$  y TBK1.

Esta unión promueve la activación del factor 3 regulador del interferon (IRF-3) el cual se trasloca al núcleo y promueve la transcripción, traducción y producción de citocinas y otras moléculas efectoras principalmente IFN $\beta$  (Akira et. al., 2004; Takeda et. al., 2004).



**Figura 5. Vía de señalización independiente de la proteína adaptadora MyD88; inducida generalmente por LPS (tomado de Takeda et. al., 2004).**

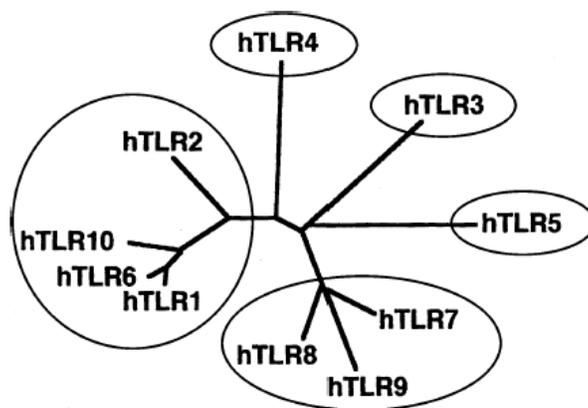
### Localización cromosómica.

La localización cromosómica de los genes que codifican para los TLRs (Takeda et al., 2003) en humano es:

- TLR1 y TLR6 se encuentran en 4p14.
- TLR2 y TLR3 se encuentran entre 4q32 y 4q35 respectivamente.
- TLR4 y TLR5 se encuentran entre 9q32-33 y 1q33.3 respectivamente.
- TLR7 y TLR8 se encuentran localizados en tándem en Xp22.
- TLR9 se encuentra localizado en 3p21.3

Los TLRs se caracterizan estructuralmente por la presencia de un segmento repetido rico en leucinas (LRR) en el dominio extracelular y un dominio del tipo “TIR” en la región extracelular (Takeda et al., 2003)

TLR1 y TLR6 tienen estructuras genómicas muy similares y se diferencian por un exón ubicado en forma de tándem en el mismo cromosoma; tal vez uno de ellos es producto de una duplicación a lo largo de la evolución (Takeda et al., 2003) (figura 6).



**Figura 6.** Árbol filogenético humano de los TLRs; este árbol fue construido por alineamiento de secuencias de aminoácidos usando el método de similitud (tomado de Takeda et al., 2003).

Como se mencionó anteriormente, la unión de patógenos a TLRs promueve que se dispare una compleja señalización intracelular; como producto de esta señalización las células secretan una amplia variedad de citocinas (Akira et. al., 2004; Kawai et al., 2006).

### **Antecedentes de los TLRs en ejercicio y dieta.**

En los últimos años se ha descrito que estímulos de ejercicio ocasionan un descenso en la expresión de algunos TLRs en células presentadoras de antígenos (APCs) como son monocitos; la sobreexpresión de los TLRs está asociado con una alta expresión de citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$  e IL10 entre otras; de esta premisa se ha partido para proponer que el ejercicio cumple una función benéfica ya que evita la inflamación asociada a patologías como son obesidad y enfermedades cardiovasculares entre otras. En el año 2005 Lancaster y su equipo (Lancaster G. et al., 2005) fueron los primeros en reportar una disminución en la expresión génica de TLR4 en monocitos (CD14+) mediante ensayos de citometría de flujo (FACS) en humanos; observó este fenómeno como resultado de un estímulo de ejercicio moderado (al 55% del rango máximo de trabajo o RMT) en bicicleta

tras un período de 1.5 horas; sus análisis fueron realizados analizando monocitos CD14<sup>+</sup> provenientes de sangre periférica (Lancaster G. et al., 2005).

Simpson y colaboradores en el año 2008 (Simpson R. et al., 2009) llevaron a cabo un estudio en el cual los pacientes estaban sujetos a un ejercicio aeróbico (70 % de la tasa de trabajo o consumo máximo de oxígeno VO<sub>2</sub> max); este estudio esclareció una polémica que existía acerca de si los estímulos de ejercicio ocasionaban o no una excesiva migración de monocitos; la polémica radicaba en que la excesiva migración de monocitos provocaba una sobreexpresión de citocinas proinflamatorias y con esto surgía una controversia de cómo el ejercicio provocaba una subexpresión de citocinas proinflamatorias vía TLRs. Simpson y colaboradores describieron que existen varios subtipos de monocitos y que el estímulo de ejercicio que el empleo en su estudio provocan una migración diferenciada de estos subtipos, encontraron que de esta migración únicamente entre el 10% al 20% de monocitos correspondían a monocitos CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>; ya se sabía que sólo los monocitos CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> generan citocinas proinflamatorias. (Simpson R. et al., 2009; Belge K. et al., 2002; Hong S. et al., 2008).

Por otro lado y con fines de investigación, este tipo de ensayos se han realizado en modelos animales mostrando resultados importantes. Zwagerman y colaboradores en el año 2010 describieron que un estímulo de 30 minutos de ejercicio (carrera, estímulo de ejercicio moderado provocaba la subexpresión del TLR4 en ratas Sprague Dawley, asoció esta subexpresión a la disminución de citocinas proinflamatorias a nivel cerebral, con esto se demostró que este estímulo de ejercicio confería neuroprotección debido a que la inflamación exacerbada a nivel cerebral ocasiona isquemia; de esta manera se concluyó que el ejercicio previene la isquemia vía TLR4 ya que la activación de este receptor promueve la expresión de citocinas proinflamatorias (Zwagerman et al., 2010; Bruunsgaard H et al., 2003; Alexopoulou L. et al 2002; McFarlin B. et al., 2006; Gleeson M. et al., 2006; Konat G., et al 2006; Cao C. et al., 2007). Gollisch y colaboradores en el 2009 realizaron un estudio en ratas para observar la expresión de moléculas proinflamatorias (IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1Ra) en tejido adiposo visceral y subcutáneo, sometieron a las ratas a un entrenamiento de ejercicio, pero además se implementaron dos dietas una normal y una elevada en grasa; en

este estudio se observó cómo se incrementaba el número y tamaño de adipocitos en tejidos adiposo subcutáneo y visceral cuando se implementaba la dieta alta en grasa; y que bajo entrenamiento las ratas con dieta alta en grasa presentaban un tamaño menor de adipocitos en los tejidos adiposos antes referidos comparados con el grupo con dieta alta en grasa y sin ejercicio. Por otro lado se observó que TNF $\alpha$  se disparaba con la dieta alta en grasa; sin embargo también se observó que las ratas entrenadas con el estímulo de ejercicio tenían una menor expresión de esta citocina comparada con la expresión que se daba en ratas con la dieta alta en grasa pero sin ejercicio (Gollisch K. et al., 2009).

En otro estudio realizado con ratones, Davis y colaboradores (Davis J. et al., 2010), además de utilizar 3 tipos de dietas (una normal, una alta en grasa y una baja en grasa) introdujo ratones nocaout para TLR2 (TLR2 $^{-/-}$ ) para observar la importancia de la expresión génica de TLR4 en la inflamación respecto a TLR2, encontró que la falta de TLR2 potenciaba el incremento de tamaño en los adipocitos (TLR2 $^{-/-}$ ) sin embargo confería protección contra la secreción de citocinas proinflamatorias en comparación de los ratones TLR2 $^{+/+}$  con las mismas condiciones de dieta (Davis J. et al., 2010).

Respecto a TLR9 se sabe que su expresión es promovida por CpG de DNA no metilado que se encuentra en bacterias y virus, sin embargo se ha observado que también se expresa ligándose a DNA desnaturalizado proveniente de células apoptóticas en forma de ligando endógeno y éste a su vez induce la producción de interleucina 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ). Esta citocina es un importante mediador de la respuesta inflamatoria, y está involucrada en una diversidad de procesos celulares incluyendo la proliferación celular, diferenciación y apoptosis.

### **Citocinas.**

Son proteínas de bajo peso molecular que regulan la función de las células que las producen u otros tipos celulares. Son los agentes responsables de gran parte de la comunicación intercelular, inducen la activación de receptores específicos de membrana, intervienen en funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación

de la secreción de inmunoglobulinas. Son producidas, fundamentalmente por los linfocitos y los macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por leucocitos polinucleares, células endoteliales, epiteliales y del tejido conjuntivo. Según la célula que las produzca se denominan linfocinas (linfocito), monocinas (monocitos) o interleucinas (células hematopoyéticas). Su acción fundamental es en la regulación del mecanismo de la inflamación. Hay citocinas pro-inflamatorias y otras anti-inflamatorias (Abbas et al., 2007; Zhang et al., 2008; Xagorari et al., 2008)

Cada citocina se une a un receptor de superficie celular específico generando cascadas de señalización celular que alteran la función celular. Esto incluye la regulación positiva o negativa de diversos genes y sus factores de transcripción, que resultan en la producción de otras citocinas, o un aumento en el número de receptores de superficie para otras moléculas, o la supresión de su propio efecto mediante retroregulación (Abbas et al., 2007; Zhang et al., 2008; Xagorari et al., 2008). La sobreestimulación de las citocinas puede disparar un síndrome peligroso llamado tormenta de citocinas (Gogishvili et al., 2009).

Las citocinas se caracterizan por su redundancia: muchas citocinas distintas comparten funciones similares. Además, las citocinas son pleiotrópicas, es decir actúan sobre muchos tipos celulares diferentes y una célula puede expresar receptores para más de una citocina. Hacer una generalización de sus efectos es prácticamente imposible, sin embargo hay algunas que están caracterizadas típicamente por sus funciones. De acuerdo con sus funciones se clasifican en:

- Autócrinas, cuando la citocinas actúa sobre la célula que la secreta.

- Parácrinas, cuando la acción se restringe al entorno inmediato del lugar de secreción.
- Endocrinas, cuando la citocina llega a regiones distantes del organismo (mediante sangre o plasma) para actuar sobre diferentes tejidos.

Se clasifican también en 4 grupos funcionales de acuerdo al sitio o fase específica de la respuesta inmune en la que actúa:

- Citocinas proinflamatorias, actúan en la respuesta inmune innata, inespecífica o inflamación.
- Citocinas que favorecen el desarrollo de inmunidad celular y/o citotóxica.
- Citocinas que favorecen la producción de las diversas clases de inmunoglobulinas o Inmunidad Humoral.
- Citocinas con funciones extra-inmunológicas y/o homeostáticas.

Las citocinas que se unen a linfocitos B o a células plasmáticas promueven un efecto inmune más fuerte que el que tienen solas. Esto puede redundar en menores dosis terapéuticas y tal vez en menos efectos colaterales. Entre los diversos tipos de citocinas se incluyen: factores de crecimiento celular, monocinas, las sintetizadas por macrófagos; las linfocinas, las de origen linfocitario y muchas otras proteínas producidas por otros tipos celulares, como las células endoteliales o los fibroblastos (Abbas et al., 2007; Zhang et al., 2008; Xagorari et al., 2008).

#### Las citocinas en el proceso de inflamación.

Las principales citocinas que actúan en la respuesta inespecífica o inflamación son: Interleucina 1 (IL-1), Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8 y quimiocinas), Interleucina 12 (IL-12), Interleucina 16 (IL-16), e interferones, todas ellas son proinflamatorias. IL-6 e IL-12, además, actúan en la inmunidad específica, IL-6 es un factor autócrino de linfocitos B7 mientras que IL-12 estimula la inmunidad celular citotóxica (Abbas et al., 2007; Zhang et al., 2008; Takeda et al., 2003).

Diversos autores mencionan la relación que existe entre los estímulos de ejercicio, ya sean ligero, intenso o por periodos largos de tiempo con la expresión de diversas citocinas, una de las citocinas más mencionadas es IL1 $\beta$ ; Lira y colaboradores (Lira et al., 2009) por ejemplo mencionan que en tejido adiposo retroperitoneal en ratas Wistar macho se observa una subexpresión de IL1 $\beta$  bajo un estímulo de ejercicio intenso comparadas con las ratas control (sin ejercicio), también observó un cambio de expresión de IL1 $\beta$  en tejido adiposo mesentérico en las mismas ratas pero en ese caso el grupo de ejercicio intenso mostraba una expresión a la alza comparado con el control (Lira et al., 2009). En otro estudio Gómez-Merino, también observó una subexpresión de IL1 $\beta$  en un grupo ratas bajo el estímulo de ejercicio moderado comparado contra su grupo control (Gomez-Merino et al., 2007); Flynn encontró una conducta de expresión de IL1 $\beta$  similar (a la alza) a la que observó Lira bajo un estímulo de ejercicio intenso, pero la particularidad del estudio de Flynn es que él detectó este comportamiento de expresión en monocitos de sangre venosa de mujeres adultas de edad avanzada (de 65 a 85 años) (Flynn et al., 2003).

### **Planteamiento del problema y justificación.**

La obesidad es un enorme problema en la población mundial y México ocupa el primer lugar de obesidad en el mundo; debido a esto los científicos se han dado a la tarea de encontrar marcadores moleculares más precisos para caracterizar molecularmente esta enfermedad compleja; antes de aplicar los nuevos conocimientos a la población abierta siempre se han realizado los primeros estudios en roedores u otro modelo animal.

Entre las patologías vinculadas con la obesidad una de las más importantes es el hígado graso; esta patología se caracteriza por una serie de síntomas como son: acumulación excesiva de grasa en el hígado por el incremento de depósito de ácidos grasos libres (triglicéridos y colesterol), decremento en la oxidación de los ácidos grasos libres, daño

celular, inflamación y fibrosis (Fisher et al., 2009; Reynaert & Geerts et al., 2005; Tilg et al., 2010, Buqué X. et al., 2008). Las ratas Sprague Dawley son uno de los modelos animales más usados para el estudio del hígado graso; y una de las citocinas proinflamatorias más importantes en el desarrollo de hígado graso es IL1 $\beta$ .

La literatura más reciente sugiere que cambios sutiles de expresión génica son ocasionados por dieta, por estímulos de ejercicio o por ambos (Solomon P. et al., 2008; Marzetti E. et al., 2008; Leidy H. et al., 2007; Nandea K. et al., 2006; Sousa e Silva T. et al., 2010; Lockard M. et al., 2010; Silva R. et al., 2010; Yasari S. et al., 2010; Sakurai T. et al., 2008; Lewis G. et al., 2010); sin embargo nunca se ha postulado que los cambios de expresión génica de TLR4, TLR9 e IL1 $\beta$  estén tan directamente ligados con estímulos de dieta y/o ejercicio; en este escrito proponemos que los cambios de expresión génica de TLR4, TLR9 e IL1 $\beta$  se encuentran directamente ligados con estos estímulos y probablemente interrelacionados entre sí.

Existen numerosos trabajos que muestran que estímulos de dieta y ejercicio promueven una expresión génica diferencial tanto en humanos como en roedores; Gleeson en el 2006 (Gleeson M. et al., 2006) observó subexpresión génica de TLR1, TLR2, TLR4 en la superficie de monocitos CD14+ provenientes de sangre periférica de humanos bajo estímulos de ejercicio moderado (60% de VO<sub>2</sub> max) comparado con el grupo control; Flynn en el 2003 (Flynn M. et al., 2003) observó subexpresión génica de TLR4 en células CD14+ de sangre venosa de mujeres de edad avanzada bajo el estímulo de moderado (estiramiento de flexión de piernas y brazos entre otros); Gollisch en el 2009 (Gollisch et al., 2009)

encontró un incremento de expresión génica de las citocinas proinflamatorias TNF $\alpha$ , IL1 e IL6 en tejido adiposo subcutáneo de Sprague Dawley como respuesta al estímulo de ejercicio (“carrera en rueda mecánica rotatoria”) y una dieta alta en grasa. Davis en el 2008 (Davis et al., 2008) probó que dietas con diferentes niveles de grasa (alta en grasa y dieta baja en grasa) activan TLR4 en tejido adiposo de ratas C57BL/10ScN de manera distinta; las dietas altas en grasa promueven la sobreexpresión génica de TLR4 comparados con las dietas bajas en grasa. Vieira en su estudio del 2009 (Vieira et al., 2009) notó subexpresión génica de citocinas proinflamatorias provenientes de tejido adiposos epididimal y retroperitoneal de ratones machos C57BL/6 que habían sido sometidos a varios estímulos de dieta, así como un estímulo de ejercicio moderado (carrera en banda motorizada); en este estudio notó que el estímulo de ejercicio moderado sin dieta reducía de manera más importante la secreción de citocinas proinflamatorias que los diversos estímulos de dieta de manera aislada. Zanchi (Zanchi et al., 2010) observó subexpresión génica de TLR4 en RNA total proveniente de músculo plantar de ratas Wistar hembras de 3 meses de edad bajo el estímulo de ejercicio de resistencia (4 horas a intensidad moderada) mediante la técnica de PCR tiempo real. Gómez-Merino en el 2007 (Gomez-Merino et al., 2007) detectó subexpresión génica de IL1 $\beta$  en tejido adiposo visceral de ratas Wistar bajo el estímulo de ejercicio moderado.

Todos los antecedentes comentados indican una clara expresión génica diferencial como respuesta ya sea a la dieta o a distintos estímulos de ejercicio; lo importante a destacar es que estos antecedentes sugieren que algunas moléculas, por ejemplo TLR4 pueden empezar a ser considerados como biomarcadores en patologías como obesidad e hígado graso; ya

que se sabe que su expresión se presenta de manera diferencial dependiendo del grado de progresión de estas enfermedades.

Respecto a los órganos implicados en el desarrollo de patologías, está descrito que el músculo esquelético es un órgano que produce y libera citocinas (miocinas); la producción y liberación de las miocinas se da como respuesta a la contracción muscular y éstas pueden influir en el metabolismo de otros tejidos (Pedersen B. et al., 2010). Este mecanismo es parte de un sistema dinámico que tiene como función la comunicación y homeostasis del tejido muscular con los demás órganos. Diversos estudios han demostrado que la producción de las miocinas (entre estas  $IL1\beta$ ) resultantes de la contracción muscular presenta un incremento considerable durante el ejercicio (Febbraio M. et al., 2002; Febbraio M. et al., 2005; Fischer C. et al., 2006; Nielsen A. et al., 2007; Pedersen B. et al., 2002; Pedersen B. et al., 2003; Pedersen B. et al., 2004; Pedersen B. et al., 2003 (2)). En los últimos años los investigadores han encontrado que las miocinas secretadas por los miocitos del tejido muscular como respuesta al ejercicio tienen un efecto parácrino en órganos como el hígado o el tejido adiposo (Pedersen B. et al., 2010).

También es muy importante mencionar que se ha demostrado que estímulos de ejercicio intenso inducen la expresión de citocinas proinflamatorias entre las cuales figura  $IL1\beta$ , este fenómeno se ha observado en diferentes tejidos: el tejido adiposo retroperitoneal y mesentérico (en modelos murinos), en plasma (humanos y modelos murinos), hígado (a nivel de hepatocitos humanos y modelos murinos) así como también en músculo (en miocitos de humanos así como en modelo murino). Asimismo, se encuentra ampliamente

difundido que el ejercicio intenso incrementa de manera importante los niveles de LPS (lipopolisacáridos) así como de ácidos grasos libres (también conocidos como no esterificados (NEFAs)); además sabemos que tanto los LPS como los NEFAs son las moléculas estimuladoras por excelencia del TLR4; TLR4 suele formar homodímeros o heterodímeros con TLR2 de manera normal y como sabemos estos receptores son primordiales en la activación del sistema inmune innato; tanto TLR4 como TLR2 se encuentran distribuidos en todos los grupos celulares que se mencionó anteriormente: tejido adiposo retroperitoneal y mesentérico (en modelos murinos), en plasma (humanos y modelos murinos), hígado (a nivel de hepatocitos humanos y modelos murinos) así como también en músculo (en miocitos de humanos así como en modelo murino); por lo tanto es evidente que el ejercicio intenso induce la expresión de citocinas proinflamatorias entre las cuales figura la IL1 $\beta$  vía TLR4, o TLR4 – TLR2 como resultado del incremento de LPS y NEFAs circulantes; o bien esta expresión también puede ser directamente inducida vía TLR9 (Stich et al., 2000; Francaux et al., 2009; Gleeson M. et al., 2006; McFarlin BK. et al., 2006; Davis et al., 2008; Lira et al., 2009; Lancaster G. et al., 2005; Lin et al., 2000; Lang et al., 2003; Rosa JC et al., 2010).

### **Hipótesis.**

El tejido hepático y muscular de ratas Sprague Dawley sometidas a una dieta grasa y ejercicio leve e intenso mostrará una expresión génica de TLR4, TLR9 e IL1 $\beta$  diferente al tejido hepático y muscular de estas mismas ratas con una dieta normal o estándar.

## Objetivos.

### General

Analizar y determinar la influencia de diferentes estímulos: dieta grasa, dieta grasa en conjunto con ejercicio leve y dieta grasa en conjunto con ejercicio intenso, sobre la expresión génica de TLR4 y TLR9, así como de IL1 $\beta$  en tejido hepático y muscular de ratas Sprague Dawley.

### Específicos

- Obtener tejido hepático y muscular de las ratas Sprague Dawley bajo los diversos estímulos: dieta control (DC), dieta grasa (DG), dieta grasa con ejercicio leve (DGEL), dieta grasa con ejercicio intenso (DGEi) a partir de.
- Determinar la expresión de mRNA, y sus niveles para los TLRs (TLR4 y TLR9) así como para IL1 $\beta$ .
- Analizar los patrones de expresión génica en el tejido hepático y muscular de las ratas Sprague Dawley y contrastarlos con los patrones esperados:

| Tejido hepático y muscular de ratas Sprague Dawley |                                |                                       |
|--|--------------------------------|---------------------------------------|
| Expresión génica esperada TLR4                     | Expresión génica esperada TLR9 | Expresión génica esperada IL1 $\beta$ |
| DG > DC  | DG = DC                        | DG > DC                               |
| DGEL > DC  | DGEL > DC                      | DGEL > DC                             |
| DGEi > DC  | DGEi > DC                      | DGEi > DC                             |
| DGEL < DG  | DGEL > DG                      | DGEL > DG                             |
| DGEi < DG  | DGEi > DG                      | DGEi > DG                             |
| DGEi > DGEL  | DGEi > DGEL                    | DGEi > DGEL                           |

\* Dieta control = DC; dieta grasa = DG; dieta grasa ejercicio leve = DGEL; dieta grasa ejercicio intenso = DGEi.

## **Metodología.**

### Tipo de estudio

Prospectivo, experimental, transversal.

### Ratas Sprague Dawley.

El estudio consistió en la caracterización de la expresión génica mediante medición de RNAm por la técnica de PCR tiempo real a partir de una cohorte de 34 ratas de la cepa Sprague Dawley de 2 meses de edad, las cuales se mantuvieron en un ambiente de bioterio con una temperatura estable controlada (20°C - 23°C). Todas las ratas Sprague Dawley se sometieron al protocolo en las instalaciones del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Todas las ratas nos fueron proporcionadas por la Dra. Martha Menjivar Iraheta mediante un protocolo de cooperación; la Dra. Menjivar es investigadora del departamento de biología perteneciente a la facultad de química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

- Dieta.

Las ratas fueron divididas aleatoriamente por motivos de disponibilidad de la siguiente manera:

- 9 ratas sometidas a una dieta control (Rodent RQ 22-5, Zelger Bros, Inc., USA) a este grupo se le denominó Dieta Control (DC).

- 9 ratas sometidas a una dieta Grasa (Rodent RQ 22-5, Zelger Bros, Inc., USA) adicionada con manteca de cerdo convencional a una razón de 100 gm manteca / 100 gm Rodent RQ 22-5) a este grupo se le denominó Dieta Grasa (DG).
- 16 ratas en las que además de recibir DG fueron sometidas a estímulos de ejercicio; éstas se dividieron en 2 grupos: 8 ratas bajo ejercicio leve (EL) y 8 ratas bajo ejercicio intenso (Ei).

\* La n de los grupos se estableció en base a toda la literatura consultada anteriormente en la cual establecen grupos de alrededor de 5 ratas por grupo; en base a la disposición que tuvimos decidimos aumentar la n a ocho o nueve ratas (según el grupo) para robustecer el estudio; la distribución de las ratas en los grupos se hizo por conveniencia.

- Fase de reconocimiento al estímulo de ejercicio.

La fase de reconocimiento consistió en que las ratas realizaran una caminata de 3 minutos diariamente por un periodo de 4 días a una velocidad de 8.3cm/seg. El ejercicio se llevó a cabo en un equipo con banda motorizada “caminadora” la cual promueve el movimiento de los roedores gracias a electrodos ubicados en la parte posterior del equipo (Treadmill LI 8706; Letica, Barcelona, España).

| <b>Velocidad<br/>Cm/seg</b> | <b>Tiempo<br/>Min</b> |
|-----------------------------|-----------------------|
| 8.3                         | 3                     |

- Fase de adaptación al estímulo de ejercicio.

Posteriormente al reconocimiento del equipo por las ratas, se inició una fase de adaptación donde se sometieron a las ratas a 4 diferentes estímulos continuos escalonados de velocidad ascendente; esto se realizó durante 3 días por un periodo de tiempo de 8 minutos:

| <b>Velocidad<br/>Cm/seg</b> | <b>Tiempo<br/>Min</b> |
|-----------------------------|-----------------------|
| 8.3                         | 2                     |
| 13.3                        | 2                     |
| 18.3                        | 2                     |
| 36.6                        | 2                     |

A esta fase se le denominó adaptación ya que en base al resultado de esta fase se seleccionaron las ratas que conformarían los grupos de Ejercicio Leve (DGEL) y ejercicio intenso (DGEi).

- Ejercicio (leve e intenso).

Las ratas que fueron sometidas al estímulo de DGEL realizaron el ejercicio o “carrera” diariamente durante 2 semanas por un período de tiempo de 30 minutos; la rutina de DGEL consistió en 3 fases:

| <b>Tiempo<br/>min</b> | <b>Velocidad<br/>Cm/seg</b> |
|-----------------------|-----------------------------|
| 5                     | 8.3                         |
| 5                     | 13.3                        |
| 20                    | 18.3                        |

Por otro lado las ratas que fueron sometidas al estímulo de DGEi realizaron el ejercicio o “carrera” diariamente durante 2 semanas por un período de 30 minutos con la siguiente rutina de 3 fases:

| <b>Tiempo<br/>min</b> | <b>Velocidad<br/>Cm/seg</b> |
|-----------------------|-----------------------------|
| 5                     | 13.3                        |
| 5                     | 18.3                        |
| 20                    | 36.6                        |

Toma de muestras (biopsia de hígado y músculo (cuádriceps)) en las ratas.

El sacrificio de las ratas se llevó a cabo un día después de la última exposición al ejercicio mediante una dosis de pentobarbital inyectada intraperitonealmente a una razón de 50mg/kg previo pesaje de cada rata.

Las biopsias fueron tomadas mediante la apertura de la cavidad abdominal siguiendo la línea media del abdomen; posteriormente se extrajo el hígado y los músculos (cuádriceps); posteriormente los tejidos fueron congelados en nitrógeno líquido para poder realizar estudios posteriores.

Corte por Criostato y tinción con rojo oleoso.

#### Materiales

- Solución amortiguadora neutral del formaldehído al 10% (pH de 7).
- Criostato
- Tejido hepático
- Isopropanol al 70%
- Dextrina acuosa al 1%

- Solución “optimal cutting tissue” (OCT)
- Rojo oleoso (solución de referencia)
- Rojo oleoso (solución de trabajo) Borato de sodio al 0.3%
- Borato de Sodio al 0.3 % ( $\text{Na}^2 \text{B}^4 \text{O}_7 \cdot 10\text{H}^2\text{O}$ )
- Dextrina acuosa al 1%
- Azul de hematoxilina
- Portaobjetos
- Cubreobjetos

- Preparación de la solución de referencia de rojo oleoso.

Homogenizar:

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| Rojo oleoso, C.I. 26125 ----- | 0.5 gm |
| Isopropanol al 100% -----     | 100 ml |

- Preparación de la solución de trabajo de rojo oleoso.

Homogenizar:

|  |       |
|--|-------|
| Solución solución de referencia de rojo oleoso ----- | 60 ml |
| Dextrina acuosa al 1% -----                          | 40 ml |

- Método.

1. Cortar el tejido hepático en fragmentos de entre 8 a 10mm.
2. Fijar con formaldehído a 10% por agitación durante toda una noche a 4°C.
3. Sumergir el tejido en solución “optimal cutting tissue” (OCT); esta es un polímero que solidifica a bajas temperaturas y mantiene la integridad del tejido.
4. Realizar cortes de tejido hepático con el criostato de 10 o 20 micras.

- Tinción.

1. Enjuagar con isopropanol al 70%.
2. Teñir con el rojo oleoso (grado solución de trabajo) por 20 minutos.
3. Enjuagar con isopropanol al 70%.

4. Sumergir en hematoxilina en Borato de sodio al 0.3% por 15 seg. al menos en 5 ocasiones.

\* Con este proceso normalmente los núcleos se tiñen después de 5 inmersiones

5. Enjuagar con agua destilada.
6. Montar en un medio de montaje acuoso o gel de glicerina previamente colocado en un portaobjetos.
7. Colocar el cubreobjetos y sellar con barniz.

Como resultado de la tinción se observan las gotas de grasa en color rojo y los núcleos en color azul.

### Extracción de RNA total por la técnica de trizol de tejido hepático y muscular

#### Material.

- Campo de Papel
- Hielo
- Hielo seco
- Bisturí
- Puntas para micropipeta
- Trizol
- Etanol al 75%
- Tubos Falcon.
- Gradilla
- Polytron (Brinkman Polytron Homogenizer Model PT 10-35, Brinkman Instruments Inc. Westbury N.Y.)
- Caja Petri
- Tubos Eppendorf de 1.5ml y de 2ml

1. Pesar 100mg de tejido en 1ml de trizol dentro del tubo Falcon; colocarlo en hielo.
2. Homogenizar el tejido mediante el polytron (lavar el polytron con etanol al 75% entre muestra y muestra)
3. Centrifugar por 15 min a 4°C a 4000 revoluciones por minuto (RPM)
4. Retirar el sobrenadante y colocaren tubos Eppendorf de 2 ml
5. Agregar 200µl de Cloroformo por cada ml de trizol.
6. Agitar por 15 segundos para posteriormente incubar las muestras por 10 min a temperatura ambiente (15°C a 30°C)
7. Centrifugar a 12000 revoluciones por minuto (RPM) a una temperatura entre 6°C - 8°C.
8. Retirar el sobrenadante y colocar en tubos eppendorf de 1.5ml
9. Agregar 0.5ml de Isopropanol por cada 1ml de trizol.
10. Incubar las muestras de 15°-30°C por 10 minutos y centrifugar a 12000 RPM a 6-8°C para recuperar el pellet
11. Retirar el sobrenadante y agregar 1 ml de etanol al 75%.

12. Resuspender el pellet mediante vortex por 15 seg
13. Centrifugar nuevamente a 12000 RPM (sólo un ligero impulso; al alcanzar esa velocidad detener la centrifuga).
14. Retirar el sobrenadante.
15. Dejar secar la pastilla.
16. Agregar 25µl de agua agua dietil dirocarbonato (DEPC) para su posterior refrigeración.

### Electroforesis en gel de agarosa

La integridad del RNA se determina por medio de una electroforesis horizontal en un gel de agarosa; el principio de la electroforesis en gel de agarosa se basa en el desplazamiento de moléculas de RNA a través de una matriz porosa formada por la agarosa polimerizada, donde el tamaño del poro es determinado por la concentración de la agarosa en una solución de sales. Al aplicarse una corriente eléctrica a través del gel, los ácidos nucleicos que poseen una carga negativa conferida por los grupos fosfato migran hacia el ánodo en condiciones de pH neutro. Los materiales para esta técnica son los siguientes:

#### Materiales

- Hielo
  - Caja Horizon 58
  - Cables
  - Bromuro de Etidio
  - Solución amortiguadora de Carga
  - Solución preparada con Tris/Borato/EDTA (TBE)
1. Colocar 45 mg en 30 ml de TBE y calentar por espacios de 5 segundos hasta que no tenga grumos.
  2. Al estar cristalino, dejar enfriar y agregar 2µ de bromuro de etidio, agregar a la caja Horizon 58, una vez gelificado, agregar Tris/Borato/EDTA (TBE) sin cubrir los electrodos.
  3. Mezclar la solución amortiguadora de carga con 0.5µl de RNA y agregar 2µ de agua Dietil Pirocarbonato (DEPC) y colocar en tubos de 0.75µ.
  4. Cargar 4µ de muestra en los pozos del gel.

5. Conectar el equipo a 70 volts (v), por 50 minutos.
  6. Finalmente, el gel se observó a través de un transiluminador (con luz ultravioleta), la radiación UV es absorbida por el RNA y emitida al bromuro de etidio que a su vez remite la radiación a 590 nanómetros (nm) del espectro visible, y finalmente se obtiene una impresión fotográfica.
- La lectura de la concentración de RNA total se realizó en el espectrofotómetro (Nanodrop 2000c; Thermo Scientific, Inc., P.O. box 3411, Silverside Rd Bancroft Building Wilmington, D.E. 19810 USA) aplicando 2µl del RNA total en el lector del equipo (a una absorbancia de 260, 240, 280 nanómetros (nm) para determinar la concentración y la pureza de la muestra).

El equipo Nanodrop 2000c (espectrofotómetro) permite calcular con elevada precisión concentraciones de ADN (doble cadena o cadena sencilla), ARN y proteínas en las muestras a partir de cantidades muy pequeñas de muestra (2 µl). Este equipo determina la concentración de ng/ml realizando mediciones de absorbancia de la muestra a 260 nm, 280nm, 230nm y 320nm; las longitudes de onda indican:

- 260nm: longitud de onda a la que absorbe el DNA o RNA.
- 260nm/280nm: cociente de estimación de la calidad o pureza del DNA. El valor óptimo oscila entre 1.8-2.0
- 230nm: valor influenciado por la presencia de sales en la muestra.
- 320nm: medida de la turbidez de la muestra.

Mediante los cálculos de estos parámetros se sabe que tan pura es nuestra muestra y si puede ser utilizada en los subsecuentes procesos.

#### Amplificación de cDNA (Transcriptor first strand cDNA synthesis Kit).

La amplificación de cDNA se realizó a partir del paquete: “kit Transcriptor first strand cDNA synthesis Kit” (Transcriptor first strand cDNA synthesis Kit ; ROCHE, Roche Diagnostics Corporation P.O. box 50414, 9115 Hague Road Indianapolis, IN 46250-0414

USA), mediante este paquete o “kit” se realiza el proceso de transcripción reversa que consiste en una reacción de síntesis de ADN monocatenario o complementario (cDNA) a partir de moléculas de RNA monocatenario; esta reacción es catalizada por la enzima transcriptasa reversa.

Ya que se cuenta con el RNA total se puede sintetizar DNA complementario (DNAc) mediante la técnica de transcriptasa reversa; al extraer el RNA de cada muestra se obtienen distintas eficiencias de rendimiento respecto a la cantidad de RNA total; por esto se debe homogenizar la cantidad de  $\mu\text{g}$  de RNA por cada muestra a  $3\mu\text{g}$ , para posteriormente realizar la reacción de síntesis de cDNA. La siguiente tabla ilustra el cómo se homogenizan diversos RNAs para llevarlos a una concentración de  $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

| Dieta control (DC) hígado |   |   |
|---------------------------|---|---|
| Muestra                   | RNA total obtenido (ng/ $\mu\text{l}$ ) | RNA a utilizar para llegar a la concentración de ( $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) |
| DC1                       | 1301.3                                  | 2.3   |
| DC2                       | 1287.5                                  | 2.3   |
| DC3                       | 1260.9                                  | 2.4   |
| DC4                       | 1571.9                                  | 1.9   |
| DC5                       | 1545.9                                  | 1.9   |
| DC6                       | 1665                                    | 1.8   |
| DC7                       | 1071.9                                  | 2.8   |
| DC8                       | 1686.7                                  | 1.8   |
| DC9                       | 1647.11                                 | 1.8   |

Ya efectuados los cálculos se procedió a realizar la primera mezcla de reacción (primera de 2) la cual consiste en:

- Agregar el volumen correspondiente a  $3\mu\text{g}$  de RNA de cada muestra.
- Agregar  $2\mu\text{l}$  de iniciador aleatorio o “random primer”
- Finalmente agregar  $\text{H}_2\text{O}$  grado PCR complementaría para llegar a un volumen de  $13\mu\text{l}$  final.

La siguiente tabla ejemplifica los cálculos que se realizaron para la primera mezcla de reacción de las muestras; estos cálculos correspondieron a dieta control (DC):

| <b>Dieta control (DC) hígado</b> |                 |   |             |                    |
|----------------------------------|-----------------|---|-------------|--------------------|
| Muestra                          | RNA total ng/μl | RNA a utilizar<br>(correspondiente a 3μg) | H2O<br>(μl) | Random Primer (μl) |
| DC1                              | 1301.3          | 2.3                                       | 8.7         | 2                  |
| DC2                              | 1287.5          | 2.3                                       | 8.7         | 2                  |
| DC3                              | 1260.9          | 2.4                                       | 8.6         | 2                  |
| DC4                              | 1571.9          | 1.9                                       | 9.1         | 2                  |
| DC5                              | 1545.9          | 1.9                                       | 9.1         | 2                  |
| DC6                              | 1665            | 1.8                                       | 9.2         | 2                  |
| DC7                              | 1071.9          | 2.8                                       | 8.2         | 2                  |
| DC8                              | 1686.7          | 1.8                                       | 9.2         | 2                  |
| DC9                              | 1647.11         | 1.8                                       | 9.2         | 2                  |

Posteriormente a la obtención el volumen final de 13μl de la mezcla de reacción inicial, esta mezcla se calienta en el termociclador a 65°C por 10 min para inmediatamente dar un choque térmico con hielo por 1 min; en seguida se le adiciona una segunda mezcla de reacción; esta segunda mezcla de reacción también conocida como mezcla maestra se prepara de la siguiente manera:

|                                       | 1X (por muestra) |
|---------------------------------------|------------------|
| Solución amortiguadora (Buffer) 5X    | 4μl              |
| Inhibidor de RNasas (RNA Protector ®) | 0.5μl            |
| Dideoxinucleótidos (MIX)              | 2μl              |
| Transcriptasa reversa                 | 0.5μl            |
| <b>Volumen total</b>                  | <b>7μl</b>       |

La mezcla maestra debe de tener un volumen total de 7μl (por muestra); estos 7μl se añaden a los 13μl de la mezcla de reacción inicial para dar un volumen total de 20μl; la mezcla completa (la que tiene un volumen de 20μl) se mete al termociclador para provocar el proceso de síntesis de DNA, bajo las siguientes condiciones:

| Orden del proceso | # ciclos | Temperatura | Tiempo (min) |
|-------------------|----------|-------------|--------------|
| 1                 | 1 ciclo  | 25°C        | 10 minutos   |
| 2                 | 1 ciclo  | 55°C        | 30 minutos   |
| 3                 | 1 ciclo  | 85°C        | 5 minutos    |

PCR tiempo real (Amplificación de cDNA a partir del kit Light Cycler – Taqman Master).

- Amplificación del cDNA.

Para verificar la calidad del DNA se realizó la amplificación de los diferentes fragmentos de cDNA precursores de los genes:  $\beta$ -actina (1296 pb), TLR4 (13636 pb), TLR9 (3326 pb) y finalmente IL1 $\beta$  (1339 pb). Siempre que se realiza un reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se debe hacer una mezcla maestra que contenga los elementos suficientes y necesarios para que se dé la amplificación del DNA en cuestión, estos son: Los iniciadores de cadena o “primers” correspondientes para amplificar el gen en cuestión (deben ser dos un iniciador de la cadena líder y otro de la cadena complementaria (primer forward (Left) y primer reverse (Right) respectivamente); la enzima Taq polimerasa (en este caso la polimerasa LightCycler® TaqMan® Master, la cual ya viene preparada con *buffer*, MgCl<sub>2</sub> y los dNTPs (los nucleótidos que se van a incorporar)); el ADN a amplificar (la cantidad de  $\mu$ l que correspondan a una concentración de 3 $\mu$ g), la sonda tipo TaqMan® proveniente de Universal ProbeLibrary® de Roche® (Exiqon A/S, Vedbaek, Denmark); y finalmente agua grado PCR (H<sub>2</sub>O) para complementar la cantidad de  $\mu$ l del volumen total que se requiera.

La amplificación se llevó a cabo en el equipo LightCycler ® 2.0 Instrument (Roche Diagnostics Corporation, 9115 Hague Road Indianapolis, IN 46256 USA), que por ser un sistema basado en carrusel requirió los capilares “LightCycler ® Topas Capillaries (20  $\mu$ )” (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Germany). El equipo

LightCycler® 2.0 Instrument analizó las muestras mediante el software LightCycler® 4.1 Roche Applied Science (Roche Diagnostics Corporation, USA).

La amplificación de cada fragmento de cDNA correspondiente a cada gen fue obtenida mediante PCR tiempo real utilizando 2µl de LightCycler® TaqMan® Master (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Germany) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, empleando 0.2µl (0.5 µM final) del iniciador de cada gen (Forw y Rev); en el caso de β-actina (β-act Forw y β-actina Rev), en caso de TLR4 (TLR4 Forw (Left) y TLR4 Rev (Right)), en caso de TLR9 (TLR9 Forw (Left) y TLR9 Rev (Right)) y finalmente en caso de IL1β (IL1β-Forw (Left) y IL1β-Rev (Right)); además se añadió 0.1µl de la sonda tipo TaqMan® proveniente de la Universal ProbeLibrary® de Roche® que detecta el cDNA correspondiente a cada gen; en el caso de β-actina la sonda #17, en el caso de TLR4 la sonda #95, en el caso de TLR9 la sonda #20 y finalmente en el caso de IL1β la sonda #78.

En todos los casos se añadió un volumen final de 5 µl correspondiente a 3 µg de DNA genómico y un volumen de 2.5 µl de H<sub>2</sub>O grado PCR para completar el volumen final de la reacción que es 10µl.

De manera que la mezcla maestra o Mix para la amplificación de todos los genes; β-actina, TLR4, TLR9 e IL1β fue la siguiente:

|                                      |             |
|--------------------------------------|-------------|
| <b>Mix <math>\beta</math>-Actina</b> | 1X          |
| Taqman                               | 2 $\mu$ l   |
| Primer L (según el gen)              | 0.2 $\mu$ l |
| Primer R (según el gen)              | 0.2 $\mu$ l |
| Sonda # (según el gen)               | 0.1 $\mu$ l |
| Agua                                 | 2.5 $\mu$ l |
| <b>Volumen total</b>                 | 5 $\mu$ l   |

Las condiciones de amplificación de las reacciones consistieron en 3 fases: una fase de preincubación a 95°C por 10 minutos, seguido por una fase de amplificación de 45 ciclos, la cual consistió en tres tiempos, el primero a 95°C por 10 segundos, el segundo de 60°C por 30 segundos y el tercero de 72°C por 1 segundo; y finalmente una fase de enfriamiento de 40°C por 30 segundos.

| Orden de los procesos | Fase del análisis | Ciclos | Temperaturas °C | Tiempos | Tipo de Análisis |
|-----------------------|-------------------|--------|-----------------|---------|------------------|
| 1                     | Preincubación     | 1      | 95              | 10 min  | ninguno          |
| 2                     | Amplificación     | 45     | 95              | 10 seg  | cuantificación   |
|                       |                   |        | 60              | 30 seg  |                  |
|                       |                   |        | 72              | 1 seg   |                  |
| 3                     | Enfriamiento      | 1      | 40              | 30 seg  | ninguno          |

En todos los casos se incluyó un control negativo para evidenciar una posible contaminación (H<sub>2</sub>O grado PCR).

- *Primers.*

Los *primers* de  $\beta$ -actina Left y Right fueron los siguientes:

$\beta$ -act L      5' CCCGCGAGTACAACCTTCT 3' Antisentido o forward (Left)  
 $\beta$ -act R      5' CGTCATCCATGGCGAACT 3' Sentido o reverso (Right)

Los *primers* de TLR4-Forw y TLR4-Rev fueron los siguientes:

TLR4-Forw (L) 5' GGATGATGCCTCTCTTGCAT 3' Antisentido o forward (Left)  
TLR4-Rev (R) 5' TGATCCATGCATTGGTAGGTAA 3' Sentido o reverso (Right)

Los *primers* de TLR9-Forw y TLR9-Rev fueron los siguientes:

TLR9-Forw (L) 5' CCGCTTGCTCAACAAGAAC 3' Antisentido o forward (Left)  
TLR9-Rev (R) 5' ATTTGAAGGTGCAGCGTGT 3' Sentido o reverso (Right)

Los *primers* de IL1 $\beta$ -Forw y IL1 $\beta$ -Rev fueron los siguientes:

IL1 $\beta$ -Forw (L) 5' TGTGATGAAAGACGGCACAC 3' Antisentido o forward (Left)  
IL1 $\beta$  -Rev (R) 5' CTTCTTCTTTGGGTATTGTTTGG 3' Sentido o reverso (Right)

- Sondas.

La sonda tipo TaqMan® proveniente de Universal ProbeLibrary® de Roche® que detectó el cDNA de la  $\beta$ -actina (NM\_031144.2 Rattus norvegicus actin, beta (Actb), mRNA) es la sonda #17 (cat. no. 04686900001), ésta generó un amplicón de (72 pb) que tiene la siguiente secuencia:

5' CCGCGAGTACAACCTTCTTGCAGCTCCTCCGTCGCCGGTCCACACCCGCCAC  
CAGTTCGCCATGGATGACG 3'.

La sonda tipo TaqMan® proveniente de la Universal ProbeLibrary® de Roche® que detectó el cDNA de TLR4 (NM\_019178.1 Rattus norvegicus toll-like receptor 4 (Tlr4), mRNA) es la sonda #95 (cat. no 04692128001), ésta generó un amplicón de (127 pb) que tiene la siguiente secuencia:

5' GGATGATGCCTCTCTTGCATCTGGCTGGGACTCTGATCATGGCATTGTTTCCTT  
TCCTGCCTGAGACCAGGAAGCTTGAATCCCTGCATAGAGGTACTTCCTAATA  
TTACCTACCAATGCATGGATCA 3'.

La sonda tipo TaqMan® proveniente de Universal ProbeLibrary® de Roche® que detectó el cDNA de TLR9 (NM\_198131.1 Rattus norvegicus toll-like receptor 9 (Tlr9), mRNA) es la sonda #20 (cat. No 04686934001), ésta generó un amplicón de (72 pb) que tiene la siguiente secuencia:

5' CATCTTCTTCCGCTTGCTCAACAAGAACACGCTCAGGTGGCTGGCTGGTCTG  
CCCAAGCTCCACACGCTGCACCTTCAAATGAATTTTCATC 3'.

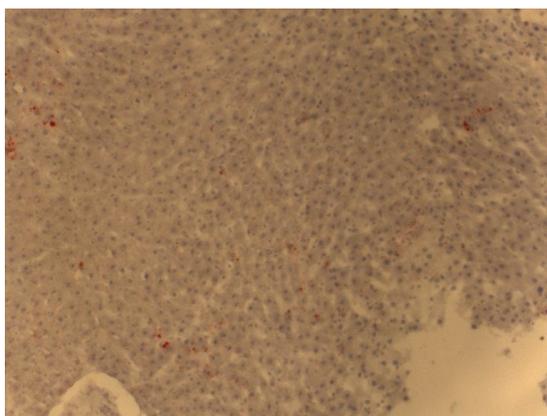
La sonda tipo TaqMan® proveniente de Universal ProbeLibrary® de Roche® que detectó el cDNA de IL1 $\beta$  (NM\_031512.2 Rattus norvegicus interleukin 1 beta (IL1 $\beta$ ), mRNA) es la sonda #78 (cat. no 04689011001), ésta generó un amplicón de (70 pb) que tiene la siguiente secuencia:

5' GTGATGAAAGACGGCACACCCACCCTGCAGCTGGAGAGTGTGGATCCCAA  
CAATACCCAAAGAAGAAG 3'.

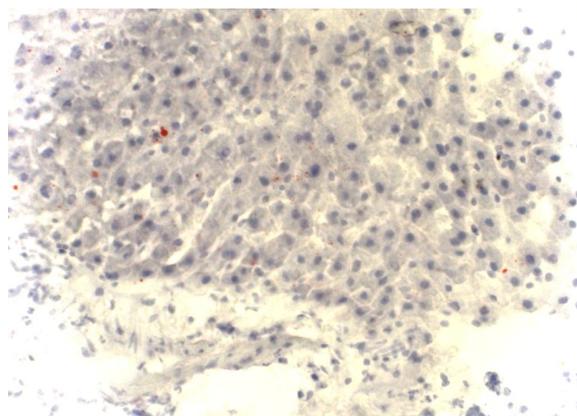
## Resultados

### Tinción de tejido con rojo oleoso.

Se realizó la tinción de tejido con rojo oleoso, como resultado de esta tinción se observó claramente mayor cantidad de color rojo (proveniente de la tinción con rojo oleoso) en las ratas a las que se les administró la dieta grasa, indicativo que tenían una mayor presencia de grasa en los hepatocitos provenientes del hígado comparado con la cantidad de color rojo que se observaba en las ratas control. El rojo oleoso tiñe las gotas de grasa (Figura 7 y 8).

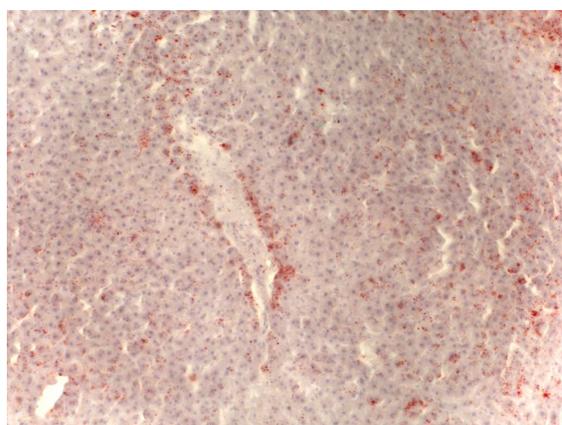


**Tinción Dieta Control 10X**

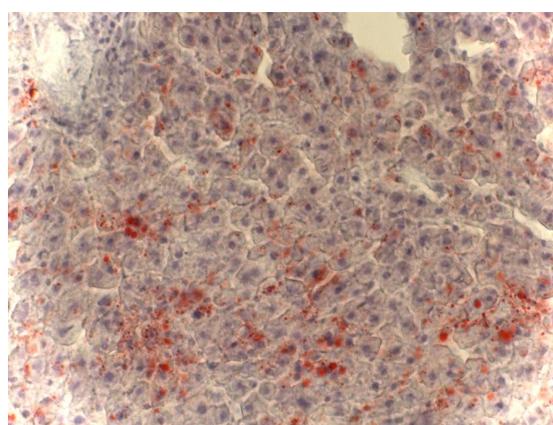


**Tinción Dieta Control 20X**

**Figura 7. Tinción con hematoxilina-eosina y rojo oleoso de tejido hepático en ratas Sprague Dawley del grupo de Dieta Control DC.**



**Tinción Dieta Grasa 10X**



**Tinción Dieta Grasa 20X**

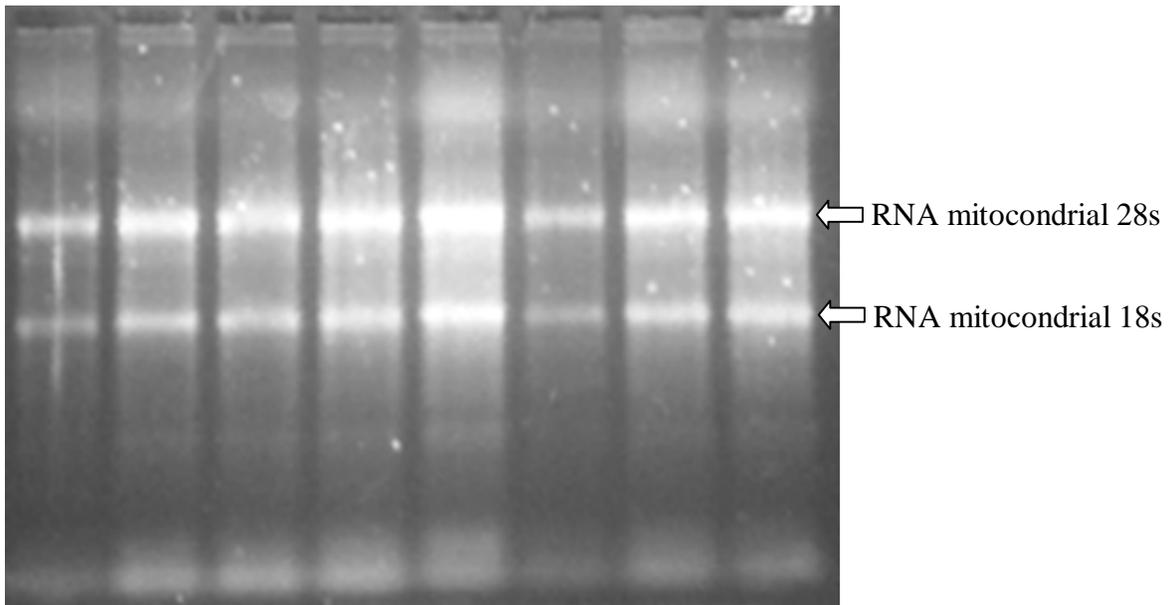
**Figura 8. Tinción con hematoxilina-eosina y rojo oleoso de tejido hepático en ratas Sprague Dawley del grupo de Dieta Grasa DG.**

### Cuantificación de RNA total.

Se realizó la lectura del RNA total en el espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Nanodrop 2000c; Thermo Scientific, Inc., P.O. box 3411, Silverside Rd Bancroft Building Wilmington, D.E. 19810 USA) para determinar la pureza y concentración de la muestra; se obtuvo una pureza promedio de 2.00 la cual es aceptable para realizar el estudio, tomando como valor de referencia 1.7 a 2.2 (radio entre la absorbancia de 260/280).

### Electroforesis en Gel de Agarosa

La integridad del RNA se determinó por medio de una electroforesis horizontal en un gel de agarosa; se obtuvo muy buena calidad de RNA a partir de la extracción de las muestras; en la siguiente figura se ilustra un ejemplo de cómo se observó la integridad del RNA:

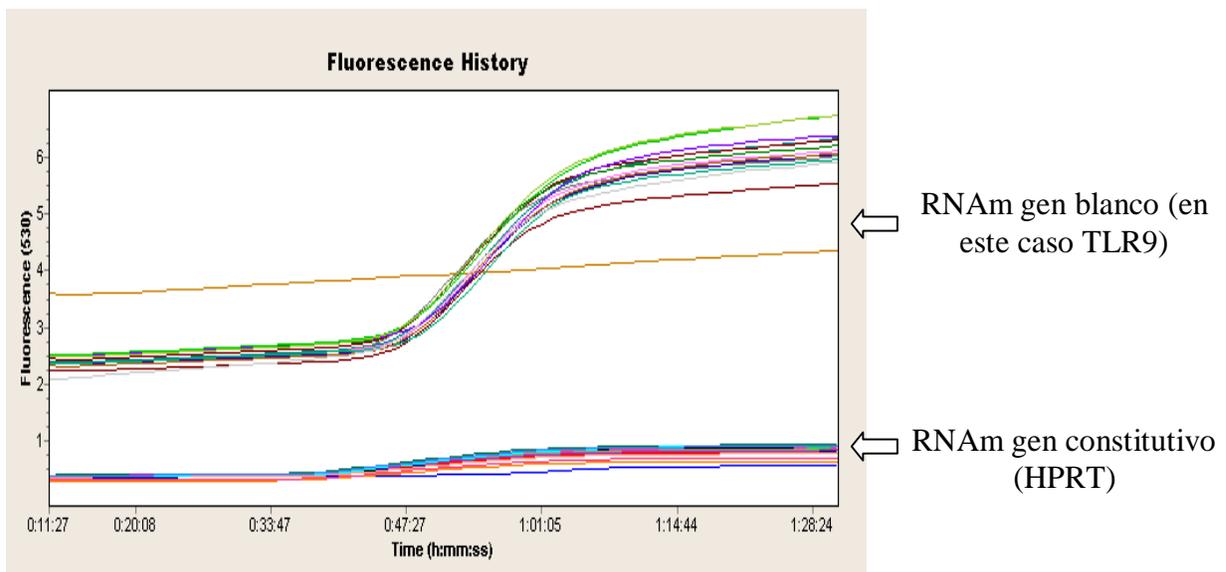


**Figura 9. Amplificación de RNA total. En esta imagen se muestra el gel de agarosa al 1% preparado con formaldehído en el cual se observan el RNA mitocondrial 28s y 18s; mediante la observación de este gel se verifica la integridad y la calidad del RNA total.**

## Expresión relativa de los genes mediante PCR en tiempo real.

- Curvas de amplificación de PCR en tiempo real.

Se obtuvo la expresión relativa de los genes mediante PCR en tiempo real en tejido hepático así como en músculo; a partir de esta expresión se obtuvieron curvas de amplificación de PCR tiempo real, en seguida se mostrará un ejemplo de cómo se observan estas:

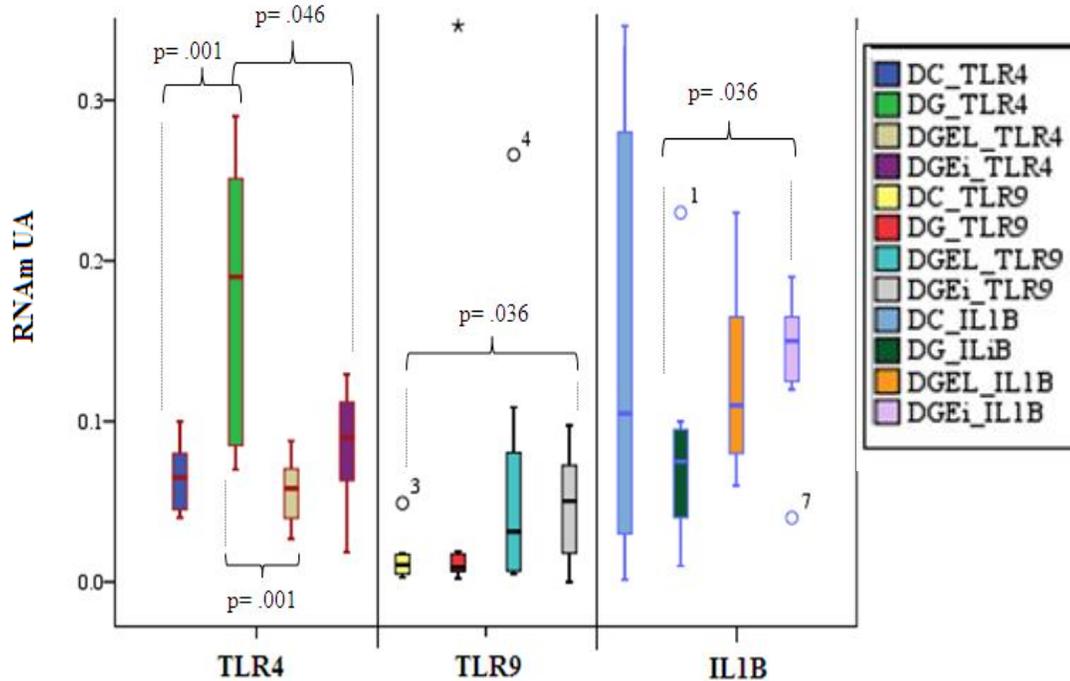


**Figura 10.** Curva de amplificación de PCR en tiempo real; en este ejemplo se observa la curva resultante de la amplificación de  $\beta$ -actina y TLR9 en tejido hepático de ratas Sprague Dawley bajo el estímulo de Dieta Grasa con Ejercicio Leve (DGEL).

- **Es importante señalar que el gen TLR4 no amplificó en tejido muscular de ratas Sprague Dawley.**

- Gráficas de expresión relativa.

### 1. Hígado.



**Figura 11. Expresión relativa de TLR4, TLR9 e IL1β en tejido hepático de Ratas Sprague Dawley. \* Unidades arbitrarias de RNA mensajero = RNAm UA.**

Expresión relativa de los genes TLR4, TLR9 e IL1β en tejido hepático de Ratas Sprague Dawley. En la figura 11 se muestra la significancia estadística que existe en la expresión de cada gen dentro de los diferentes grupos (DC, DG, DGEL y DGEi). Más adelante en la sección de análisis estadístico se recapitularán los datos y se hará el análisis; también en el apartado de discusión se retomará el tema.

## 2. Músculo.

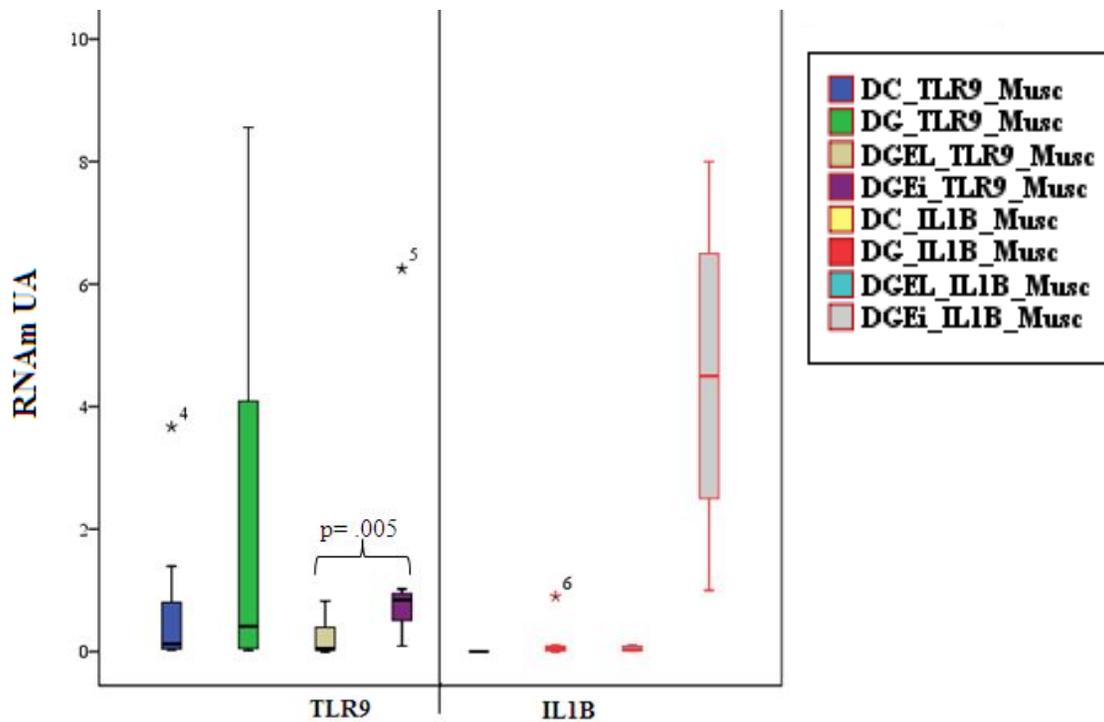


Figura 12. Expresión relativa de TLR4, TLR9 e IL1β en tejido muscular de Ratas Sprague Dawley.

\* Los valores atípicos o sin sentido se describen como \*<sup>n</sup>

Expresión relativa de los genes TLR4, TLR9 e IL1β en tejido muscular de Ratas Sprague Dawley. En la figura 12 se muestra la significancia estadística que existe en la expresión de cada gen dentro de los diferentes grupos (DC, DG, DGEL y DGEi).

Es importante recalcar que el gen TLR4 no se expresó en músculo; tampoco el gen IL1β amplificó en el grupo de DC en músculo de rata Sprague Dawley.

- Análisis estadístico.

La expresión de TLR4 en hígado mostró un aumento con diferencia significativa entre la DC y la DG con una  $p=0.001$  y una disminución de la expresión al comparar DG con DGEL y DGEi ( $p=0.001$  y  $p=0.046$  en forma respectiva); este análisis se realizó a través del programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (SPSS<sup>®</sup> 15.0 for Windows, Rel. 11.0.1. 2001. Chicago: SPSS Inc.) mediante la prueba de U de Mann-Whitney.

Respecto a la expresión resultante de TLR9 hay un aumento con diferencia significativa entre la DC respecto a la DGEi ( $p=0.036$ ). Para IL-1 $\beta$  únicamente se observó un aumento de expresión con diferencia significativa entre la DG respecto a DGEi ( $p=0.036$ ).

| Significancia estadística (Expresión génica en hígado) |       |       |             |
|--|-------|-------|-------------|
|  | TLR4  | TLR9  | IL1 $\beta$ |
| DC/DG  | 0.001 | 0.73  | 0.436       |
| DC/DGEL  | 0.606 | 0.277 | 0.743       |
| DC/DGEi  | 0.2   | 0.036 | 0.167       |
| DG/DGEL  | 0.001 | 0.541 | 0.2         |
| DG/DGEi  | 0.046 | 0.114 | 0.036       |
| DGEL/DGEi  | 0.083 | 0.721 | 0.505       |

\* Dieta Control (DC), Dieta Grasa (DG), Dieta Grasa Ejercicio Intenso (DGEi), Dieta Grasa Ejercicio Leve (DGEL).

**Tabla 2. Significancia estadística de la expresión génica en hígado de las ratas Sprague Dawley.**

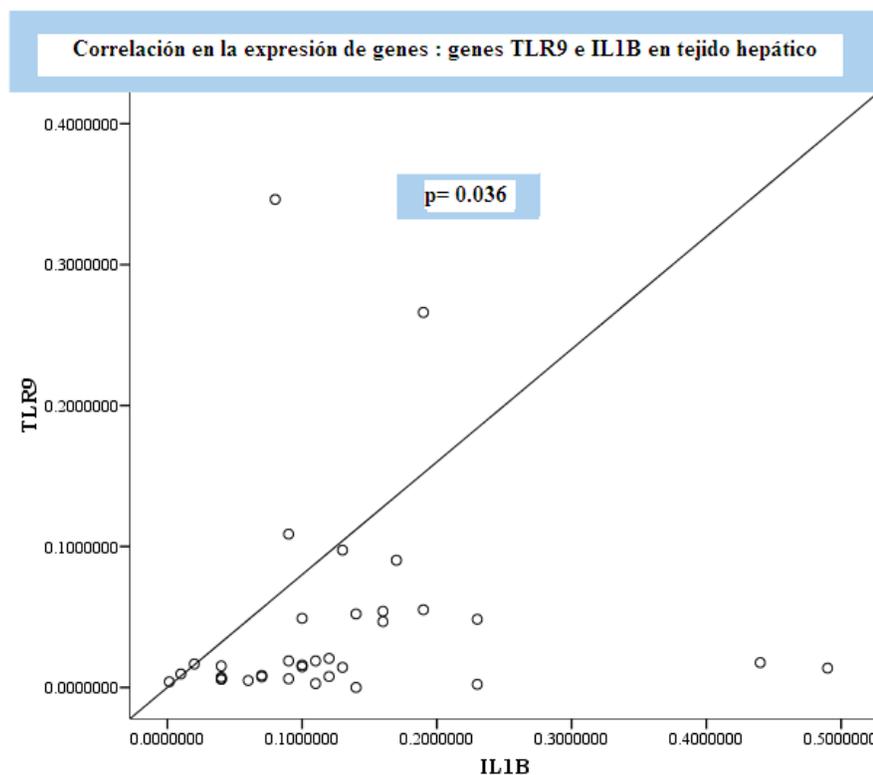
La expresión de TLR9 en músculo mostró un aumento con diferencia significativa entre la DGEL y la DGEi con una  $p=0.005$ .

| Significancia estadística (Expresión génica en músculo) |       |                 |
|---|-------|-----------------|
|   | TLR9  | IL1 $\beta$     |
| DC/DG   | 0.546 | DC no amplificó |
| DC/DGEL   | 0.139 | DC no amplificó |
| DC/DGEi   | 0.277 | DC no amplificó |
| DG/DGEL   | 0.114 | 0.888           |
| DG/DGEi   | 0.541 | 0.2             |
| DGEL/DGEi   | 0.005 | 0.13            |

\*Dieta Control (DC), Dieta Grasa (DG), Dieta Grasa Ejercicio Intenso (DGEi), Dieta Grasa Ejercicio Leve (DGEL).

**Tabla 3. Significancia estadística de la expresión génica en músculo de las ratas Sprague Dawley**

Por otro lado se observó una correlación en la expresión de los genes TLR9 e IL1 $\beta$  en tejido hepático; la correlación tuvo una  $p=0.036$  mediante el análisis de correlación bivariada. La correlación se hizo para todos los datos sin distinción de tratamiento



**Figura 13. Gráfica de correlación de la expresión de los genes TLR9 e IL1 $\beta$  en tejido hepático de todas las muestras, sin distinción de tratamiento.**

| Correlaciones no paramétricas |             |                             |             |         |
|-------------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|---------|
|                               |             |                             | IL1 $\beta$ | TLR9    |
| Rho de Spearman               | IL1 $\beta$ | Coefficiente de correlación | 1           | 0.36018 |
|                               |             | Sig. (bilateral)            | .           | 0.0364  |
|                               |             | N                           | 34          | 34      |
|                               | TLR9        | Coefficiente de correlación | 0.3601783   | 1       |
|                               |             | Sig. (bilateral)            | 0.0363998   | .       |
|                               |             | N                           | 34          | 34      |

\* La correlación es significativa al nivel 0.05 (bilateral).

**Tabla 4.** Tabla de correlación de la expresión de los genes TLR9 e IL1 $\beta$  en tejido hepático de todas las muestras, sin distinción de tratamiento.

### Discusión.

Las ratas Sprague Dawley son un modelo animal utilizado para el estudio del hígado graso. Este es una patología que se caracteriza principalmente por la acumulación de grasa en los hepatocitos y esto lleva a desarrollar resistencia a la insulina, así como una posterior inflamación crónica degenerativa. En este fenómeno se encuentra implicada la expresión de diversas citocinas proinflamatorias.

El ejercicio es una herramienta terapéutica que se usa para tratamiento de hígado graso. Sin embargo es necesario profundizar en cómo los estímulos de ejercicio a diferentes intensidades inciden en la expresión de los genes blanco (genes candidatos) relacionados con el proceso fisiopatológico de esta enfermedad; esto brindará información sobre los mecanismos fisiopatológicos así como la posible identificación de biomarcadores que permitan evaluar los beneficios del tratamiento.

La justificación por la que TLR4, TLR9 e IL1 $\beta$  fueron analizados en este trabajo proviene de revisiones como la de Gao (Gao et al., 2010) en la cual demuestra una relación entre inmunidad innata y esteatohepatitis mediada por TLRs, él menciona que múltiples tipos celulares promueven la inflamación vía TLR9 y cita que se conoce poco acerca de los ligandos del mismo; además se conoce que el DNA bacteriano activa la expresión génica de TLR9 y también existen evidencias que postulan que el DNA “basura o fragmentado” resultante de la necrosis hepatocítica activa este receptor. Gao también observó que la expresión génica de TLR4 y TLR9 combinada tiene un efecto sinérgico que promueve el fenómeno de activación del inflamosoma NLRP3 (a través de expresión de TLR9 en células de Kupffer induciendo la producción de IL1 $\beta$  vía MyD88), el cual a su vez desencadena esteatosis y fibrosis, que son según algunos autores, fases iniciales de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (Gao et al., 2010).

Gao evidencia la participación de TLR4, TLR9 e IL1 $\beta$  en el desarrollo de hígado graso. De manera complementaria este trabajo analiza la respuesta de la expresión génica de estos mismos genes en tejido hepático y muscular bajo estímulos de ejercicio.

Algo que provocaría el suministro de fragmentos de DNA para la activación de TLR9 de manera similar a lo mencionado por Gao, es el ejercicio intenso, ya que éste promueve la necrosis celular en diversos órganos debido a que en muchos casos fuerza al organismo y produce isquemia así como lesiones las cuales desencadenan en una alta ruptura de fibras musculares y de otros tejidos (Komulainen et al., 1994; Ebbeling et al., 1989; Clarkson et

al., 1999; Pyne et al., 1994; Twist and Eston et al., 2005; Armstrong et al., 1996; Hikida et al., 1983).

El presente estudio empleó el modelo animal de ratas Sprague Dawley. Estas ratas fueron divididas aleatoriamente en 4 grupos por motivos de disponibilidad de los animales: 9 ratas en el grupo de Dieta control (DC) alimentadas con una dieta estándar; 9 ratas en el grupo de Dieta Grasa (DG) alimentadas con una dieta rica en grasa de cerdo; 8 ratas en el grupo de Dieta Grasa con Ejercicio Leve (DGEL) que recibían dieta grasa pero además estaban sometidas a un estímulo de ejercicio, el cual lo denominamos leve (velocidad promedio de 13.3 cm/seg); y finalmente el grupo conformado por 8 ratas denominado Dieta Grasa con Ejercicio Intenso (DGEi), que recibía dieta grasa, pero además estaba sometido a un estímulo de ejercicio, el cual lo denominamos intenso (velocidad promedio de 22.7 cm/seg). Se midió la expresión génica de estas ratas en hígado y músculo (cuadriceps) mediante la técnica de PCR en tiempo real.

Es muy importante recalcar que ningún estudio anterior a éste había realizado pruebas de expresión de TLR4, TLR9 e IL1 $\beta$  en músculo e hígado bajo el estímulo de dieta grasa (DG) aunado al estímulo de ejercicio intenso (DGEi) y ejercicio leve (DGEL) en ratas Sprague Dawley; durante la primera década de este siglo se ha descrito la expresión génica de TLR4, TLR9 e IL1 $\beta$  principalmente en células sanguíneas y tejido adiposo y de manera aislada en músculo proveniente de humano y de rata los cuales se mencionan a continuación en orden de aparición temporal:

1. El ejercicio de resistencia (intenso) produce incremento de ácidos grasos no esterificados (NEFAs) (Stich et al., 2000; Francaux et al., 2009) en la línea celular de adipocitos 3T3L1, se ha corroborado que TLR4 es activado por NEFAs (Stich et al., 2000). A partir de este trabajo se postula que la sobreexpresión de TLR4 es ocasionada en parte por el ejercicio intenso y que la subexpresión de este mismo está relacionada con estímulos de ejercicio leve.
2. El estímulo de ejercicio de resistencia (ejercicio leve), en células CD14+ de sangre venosa proveniente de mujeres de edad avanzada, promueve la subexpresión de TLR4. (Flynn M. et al., 2003).
3. Subexpresión génica de TLR1, TLR2, TLR4 en la superficie de monocitos CD14+ provenientes de sangre periférica de humanos como respuesta a estímulos de ejercicio moderado y crónico (al 60% de VO<sub>2</sub> max) detectada mediante la técnica de citometría de flujo (FACS) (Gleeson M. et al., 2006).
4. Subexpresión génica de IL1 $\beta$  en tejido adiposo visceral de ratas Wistar bajo el estímulo de ejercicio moderado (Gómez-Merino et al., 2007).
5. Sobreexpresión de TLR4 debido a que los ácidos grasos saturados activan TLR4 en tejido adiposo de ratas C57BL/10ScN; esto fue corroborado con ratas control y ratas nocaout para TLR4; en este experimento las ratones C57BL/10ScN estuvieron sometidas a estímulos de dieta alta en grasa y dieta baja en grasa por un período de tiempo de 16 días; los resultados fueron procesados mediante la técnica de PCR tiempo real (Davis et al., 2008).
6. Sobreexpresión génica de las citocinas proinflamatorias TNF $\alpha$ , IL1 e IL6 en tejido adiposo subcutáneo proveniente de ratas Sprague Dawley bajo el estímulo de ejercicio (“carrera en rueda mecánica rotatoria”) así como una dieta alta en grasa (Gollisch et al., 2009).
7. Ligera subexpresión génica de IL1 $\beta$  bajo un estímulo de ejercicio intenso en tejido adiposo retroperitoneal de ratas macho Wistar. En contraste él también

- detectó una ligera sobreexpresión génica de IL1 $\beta$  bajo un estímulo de ejercicio intenso en tejido adiposo mesentérico de ratas macho Wistar (Lira et al., 2009).
8. Subexpresión de TLR4 en músculo plantar de ratas Wistar hembras de 3 meses de edad bajo el estímulo de ejercicio de resistencia (4 horas a intensidad moderada) (mediante la técnica de PCR tiempo real) (Zanchi et al., 2010).
  9. Sobreexpresión génica de TLR2 y TLR4 como respuesta al estímulo de ejercicio agudo (intenso) en monocitos provenientes de sangre periférica de humano; el ensayo fue realizado mediante inmunofluorescencia, además de la técnica de citometría de flujo (FACS) (Booth et al., 2010).

Existen otros estudios donde se sugiere que los estímulos ambientales como el ejercicio y dieta modifican y en algunos casos modulan la expresión génica (Flynn M. et al., 2003; Simpson R. Et al., 2009; Lancaster G. et al., 2005; Belge K. et al., 2002; Hong S. et al., 2008; Zwagerman et al., 2010; Bruunsgaard H et al., 2003; Alexopoulou L. et al 2002; McFarlin B. et al., 2006). Entre los genes más citados que presentan este fenómeno se encuentran algunos genes que promueven la respuesta inmune a nivel celular como son los receptores tipo Toll (TLRs), particularmente TLR4 y TLR9, así como algunos genes que promueven respuesta inflamatoria (que codifican para citocinas proinflamatorias) como: IL6, TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  (Lancaster G. et al., 2005; Simpson R. et al., 2009; Belge K. et al., 2002; Hong S. et al., 2008; Francaux et al., 2009).

Existen reportes donde la simple pérdida de peso tiene efectos antiinflamatorios, en estos pacientes se ha observado que la pérdida de peso conlleva a una disminución de citocinas proinflamatorias en tejido adiposo; en estos estudios se encontró específicamente el descenso de expresión génica de TNF $\alpha$  (Kopp H et al., 2003; Ryan A. et al., 2004); varios

autores consideran a la pérdida de peso ocasionada por ejercicio como un factor antiinflamatorio (Hammett C. et al., 2006; Nicklas B. et al., 2004; Verdaet D. et al., 2004).

Reportes recientes sugieren que IL1 $\beta$  es un posible blanco terapéutico para modular la inflamación mediada por el complejo del inflamosoma NLRP3 que se encuentra caracterizado como un factor inflamatorio muy importante en la patología asociada conocida como hígado graso no alcohólico (NALDF), esto se debe a que cuando aumenta la producción de IL1 $\beta$  vía la activación de la caspasa-1 causa la inflamación en hígado (Cook et al., 2010).

Una de las características típicas que presenta el inflamosoma NLRP3 (el vinculado a hígado graso) es la excesiva secreción de IL1 $\beta$  aunado a una sobreexpresión génica de IL1 $\beta$  (Cook et al., 2010).

Algunos estudios sobre la progresión de cáncer ligada a la inflamación en el modelo de ratón muestran que bloqueando IL1 $\beta$  disminuye la expresión de IL-6 lo cual conduce a reducir de manera significativa la inflamación y con esto la progresión de esta enfermedad (Cook et al., 2010).

Imaeda y colaboradores (2009) encontraron que la síntesis de IL1 $\beta$  en hígado es dependiente de TLR9 y es parte importante en la formación del complejo NLRP3 (Imaeda et al., 2009). Miura y colaboradores por su parte, en su estudio del año 2010 observaron en que células de Kupffer de ratones C57BL/6 nocaout para Myd88 $^{-/-}$  / TLR9 $^{-/-}$  presentaban

una subexpresión de IL1 $\beta$  aún bajo el estímulo de dieta deficiente de colina (CDAA) la cual es una dieta hipercalórica, con esto concluyó al igual que Imaeda que la secreción de IL1 $\beta$  en hígado (producido por células de Kupffer) es dependiente de TLR9; además concluyó que el efecto nocaout de Myd88 $^{-/-}$  / TLR9 $^{-/-}$  confería “protección” al desarrollo de esteatohepatitis y a su vez al desarrollo de esteatohepatitis no alcohólica (NALDF), comparado con ratones normales (Miura et al., 2010; Imaeda et al., 2009).

Los resultados de este estudio en hígado muestran lo siguiente:

*La DG ocasiona un cambio de expresión génica de TLR4 comparada con la expresión génica observada bajo una dieta estándar (DC); TLR9 e IL1 $\beta$  no mostraron cambios.*

**TLR4** mostró un aumento en la expresión génica con una significancia estadística de 0.001 (p= 0.001) entre el grupo DG comparado con el grupo DC (figura 11, tabla 2 y tabla 5); esto coincide con lo observado por Davis en sus estudios, en los cuales ellos argumentan que la expresión de este gen aumenta bajo el estímulo de una dieta rica en grasa (Davis et al., 2008).

| Significancia estadística (Expresión génica en hígado) |       |      |             |
|--|-------|------|-------------|
|  | TLR4  | TLR9 | IL1 $\beta$ |
| DC/DG  | 0.001 | 0.73 | 0.436       |

\*Dieta Control (DC), Dieta Grasa (DG), Dieta Grasa Ejercicio Intenso (DGEi), Dieta Grasa Ejercicio Leve (DGEL).

**Tabla 5. Significancia estadística de la expresión génica en hígado de las ratas Sprague Dawley entre el grupo DC y el grupo DG.**

*La DGEL ocasiona un cambio de expresión génica de IL1 $\beta$  comparada con la expresión génica observada bajo una dieta estándar (DC); TLR4 y TLR9 no mostraron cambios importantes.*

**IL1 $\beta$**  mostró una subexpresión génica en el grupo de DGEL comparado contra el grupo de DC (figura 11, tabla 2 y tabla 6); este cambio no implica una significancia estadística alguna bajo nuestras condiciones experimentales. Sin embargo Gómez-Merino en el 2007 en su estudio, el cual es muy similar, observó una subexpresión génica significativa de IL1 $\beta$  en tejido adiposo visceral de ratas Wistar bajo el estímulo de ejercicio moderado; lo cual indica que existen sutilezas de expresión génica entre el modelo de rata Wistar y el modelo de rata Sprague Dawley que es nuestro modelo (nosotros también detectamos subexpresión génica pero no significativa).

| Significancia estadística (Expresión génica en hígado) |       |       |             |
|--|-------|-------|-------------|
|  | TLR4  | TLR9  | IL1 $\beta$ |
| DC/DGEL  | 0.606 | 0.277 | 0.743       |

\*Dieta Control (DC), Dieta Grasa (DG), Dieta Grasa Ejercicio Intenso (DGEi), Dieta Grasa Ejercicio Leve (DGEL).

**Tabla 6. Significancia estadística de la expresión génica en hígado de las ratas Sprague Dawley entre el grupo DC y el grupo DGEL.**

*La DGEi ocasiona un cambio de expresión génica de TLR9 comparada con la expresión génica observada bajo una dieta estándar (DC); TLR4, e IL1 $\beta$  no mostraron cambios importantes.*

**TLR4** mostró aumento en la expresión génica en el grupo de DGEi comparado contra el grupo de DC (figura 11, tabla 2 y tabla 7); este aumento en la expresión génica no tuvo una

significancia estadística bajo nuestras condiciones experimentales.

**TLR9** mostró un aumento significativo ( $p= 0.036$ ) en la expresión génica en el grupo de DGEi comparado contra el grupo de DC (figura 11, tabla 2 y tabla 7).

| Significancia estadística (Expresión génica en hígado) |      |       |             |
|--|------|-------|-------------|
|  | TLR4 | TLR9  | IL1 $\beta$ |
| DC/DGEi  | 0.2  | 0.036 | 0.167       |

\*Dieta Control (DC), Dieta Grasa (DG), Dieta Grasa Ejercicio Intenso (DGEi), Dieta Grasa Ejercicio Leve (DGEL).

**Tabla 7. Significancia estadística de la expresión génica en hígado de las ratas Sprague Dawley entre el grupo DC y el grupo DGEi.**

*La DGEL ocasiona un cambio de expresión génica de TLR4 comparada con la expresión génica observada bajo una dieta rica en grasa (DG); TLR9 e IL1 $\beta$  no mostraron cambios importantes.*

**TLR4** mostró una disminución significativa ( $p= 0.001$ ) en la expresión génica entre el grupo DGEL comparado con el grupo DG (figura 11, tabla 2 y tabla 8), tomando como base que la dieta grasa se encuentra en ambos casos es decir, que las condiciones basales son similares se puede considerar con sus debidas reservas, que esto coincide con lo observado por Flynn en sus estudios en células CD14+ de sangre de venosa mujeres de edad avanzada; también coincide con los resultados de Zanchi en su estudio del 2010, donde observó subexpresión de TLR4 en RNA total proveniente de músculo plantar de ratas Wistar hembras de 3 meses de edad.

| Significancia estadística (Expresión génica en hígado) |       |       |             |
|--|-------|-------|-------------|
|  | TLR4  | TLR9  | IL1 $\beta$ |
| DG/DGEL  | 0.001 | 0.541 | 0.2         |

\*Dieta Control (DC), Dieta Grasa (DG), Dieta Grasa Ejercicio Intenso (DGEi), Dieta Grasa Ejercicio Leve (DGEL).

**Tabla 8. Significancia estadística de la expresión génica en hígado de las ratas Sprague Dawley entre el grupo DG y el grupo DGEL.**

*La DGEi ocasiona un cambio de expresión génica de TLR4 e IL1 $\beta$  comparada con la expresión génica observada bajo una dieta rica en grasa (DG); TLR9 no mostró cambios importantes.*

**TLR4** mostró una disminución en la expresión génica con una significancia estadística de 0.046 ( $p= 0.046$ ) entre el grupo DGEi comparado con el grupo DG (figura 11, tabla 2 y tabla 9); como ya se ha mencionado anteriormente, esto coincide con lo que Flynn describió en sus pacientes; también coincide con lo que observó Gleeson en monocitos CD14+ provenientes de sangre periférica en pacientes humanos.

**IL1 $\beta$**  mostró un aumento en la expresión génica con una significancia estadística de 0.036 ( $p= 0.036$ ) entre el grupo DGEi comparado con el grupo DG (figura 11, tabla 2 y tabla 9); este fenómeno coincide con los resultados de Gollisch, quien encontró algo muy similar en la misma cepa de rata que usamos en este estudio (Sprague Dawley), sólo que él observó esta conducta en tejido adiposo. Por otro lado este fenómeno es muy interesante, ya que Lira en su estudio donde trabajó con ratas Wistar bajo ejercicio intenso describió que la expresión génica de IL1 $\beta$  descendía en tejido adiposo retroperitoneal, sin embargo en este

mismo experimento Lira observó que la expresión génica de IL1 $\beta$  descendía en tejido adiposo mesentérico, de manera que Lira encuentra 2 distintas conductas respecto a la expresión génica dentro del mismo experimento, esto nos hace reflexionar que a pesar de que en ambos casos Lira procesa tejido adiposo, la ubicación de este tejido marca cambios importantes en cuanto a un aumento en la expresión génica o un descenso en esta respecto a un estímulo de ejercicio intenso; por esto es muy importante caracterizar la expresión génica en tejidos de interés como en este caso el hígado; y como vemos incluso la cepa de rata que se utilice para el experimento en ocasiones muestra una conducta de expresión génica diferente.

| Significancia estadística (Expresión génica en hígado) |       |       |             |
|--|-------|-------|-------------|
|  | TLR4  | TLR9  | IL1 $\beta$ |
| DG/DGEi  | 0.046 | 0.114 | 0.036       |

\*Dieta Control (DC), Dieta Grasa (DG), Dieta Grasa Ejercicio Intenso (DGEi), Dieta Grasa Ejercicio Leve (DGEL).

**Tabla 9. Significancia estadística de la expresión génica en hígado de las ratas Sprague Dawley entre el grupo DG y el grupo DGEi.**

*La DGEi no ocasiona cambios de expresión génica de TLR4, TLR9 e IL1 $\beta$  comparada con la expresión génica observada bajo una dieta rica en grasa y un estímulo de ejercicio leve (DGEL).*

Los resultados de este estudio en músculo muestran lo siguiente:

- *El gen TLR4 no amplificó en tejido muscular de ratas Sprague Dawley.*

Resulta muy interesante constatar que la expresión génica es distinta no solo en tejidos sino que también en la ubicación de éstos; en este estudio no encontramos expresión génica en cuádriceps de ratas Sprague Dawley bajo ninguna condición ni con una dieta estándar, ni con una dieta grasa así como tampoco con estímulos de ejercicio ya sea intenso o leve; este dato es muy interesante ya que Zanchi encontró que en músculo plantar de rata Wistar hembra se daba una subexpresión génica de TLR4 comparada contra la rata control; es peculiarmente interesante reflexionar que además de la ubicación.

*Dentro de todas las combinaciones posibles: DC-DG, DC-DGEL, DC-Ei, DG-DGEL, DG-DGEi, y finalmente DGEL-DGEi; en ambos genes (TLR9 e IL1  $\beta$ ). Solo se observó cambio de expresión génica con significancia estadística en el gen TLR9 entre el grupo DGEL y DGEi.*

**TLR9** mostró un aumento en la expresión génica con una significancia estadística de 0.005 ( $p= 0.005$ ) entre el grupo DGEi comparado con el grupo DGEL (figura 12, tabla 2 y tabla 10). Este hallazgo es algo esperado, ya que como se argumentó anteriormente sabemos que el ejercicio intenso ocasiona daño celular contrario al ejercicio leve y que el DNA “basura” resultante de este daño celular activa la expresión génica de TLR9; esta sobreexpresión génica en TLR9 era algo esperado.

| Significancia estadística (Expresión génica en músculo) |       |             |
|---|-------|-------------|
|   | TLR9  | IL1 $\beta$ |
| DGEL/DGEi   | 0.005 | 0.13        |

**\*Dieta Control (DC), Dieta Grasa (DG), Dieta Grasa Ejercicio Intenso (DGEi), Dieta Grasa Ejercicio Leve (DGEL).**

**Tabla 10. Significancia estadística de la expresión génica en músculo de las ratas Sprague Dawley entre el grupo DGEL y el grupo DGEi.**

Respecto a la correlación en la expresión de genes conjuntando la expresión de todos los grupos en ambos tejidos, sólo se observó correlación entre los genes TLR9 e IL1 $\beta$  en tejido hepático; la correlación tuvo una de  $p=0.036$  (figura 13 y tabla 4).

Esto apunta que la expresión de los genes TLR9 e IL1 $\beta$  se encuentra estrechamente relacionada debido a que como se sabe la activación de TLR9 desemboca en una cascada de señalización en la cual se promueve la expresión de genes que codifican para citocinas proinflamatorias como son TNF $\alpha$ , IL6 e IL1 $\beta$  entre otros, de manera que lo observado corrobora en parte lo que se sabe acerca de la ruta de señalización que promueve TLR9, sin embargo es muy importante apuntar acerca de que es la primera vez que se hace referencia a la dieta y estímulos de ejercicio como un factor determinante y directo implicado en la expresión de la citocina proinflamatoria IL1 $\beta$  vía TLRs.

El patrón de expresión génica que exhibió TLR4 en hígado fue ideal respecto a lo observado en la literatura en otros tejidos es decir:

- Se observó una sobreexpresión de TLR4 entre el grupo DG y el grupo DC, como sabemos debido a que los ácidos grasos provenientes de la DG estimulan la expresión de TLR4.
- Se observó una subexpresión de TLR4 en DGEL y DGEi respecto al grupo de DG, esto se debe a que como sabemos el estímulo de ejercicio reduce la expresión génica ocasionada por los TLRs.

Respecto a la conducta de la expresión génica observada en TLR9, igualmente fue muy concorde a lo que reporta la literatura y a nuestra hipótesis:

- TLR9 mostró una expresión génica muy baja en dieta control así como en dieta grasa, esto concuerda con el hecho de que TLR9 no se activa con una dieta grasa.
- TLR9 bajo los estímulos de ejercicio efectivamente presenta una sobreexpresión, ya sea con DGEL o DGEi, esto es concordante con el hecho de que los estímulos de ejercicio ocasionan rompimiento tisular así como celular (esto es normal), este hecho genera trazas de ADN “basura o fragmentado” que en ocasiones suelen ser unicatenarias y este es el ligando de TLR9 por lo cual es muy lógico que los estímulos de ejercicio ocasionen una sobreexpresión génica de TLR9.

Finalmente en hígado la expresión de IL1 $\beta$  tuvo un patrón de expresión génica inesperado ya que la dispersión que presentó el grupo DC era muy amplia. Por otro lado hubo una expresión génica aparentemente menor de IL1 $\beta$  en DG que en DC; sin embargo la dispersión que se observó en DGEL y DGEi fue menor por lo que pensamos que el estímulo de ejercicio tiene un efecto “normalizador” en la conducta de dispersión que se observó en la expresión génica de IL1 $\beta$  en el grupo control (DC); lo que sí se logró observar y que es acorde a lo que se menciona en la literatura (observado en otros modelos y otros tejidos) es una sobreexpresión génica de IL1 $\beta$  entre DG y DGEi.

El patrón de expresión génica que exhibió TLR4 en músculo fue muy inusual e inesperada ya que no se logró detectar TLR4; nuestro gen constitutivo o control HPRT se comportó de

manera normal sin embargo simplemente no se observó expresión de TLR4; para poder explicar este hecho hay varias posibles explicaciones:

Posiblemente en el modelo de Rata Sprague Dawley existe alguna característica no reportada acerca de que el cuádriceps expresa muy poco TLR4; armar una discusión acerca de este punto resulta muy aventurado, lo que se ha reportado acerca de la expresión de TLRs en ratas es muy escaso; solo Zanchi en su estudio del 2010 reportó subexpresión de TLR4 en músculo plantar como resultado de un estímulo de ejercicio leve; tal vez el músculo cuádriceps per se es un músculo que en ratas tiene niveles de expresión de TLR4 indetectables, sin embargo esta aseveración carece de un argumento sólido. No se debe olvidar que las cepas usadas en laboratorio como por ejemplo la Sprague Dawley son genéticamente modificadas y en ocasiones estas modificaciones genéticas vienen acompañadas de características inusuales que no se observan en las ratas silvestres.

Por lo anterior es muy aventurado justificar la falta de expresión de TLR4 en cuádriceps por explicaciones no fundamentadas, la realidad es que se debe de profundizar bastante en el tema para analizar qué explicación puede justificar la falta de expresión de TLR4 en este músculo de la rata Sprague Dawley.

El patrón de expresión génica que presentó TLR9 en músculo de ratas Sprague Dawley no fue lo que se esperaba: hubo una expresión baja en DC; hubo una enorme dispersión en la expresión génica en DG; la expresión que mostró TLR9 en DGEL y DGEi fue similar a la de DC sin embargo tiene a ser más alta, aunque no lo suficiente como para aseverar que el ejercicio induce la sobreexpresión de TLR9; lo que sí se observa es que el ejercicio

ciertamente tiene una especie de efecto modulador ya que las expresiones obtenidas en DGEi y DGEL son similares. Por último, sí se observó que el ejercicio intenso produce, tal como lo marca la literatura, mayor destrucción de tejido tisular y celular, y como resultado de esto, una mayor cantidad de ADN fragmentado), esta conclusión surge a partir de que si se observa una sobreexpresión entre DGEL y DGEi que incluso marca una significancia estadística de  $p= 0.005$ .

Finalmente la expresión génica de  $IL1\beta$  es muy, baja en músculo lo que indica que el cuádriceps de rata Sprague Dayley en realidad no es un tejido secretor de citocinas en la mayoría de los casos ya que la expresión observada en DC, DG y DGEL es prácticamente la misma; sin embargo se encontró algo muy interesante ya que la DGEi ocasiona una, me atrevería a decir “hiperexpresión génica de  $IL1\beta$ ” que es muy evidente; como se ha comentado anteriormente se sabe que el ejercicio intenso induce una enorme cantidad de trazas de ADN “basura o fragmentado” que promueven una expresión exacerbada de  $IL1\beta$ , de alguna manera es muy lógico pensar que el músculo directamente es el órgano que tiene más ruptura tisular y/o celular como resultado del ejercicio; posiblemente por eso se observa de manera muy notable la expresión de  $IL1\beta$  en DGEi.

### **Conclusión.**

- La dieta alta en grasa a la cual se sometieron las ratas Sprague Dawley ocasiona una elevación en la expresión a nivel de RNAm de TLR4 en hígado.
- Los estímulos de ejercicio ya sea intenso o leve reducen la expresión génica de TLR4 en hígado de ratas Sprague Dawley que están recibiendo un estímulo de dieta

grasa. Este fenómeno muestra significancia estadística, particularmente en hígado, cuando comparamos DG contra DGEL.

- El estímulo de ejercicio intenso aumentan la expresión génica de TLR9 en hígado mientras que se observa una reducción de la expresión génica en músculo bajo el estímulo de dieta grasa.
- El ejercicio intenso produce una sobreexpresión de IL1 $\beta$  en músculo sin significancia estadística; en hígado también se produce una sobreexpresión génica pero se observa solo cuando se compara dieta grasa más ejercicio intenso contra dieta grasa.
- En músculo se observa una sobreexpresión génica de TLR9 en DGEi comparada con DGEL.
- Se estableció por primera vez una relación: dieta – ejercicio – TLRs – citocinas proinflamatorias; esta relación lineal no había sido descrita de esta manera anteriormente.

Como última capitulación de este trabajo es muy importante notar que los resultados indican que TLR4 en hígado es el gen que varía de manera más notable su expresión como respuesta a los distintos estímulos (DG, DGEL y DGEi); por eso creemos que este gen se perfila para ser el mejor candidato como biomarcador, al menos en este tejido.

## Literatura consultada.

Abbas, Abul K. & Litchman, Andrew H. (2004), *Inmunología Celular y Molecular*. Madrid: El Servier España.

Akira S. and Kawai T. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004. Vol.4 No. 7, p. 499-511.

Alexopoulou L., Thomas V., Schnare M., Lobet Y., Anguita J., Schoen R., Medzhitov R., Fikrig E. and Flavell R. Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nat. Med*. 2002. No. 8, p.878-884.

Armstrong R. Muscle damage and endurance events. *Sports Med*. 1986. No. 3, Vol. 5 p. 370-381.

Banchereau J, & Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998. No. 392. Vol. 6673, p.245-52.

Barbany I. Cairó, J (2002). *Fisiología del Ejercicio Físico y del Entrenamiento*. Paidotribo: Barcelona

Bautista G., Mosqueda G. Role of toll-like receptors in innate immunity and their implication in veterinary medicine. *Vet. Méx*. 2005. Vol 36, No. 4, p. 453-488.

Belge K., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T., Ziegler-Heitbrock, L. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J. Immunol*, 2002. No. 16, p. 3536–3542.

Bouchard C., Malina, R. & Perusse, L. (1997). *Genetics of Fitness and Physical Performance*. Champaign, IL: Human Kinetics.

Booth S., Florida-James G., McFarlin B., Spielmann G., O'Connor D., Simpson R. The impact of acute strenuous exercise on TLR2, TLR4 and HLA.DR expression on human blood monocytes induced by autologous serum. *Eur J Appl Physiol*. 2010. No. 110, Vol. 6. p 1259-1268.

Brunsgaard H., Ladelund S., Pedersen A., Schroll M., Jorgensen T and Pedersen B. Predicting death from tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in 80-year-old people. *Clin. Exp. Immunol*. 2003. No. 132, p.24-31.

Buqué X, Aspichueta P, Ochoa B. Molecular basis of obesity-related hepatic steatosis. *Rev Esp Enferm Dig*. 2008. No. 100. Vol. 9, p.565-578.

Cao C., Yang Q., Lv F., et al. Reduced cerebral ischemia–reperfusion injury in Toll-like receptor 4 deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2007. No. 353, p. 50.

Clarkson P., Sayers S. Etiology of exercise-induced muscle damage. *Can J Appl Physiol*. 1999. No. 24, Vol. 3. p. 234-248.

Cook G., Savic S., Wittmann M., McDermott M. The NLRP3 inflammasome, a target for therapy in diverse disease states. *Eur J Immunol*. 2010. No. 40, Vol.3. p. 631-634.

Cook, D, Pisetsky D, Schwartz D. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nature Immunology*. 2004. Vol. 23, No. 4, p. 975-979.

Craig T. and Roger E. The effects of exercise-induced muscle damage on maximal intensity intermittent exercise performance. *European Journal of Applied Physiology*. 2005. No. 5-6, Vol. 94. p. 652-658.

- Davis J., Braucher D., Walker-Daniels J., Spurlock M. Absence of Tlr2 protects against high-fat diet-induced inflammation and results in greater insulin-stimulated glucose transport in cultured adipocytes. *J. Nutr. Biochem.* 2010 No.5 p, 65-68.
- Davis J., Gabler N., Walker-Daniels J., Spurlock M. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity (Silver Spring)*. 2008. No. 16, Vol.6. p.1248-1255.
- Ebbeling C., Clarkson P. Exercise-induced muscle damage and adaptation. *Sports Med.* 1989. No. 7, Vol. 4. p. 207-234.
- Febbraio M., Pedersen B. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J.* 2002, No.16, p. 1335–1347.
- Febbraio M., Pedersen B. Contraction-induced myokine production and release: is skeletal muscle an endocrine organ? *Exerc Sport Sci Rev.* 2005, No. 33, p.114–119.
- Fischer C. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exercise Immunol Rev* 2006. No.12, p. 6–33.
- Fisher C., Lickteig A., Augustine L., Oude Elferink R., Besselsen D., Erickson R., Cherrington N.. Experimental non-alcoholic fatty liver disease results in decreased hepatic uptake transporter expression and function in rats. *Eur J Pharmacol.* 2009. Vol. 24, No. 12, p. 119-127.
- Flynn M., McFarlin B., Phillips M., Stewart L. and Timmerman K. Toll-Like Receptor 4 and CD14 mRNA expression are lower in resistive exercise-trained elderly women. *J. Appl. Physiol.* 2003. No. 95, p. 1833-1842.
- Francaux M. Toll-like receptor signalling induced by endurance exercise. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2009. No.34, Vol.3. p.454-458.
- Gao B. Innate immunity and steatohepatitis: a critical role of another toll (TLR-9). *Gastroenterology.* 2010. No.139, Vol.1, p.27-30.
- Gleeson M., McFarlin B., Flynn M. Exercise and Toll-like receptors. *Exerc. Immunol. Rev.* 2006. No. 12, p. 34-53.
- Gogishvili T., Langenhorst D., Lühder F., Elias F., Elflein K., Dennehy K., Gold R. and Hünig T. Rapid regulatory T-cell response prevents cytokine storm in CD28 superagonist treated mice. *PLoS One.* 2009. Vol. 4, No. 2, p. 1-9.
- Gollisch K., Brandauer J., Jessen N., Toyoda T., Nayer A., Hirshman M, Goodyear L. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009. No. 297 Vol. 2, p. E495-504.
- Hammett C., Prapavessis H., Baldi J., Varo N., Schoenbeck U., Ameratunga R., French J., White H. and Stewart R. Effects of exercise training on 5 inflammatory markers associated with cardiovascular risk. *Am Heart J.* 2006. No. 151, p. 367e7-367e16.
- Hebbelinck, M. International organisations for sport sciences: developments and perspectives. *Sport. Science Review*, 1984. p.13–18.
- Hikida R., Staron R., Hagerman F., Sherman W., Costill D. Muscle fiber necrosis associated with human marathon runners. *J Neurol Sci.* 1983. No. 59, Vol. 2. P. 185-203.

- Hong S., Mills, P., Effects of an exercise challenge on mobilization and surface marker expression of monocyte subsets in individuals with normal vs. elevated blood pressure. *Brain Behav. Immun.* 2008. No. 22, p. 590–599.
- Imaeda A., Watanabe A., Sohail M., Mahmood S., Mohamadnejad M., Sutterwala F., Flavell R., Mehal W. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *J Clin Invest.* 2009. No. 119, Vol.2, p.305-314.
- Janeway C. Jr. & Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002. Vol. 20, p. 197-216.
- Jokl, E., Simon, E. International Research in Sport and Physical Education. Springfield (Ill): Thomas. 1964.
- Kaufmann S. The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines. *Nature Reviews Microbiology.* 2007. No. 5, p. 491-504.
- Kawai T and Akira S. TLR signaling. *Cell Death and Differentiation.* 2006. No. 13 Vol. 5, p. 816-825.
- Komulainen J., Vihko V. Exercise-induced necrotic muscle damage and enzyme release in the four days following prolonged submaximal running in rats. *Pflugers Arch.* 1994. No. 428, Vol. 3-4. p.346-351.
- Konat G., Kielian T., Marriott I. The role of Toll-like receptors in CNS response to microbial challenge. *J. Neurochem.* 2006 No. 99, p. 1–12.
- Kopp H., Kopp C., Festa A., Krzyzanowska K., Kriwanek K., Minar E., Roka R. and Scherthaner G. Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003. No. 23. Vol. 6, p.1042-1047.
- Laboratorios Bago. Ejercicio físico para la salud y la calidad de vida. disponible desde internet en: <[http://www.bago.com/cardired/Ejercicio\\_salud/Ejercicio\\_salud.asp#INICIO](http://www.bago.com/cardired/Ejercicio_salud/Ejercicio_salud.asp#INICIO)> [con acceso el 2-5-2011].
- Lai Y. and Gallo R. Receptores Toll-like en las infecciones de la piel y enfermedades inflamatorias. *Infect Disord Drug Targets.* 2008. Vol. 8, No. 3, p. 144-55.
- Lancaster G., Khan Q., Drysdale P., Wallace F., Jeukendrup A., Drayson M. and Gleeson M. The physiological regulation of toll-like receptor expression and function in humans. *J. Physiol* 2005. No. 563 Vol. 3, p. 945-955.
- Lang C., Silvis C., Deshpande N., Nystrom G., Frost R. Endotoxin stimulates in vivo expression of inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, -6, and high-mobility-group protein-1 in skeletal muscle. *Shock.* 2003. No. 19, p.538–546.
- Leidy H., Dougherty K., Frye B., Duke K., Williams N. Twenty-four-hour ghrelin is elevated after calorie restriction and exercise training in non-obese women. *Obesity (Silver Spring).* 2007. No. 15, p. 446-455.
- Lewis G., Farrell L., Wood MJ., Martinovic M., Arany Z., Rowe GC., Souza A., Cheng S., McCabe E., Yang E., Shi X., Deo R., Roth F., Asnani A., Rhee E., Systrom D., Semigran M., Vasan R., Carr S., Wang T., Sabatine M., Clish C., Gerszten R. Metabolic signatures of exercise in human plasma. *Sci Transl Med.* 2010. No. 26, Vol. 33, p. 33-37.
- Lin Y, Lee H., Berg A., Lisanti M., Shapiro L., Scherer P. The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *J Biol Chem.* 2000. No. 275, p. 24255–24263.
- Lira F., Rosa J., Yamashita A., Koyama C., Batista M. Endurance training induces depot-specific changes in IL-10/TNF-alpha ratio in rat adipose tissue. *Cytokine.* 2009 No.45 Vol. 2, p.80-85.

- Lockard M., Witkowski S., Jenkins N., Spangenburg E., Obisesan T., Hagberg J. Thrombin and exercise similarly influence expression of cell cycle genes in cultured putative endothelial progenitor cells. *J Appl Physiol*. 2010. No. 108, p. 1682-1690.
- O'Neill L., "Immunity's Early-Warning System", *Scientific American*. 2005. No. 292, p. 38-45.
- McFarlin B., Flynn M., Campbell W., et al. Physical activity status, but not age, influences inflammatory biomarkers and toll like receptor 4. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci*. 2006. No. 61, p. 388–393.
- Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2001. No. 1. Vol. 2, p.135-145.
- Mencin A., Kluwe J., Schwabe R. Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. *Gut*. 2009. No. 58, Vol. 5, p.704-720.
- Miura K., Kodama Y., Inokuchi S., Schnabl B., Aoyama T., Ohnishi H., Olefsky J., Brenner D., Seki E. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. *Gastroenterology*. 2010. No. 139, Vol.1. p.323-334.
- Nadeau K., Ehlers L., Aguirre L., Moore R., Jew K., Ortmeier H., Hansen B., Reusch J., Draznin B. Exercise training and calorie restriction increase SREBP-1 expression and intramuscular triglyceride in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006. No. 291, p. 90-98.
- Nicklas B., Ambrosius W., Messier S., Miller G., Penninx B., Loeser R., Palla S., Bleecker E. and Pahor M. Diet-induced weight loss, exercise, and chronic inflammation in older, obese adults: a randomized controlled clinical trial. *Am J Clin Nutr*. 2004. No. 79, p. 544-551.
- Nielsen A., Mounier R., Plomgaard P., Mortensen O., Penkowa M., Speerschneider T., Pilegaard H., Pedersen B. Expression of interleukin-15 in human skeletal muscle: effect of exercise and muscle fibre type composition. *J Physiol*. 2007. NO. 584, p.305–312.
- Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol*. 2005. No. 560. p. 11-18.
- Paterno A. Factores de riesgo coronario en la adolescencia. Estudio FRICELA. *Rev. Esp. Cardiol*. 2003. Vol. 56, No. 5, p. 452-458
- Pedersen B., Akerstrom T., Nielsen A., Fischer C. Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol*. 2010, No. 103, p. 1093–1098.
- Pedersen B., Steensberg A. Exercise and hypoxia: effects on leukocytes and cytokines—shared mechanisms? *Med Sci Sports Exerc*. 2002. No. 34, p. 2004–2013.
- Pedersen B., Steensberg A., Fischer C., Keller C., Keller P, Plomgaard P., Wolsk-Petersen E., Febbraio M. The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? *Proc Nutr Soc*. 2004. No. 63, p. 263–267.
- Pedersen B., Steensberg A., Fischer C., Keller C., Keller P., Plomgaard P., Febbraio M., Saltin B. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *J Muscle Res Cell Motil*. 2003.No. 24, p.113–119.
- Pedersen B., Steensberg A., Keller P., Keller C., Fischer C., Hiscock N., Hall G., Plomgaard P., Febbraio M. Muscle-derived interleukin-6: lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects. *Pflügers Arch*. 2003. No. 446, p. 9–16.
- D. Exercise-induced muscle damage and inflammation: a review. *Aust J Sci Med Sport*. 1994. No. 26, Vol. 3-4. p. 49-58.

- Reynaert H, Geerts A, Henrion. The treatment of non-alcoholic steatohepatitis with thiazolidinediones. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 2005. No. 22. p. 897–905.
- Rosa C., Lira S., Eguchi R., Pimentel D., Venancio P., Cunha A., Oyama M., De Mello T., Seelaender M, and Oller do Nascimento M. Exhaustive Exercise Increases Inflammatory Response via Toll Like Receptor-4 and NF-kBp65 Pathway in Rat Adipose Tissue. *Journal of Cellular Physiology.* 2010, p. 1604-1607.
- Roth S. (2007). *Genetics Primer for Exercise Science and Health.* Champaign, IL: Human Kinetics.
- Ryan A. and Niklas B. Reductions in plasma cytokine levels with weight loss improve insulin sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. *Diabetes Care.* 2004. No. 27. Vol. 7, p. 1699-1705.
- Sakurai T., Izawa T., Kizaki T., Ogasawara J., Shirato K., Imaizumi K., Takahashi K., Ishida H. & Ohno H. Exercise training decreases expression of inflammation-related adipokines through reduction of oxidative stress in rat white adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2009. No. 379, p. 605-609.
- Sánchez E, Orozco G. and Martín J. Toll-like receptors and human pathology. *Inmunología* 2004. Vol. 23, No 4, p. 328-338.
- Silva R., Vieira R., Duarte A., Lopes F., Perini A. Mauad T., Martins M., Carvalho C. Aerobic training reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. *Eur Respir J.* 2010. No. 35, p. 994-1002.
- Simpson R., McFarlin B., McSporran C., Spielmann G., Hartaigh B., Guy K. Toll-like receptor expression on classic and pro-inflammatory blood monocytes after acute exercise in humans. *Brain. Behav. Immun.* 2009. No. 23 Vol. 2, p. 232-239.
- Solomon T. P. J., Sistrun S. N., Krishnan R. K., Del-Aguila L. F., Marchetti C. M., O'Carroll S. M., O'Leary V. B., Kirwan J. P. Exercise and diet enhance fat oxidation and reduce insulin resistance in older obese adults. *J Appl Physiol.* 2008. No. 104, p. 1313–1319.
- Sousa e Silva T., Longui C., Rocha M., Faria C., Melo M., Faria T., de Souza J., Rizzo L. Prolonged physical training decreases mRNA levels of glucocorticoid receptor and inflammatory genes. *Horm Res Paediatr.* 2010. No. 74, p. 6-14.
- Stich V., de Glisezinski I., Berlan M., Bulow J., Galitzky J., Harant I., et al. Adipose tissue lipolysis is increased during a repeated bout of aerobic exercise. *J. Appl. Physiol.* 2000. No.88, p.1277–1283.
- Takeda K, Kaisho T and Akira S. Toll-like receptors. *Annu. Review of Immunology.* 2003. No. 21, p. 335-376.
- Tilg H, Moschen A. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology.* 2010 No. 52. Vol. 5, p 1836-1846.
- Verdaet D., Dendale P., De Bacquer D., Delanghe J., Block P. and De Backer G. Association between leisure time physical activity and markers of chronic inflammation related to coronary heart disease. *Atherosclerosis.*2004. No. 176, p. 303-310.
- Wackerhage H., Miah A., Harris R., Montgomery H., Williams A. Genetic research and testing in sport and exercise science: a review of the issues. *J Sports Sci.* 2009 Vol. 27, No. 11. P. 1109-1116.
- Wasserman D., Abumrad N. Physiological bases for the treatment of the physically active individual with diabetes. *Sports Med.* 1989 No. 7 Vol. 6, p. 376-392.

Xagorari A. and Chlichlia K. Toll-like receptors and viruses: induction of innate antiviral immune responses. *Open Microbiology Journal*. 2008. No. 2, p. 49-59.

Yasari S, Prud'homme D, Wang D, Jankowski M, Levy E, Gutkowska J, Lavoie J. Exercise training decreases hepatic SCD-1 gene expression and protein content in rats. *Mol Cell Biochem*. 2010. No. 335, p. 291-299.

Zanchi N., Lira F., de Siqueira Filho M., Rosa J., de Oliveira Carvalho C., Seelaender M., Santos R., Lancha A. Chronic low frequency/low volume resistance training reduces pro-inflammatory cytokine protein levels and TLR4 mRNA in rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*. 2010. No.109, Vol. 6. p.1095-10102.

Zhang C. and Lodish H. Cytokines regulating hematopoietic stem cell function. *Current Opinion Hematology*. 2008. Vol. 15, No. 4, p. 307-311.

Zwagerman N., Plumlee C., Guthikonda M., Ding Y. Toll-like receptor-4 and cytokine cascade in stroke after exercise. *Neurol. Res*. 2010. No. 32 Vol. 2, p. 123-126.

## ANEXO I.

### Características de ratas Sprague Dawley

La rata Sprague Dawley es un modelo animal que sirve como un excelente modelo para estudios toxicológicos, reproductivos, farmacológicos, también son un modelo animal muy útil en la investigación y en estudios sobre el comportamiento.

Características comunes de la rata Sprague Dawley incluyen:

| Desarrollo de patologías asociadas con el modelo  | Uso en Investigación            |
|---|---------------------------------|
| • Hiperleptinemia   | • Para regular presión arterial |
| • Hiperfagia  | • Se adaptan a dietas           |
| • Hipertension  | • Aumento de Tejido Graso       |
| • Resistentes a leptina   | • Efectos Hormonales            |
|   | • Efectos Musculares            |
|   | • Efectos Neurológicos          |
|   | • Efecto Prevención/Reversión   |
|   | • Expresión Fenotípica          |
|   | • Estres                        |
| Cuadro de Harlan Laboratories Disponible en: <a href="http://www.harlan.com">www.harlan.com</a> |                                 |
| © 2008 Harlan Laboratories, Inc.  |                                 |

| Anatomía y fisiología    |   |
|--------------------------|---|
| Peso corporal de adultos | 250 - 300 g (mujeres); 450 - 520g (macho) |
| Vida útil                | 2.5 – 3.5 años                            |
| Frecuencia respiratoria  | 70 a 115 respiraciones por minuto         |
| Frecuencia cardíaca      | 250 a 450 latidos / minuto                |

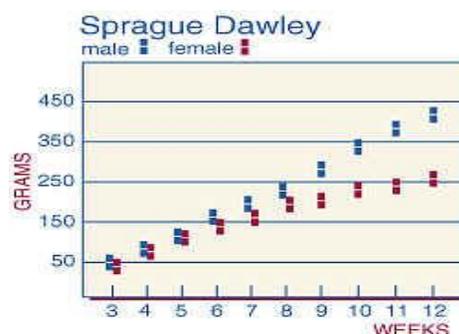
### Características Fisiológicas

|  |
|--|
| La fórmula dentaria es 2 (I 1 / 1, M 3 / 3) = 16. Los incisivos están abiertos de las raíces y crecen continuamente.   |
| El esófago hacia el estómago en la curvatura menor a través de un pliegue de tejido del estómago. Debido a esta disposición anatómica, la rata no es capaz de vomitar.   |
| Al igual que el caballo, la rata no tiene una vesícula biliar.   |
| El pulmón izquierdo consta de un lóbulo, el pulmón derecho se compone de cuatro lóbulos.   |
| La rata tiene cinco pares de glándulas mamarias. Distribución de tejido mamario es difuso, que se extiende desde la línea media ventral por los flancos, el tórax, y parte del cuello.   |
| La rata responde a la disminución de la temperatura ambiente por termogénesis sin escalofrío, y al aumento de la temperatura ambiente mediante el aumento de la vascularización de su larga cola, que puede servir como órgano de regulación térmica. Termogénesis sin escalofrío en su mayor parte se produce en la grasa marrón, la mayor concentración de que se encuentra en el tejido subcutáneo entre las escápulas. |
| Se utilizan ratas macho por la escases de procesos hormonales propios de las ratas hembras lo que facilita el tratamiento y entrenamiento de las mismas.   |

### Nutrición.

Las ratas deben fueron alimentadas con una dieta comercial especializadas para roedores (Rodent RQ 22-5; Zelger Bros, Inc., P.O. box 95, Gardners PA 17324 USA) y agua a voluntad. Estas dietas son nutricionalmente completas y no requieren suplementos.

La ingesta de alimentos es de aproximadamente 5g/100g peso corporal/día; la ingesta de agua es de aproximadamente 10-12ml/100g peso corporal / día.



### Referencia:

Ace Animals, Inc, Sage Labs. disponible en:

<http://www.aceanimals.com/SpragueDawley.html>

## ANEXO II.

### Programa de ejercicio para las ratas Sprague Dawley.

#### Rutina de reconocimiento al ejercicio en las ratas Sprague Dawley.

- Se mantuvo a las ratas caminando en la caminadora por 3 minutos diarios en un periodo de 4 días con una velocidad de 8.3 cm/seg.

#### Rutina de adaptación al ejercicio en las ratas Sprague Dawley.

- En base a las velocidades obtenidas durante la fase de reconocimiento se realizó una rutina durante tres días.
- En esta etapa se seleccionaron a las ratas que formaron los grupos:

| Velocidad<br>Cm/seg | Tiempo<br>Min |
|---------------------|---------------|
| 8.3                 | 2             |
| 13.3                | 2             |
| 18.3                | 2             |
| 36.6                | 2             |

#### Establecimiento de rutinas (ejercicio leve y ejercicio intenso).

- La rutina de Ejercicio Leve (DGEL) consistió en 3 fases (3 velocidades):

| Tiempo<br>min | Velocidad<br>Cm/seg |
|---------------|---------------------|
| 5             | 8.3                 |
| 5             | 13.3                |
| 20            | 18.3                |

- La rutina de Ejercicio Intenso (DGEi) consistió en 3 fases (3 velocidades):

| Tiempo<br>min | Velocidad<br>Cm/seg |
|---------------|---------------------|
| 5             | 13.3                |
| 5             | 18.3                |
| 20            | 36.6                |

Las ratas realizaron las rutinas a las velocidades y tiempos antes mencionados, por un periodo de dos semanas, posteriormente se efectuó el sacrificio un día después de la última exposición al ejercicio.

|  | Lunes | Martes | Miércoles | Jueves | Viernes |
|--|-------|--------|-----------|--------|---------|
| Semana 1   | 1     | 1,2    | 1         | 2      | 1       |
| Semana 2   | 1     | 2, Φ   | 2         | 2      | Φ       |
| Grupo 1.- DGEL    Grupo 2.- DGEi    Φ Sacrificio |       |        |           |        |         |