



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala



“Cambios en la expresión y producción de lipocalina 2 en ratones con diabetes tipo 2 sometidos a ejercicio aeróbico.”

Tesis de licenciatura para obtener el título de:

Cirujano Dentista

Presenta:

Barbara Zamora Ruiz

Director de tesis:

Dra. Ana Lilia García Hernández

Dictaminadores:

Dr. Isaac Obed Pérez Martínez

M en C. Saúl Ernesto Cifuentes Mendiola

Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 13 de mayo de 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-DGAPA-PAPIIT) por el financiamiento para la realización de este trabajo con número de proyecto: *IN213122* y el financiamiento *COMECYT-FICDTEM-2021-075*.

A mis padres por su apoyo, comprensión, consejos y tiempo.

A Chayi y a mi hermana Angie por darme todo su amor, por motivarme, por formar esta relación tan bonita, por las risas, las lágrimas, las aventuras y por creer en mí. Sin ustedes nada de esto hubiera sido posible, espero que pronto podamos viajar a Corea del Sur y conocer el país juntas, las amo.

A mis abuelitos Teté, Manuelito y Ángel, porque siempre creyeron en mí y en el tiempo que compartí con ellos siempre sentí su amor y su apoyo. Gracias por aparecer en mis sueños cuando más los necesito.

A una parte de la familia Ruiz y la familia Zamora por creer en mí, por su cariño y por su apoyo.

A Samuel por creer en mí, por sus consejos, por las aventuras, por su apoyo y por escucharme cuando más lo necesito. Somos un gran equipo.

A Manu por su amistad, las risas, por escucharme, por creer en mí y motivarme al mismo tiempo.

A mis amigos de las diferentes etapas de mi vida, ustedes saben quiénes son, los recuerdo con mucho cariño, siempre se preocupan por mí, me cuidan y me escuchan cuando más lo necesito. Nunca han dejado de creer en mí.

A mis profesores desde la guardería hasta la universidad, porque a pesar del paso del tiempo me recuerdan con cariño y siguen viendo potencial en mí.

A la Dra. Ana por ver potencial en mí, por darme una oportunidad y por su apoyo para la realización de este proyecto.

A Diana y Ernesto por su tiempo, anécdotas, risas, consejos y enseñanzas dentro y fuera del laboratorio.

A mi mente y cuerpo por unir fuerzas para llegar hasta acá.

"Incluso las cicatrices que dejaron tus errores forman parte de tu hermosa constelación."

Love Myself - BTS

"Vuela hasta alcanzar lo más alto, este es el camino que elegiste, no te desanimes ahora, después de todo este es el primer vuelo."

Outro: Wings - BTS

Índice

Resumen	4
Abstract	5
1.Introducción	6
1.1 Diabetes Mellitus Tipo 2	6
1.2 Osteopatía como complicación de DM2	7
1.3 Lipocalina 2	9
1.4 Papel de la Lipocalina 2 en la fragilidad ósea y diabetes.....	10
1.5 Efecto del ejercicio aeróbico sobre la salud ósea	13
1.6 El ejercicio aeróbico y el control glucémico	14
2.Antecedentes.....	16
3.Justificación	18
4.Hipótesis	19
5. Objetivo	19
6. Estrategia Experimental	19
7. Material y Métodos.....	20
7.1 Animales	20
7.2 Inducción de DM2	21
7.3 Obtención de muestras de sangre y curvas de tolerancia a la glucosa e insulina	22
7.4 Inversión del ciclo luz/oscuridad	23
7.5 Ejercicio aeróbico	24
7.6 Obtención de muestras	25
7.7 Cuantificación de LCN2 en suero.....	25
7.8 Análisis de la actividad específica de la fosfatasa alcalina en el fémur	26
7.9 Análisis estadístico	26
8. Resultados.....	27
8.1 El EA de mediana intensidad genera pérdida de peso corporal, disminución del IMC y de la circunferencia abdominal en ratones con DM2.....	27
8.2 El EA de baja y mediana intensidad disminuyen la hiperglucemia e incrementan la sensibilidad a la insulina y solo el EA de mediana incremental la tolerancia a la glucosa en ratones con DM2	29
8.3 El EA de baja y mediana intensidad disminuye la concentración sérica de LCN2 en ratones con DM2	30
8.4 Los niveles de LCN2 en suero de ratones diabéticos con ejercicio aeróbico de baja y mediana intensidad se correlacionan positivamente con la resistencia a la insulina	31
8.5 El EA de baja y mediana intensidad en ratones con DM2 aumenta la actividad osteoblástica	32
8.6 Los niveles de LCN2 en suero de ratones diabéticos con ejercicio aeróbico de baja y mediana intensidad no se relacionan con el número de células positivas a fosfatasa alcalina.	33
9. Discusión	34
10. Conclusiones	37
11. Referencias	38

Resumen

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un trastorno metabólico crónico caracterizado por hiperglucemia persistente, debido a la resistencia a la insulina y a la disfunción de células beta, provocando un pobre mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. La DM2 provoca el desarrollo de múltiples complicaciones en diferentes órganos y tejidos, una de ellas son las osteopatías las cuales aumentan la fragilidad ósea debido a una mala calidad de los huesos. Su fisiopatología involucra el incremento de lipocalina 2 (LCN2) que promueve la resorción ósea y altera la actividad osteoblástica lo que resulta en fragilidad ósea. La LCN2 es una citocina secretada principalmente por osteoblastos que está involucrada en el control del apetito, el metabolismo de la glucosa y regula el metabolismo óseo en condiciones normales. El ejercicio aeróbico ha mostrado ser eficaz para mejorar la salud metabólica y ósea en condiciones de salud y en enfermedades metabólicas a través de sus efectos antiinflamatorios; sin embargo, se desconoce si podría ser capaz de disminuir los niveles de LCN2 a nivel sistémico y si podría ser uno de los mecanismos que conducen a la mejora de la salud metabólica y ósea en la DM2. **Objetivo:** Determinar la concentración de lipocalina 2 en el suero de ratones diabéticos sometidos a ejercicio aeróbico y ver su correlación con el metabolismo de la glucosa y la función osteoblástica. **Material y métodos:** Se emplearon 18 ratones de la cepa C57BL/6 de cuatro semanas de edad divididos en controles sanos (n=9) y DM2 (n=9). A su vez cada grupo se dividió en sedentario, ejercicio aeróbico (EA) de intensidad baja (BI) y moderada (MI). La inducción de DM2 se realizó por medio de la administración de estreptozocina (SZC) y con dieta hipercalórica. El EA se realizó en ruedas para correr automatizadas y se controlaron ambas intensidades de EA de baja intensidad y de mediana intensidad por 10 semanas. **Resultados:** El peso, IMC y circunferencia abdominal se incrementaron en los ratones DM2-SED y DM2-BI. El EA de baja y mediana intensidad disminuyó la concentración de glucosa en sangre en los ratones con DM2 a niveles normales, e incrementaron el aprovechamiento de glucosa y la sensibilidad a la insulina. Los niveles séricos de LCN2 fueron menores en los grupos DM2 con ambas intensidades de EA en comparación con el grupo DM2-SED. El EA aumentó la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP). Además, observamos una correlación positiva entre los niveles de LCN2 y la resistencia a la insulina. **Conclusión:** El EA de mediana intensidad es más eficaz para mejorar la salud metabólica y la actividad osteoblástica a través de la disminución de LCN2.

Abstract

Diabetes mellitus type 2 (DM2) is a chronic metabolic disorder characterized by persistent hyperglycemia, due to insulin resistance and beta cell dysfunction, causing poor maintenance of glucose homeostasis. DM2 causes the development of multiple complications in different organs and tissues, one of them being osteopathies which increase bone fragility due to poor bone quality. Its pathophysiology involves the increase of lipocalin 2 (LCN2) which promotes bone resorption and alters osteoblastic activity resulting in bone fragility. LCN2 is a cytokine secreted mainly by osteoblasts that is involved in appetite control, glucose metabolism and regulates bone metabolism under normal conditions. Aerobic exercise has been shown to be effective in improving metabolic and bone health in healthy conditions and metabolic diseases through its anti-inflammatory effects; however, it is unknown whether it might be able to decrease LCN2 levels at the systemic level and whether it could be one of the mechanisms leading to improved metabolic and bone health in DM2. **Objective:** To determine the concentration of lipocalin 2 in the serum of diabetic mice subjected to aerobic exercise and to see its correlation with glucose metabolism and osteoblastic function. **Material and methods:** Eighteen 4-week-old C57BL/6 mice were divided into healthy controls (n=9) and DM2 (n=9). Each group was further divided into sedentary, low (BI) and moderate (MI) intensity aerobic exercise (EA). DM2 induction was performed by administration of streptozocin (SZC) and with hypercaloric diet. EA was performed on automated running wheels and both low-intensity and medium-intensity EA intensities were monitored for 10 weeks. **Results:** Weight, BMI and abdominal circumference were increased in DM2-SED and DM2-BI mice. Low- and medium-intensity EA decreased blood glucose concentration in DM2 mice to normal levels, and increased glucose utilization and insulin sensitivity. Serum LCN2 levels were lower in the DM2 groups with both intensities of EA compared with the DM2-SED group. EA increased alkaline phosphatase (ALP) activity. In addition, we observed a positive correlation between LCN2 levels and insulin resistance. **Conclusion:** medium-intensity EA is more effective in improving metabolic health and osteoblastic activity through LCN2 decrease.

1. Introducción

1.1 Diabetes Mellitus Tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un trastorno metabólico crónico que se caracteriza por hiperglucemia persistente causada por una disminución en la acción periférica de la insulina, lo que se define como resistencia a la insulina (1).

La DM2 representa entre el 90% y 95% de todos los casos de diabetes a nivel mundial. El riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (DM2) aumenta con la edad, la obesidad, factores genéticos, la dieta y la falta de actividad física (4).

Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018, publicada por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en México 8 millones 600 mil personas padecen DM2, es decir el 10.3% de la población, de la cual, 11.4% eran mujeres y 9.1% eran hombres (2). Para el 2019 la Federación Internacional de Diabetes (IDF) estimó 12 millones 800 mil casos, colocando a México en el 6to lugar con más casos de diabetes a nivel mundial (3).

La DM2 se caracteriza por tres eventos principales:

a) Disfunción de las células β

La hiperglucemia y la hiperlipidemia inducen estrés oxidativo y estrés metabólico en las células β del páncreas, ya que generan especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales inhiben los canales de Ca^+ activando las vías de respuesta apoptótica de la proteína desplegada (UPR) e inducen la liberación de $\text{IL-1}\beta$, la cual recluta macrófagos y aumenta la inflamación local en los islotes pancreáticos. Como resultado la organización de los islotes y la comunicación entre células β se afecta, y por lo tanto hay una regulación deficiente en la liberación de insulina (5).

b) Resistencia a la insulina

Cuando hay una alteración/disminución de la respuesta metabólica de la insulina en las células se le conoce como resistencia a la insulina (IR). Esta puede dividirse en tres categorías: 1) Disminución de la secreción de insulina en las células β , 2)

Efecto antagonista sobre la insulina por medio del aumento de la secreción de glucagón, glucocorticoides y catecolaminas, las cuales alteran la señalización en los receptores de insulina y 3) Alteración de la respuesta a la insulina en los tejidos diana cómo: el tejido adiposo, el músculo esquelético y el hígado (5).

c) Gluconeogénesis excesiva en el hígado

En estados fisiológicos normales la acción del glucagón + insulina, da como resultado la regulación de la producción de glucosa hepática. Mientras que el glucagón induce la producción de glucosa hepática, la insulina actúa como un inhibidor de la producción de glucosa cuando su concentración en sangre es elevada (5). En la DM2 los niveles fisiológicos de insulina circulante son insuficientes, esto altera la regulación de la producción de glucosa hepática, ya que no hay quien inhiba esta producción cuando los niveles de glucemia son altos.

1.2 Osteopatía como complicación de la DM2

La DM2 produce hiperglucemia crónica que en conjunto con otras alteraciones metabólicas cómo el estrés oxidativo, pueden generar daños a los diferentes sistemas que conforman nuestro cuerpo, lo cual lleva al desarrollo de complicaciones de salud discapacitantes y potencialmente mortales (1). Una de estas complicaciones es la alteración del metabolismo óseo y el deterioro de la microarquitectura ósea, esto quiere decir que existe una relación directa entre el tejido óseo y el metabolismo de la glucosa, la cual veremos más adelante.

El tejido óseo es un tejido conjuntivo formado por cuatro tipos de células: Osteoblastos, Células del revestimiento óseo, Osteocitos y Osteoclastos (7,8). Las funciones de este tejido son: la locomoción, dar protección a los órganos vitales y a los tejidos blandos, el almacenamiento de calcio y fosfato, alojar a la médula ósea y la hematopoyesis (7).

En años recientes, se ha reconocido que las osteopatías son complicaciones frecuentes en los pacientes diabéticos, que resultan en una alta prevalencia de fracturas ocasionadas por caídas y/o eventos no traumáticos. Lo anterior, se da

pesar de que de forma interesante las personas que padecen DM2 tienen un incremento de 5 a 10% en la densidad mineral ósea (DMO) en comparación con las no diabéticas (7-10).

Actualmente, no existe un registro epidemiológico exacto de esta complicación, sin embargo, diversos estudios indican que hombres y mujeres con DM2 presentan un riesgo hasta 3 veces mayor de sufrir fracturas principalmente en cadera, fémur, espina y muñeca (8). El incremento de fracturas disminuye de manera importante la calidad y esperanza de vida en las personas con DM2 debido a que se requieren periodos prolongados de inmovilización que generalmente empeoran o facilitan la aparición de otras complicaciones de la DM2 (11-15).

Se ha propuesto que el riesgo de fractura en la DM2 se ve influenciada en gran parte por factores como el tiempo de evolución, un índice de masa corporal elevado, la presencia de otras complicaciones derivadas de la DM2 y algunos tratamientos antidiabéticos (8, 11, 16).

Se ha reportado que los pacientes diabéticos tipo 2 con más de 10 años de evolución presentan mayor riesgo de fractura en comparación con los recién diagnosticados, además de que tienden a presentar fracturas más severas y en su mayoría se ven afectados los huesos de soporte (17-20).

El incremento en la DMO en comparación a pacientes no diabéticos es más marcado en aquellos con un índice de masa corporal (IMC) elevado. Una mayor DMO se atribuye a que el hueso se adapta para soportar las cargas mecánicas a las que es sometido por el aumento de tejido adiposo, sin embargo, el hueso formado es menos resistente (16).

El uso de insulina aumenta la susceptibilidad de padecer periodos de hipoglucemia, lo que afecta directamente a las células óseas y favorece el desarrollo de la hipotensión ortostática y sarcopenia que aumentan el riesgo de caídas y por tanto de fracturas (8, 21).

En los últimos años se ha sugerido que el deterioro en la calidad del hueso, específicamente en la microarquitectura y las propiedades materiales óseas provocadas por la DM2 son las responsables del desarrollo de fragilidad ósea (10, 22).

A nivel microestructural, se ha visto mediante resonancia magnética (MRI) y por tomografía cuantitativa computarizada (qCT) que el hueso de pacientes con DM2 tiene un incremento en la porosidad ósea cortical y una disminución en la masa del hueso trabecular (12).

Así mismo, los exámenes de microindentación y de análisis de elementos finitos, que son técnicas recientemente diseñadas para medir las propiedades biomecánicas óseas, indican que las tibias y los fémures en modelos animales con DM2 tienen menor resistencia, rigidez y capacidad de carga (9, 17).

Acorde con estos hallazgos, se ha determinado que las alteraciones en la microestructura y de las propiedades materiales afectan considerablemente la integridad biomecánica del hueso, que deriva en la incapacidad de adaptación de este a las cargas a las que es sometido. Es importante resaltar que el deterioro óseo es el resultado de mecanismos celulares y moleculares más complejos que repercuten en el proceso de remodelado y en la calidad ósea (23).

1.3 Lipocalina 2

La Lipocalina (LCN2), también conocida como 24p3 o lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), es una glucoproteína de 25 kDa producida por neutrófilos, adipocitos, macrófagos, hepatocitos, células renales y osteoblastos. La LCN2 está involucrada en una amplia variedad de procesos, y su función es dependiente del microambiente donde se produzca y el ligando al que se una (24, 25). Forma parte de la superfamilia de las lipocalinas, un grupo de proteínas circulatorias que transportan moléculas pequeñas e hidrofóbicas como esteroides, ácidos grasos, retinoides, prostaglandinas y hormonas. Se han propuesto dos

receptores de superficie celular SLC22A17 y 24p3R, los cuales se unen a LCN2 (26).

La estructura altamente conservada de LCN2 se compone de un barril beta de ocho hebras que forma un cáliz de cierre en una dirección antiparalela, que representa el sitio de unión del ligando interno que permite que la lipocalina se una a sus ligandos. Esta cavidad de unión de LCN2 es significativamente más grande y polar que otras proteínas de lipocalina. Esto permite que LCN2 se una a los receptores que se encuentran en la superficie de las membranas plasmáticas para formar grandes complejos de moléculas al unirse a ligandos más grandes y menos hidrofóbicos como proteínas de mamíferos, lo que a su vez permite que la célula lleve a cabo funciones clave en la división y regulación celular (26).

Se sabe que puede unirse a la metaloproteasa de matriz 9 (MMP-9) para incrementar su estabilidad y actividad lo cual es importante para la extravasación de neutrófilos, así como para la invasión y metástasis del cáncer (24). También tiene efectos proinflamatorios ya que es capaz de dirigir la infiltración de células inmunes, influye en la polarización de macrófagos M1, promueve la formación de células espumosas, la expresión del inflamosoma NLRP3 y se considera una proteína secuestradora de hierro en la respuesta inmune innata antibacteriana como se observa en la Fig.1 (27, 28).

1.4 Papel de la Lipocalina 2 en la fragilidad ósea y la diabetes tipo 2

Estudios más recientes en modelos murinos han descrito la participación de la LCN2 en el metabolismo energético ya que es altamente expresada en el tejido adiposo, especialmente en estados patológicos como la obesidad y la DM2 porque es inducida por el TNF- α e IFN- γ (28-31). Se ha observado una correlación positiva entre las concentraciones de LCN2 y la circunferencia abdominal, el porcentaje de grasa corporal, la presión sistólica, los niveles de glucosa en ayunas, las concentraciones séricas de insulina, triglicéridos y mediadores inflamatorios como la IL-1b, IL-6, IL-17 y TNF- α (29,32,33).

A través de estudios en modelos animales transgénicos, también se ha sugerido que la expresión LCN2 proveniente de osteoblastos es sumamente importante para múltiples procesos fisiológicos incluido el control del apetito mediante la unión al receptor MCR4 en el hipotálamo, la producción y sensibilidad a la insulina (31,34), la termogénesis y el gasto energético en el tejido adiposo marrón como se muestra en la Fig.1 (28).

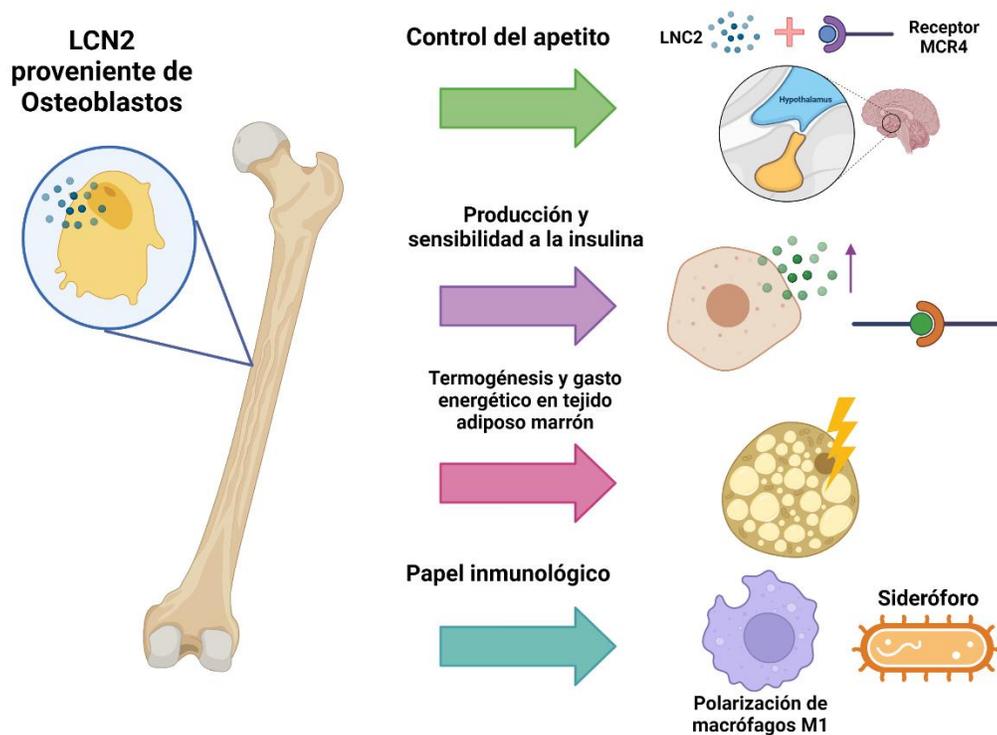


Fig.1 Papel de la LCN2 proveniente de osteoblastos en procesos fisiológicos como: el control del apetito, producción de la insulina, termogénesis y gasto energético, polarización de macrófagos M1 y en la respuesta inmune innata. Elaboración propia.

Por otro lado, se ha demostrado que la LCN2 participa en la regulación del metabolismo óseo ya que funciona como un factor sensible a estímulos mecánicos y se encuentra incrementado en modelos animales y humanos sometidos a protocolos de sedentarismo (33). Bajo estas condiciones, el aumento de LCN2 no solo favorece el desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina, sino que además reduce la diferenciación de osteoblastos y la formación ósea, a la vez que estimula

la producción de IL-6 y del ligando de receptor activador para el factor nuclear $\kappa\beta$ (RANKL) para promover la osteoclastogénesis y la resorción ósea patológica (24,25). De forma similar, en ratones transgénicos la sobreexpresión de LCN2 tiene efectos negativos en el tejido óseo ya que se encontraron huesos de menor tamaño, con disminución del número de trabéculas, y una pared cortical delgada. Estos cambios fueron atribuidos a la reducción de la aposición de matriz ósea por parte los osteoblastos, los cuales también disminuyeron su diferenciación como se muestra en la Fig.2 (35). A pesar de las asociaciones antes mencionadas, parece que cierta expresión de LCN2 es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis ósea y energética (25).

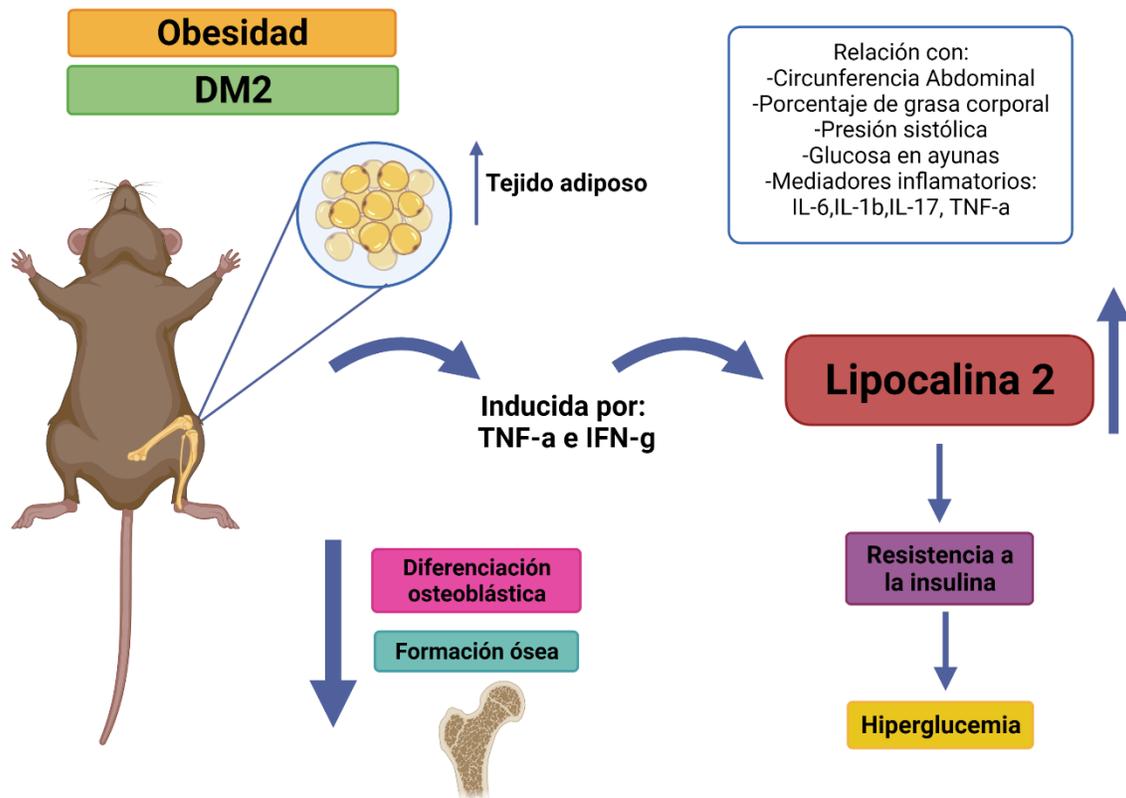


Fig.2 Los niveles elevados de la LNC2 alteran el metabolismo de la glucosa y el metabolismo óseo.
 Elaboración propia.

En un estudio realizado por Capulli y cols. (2017) (36), la ablación sistémica de LCN2 en ratones produjo osteopenia caracterizada por el adelgazamiento del

hueso cortical y una microarquitectura trabecular poco compleja, un número reducido de osteoblastos y una menor tasa de formación ósea. Estos fenómenos los atribuyeron a la alteración del metabolismo energético debido a la disminución de la expresión del transportador de glucosa GLUT-1, el cual es necesario para la captación de glucosa en osteoblastos y por lo tanto son fundamentales para su diferenciación y activación. La LCN2 se encuentra incrementada a nivel sistémico durante la DM2 y ha sido ampliamente relacionada con la hiperglucemia y la resistencia a la insulina.

1.5 Efecto del ejercicio aeróbico sobre la salud ósea

Se ha propuesto que una alternativa de tratamiento para la osteopatía diabética es por medio de la influencia mecánica sobre el hueso, ya que es común que en la obesidad y en la DM2 exista poca actividad física, lo que altera los mecanismos de remodelación y mineralización ósea, además aumentan la adiposidad de la médula ósea (37). La respuesta del hueso a este estímulo mecánico depende tanto de las células óseas maduras, como de las células troncales mesenquimales de la médula ósea (MSC) (37,38).

La actividad física ejerce fuerzas sobre la matriz ósea, incluidas las deformaciones, las aceleraciones y el esfuerzo cortante de fluido, las cuales se transducen a la población de células óseas, adipocitos y MSC, con la participación de redes citoesqueléticas compuestas principalmente por actina, microtúbulos y filamentos intermedios. Los cuales activan moléculas de señalización que incluyen a: MAP-quinasas, YAP/TAZ y β catenina. A partir de aquí se activa el complejo LINC en el núcleo de las células óseas maduras aumenta la señalización de β catenina activando la vía Wnt y en las MSC ocurren diferentes uniones en el núcleo entre LINC y la lámina A/C, provocando que entren en linaje osteogénico. Esto quiere decir que las MSC y su progenie diferenciada en linaje osteogénico son mecanosensibles, que al aumento de las señales mecánicas estimulan el anabolismo óseo como se muestra en la Fig.3 (38).

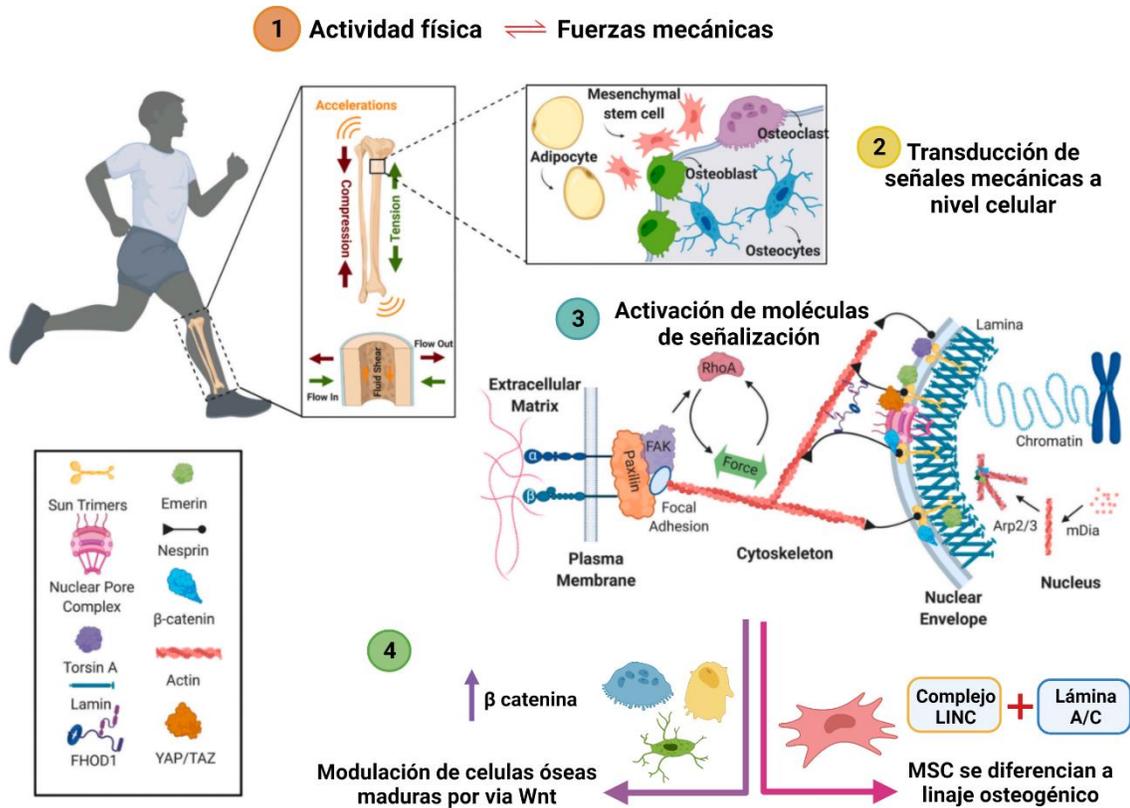


Fig.3 La actividad física ejerce fuerzas sobre la matriz ósea que se transducen a las células óseas e impulsan la diferenciación celular en linaje osteogénico y modulan la actividad de las células óseas maduras. Modificado (Birks,2021)

1.6 El ejercicio aeróbico y el control glucémico

Se ha reportado que el EA es un complemento clave en el tratamiento de la DM2 mejorando el control glucémico debido al aumento de la sensibilidad a la insulina periférica, a través de varios mecanismos moleculares. Algunas de las actividades consideradas como EA son: ciclismo, natación, caminata, trotar/correr y montañismo, las cuales en contraste con el entrenamiento físico de alta intensidad a corto plazo como los ejercicios de musculatura en donde la glucosa es el principal sustrato metabólico, mientras que con EA son los ácidos grasos (39-42).

En condiciones normales el mecanismo molecular llamado Transducción de Señal de Insulina (IST) inicia cuando la insulina se une a la cadena α del receptor de insulina (IR) esto genera cambios en la cadena β de IR los cuales conducen a la autofosforilación de los residuos de tirosina, al reclutamiento de sustratos del

receptor de insulina (IRS), la proteína transformadora de SHC y la proteína adaptadora con PH y la proteína de dominio SH2. De esta manera se activa IRS-1, posteriormente activa la fosfoinositido 3-quinasa la cual cataliza el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato en fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃), se activará a la proteína B quinasa (Akt) facilitando la entrada de la glucosa en la célula mediante la translocación de la proteína transportadora de glucosa 4 (GLUT4) a la membrana celular (40-44).

Sin embargo, un estilo de vida sedentario y una mala alimentación producen obesidad esto genera un mayor riesgo de resistencia a la insulina y desencadena en DM2. Se ven implicados diferentes mecanismos moleculares en los cuales el EA puede interferir de manera positiva promoviendo la sensibilidad a la insulina (Tabla.1) (40,42).

Tabla.1 Alteraciones en la DM2 donde el EA tiene efectos benéficos. (40,42) Elaboración propia.

Alteraciones en la DM2	Efectos del EA
El aumento de masa del tejido adiposo promueve la liberación de adipocinas (leptina, adiponectina, resistina y visfatina), proteína C reactiva y citocinas inflamatorias (IL-8, IL-6, IL-10 interferón γ y quimiocina de motivo CXC 10) los cuales promueven la inflamación.	Incrementa la lipólisis utilizando ácidos grasos como sustrato, esto reduce la masa corporal, la inflamación y mejora la resistencia a la insulina.
Al haber una falla en la expresión y localización de GLUT-4 puede resultar en una señal deficiente de la insulina y posteriormente resistencia a la insulina.	Aumenta la expresión de GLUT-4 en los músculos esqueléticos a través de la vía AMPK y Ca ²⁺ / proteína quinasa II dependiente de calmodulina las cuales inducen la expresión de GLUT-4, lo cual mejora el control glucémico.
La sobrecarga de radicales libres genera daño oxidativo, afectando la función de las células β .	A largo plazo mejora el estado redox y reduce la resistencia a la insulina.
Los niveles altos de cerámidas reducen la señalización de la insulina mediante varios mecanismos moleculares como la apoptosis de las células β , la inducción de respuestas inflamatorias, el estrés del retículo endoplásmico, mayor expresión de adipocinas, estrés oxidativo, resistencia a la insulina en tejidos periféricos y la reducción de la expresión de insulina en las células de los islotes pancreáticos.	Se ha observado reducción en los niveles plasmáticos de cerámidas, lo que resulta en una mejor señalización de la insulina y reduce la resistencia a la insulina.
Debido al deterioro de la IST normal, por el estrés oxidativo el cual provoca la fosforilación de serina IRS-1, 2 generando un poco activación de PI3K y resistencia a la insulina.	Aumento de la fosforilación de IRS-1, mejorando la transducción de la señal de insulina.

Se genera apoptosis y diferenciación de las células β debido a la alta demanda de producción de insulina.	Mejora la función y previene la apoptosis celular en los islotes pancreáticos.
Existe un área de superficie capilar reducida debido al sedentarismo ya que hay poca demanda de utilización de la insulina.	Induce la angiogénesis, lo cual conduce a un aumento de la densidad capilar y el desarrollo de nuevas redes vasculares, debido a la demanda de oxígeno y sustratos metabólicos aumentando la sensibilidad a la insulina.

2. Antecedentes

El desarrollo de DM2 conlleva a diferentes complicaciones a nivel sistémico debido a la alteración del metabolismo de la glucosa y la acumulación de tejido adiposo en otros tejidos, esto provoca un estado hiperglucémico persistente e inflamación crónica (5,6). Una de estas complicaciones es la fragilidad ósea por la inhibición de la actividad osteoblástica (16). Se sabe que el EA en condiciones de salud incrementa la calidad y resistencia ósea, además mantiene los niveles glucémicos en parámetros normales (37,38). En la DM2 el EA tiene efectos antiinflamatorios, disminuye la hiperglucemia y mejora la sensibilidad a la insulina por lo cual se ha sugerido que forme parte fundamental en el tratamiento de la DM2 (39,48).

El incremento de la concentración sérica de LCN2 en ratones y humanos inmovilizados sometidos a la reducción de actividad física y a enfermedades metabólicas como DM2 y obesidad, evidencia que los osteoblastos aumentan su capacidad para estimular la osteoclastogénesis mediante la inducción de factores proosteoclastogénicos como: RANKL e IL-6 y la osteoprotegerina (OPG) lo que sugiere que tiene un papel dominante sobre los osteoblastos (33,41,45).

Se evaluó la respuesta mecánica de LCN2 en el suero de pacientes sanos sometidos a reposo en cama, en el cual se observó un aumento significativo de esta proteína. Después lo realizaron en ratones sometidos a descarga mecánica inducida por 3 procedimientos diferentes: en ratones C57BL/6 con suspensión de extremidades traseras por 21 días (WT), en las patas traseras de ratones C57BL/6

se provocó parálisis muscular inducida por toxina botulínica (Botox) y en ratones (origen CB6F1/C57BL6) con distrofia muscular ligada al cromosoma X (MDX9) de ocho semanas de edad, donde también hubo un aumento significativo que fue contrarrestado por ejercicio aeróbico en los ratones WT y MDX9: 1. Correr a una velocidad de 9m/min durante 30min, dos veces por semana durante 3 semanas y 2. Nado forzado 5min 3 veces al día por 3 semanas. Los resultados arrojaron que los niveles séricos de LCN2 eran más altos después de la descarga mecánica inducida y se redujeron con el entrenamiento de nado forzado (33).

Un estudio evaluó el efecto de un programa de ejercicio aeróbico sobre los niveles de LCN2 en mujeres coreanas con obesidad, el programa de ejercicio aeróbico era de 45 min/ sesión, 3000 kcal/día y entrenamiento de fuerza muscular de 20 min/sesión, 100 kcal/día, ambos cinco veces a la semana. Se midieron los niveles de LCN2 antes de iniciar con el programa y fueron marginalmente significativos ($p=0.054$). Los niveles de IL-6 aumentaron significativamente después del programa de ejercicio, sin embargo, no hubo cambios significativos de la LCN2 (46).

Por otro lado, en un estudio clínico sometieron a pacientes obesos a actividad física especialmente con entrenamientos de resistencia durante 8 semanas mencionan que algunos mecanismos como la actividad física o la disminución de algunos marcadores inflamatorios como IL-6 y TNF- α pueden disminuir los niveles de LCN2, se sabe que la actividad física tiene la capacidad de ser antiinflamatoria, sin embargo, estos mecanismos deben ser más estudiados (41).

Otro estudio en personas sedentarias sometidas a ejercicio aeróbico por 12 semanas reportó que hay disminución de la masa corporal, de LCN2 en plasma y favorece a la tolerancia a la glucosa y a la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, algunos factores como IL-6 y TNF- α deben ser examinados para poder explicar la disminución de LCN2 en plasma ya que también disminuye la proteína C reactiva (PCR) la cual está involucrada en la inflamación crónica presente en la obesidad

(45).

Estos antecedentes son evidencia de que la LCN2 es una osteocina que al estar aumentada en estados inflamatorios crónicos procedentes de enfermedades metabólicas como la DM2, tiene un papel importante en regular de manera negativa los mecanismos principales de estos padecimientos, incluidos la hiperglucemia, la resistencia a la insulina y afectaciones como la fragilidad ósea por la inhibición de la actividad osteoblástica. Sin embargo, lo que se ha reportado no ha dejado claro si el ejercicio aeróbico de mediana intensidad puede disminuir los niveles séricos de LCN2 y que esto se vea reflejado en la actividad osteoblástica y en la regulación del metabolismo de la glucosa.

Por lo que en esta investigación nos centramos en evaluar el efecto del ejercicio aeróbico de mediana intensidad en los niveles de LCN2 en suero, en la hiperglucemia, la resistencia a la insulina y la función/activación osteoblástica.

3. Justificación

La LCN2 se encuentra incrementada en la DM2 y se ha sugerido que este incremento puede agravar la hiperglucemia, la resistencia a la insulina y la fragilidad ósea, mientras que la actividad física regula su expresión y se relaciona con una mejora de la salud ósea.

Se deben buscar tratamientos específicos para la fragilidad ósea observada en la DM2 y el EA representa una opción de tratamiento debido a sus efectos benéficos en la glucemia, la inflamación y la regulación de la calidad ósea, gracias a la modulación de osteocinas como la LCN2 y otros mediadores proinflamatorios.

Es necesario estudiar en un modelo murino de diabetes tipo 2 el efecto de la actividad física de diferentes intensidades en el papel y la relación de la LCN-2 en el metabolismo de la glucosa y la función osteoblástica debido a que la modulación de la LCN2 en la diabetes podría resultar en un tratamiento de la fragilidad ósea en la DM2.

4. Hipótesis

Si ratones con diabetes tipo 2 son sometidos a ejercicio aeróbico de baja o mediana intensidad, habrá una disminución de los niveles de LCN2 en suero y a su vez esto se correlacionará con la disminución en la resistencia a la insulina, la glucemia y el incremento de la actividad osteoblástica.

5. Objetivo

General

Determinar la concentración de lipocalina 2 en el suero de ratones diabéticos sometidos a ejercicio aeróbico y su correlación con el metabolismo de la glucosa y la función osteoblástica.

Particulares

En ratones sanos y con DM2, sometidos o no a ejercicio aeróbico de intensidad baja o mediana:

- 1) Caracterizar los cambios somatométricos y el perfil glucémico.
- 2) Cuantificar la concentración de LCN2 en suero.
- 3) Analizar la actividad osteoblástica en el fémur.
- 4) Relacionar las concentraciones plasmáticas de LCN2 con la sensibilidad a la insulina, la glucemia y la función osteoblástica.

6. Estrategia experimental

Para cumplir con los objetivos planteados, se diseñó una estrategia experimental en donde se resumen los métodos utilizados para la obtención de resultados como se observa en la Fig.4.

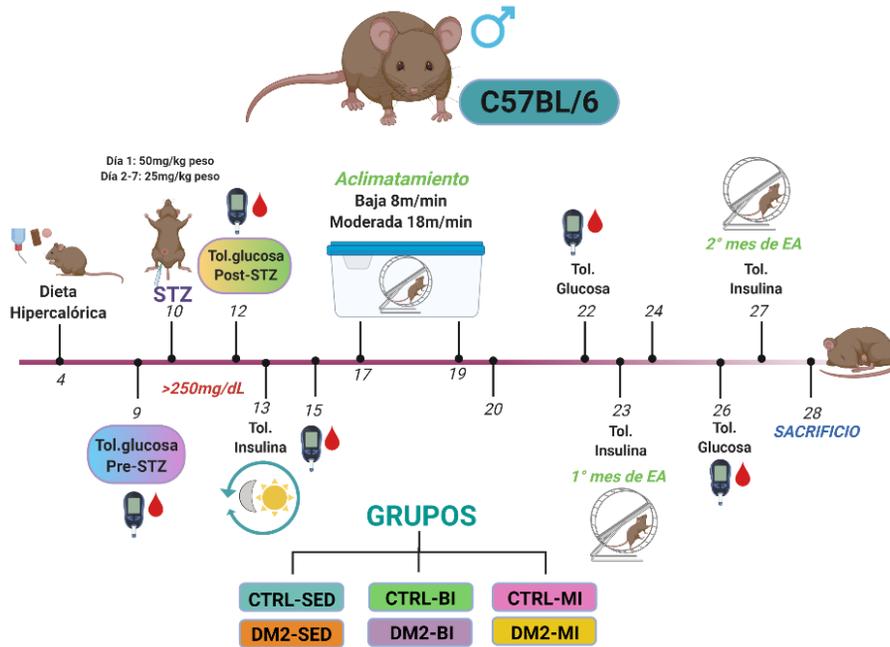


Fig.4 Desarrollo del experimento. Elaboración propia.

7. Material y métodos

Los procedimientos experimentales fueron realizados en el Laboratorio de Investigación Odontológica, Sección de Inmunidad Oral y Regulación Ósea, ubicado de la Clínica Universitaria de Salud Integral Almaraz perteneciente a la FES Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México en el período de agosto de 2020 a julio de 2021.

7.1 Animales

Este estudio se realizó bajo las recomendaciones mencionadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio" publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 28 de junio del 2001 y de acuerdo con las normas de la Comisión de Bioseguridad y de Ética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la

Universidad Nacional Autónoma de México. Teniendo los objetivos claros de este experimento se utilizó el menor número posible de animales por grupo.

Se utilizaron un total de 18 ratones macho de la cepa C57BL/6 de cuatro semanas de edad con un peso de entre 10 y 12 g. los animales fueron mantenidos en condiciones de bioterio a una temperatura constante de 23°C en cajas de acrílico individuales con 1 cm de cama sanitaria estéril, que se reemplazó diariamente al igual que el agua y el alimento. Todos los individuos fueron alimentados *ad libitum*.

Los 18 ratones fueron divididos en dos grupos principales: Control (CTRL) y DM2, a su vez estos se subdividieron como se muestra en la Fig.5.

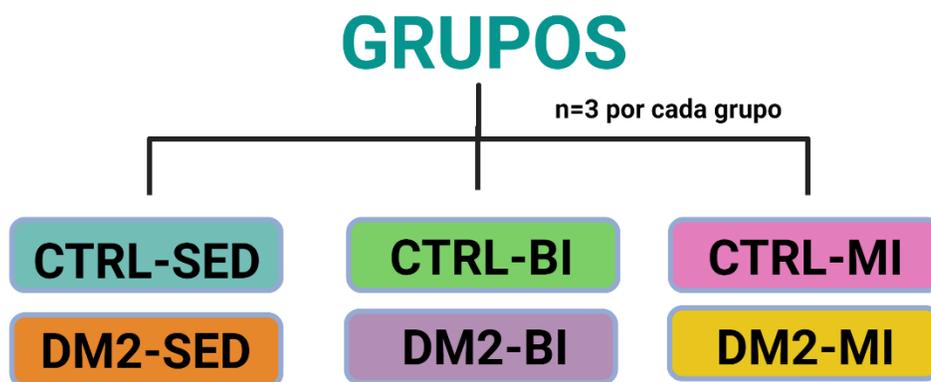


Fig.5 Distribución de los grupos de estudio dónde: Control (CTRL), Sedentario (SED), Diabetes Mellitus T2 (DM2), EA de Baja Intensidad (BI) y EA de Moderada Intensidad (MI). Elaboración propia.

7.2 Inducción de DM2

La DM2, fue inducida a través de la combinación de una dieta rica en carbohidratos para provocar resistencia a la insulina por obesidad la cual fue administrada durante todo el experimento (Tabla.2) y por la administración intraperitoneal de bajas dosis de estreptozocina (SZC) en pBS 1X (durante 7 días a partir de las 10 semanas de iniciada la dieta) de acuerdo con lo reportado por Yu et al. (2017) (46).

En concreto, el primer día se administró una dosis de 50mg/Kg y los días 2-7 una dosis de 25 mg/Kg.

Diariamente se monitoreo el peso y el consumo de alimento, semanalmente el IMC, la circunferencia abdominal semanal y la glucosa se midió cada 15 días.

Se consideró a los ratones como diabéticos, a aquellos cuyos índices de glicemia fueran >250mg/dL y que presentaran resistencia a la insulina reportado por Yu et al. (2017) (46).

Tabla 2. Composición de la dieta hipercalórica y estándar.

Dieta Hipercalórica Contenido energético: 5.4 Kcal/g			Dieta estándar Contenido energético: 3.8 Kcal/g
Pellets de LabDiet 5010	37.5%	15% Proteína	20% Proteína
Cacahuates	25%	46.5% Grasa	10% Grasa
Chocolate	25%	38.5% Carbohidratos	70% Carbohidratos
Galletas	12.5%		
Leche condensada	25%		
Dieta Líquida			Dieta líquida
Agua con chocolate (50 g/L)			Agua embotellada

7.3 Obtención de muestras de sangre y curvas de tolerancia a la glucosa e insulina

Se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa e insulina en la semana 9 previo a la inducción de DM2, en la semana 12 y 13 después de haber inducido la DM2, a la mitad del protocolo de entrenamiento en la semana 22 y 23 y antes del sacrificio en la semana 26 y 27.

Para la cuantificación de glucosa, los ratones se sometieron a ayuno durante 4-6 horas (9:00 a.m. a 15:00 p.m. antes de la inversión del ciclo, y de 23:00 p.m. a 5:00 a.m. una vez que se encuentran en ciclo invertido).

El procedimiento consistió en la administración por vía intraperitoneal de glucosa (1g/Kg de peso de ratón) e insulina (0.5UI/ Kg de peso de ratón) diluidas en PBS estéril según el caso, después se realizó una pequeña incisión en la vena caudal provocando un ligero sangrado, del cual se tomó una muestra de sangre con una tira reactiva de un glucómetro One Touch Ultra Mini en los minutos 0, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 como lo indica la Fig.6.

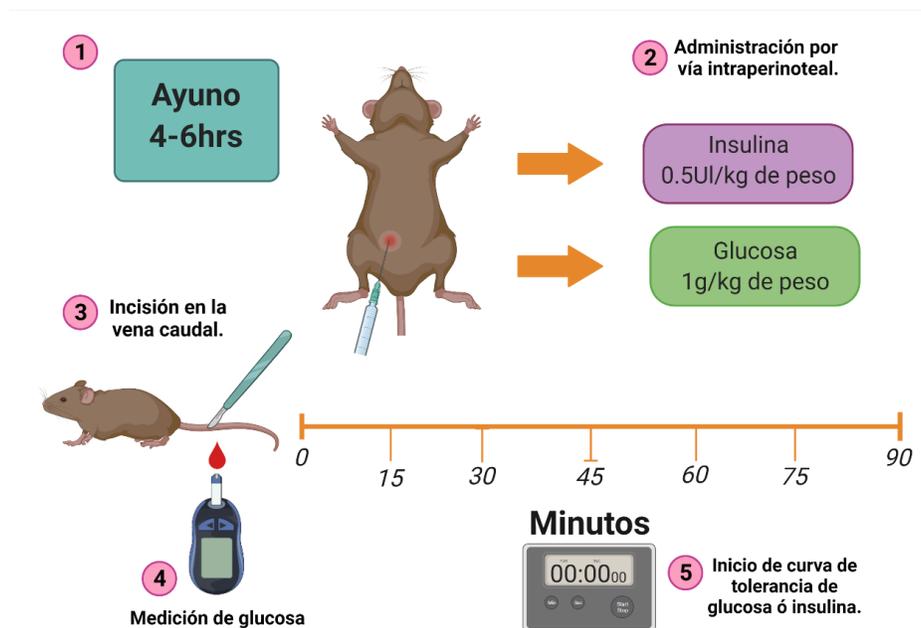


Fig.6 Procedimiento paso a paso de las curvas de tolerancia a la glucosa e insulina. Elaboración propia.

7.4 Inversión del ciclo luz-oscuridad

Una vez que se determinó que los ratones desarrollaron DM2 (a las 13 semanas de edad), se invirtió su ciclo de luz-oscuridad (Luz 20:00 hrs a 7:59 hrs, Oscuridad 8:00 hrs. a 19:59 hrs.), esto debido a que los ratones son animales nocturnos y por lo tanto sus picos de actividad se dan durante la noche.

Si los ratones fuesen entrenados durante el día, podría inducirles estrés por la alteración de sus periodos de sueño o podrían no responder al ejercicio. (49,50)

7.5 Ejercicio aeróbico

El programa de ejercicio que se empleó en los ratones fue diseñado por Zhang et. al., (2017) (47). Se utilizaron cajas con ruedas para correr automatizadas, lo cual permitió controlar las diferentes velocidades que representan la intensidad baja (8m/min, volumen de oxígeno máximo $VO_2=60\%$) y moderada (18m/min, $VO_2=85\%$).

A las 17 semanas de edad, se aclimató a los ratones por 3 días durante 10 minutos en las ruedas a 6 m/min. A las 18 y 19 semanas de edad se sometieron a un primer régimen de entrenamiento, durante el cual se aumentó la velocidad y el tiempo hasta las 28 semanas de edad como se muestra en la Tabla.3.

El entrenamiento se realizó en un horario de 14:00 a 18:00 horas debido a que equivale a la mitad de su fase activa y en ese periodo se dió la mayor actividad de los roedores.

Tabla 3. Regímenes de entrenamiento. Elaboración propia.

GRUPO	LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES	SÁBADO	DOMINGO	
PRIMER ENTRENAMIENTO	CTRL/DM2 SED SIN ACTIVIDAD FÍSICA							
	CTRL/DM2 BI 65% VO2 MAX	Velocidad: 8m/min Duración: 20min		Velocidad: 8m/min Duración: 30min		Velocidad: 8m/min Duración: 40min	DESCANSO	
	CTRL/DM2 MI 85% VO2 MAX	Velocidad: 12m/min Duración: 20min		Velocidad: 15m/min Duración: 30min		Velocidad: 18m/min Duración: 40min		
	SEGUNDO ENTRENAMIENTO							
	CTRL/DM2 BI 65% VO2 MAX			Velocidad: 8m/min Duración: 50min				DESCANSO
	CTRL/DM2 MI 85% VO2 MAX			Velocidad: 18m/min Duración: 50min				

7.6 Obtención de las muestras

Después de finalizar el entrenamiento, los animales se sacrificaron por sobredosis de CO₂ y se obtuvo una muestra de sangre por punción cardiaca y se separó el suero sanguíneo por centrifugación

Las patas traseras se removieron para obtener el fémur izquierdo para el análisis histoquímico, como se muestra en la Fig.7.

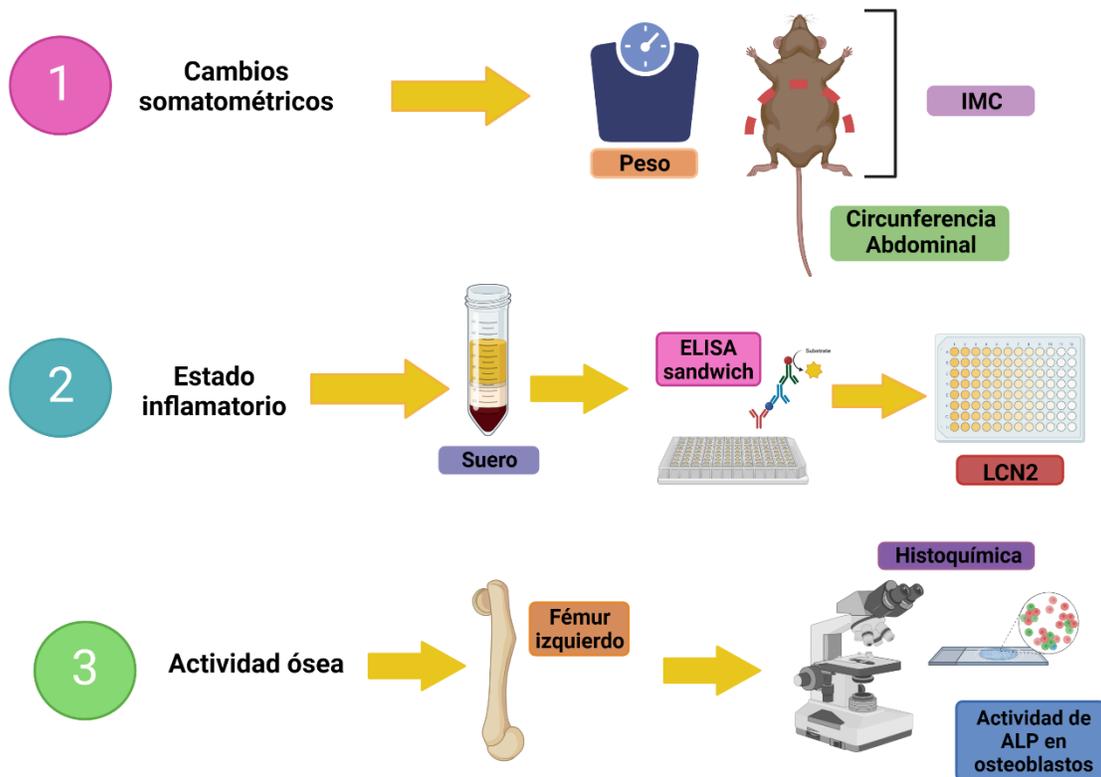


Fig.7 Obtención y procesamiento de muestras. Elaboración propia.

7.7 Cuantificación de LCN2 en suero

Se determinó la concentración de LCN-2 en el suero sanguíneo con el kit comercial Mouse NGAL (Lipocalin-2) ELISA kit (BioLegend, EEUU), de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

7.8 Análisis de la actividad específica de la fosfatasa alcalina en el fémur

Para determinar el efecto del EA sobre la actividad de los osteoblastos se realizó un análisis histoquímico para detectar la actividad de la ALP en los fémures de cada grupo experimental. Una vez obtenido el fémur se fijó, se descalcificó y se deshidrató con alcoholes crecientes y se aclaró con xilol, las muestras fueron incluidas en parafina y se obtuvieron secciones de 5 μm en un microtomo. Las secciones de fémur se desparafinaron, se hidrataron a través de una serie de xileno y alcohol graduado, y se pre incubaron durante la noche en cloruro de magnesio al 1% en tampón Tris-maleato de 100 mM (pH 9,2) y luego se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en una solución de sustrato ALP tampón Tris-maleato 100mM pH 9,2 (que contiene 0,2mg/ml de naftol AS-MX fosfato y 0,4mg/ml de Fast Red TR) recién preparada el cual permite teñir a las células ALP⁺ en color rojo. (53)

Las secciones histológicas se analizaron en un microscopio óptico y se tomaron 6 micrografías de la epífisis y metáfisis del fémur en cada sección histológica a una magnificación de 40X. Se identificaron las células positivas para ALP a lo largo del endostio (osteoblastos) y se cuantificaron.

7.9 Análisis estadístico

Los grupos experimentales tuvieron una n=3.

Todos los datos experimentales se analizaron con el programa estadístico Graphpad Prism 6. Para determinar diferencias significativas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido por el post hoc de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas si $p \leq 0.05$.

Para determinar la correlación entre las concentraciones de LCN2 con la resistencia a la insulina, la glucemia y la función osteoblástica se realizó un análisis de correlación de Pearson con el software Graphpad Prism 6 y se consideró correlación positiva si $r > 0$ y < 1 ; o correlación negativa si $r > -1$ y < 0 , y una $p \leq 0.05$.

8. Resultados

8.1 El EA de mediana intensidad genera pérdida de peso corporal, disminución del IMC y de la circunferencia abdominal en ratones con DM2.

Se analizó el efecto del EA sobre los cambios somatométricos, el consumo de alimento en gramos y el consumo calórico.

En los ratones sanos, ambas intensidades de ejercicio no modificaron el peso, el IMC y la circunferencia abdominal durante todo el experimento y no se observaron diferencias entre las dos intensidades de ejercicio.

En los ratones DM2-SED y DM2-BI se incrementó el peso corporal, el IMC y la circunferencia abdominal de manera gradual hasta las 28 semanas de edad en comparación con el grupo DM2-MI.

En el grupo DM2-MI hubo una disminución del peso, IMC y circunferencia abdominal a partir de la semana 20 a pesar de la dieta hipercalórica con el grupo DM2-BI. (Fig.8 A, B, C).

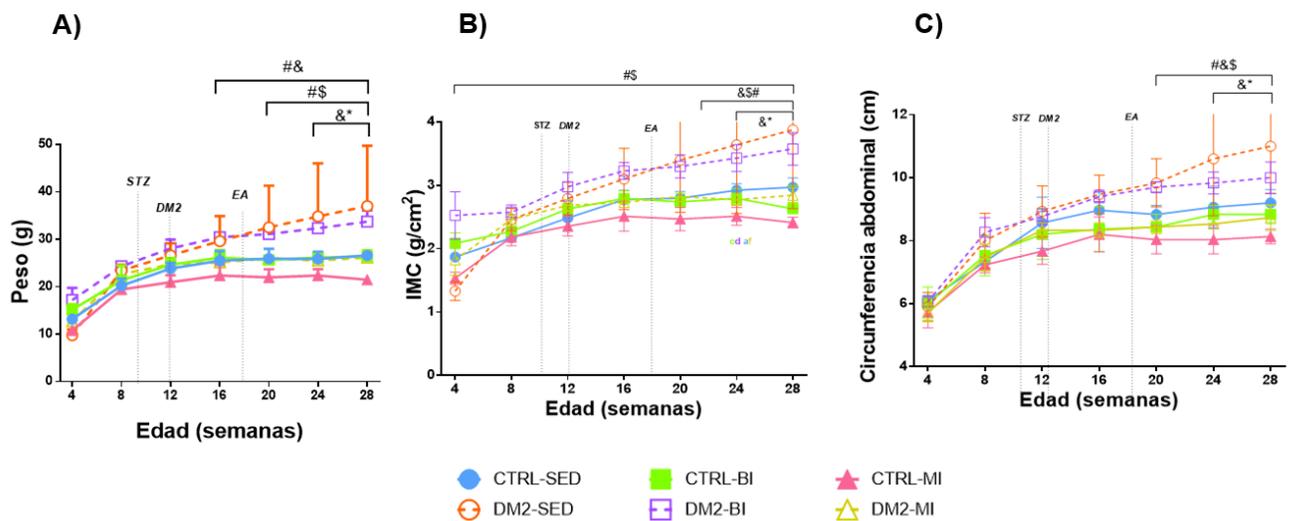


Figura 8. Cambios somatométricos provocados por EA de baja y moderada intensidad en ratones. El EA de mediana intensidad genera pérdida de peso corporal, disminución del IMC y de la circunferencia abdominal en ratones con DM2. Se observa desde el inicio del experimento y hasta el fin del entrenamiento (A) Peso corporal, (B) IMC (Índice de Masa Corporal) y (C) Circunferencia abdominal (cm).

Circunferencia abdominal: (!) CTRL-SED, (&) DM2-SED, (@)CTRL-BI, (\$) DM2-BI, (#) CTRL-MI, (*)DM2-MI $n=3$ $p \leq 0.05$; ANOVA de dos vías, Tukey post hoc.

Se observó un aumento del consumo de alimento en gramos y de calorías en los ratones DM2-SED de manera continua a partir de la semana 20 siendo más evidente en la semana 28. Se observó una ligera disminución en el consumo calórico en la semana 24 no obstante aumentó en la semana 28. En contraste a este comportamiento en los ratones DM2-MI comenzó a disminuir de manera gradual a partir de la semana 20, a las 22 semanas y fue más notorio en la semana 28 (Fig.9 A).

En cuanto al consumo calórico hubo un ligero incremento en la semana 24, sin embargo, disminuyó de manera significativa a la semana 28 (Fig.9 B).

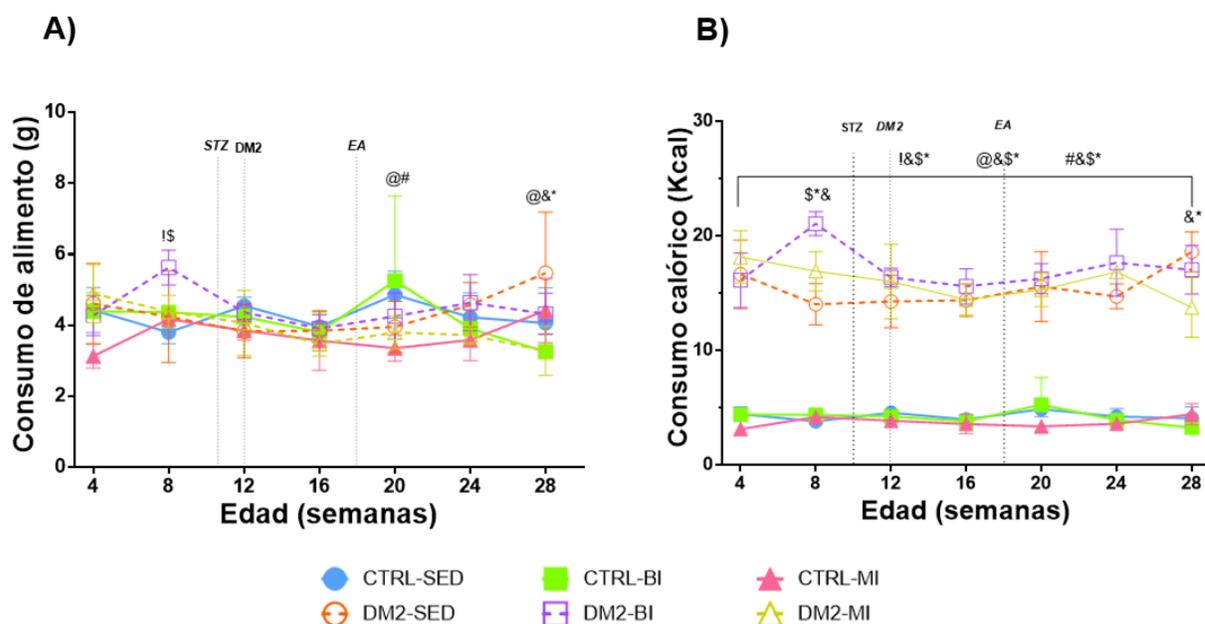


Figura 9. Patrón de alimentación en ratones control y con DM2 sedentarios o con EA de tipo aeróbico de baja y moderada intensidad. (A) cantidad de alimento consumido en gramos, (B) consumo calórico semanal: (!) CTRL-SED, (&) DM2-SED, (@)CTRL-BI, (\$) DM2-BI, (#) CTRL-MI, (*)DM2-MI $n=3$ $p \leq 0.05$; ANOVA de dos vías, Tukey post hoc.

estudio: (!) CTRL-SED, (&) DM2-SED, (@)CTRL-BI, (\$) DM2-BI, (#) CTRL-MI, (*)DM2-MI n=3 p≤0.05; ANOVA de dos vías, Tukey post hoc.

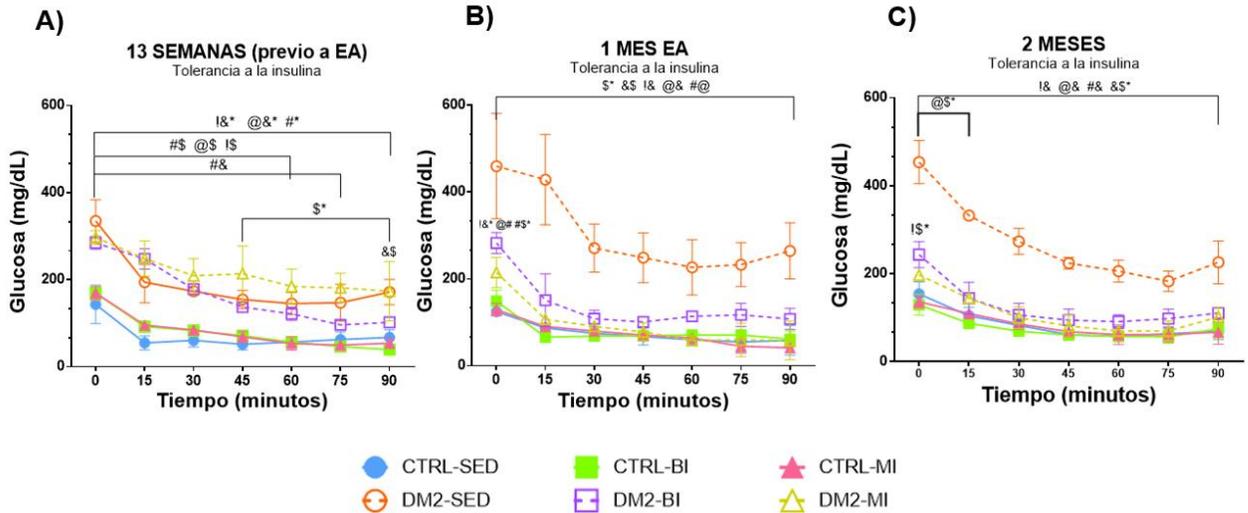


Figura.11 Resultados del ensayo de tolerancia a la insulina (A) Previo al EA (13 semanas); (B) 1 mes de EA (23 semanas); (C) 2 meses de EA (27 semanas) de los diferentes grupos de estudio: (!) CTRL-SED, (&) DM2-SED, (@) CTRL-BI, (\$) DM2-BI, (#) CTRL-MI, (*)DM2-MI n=3 p≤0.05; ANOVA de dos vías, Tukey post hoc.

8.3 El EA de baja y mediana intensidad disminuye la concentración sérica de LCN2 en ratones con DM2

Para determinar el efecto del EA sobre las concentraciones de LCN2, debido a que se ha reportado que está estrechamente relacionada con la homeostasis del metabolismo energético y su incremento favorece la inflamación sistémica, la hiperglucemia y puede afectar negativamente el tejido óseo (29,32,33).

Nuestros resultados demostraron que los ratones DM2-SED tuvieron una mayor concentración de LCN2 en comparación a los ratones CTRL-SED.

Sin embargo, el EA fue capaz de disminuir las concentraciones séricas de LCN2 en los ratones DM2-BI y DM2-MI en comparación con los ratones DM2-SED (Fig.12).

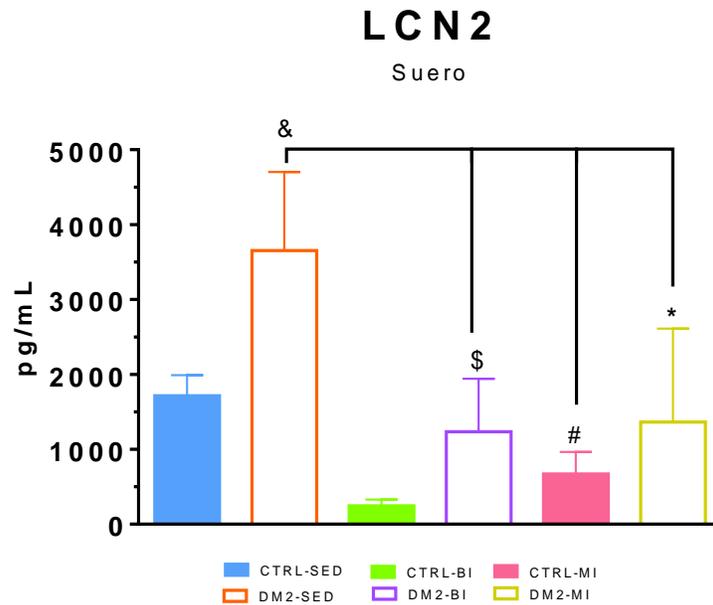


Figura.12 Efectos del EA de tipo aeróbico de baja y mediana intensidad en la concentración sérica de LCN2 después de 2 meses de EA: (!) CTRL-SED, (&) DM2-SED, (@)CTRL-BI, (\$) DM2-BI,(#) CTRL-MI, (*)DM2-MI n=3 p≤0.05; ANOVA de dos vías, Tukey post hoc.

8.4 Los niveles de LCN2 en suero de ratones diabéticos con ejercicio aeróbico de baja y mediana intensidad se correlacionan positivamente con la resistencia a la insulina

Para analizar la relación de las concentraciones séricas de LCN2 sobre la glucemia y la resistencia a la insulina en ratones sometidos a EA de baja y mediana intensidad a las 28 semanas, se realizó un análisis de correlación de Pearson entre ambas variables, en dónde se obtuvo una correlación positiva entre la elevación y el aumento de la resistencia a la insulina (Fig.13B), pero no con la glucemia (Fig.13A).

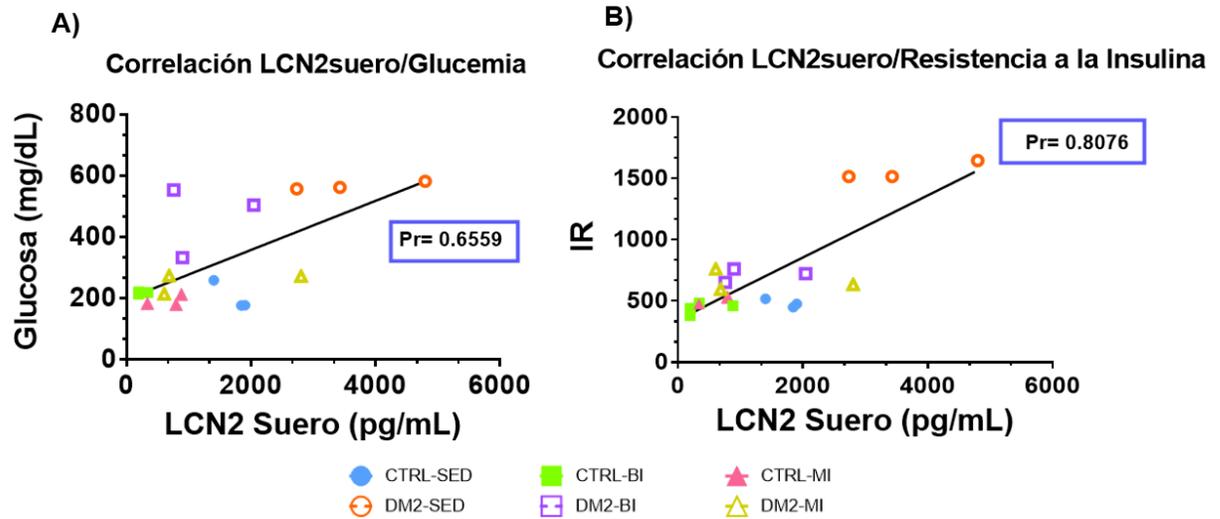


Fig.13 Análisis de correlación de Pearson entre la glucemia, la resistencia a la insulina y las concentraciones séricas de LCN2.

Correlación positiva si $0 < r < 1$; correlación negativa si $-1 < r < 0$. $P \leq 0.05$; Correlación de Pearson.

8.5 El EA de baja y mediana intensidad en ratones con DM2 aumenta la actividad osteoblástica

Se cuantificó el número de osteoblastos endosteales positivos a ALP los cuales se observan de color rojo. (Fig.14A) Los ratones DM2-SED tuvieron un menor número de células positivas a ALP, en comparación con los ratones CTRL. Los ratones DM2 BI y DM2-MI tuvieron un mayor número de células positivas a ALP en comparación a los ratones DM2-SED (Fig.14 B).

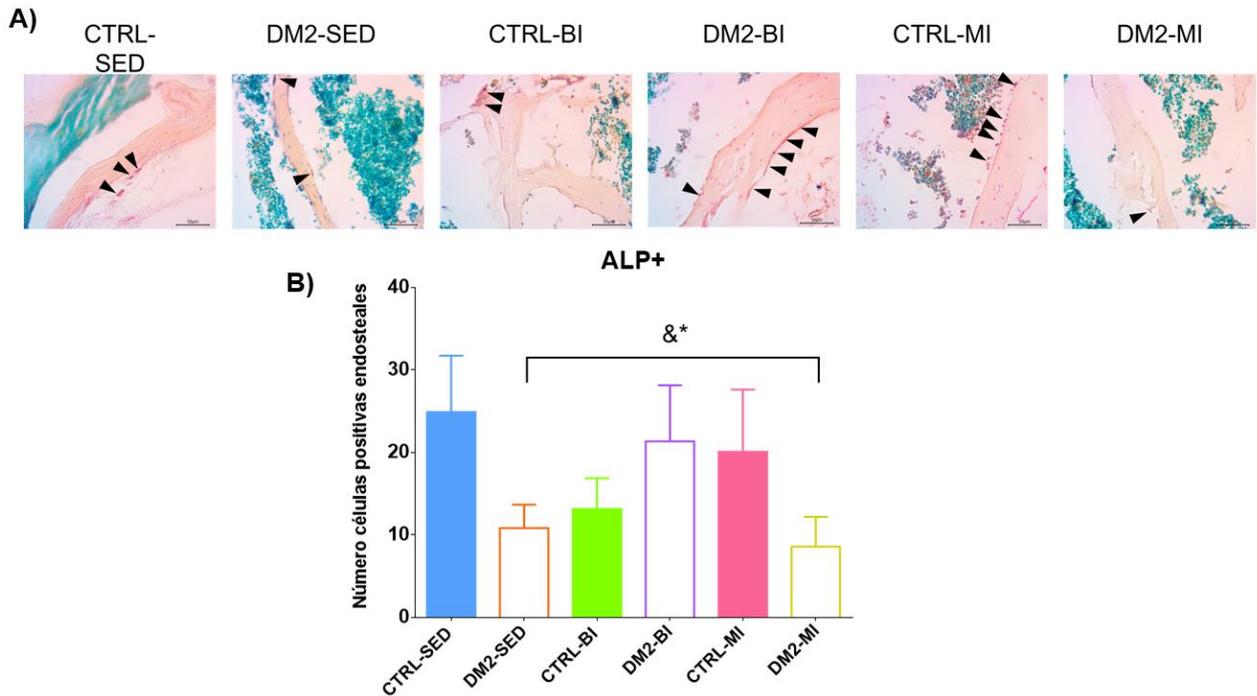


Fig. 14(A) Localización de actividad de ALP en osteoblastos 4x (punta de flecha negra). (B) Efectos del EA de baja y mediana intensidad en el número de células positivas a ALP: (!) CTRL-SED, (&) DM2-SED, (@)CTRL-BI, (\$) DM2-BI, (#) CTRL-MI, (*)DM2-MI n=3 $p \leq 0.05$; ANOVA de dos vías, Tukey post hoc.

8.6 Los niveles de LCN2 en suero de ratones diabéticos con ejercicio aeróbico de baja y mediana intensidad no se relacionan con el número de células positivas a fosfatasa alcalina.

Para analizar la relación de las concentraciones séricas de LCN2 sobre el número de células positivas (osteoblastos endosteales) a ALP en ratones sometidos a EA de baja y mediana intensidad a las 28 semanas, se realizó un análisis de correlación de Pearson entre ambas variables, dando como resultado una correlación negativa entre los niveles séricos de LCN2 y el número de osteoblastos endosteales positivos a ALP (Fig.15).

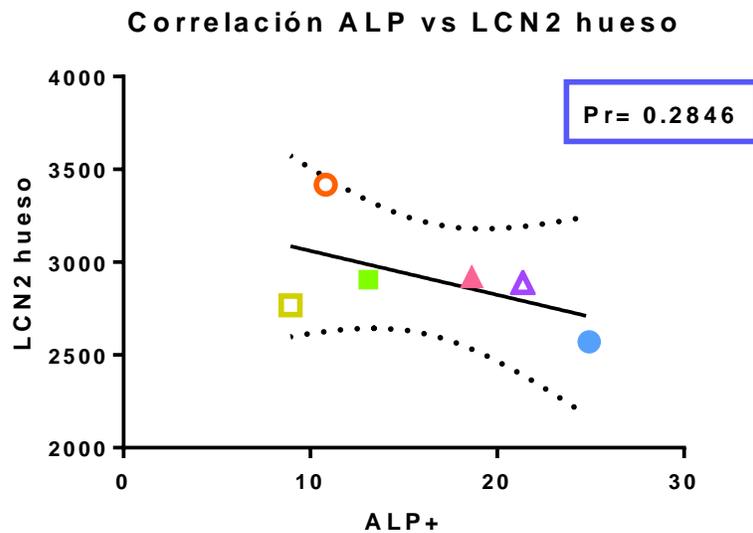


Fig.15 Análisis de correlación de Pearson entre el número de células(osteoblastos) positivas a ALP y las concentraciones séricas de LCN2.

Correlación positiva si $0 < r < 1$; correlación negativa si $-1 < r < 0$. $P \leq 0.05$; Correlación de Pearson.

9. Discusión

En este estudio demostramos que el EA de mediana intensidad mejora el perfil metabólico de la glucosa, modula la concentración de la LCN2 a niveles normales y activa el anabolismo óseo, por lo que puede ser un mecanismo de acción de gran importancia en la DM2 y la osteopatía diabética.

Se utilizaron ratones C57BL/6 a los cuales se les indujo el desarrollo de la DM2 por medio de una dieta hipercalórica y la administración de estreptozocina (SZC), estos ratones presentaron características clínicas de este padecimiento como: obesidad, hiperglucemia crónica, intolerancia a la glucosa, disfunción en la secreción y actividad de la insulina (46) e incremento en la concentración de LCN2 (34). Los ratones se sometieron a un régimen de ejercicio aeróbico de baja y mediana intensidad.

Respecto a los efectos del EA sobre la morfometría se observó que la intensidad moderada fue la única que provocó pérdida de peso corporal, disminución del IMC y de la circunferencia abdominal. Sin embargo, esto difiere con el estudio de en comparación con Mogadhasi, 2014 (41) en el cual no hubo cambios significativos en los cambios somatométricos. Estas discrepancias pueden explicarse a que los días y la duración de cada sesión de entrenamiento (3 sesiones por semana de 34 minutos) eran menores en comparación a nuestro régimen de entrenamiento.

Es importante destacar que en nuestro estudio se determinó cada intensidad en base a la distancia y la velocidad recorrida por el ratón, sin embargo, es necesario complementarlo con la medición del VO_2^{\max} durante el entrenamiento ya que este nos indica un buen rendimiento del ratón durante la sesión de EA (55). La mediana intensidad de EA pudo haber inducido un mayor gasto energético contrarrestando el exceso de calorías consumidas y evitando el aumento de peso corporal. Por lo que sería importante cuantificar el gasto energético de cada grupo.

Nuestros resultados demostraron que ambas intensidades de EA disminuyen la hiperglucemia debido a que inducen mayor sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos. A pesar de ello el EA de mediana intensidad aumentó la tolerancia a la glucosa tal cómo lo reportó Chiang,2019 (56) en donde también esta intensidad disminuyó los niveles de glucosa conforme al tiempo y frecuencia del EA.

Estos efectos del EA sobre el perfil metabólico de la glucosa pueden deberse a la modulación en las concentraciones séricas de LCN2, debido a que observamos que el EA disminuye la LCN2 a niveles normales y a que se ha reportado que el incremento de LCN2 favorece la hiperglucemia y la resistencia a la insulina. En la DM2 hay una mayor concentración sérica de LCN2 lo que podría perjudicar la calidad del tejido óseo al alterar la función osteoblástica (33).

En nuestro estudio observamos que los ratones DM2-SED tuvieron mayor concentración de LCN2 en suero similar al estudio de Takaya,2021 (57) los pacientes de este estudio también presentaban hiperglucemia, resistencia a la insulina y las características somatométricas como nuestros ratones DM2. No obstante, su papel metabólico en la DM2 sigue siendo un tema controversial, ya que hay estudios cómo el de Mosialou,2017 (31) en el cuál en modelos de ratón knockout del gen LCN2 observaron disminución en la tolerancia a la insulina e hiperglucemia. Sin embargo, se observó que el EA en los ratones DM2-MI redujo la concentración sérica de LCN2 alcanzando los niveles de los grupos CTRL-SED similar al estudio de Mohammadi,2014 (45). Esto indica que el EA de mediana intensidad es ideal para regular la concentración de LCN2 en suero.

Encontramos una relación significativa entre la concentración de LCN2 en suero y la resistencia a la insulina al igual que Mohammadi, 2014 (45) y Wu Yan,2007 (58) por lo que el EA puede ser una herramienta para reducir las concentraciones de LCN2 en suero y por lo tanto disminuir la intolerancia a la insulina en la DM2.

Finalmente evaluamos la actividad osteoblástica, se sabe que la ALP se encuentra en la membrana de los osteoblastos y es considerada un marcador celular del remodelado óseo ya que participa en la diferenciación temprana del proceso de biomineralización (53,54). El grupo DM2-SED tuvo un menor número de células positivas a ALP ya que por la poca actividad física no hay estímulos biomecánicos suficientes para el tejido óseo, lo que significa que la actividad osteoblástica en base a la remodelación ósea podría estar reducida y por la DM2 su metabolismo óseo podría estar alterado (16). Los ratones DM2-BI tuvieron un mayor número de células positivas a ALP en comparación los ratones DM2-MI, esto podría ser por el tipo de intensidad de EA, ya que el de mediana intensidad requiere de un mayor remodelado óseo, es decir que hay una mayor estimulación biomecánica lo que aumenta la actividad de los osteoblastos en cuanto a la remodelación ósea. (59). Sin embargo es necesario que también se evalúen las concentraciones de marcadores de resorción ósea en los osteoclastos cómo la enzima fosfatasa ácida

resistente al tartrato (TRAP) y el telopéptido C-terminal de colágeno tipo I (CTX) además de la expresión de citocinas como la IL-6, IL-10 y el TNF- α ya que podrían ayudar a explicar mejor el efecto de la intensidad del ejercicio como hipoglucemiante, antiinflamatorio y como estimulante biomecánico sobre la salud ósea en la osteopatía diabética (60).

10. Conclusiones

- El EA de intensidad moderada disminuye el peso corporal, el IMC, la circunferencia abdominal y la hiperglucemia más que el EA de baja intensidad.
- El EA de baja y mediana intensidad disminuyen los niveles altos de glucemia al aumentar la sensibilidad a la insulina.
- Ambas intensidades de EA disminuyen la concentración de LCN2 en suero.
- La resistencia a la insulina se correlaciona positivamente con las concentraciones séricas de LCN2.
- El EA de mediana intensidad estimula la actividad osteoblástica.
- El EA de mediana intensidad, la modulación de LCN2 y una dieta equilibrada pueden considerarse como una opción terapéutica para el tratamiento de DM2 y por lo tanto de la osteopatía diabética.

11. Referencias

1. Goyal R, Jialal I. Diabetes Mellitus tipo 2. [Actualizado el 20 de mayo de 2021]. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 enero-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513253/>
2. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018. (2018). Recuperado 7 de septiembre de 2021, de ENSANUT website: https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf
3. Datos y cifras sobre la diabetes. (2020). Recuperado 3 de septiembre de 2021, de idf.org website: <https://idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes/facts-figures.html>
4. American Diabetes Association. (2) Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 2015 Jan;38 Suppl:S8-S16. doi: 10.2337/dc15-S005. PMID: 25537714.
5. Kolb, H., Kempf, K., Röhling, M., & Martin, S. (2020). Insulin: too much of a good thing is bad. *BMC medicine*, 18(1), 224. <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01688-6>
6. Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., ... Martín, C. (2020). Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6275. doi:10.3390/ijms21176275
7. Marsot Charlotte, Chanson Philippe, Borson-Chazot Françoise. (2018). Os et métabolisme. *Annales d'Endocrinologie*, 79, Pages S40-S47. 09/09/21, De Science Direct Base de datos.
8. Napoli N, Chandran M, Pierroz DD, Abrahamsen B, Schwartz AV, Ferrari SL, et al. (2017) Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. *Nature Reviews Endocrinology*;13(4):208-19.
9. Dede, A. D., Tournis, S., Dontas, I., & Trovas, G. (2014). Type 2 diabetes mellitus and fracture risk. *Metabolism: clinical and experimental*, 63(12), 1480-1490. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.09.002>
10. Trierweiler, H., Kisielewicz, G., Hoffmann Jonasson, T., Rasmussen Petterle, R., Aguiar Moreira, C., & Zeghbi Cochenski Borba, V. (2018). Sarcopenia: a chronic complication of type 2 diabetes mellitus. *Diabetology & metabolic syndrome*, 10, 25. <https://doi.org/10.1186/s13098-018-0326-5>
11. Carnevale, V., Romagnoli, E., D'Erasmus, L., & D'Erasmus, E. (2014). Bone damage in type 2 diabetes mellitus. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 24(11), 1151-1157. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2014.06.013>
12. Cortet, B., Lucas, S., Legroux-Gerot, I., Penel, G., Chauveau, C., & Paccou, J. (2019). Bone disorders associated with diabetes mellitus and its

- treatments. *Joint bone spine*, 86(3), 315-320. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2018.08.002>
13. Bonds, D. E., Larson, J. C., Schwartz, A. V., Strotmeyer, E. S., Robbins, J. A., Rodriguez, B. L., Johnson, K. C., & Margolis, K. L. (2006). Risk of fracture in women with type 2 diabetes: The women's health initiative observational study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(9), 3404-3410. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0614>
 14. Napoli, N., Schwartz, A. V., Palermo, L., Jin, J. J., Wustrack, R., Cauley, J. A., Ensrud, K. E., Kelly, M., & Black, D. M. (2013). Risk factors for subtrochanteric and diaphyseal fractures: The study of osteoporotic fractures. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(2), 659-667. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1896>
 15. Liefde, I., Klift, M., de Laet, CEDH., van Daele, P., Hofman, B., & Pols, H. (2005). Bone mineral density and fracture risk in type-2 diabetes mellitus: the Rotterdam Study. *Osteoporosis International*, 16(12), 1713-1720. <https://doi.org/10.1007/s00198-005-1909-1>
 16. Picke, A., Campbell, G.M., Napoli, N., Hofbauer, L.C., & Rauner, M. (2019). Update on the impact of type 2 diabetes mellitus on bone metabolism and material properties. *Endocrine Connections*, 8, R55 - R70.
 17. Janghorbani, M., Feskanich, D., Willett, W. C., & Hu, F. (2006). Prospective study of diabetes and risk of hip fracture: the Nurses' Health Study. *Diabetes care*, 29(7), 1573-1578. <https://doi.org/10.2337/dc06-0440>
 18. Melton LJ, 3rd, Leibson CL, Achenbach SJ, Therneau TM, Khosla S.(2008) Fracture risk in type 2 diabetes: update of a population-based study. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* ;23(8):1334-42. DOI: 10.1359/jbmr.080323.
 19. Ivers, R. Q., Cumming, R. G., Mitchell, P., Peduto, A. J., & Blue Mountains Eye Study (2001). Diabetes and risk of fracture: The Blue Mountains Eye Study. *Diabetes care*, 24(7), 1198-1203. <https://doi.org/10.2337/diacare.24.7.1198>
 20. Leslie WD, Lix LM, Prior HJ, Derksen S, Metge C, O'Neil J. Biphasic fracture risk in diabetes: A population-based study. *Bone*. 40(6):1595-601. DOI: 10.1016/j.bone.2007.09.003.
 21. Ntouva, A., Toulis, K. A., Keerthy, D., Adderley, N. J., Hanif, W., Thayakaran, R., Gokhale, K., Thomas, G. N., Khunti, K., Tahrani, A. A., & Nirantharakumar, K. (2019). Hypoglycaemia is associated with increased risk of fractures in patients with type 2 diabetes mellitus: a cohort study. *European journal of endocrinology*, 180(1), 51-58. <https://doi.org/10.1530/EJE-18-0458>
 22. Waard EA, van Geel TA, Savelberg HH, Koster A, Geusens PP, van den Bergh JP.(2014) Increased fracture risk in patients with type 2 diabetes mellitus: an overview of the underlying mechanisms and the usefulness of imaging modalities and fracture risk assessment tools. *Maturitas*. 79(3):265-74. DOI: 10.1016/j.maturitas.2014.08.003.

23. Saito, M., & Marumo, K. (2010). Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 21(2), 195-214. <https://doi.org/10.1007/s00198-009-1066-z>
24. Abella, V., Scotece, M., Conde, J., Gómez, R., Lois, A., Pino, J., Gómez-Reino, J. J., Lago, F., Mobasher, A., & Gualillo, O. (2015). The potential of lipocalin-2/NGAL as biomarker for inflammatory and metabolic diseases. *Biomarkers: biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, 20(8), 565-571. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2015.1123354>
25. Mosialou, I., Shikhel, S., Luo, N., Petropoulou, P. I., Panitsas, K., Bisikirska, B., Rothman, N. J., Tenta, R., Cariou, B., Wargny, M., Sornay-Rendu, E., Nickolas, T., Rubin, M., Confavreux, C. B., & Kousteni, S. (2020). Lipocalin-2 counteracts metabolic dysregulation in obesity and diabetes. *The Journal of experimental medicine*, 217(10), e20191261. <https://doi.org/10.1084/jem.20191261>
26. Jaber, S. A., Cohen, A., D'Souza, C., Abdulrazzaq, Y. M., Ojha, S., Bastaki, S., & Adeghate, E. A. (2021). Lipocalin-2: Structure, function, distribution and role in metabolic disorders. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 142, 112002. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112002>
27. Millar, S. A., Anderson, S. I., & O'Sullivan, S. E. (2019). Osteokines and the vasculature: a review of the *in vitro* effects of osteocalcin, fibroblast growth factor-23 and lipocalin-2. *PeerJ*, 7, e7139. <https://doi.org/10.7717/peerj.7139>
28. Mera, P., Ferron, M., & Mosialou, I. (2018). Regulation of Energy Metabolism by Bone-Derived Hormones. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(6), a031666. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031666>
29. Jang, Y., Lee, J. H., Wang, Y., & Sweeney, G. (2012). Emerging clinical and experimental evidence for the role of lipocalin-2 in metabolic syndrome. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 39(2), 194-199. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05557>
30. Bhusal, A., Rahman, M. H., Lee, W. H., Bae, Y. C., Lee, I. K., & Suk, K. (2019). Paradoxical role of lipocalin-2 in metabolic disorders and neurological complications. *Biochemical pharmacology*, 169, 113626. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113626>
31. Mosialou, I., Shikhel, S., Liu, J. M., Maurizi, A., Luo, N., He, Z., Huang, Y., Zong, H., Friedman, R. A., Barasch, J., Lanzano, P., Deng, L., Leibel, R. L., Rubin, M., Nickolas, T., Chung, W., Zeltser, L. M., Williams, K. W., Pessin, J. E., & Kousteni, S. (2017). MC4R-dependent suppression of appetite by

- bone-derived lipocalin 2. *Nature*, 543(7645), 385–390. <https://doi.org/10.1038/nature21697>
32. Han, Y., You, X., Xing, W., Zhang, Z., & Zou, W. (2018). Paracrine and endocrine actions of bone-the functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. *Bone research*, 6, 16. <https://doi.org/10.1038/s41413-018-0019-6>
33. Rucci, N., Capulli, M., Piperni, S. G., Cappariello, A., Lau, P., Frings-Meuthen, P., Heer, M., & Teti, A. (2015). Lipocalin 2: a new mechanoresponding gene regulating bone homeostasis. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 30(2), 357–368. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2341>
34. Greenhill C. (2017). Bone: Osteoblast-derived lipocalin 2 suppresses appetite. *Nature reviews. Endocrinology*, 13(5), 250.
35. Wei Wang, Shandong Ye, Liting Qian, Yan Xing, And Ren, Chao Chen, Sumei Li, Jiang Xu, Qian Liu, Lin Dong, Chunchun Xiao, Wan Zhou (2018), Elevated serum lipocalin 2 levels are associated with indexes of both glucose and bone metabolism in type 2 diabetes mellitus, *Endokrynologia Polska ;69(3):276-282* DOI: 10.5603/EP. a2018.0030
36. Capulli, M., Ponzetti, M., Maurizi, A., Gemini-Piperni, S., Berger, T., Mak, T. W., Teti, A., & Rucci, N. (2018). A Complex Role for Lipocalin 2 in Bone Metabolism: Global Ablation in Mice Induces Osteopenia Caused by an Altered Energy Metabolism. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 33(6), 1141–1153. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3406>
37. Pagnotti, G. M., Styner, M., Uzer, G., Patel, V. S., Wright, L. E., Ness, K. K., Guise, T. A., Rubin, J., & Rubin, C. T. (2019). Combating osteoporosis and obesity with exercise: leveraging cell mechanosensitivity. *Nature reviews. Endocrinology*, 15(6), 339–355. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0170-1>
38. Birks, Scott & Uzer, Gunes. (2021). At the Nuclear Envelope of Bone Mechanobiology. *Bone*. 151. DOI: 10.1016/j.bone.2021.116023
39. Prior, S. J., Blumenthal, J. B., Katznel, L. I., Goldberg, A. P., & Ryan, A. S. (2014). Increased skeletal muscle capillarization after aerobic exercise training and weight loss improves insulin sensitivity in adults with IGT. *Diabetes care*, 37(5), 1469–1475. <https://doi.org/10.2337/dc13-2358>
40. Yaribeygi, H., Sathyapalan, T., Atkin, S. L., & Sahebkar, A. (2020). Molecular Mechanisms Linking Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 8609213. <https://doi.org/10.1155/2020/8609213>

41. Moghadasi, M., & Mohammadi Domieh, A. (2014). Effects of Resistance versus Endurance Training on Plasma Lipocalin-2 in Young Men. *Asian journal of sports medicine*, 5(2), 108-114.
42. Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological reviews*, 98(4), 2133-2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>
43. Yaribeygi, H., Atkin, S. L., Simental-Mendía, L. E., & Sahebkar, A. (2019). Molecular mechanisms by which aerobic exercise induces insulin sensitivity. *Journal of cellular physiology*, 234(8), 12385-12392. <https://doi.org/10.1002/jcp.28066>[BR11]
44. Sylow, L., Kleinert, M., Richter, E. A., & Jensen, T. E. (2017). Exercise-stimulated glucose uptake - regulation and implications for glycaemic control. *Nature reviews. Endocrinology*, 13(3), 133-148. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.162>
45. Mohammadi A, Alikhajehlandi, Reddy P. V. (2014) Impact of Aerobic Exercise Training on Insulin Resistance and Plasma Lipocalin 2 levels in Obese Young Men. *Biomed Pharmacol J*;7(1)
46. Choi, K. M., Kim, T. N., Yoo, H. J., Lee, K. W., Cho, G. J., Hwang, T. G., Baik, S. H., Choi, D. S., & Kim, S. M. (2009). Effect of exercise training on A-FABP, lipocalin-2 and RBP4 levels in obese women. *Clinical endocrinology*, 70(4), 569-574. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03374.x>
47. Yu, T., Sungelo, M. J., Goldberg, I. J., Wang, H., & Eckel, R. H. (2017). Streptozotocin-Treated High Fat Fed Mice: A New Type 2 Diabetes Model Used to Study Canagliflozin-Induced Alterations in Lipids and Lipoproteins. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme*, 49(5), 400-406. <https://doi.org/10.1055/s-0042-110934>
48. Zhang, L., Chen, X., Wu, J., Yuan, Y., Guo, J., Biswas, S., Li, B., & Zou, J. (2017). The effects of different intensities of exercise and active vitamin D on mouse bone mass and bone strength. *Journal of bone and mineral metabolism*, 35(3), 265-277. <https://doi.org/10.1007/s00774-016-0764-9>
49. Gabriel, B. M., & Zierath, J. R. (2019). Circadian rhythms and exercise - resetting the clock in metabolic disease. *Nature reviews. Endocrinology*, 15(4), 197-206. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0150-x>
50. Endocrinology, N. (2022). Circadian rhythms in endocrinology and metabolism. Retrieved 3 March 2022, from <https://www.nature.com/collections/dpdpzdskcm>

51. Kränkel, N., Bahls, M., Van Craenenbroeck, E. M., Adams, V., Serratos, L., Solberg, E. E., Hansen, D., Dörr, M., & Kemp, H. (2019). Exercise training to reduce cardiovascular risk in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus: How does it work? *European journal of preventive cardiology*, 26(7), 701–708. <https://doi.org/10.1177/2047487318805158>
52. Balducci, S., Zanuso, S., Nicolucci, A., Fernando, F., Cavallo, S., Cardelli, P., Falluca, S., Alessi, E., Letizia, C., Jimenez, A., Falluca, F., & Pugliese, G. (2010). Anti-inflammatory effect of exercise training in subjects with type 2 diabetes and the metabolic syndrome is dependent on exercise modalities and independent of weight loss. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD*, 20(8), 608–617. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.04.015>
53. Miao, D., & Scutt, A. (2002). Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 50(3), 333–340. <https://doi.org/10.1177/002215540205000305>
54. Vimalraj S. (2020). Alkaline phosphatase: Structure, expression, and its function in bone mineralization. *Gene*, 754, 144855. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144855>
55. Menz, V., Marterer, N., Amin, S. B., Faulhaber, M., Hansen, A. B., & Lawley, J. S. (2019). Functional Vs. Running Low-Volume High-Intensity Interval Training: Effects on VO₂max and Muscular Endurance. *Journal of sports science & medicine*, 18(3), 497–504.
56. Chiang, S. L., Heitkemper, M. M., Hung, Y. J., Tzeng, W. C., Lee, M. S., & Lin, C. H. (2019). Effects of a 12-week moderate-intensity exercise training on blood glucose response in patients with type 2 diabetes: A prospective longitudinal study. *Medicine*, 98(36), e16860. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000016860>
57. Takaya, J., Tanabe, Y., & Kaneko, K. (2021). Increased lipocalin 2 levels in adolescents with type 2 diabetes mellitus. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM*, 34(8), 979–985. <https://doi.org/10.1515/jpem-2021-021>
58. Qing-Wu Yan, Qin Yang, Nimesh Mody, Timothy E. Graham, Chung-Hsin Hsu, Zhao Xu, Nicholas E. Houstis, Barbara B. Kahn, Evan D. Rosen. (2007) The Adipokine Lipocalin 2 Is Regulated by Obesity and Promotes Insulin Resistance. *Diabetes* 1; 56 (10): 2533–2540. <https://doi.org/10.2337/db07-0007>
59. Vrbanac, Z., Brkljaca Bottegaro, N., Skrlin, B., Bojanic, K., Kusec, V., Stanin, D., & Belic, M. (2020). The Effect of a Moderate Exercise Program on Serum

Markers of Bone Metabolism in Dogs. *Animals : an open access journal from MDPI*, 10(9), 1481. <https://doi.org/10.3390/ani10091481>

60. Mezil, Y. A., Allison, D., Kish, K., Ditor, D., Ward, W. E., Tsiani, E., & Klentrou, P. (2015). Response of Bone Turnover Markers and Cytokines to High-Intensity Low-Impact Exercise. *Medicine and science in sports and exercise*, 47(7), 1495-1502. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000555>
61. Chen, H., Li, J., & Wang, Q. (2018). Associations between bone-alkaline phosphatase and bone mineral density in adults with and without diabetes. *Medicine*, 97(17), e0432. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000010432>