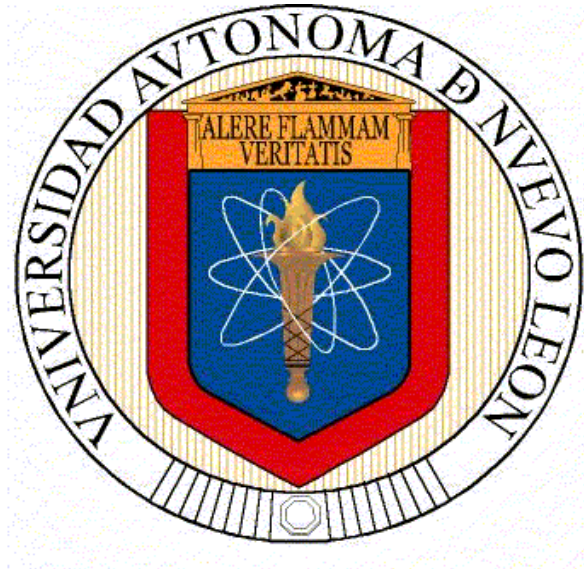


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



**INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD FÍSICA SOBRE LA DINÁMICA
MITOCONDRIAL EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATAS CON
OBESIDAD**

POR

ROSA IRAIS RIVERA ÁLVAREZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

FEBRERO, 2016

AGRADECIMIENTOS

Primero, quiero agradecer a Dios, por brindarme la oportunidad de vivir esta experiencia y por poner en mi camino a las personas correctas. Igualmente a mis padres, porque gracias a su apoyo incondicional, amor, motivación y ejemplo, he conseguido alcanzar mis metas profesionales.

La realización de esta tesis se logró con la ayuda de varias personas e instituciones a quienes deseo expresar mi agradecimiento.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría y a la Cátedra de Cardiología del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, por proporcionar las instalaciones, el material, y el equipo necesario para la realización de este proyecto.

Al Dr. Erick Ramírez López, por su participación como Director de tesis y por ayudarme a encontrar un nuevo camino en mi profesión.

De manera especial, quiero reconocer la labor de la M. en C. Noemí García Ramírez. Maestra, gracias por asesorarme con paciencia, por su apoyo y confianza a lo largo de este proceso y, por convertir mis inseguridades como estudiante en fortalezas.

Al núcleo básico de la Maestría en Ciencias en Nutrición, en especial a la Dra. Blanca González, por facilitarme los procesos administrativos y por estar al pendiente de mí, no solo como alumna, si no como persona. Al Dr. Manuel López-Cabanillas, porque además de ser un excelente profesor, se convirtió en una gran motivación. Gracias por sus detalles y atenciones, me hicieron sentir bienvenida y apreciada.

La culminación de este proyecto no habría sido posible sin el apoyo de Fernanda y Guadalupe. Fer, gracias por ser mi compañera y amiga incondicional en este viaje, por entenderme, apoyarme y ser pieza clave en este

proceso desde el principio. Guadalupe, gracias por tus consejos, tus atenciones y sobre todo, por tu amistad.

También quiero reconocer el apoyo de mis compañeros y profesores de laboratorio con quienes compartí esta experiencia la mayor parte del tiempo. Al Dr. Gerardo García, por recibirme e integrarme al grupo de investigación y porque siempre encontré apoyo y motivación en sus palabras. De igual forma, al Dr. Julio Altamirano, por su aportación a mi formación académica y al mejoramiento del proyecto.

A mis amigas, Judith, Mariana y Lola, quienes me acompañaron en los momentos difíciles, y me motivaron con palabras, abrazos y risas.

Ariel, Jorge, Josué y Gilberto, gracias por compartir conmigo la experiencia en el laboratorio y aprender juntos.

Finalmente, agradezco la aportación del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado.

DEDICATORIA

Para mi familia:
Clarita, Yeyo y Esteban

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1 Definición del problema	4
2.2 Justificación	5
3. ANTECEDENTES	6
3.1 Etiología y prevalencia de la obesidad	6
3.2 Músculo esquelético y fibras musculares	9
3.3 Mecanismo de contracción del músculo esquelético	12
3.4 Regulación energética del músculo esquelético	14
3.4.1 Vía de la proteína cinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK)	15
3.5 Actividad física	17
3.5.1 Actividad física y vías de señalización	18
3.5.1.1 El calcio como regulador energético	18
3.5.1.2 Especies reactivas de oxígeno como segundos mensajeros	20
3.6 Dinámica Mitocondrial	22
3.6.1 Fusión Mitocondrial	23
3.6.2 Fisión Mitocondrial	24
3.6.3 Dinámica Mitocondrial y especies reactivas de oxígeno	26
3.6.4 Obesidad, actividad física y dinámica mitocondrial	27
4. HIPÓTESIS	30
5. OBJETIVOS	30
5.1 Objetivo general	30
5.2 Objetivos específicos	30
5.2.1 Objetivo específico 1	30
5.2.2 Objetivo específico 2	31
6. MATERIALES Y MÉTODOS	31
6.1 Material químico	31

6.2 Material biológico	32
6.3 Métodos	32
6.3.1 Diseño del estudio	32
6.3.2 Medición del peso	34
6.3.3 Actividad física	34
6.3.4 Disección del músculo gastrocnemio	34
6.3.5 Extracción de mitocondrias	35
6.3.6 Medición del peso y homogenización del músculo gastrocnemio	36
6.3.7 Análisis de la expresión de proteínas por western blot	36
6.3.8 Análisis semicuantitativo por densidad de pixeles	37
6.3.9 Actividad enzimática	37
6.3.10 Procesamiento de los datos	38
7. RESULTADOS	39
7.1 Caracterización antropométrica del modelo experimental	39
7.2 Determinación de la expresión de AMPK como sensor energético	40
7.3 Análisis de los niveles de expresión de las proteínas relacionadas con la dinámica mitocondrial	42
7.3.1 Nivel de expresión de Mfn2	42
7.3.2 Nivel de expresión de Drp1	44
7.4 Análisis del estrés oxidante	46
7.4.1 Análisis de la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa	46
7.4.2 Análisis de la actividad de la enzima aconitasa	48
8. DISCUSIÓN	49
9. CONCLUSIONES	55
10. LITERATURA CITADA	56

LISTA DE TABLAS

Tabla1. Peso corporal y peso del músculo gastrocnemio normalizado con la longitud del fémur de ratas con obesidad y delgadas 39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la célula muscular esquelética.	9
Figura 2. Imagen de microscopio electrónico de un sarcómero de músculo esquelético y sus estructuras	11
Figura 3. Dinámica mitocondrial	25
Figura 4. Diagrama de la división de los grupos de estudio	33
Figura 5. Cambios en la expresión de AMPK en el músculo gastrocnemio de ratas con obesidad y delgadas, sedentarias y sometidas a actividad física	41 43
Figura 6. Cambios en la expresión de Mfn2 en el músculo gastrocnemio de ratas con obesidad y delgadas, sedentarias y sometidas a actividad física	45
Figura 7. Cambios en la expresión de Drp1 en el músculo gastrocnemio de ratas con obesidad y delgadas, sedentarias y sometidas a actividad física	47
Figura 8. Cambios en la actividad de enzimas antioxidantes de mitocondrias del músculo gastrocnemio de ratas con obesidad y delgadas, sedentarias y sometidas a actividad física	48
Figura 9. Cambios en la actividad de catalasa/citrato sintasa de mitocondrias del músculo gastrocnemio de ratas con obesidad y delgadas, sedentarias y sometidas a actividad física	

NOMENCLATURA

°C	Grados centígrados
µg	Microgramo
µm	Micrómetros
ADNmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ADP	Adenosín difosfato
AF	Actividad física
AMP	Adenosín monofosfato
AMPK	Cinasa activada por adenosín monofosfato
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
CaMK	Proteína cinasa dependiente de calcio calmodulina
CoA	Coenzima A
CAT	Catalasa
Cr	Creatina
CTE	Cadena transportadora de electrones
Dg	Rata Zucker delgada
DgAF	Rata Zucker delgada sometida a actividad física
Drp1	Proteína relacionada a dinaminas
EGTA	Ácido tetraacético del etilenglicol
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FAD	Flavina adenina dinucleótido
Fis	Fisina
g	Gramos
GEB	Gasto energético basal
GET	Gasto energético total
GTP	Guanosín trifosfato
GTP-asa	Guanosín trifosfatasa
H ₂ O	Agua

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IK β	Proteína inhibidora K β
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
kg	Kilogramo
m ²	Metro cuadrado
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
Mfn2	Mitofusina 2
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitro
mmol	Milimol
mM	Milimolar
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NFAT	promotor transcripcional del factor nuclear de células T activadas
NFK β	Factor nuclear NF kappa beta
Nm	Nanómetros
Ob-R	Receptor de leptina
Ob	Rata Zucker con obesidad
ObAF	Rata Zucker con obesidad sometida a actividad física
ObS	Rata Zucker con obesidad sedentaria
ObAF	Obesa sometida a actividad física
OMS	Organización Mundial de la Salud
Opa1	Proteína de atrofia óptica 1
PCr	Fosfocreatina
pH	Potencial de hidrogeniones
Pi	Fosfato inorgánico
PKC	Proteína Cinasa C
RDHP	Receptores de dihidropiridina

RPM	Revoluciones por minuto
RyR1	Receptores de rianodina tipo1
SERCA	ATP-asa de calcio del retículo sarcoplásmico
SHE	Solución de sacarosa, HEPES y EGTA
SOD	Superóxido dismutasa
TNF	Factor de necrosis tumoral
UCP	Proteínas desacoplantes
VO ₂ máx	Volumen máximo del consumo de oxígeno

1. RESUMEN

La obesidad es una enfermedad crónica y multifactorial, cuyos principales tratamientos son una dieta correcta y la incorporación de actividad física (AF). La AF tiene como función estimular la contracción del músculo esquelético generando cambios progresivos que se ven reflejados en la regulación de las vías de señalización específicas relacionadas con el metabolismo celular, donde la mitocondria juega un papel primordial. Si la demanda energética se incrementa, la mitocondria sufre cambios conformacionales, en orden de mantener su función para atender dichas demandas (Friedman & Nunnari, 2014). La dinámica mitocondrial es uno de los mecanismos que se activan durante este proceso; a través de eventos de fusión y fisión, los cuales están mediados por proteínas pertenecientes a la familia de las dinaminas como la Mitofusina 2 (Mfn2) y la proteína de atrofia óptica 1 (Opa1) las cuales participan en la fusión; así como la Fisina 1 (Fis1) y la proteína relacionada a dinamina 1 (Drp1) que regulan en la fisión (Otera, Ishida & Mishira, 2013).

La activación de la dinámica mitocondrial es mediada por las especies reactivas de oxígeno (ERO), principalmente por el radical superóxido, el cual genera la propia mitocondria (Liesa & Shirihaj, 2013). Sin embargo, en condiciones de obesidad, las ERO se encuentran incrementadas debido al exceso de nutrimentos (Youle & Blik, 2012) las cuales activan la dinámica mitocondrial de forma desregulada. En relación a esto, no existe evidencia acerca de la regulación de la dinámica mitocondrial por AF bajo condiciones de obesidad. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue determinar los cambios en la dinámica mitocondrial inducidos por la AF en el músculo esquelético de ratas con obesidad.

El análisis se realizó en el músculo gastrocnemio de ratas macho con obesidad (Ob) y delgadas (Dg) de 12 semanas de edad, midiendo la expresión de las proteínas involucradas en la dinámica mitocondrial, por western blot. Además se determinó el nivel de estrés oxidativo midiendo la actividad de enzimas marcadoras como aconitasa, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) por medio de ensayos de colorimetría y oximetría respectivamente.

Los resultados obtenidos muestran una clara disminución de la masa muscular, inducido por la condición de obesidad (17%, $p < 0.05$) y un aumento del estrés oxidativo evidenciado por el decremento de la actividad de aconitasa influenciado por la condición de obesidad y la AF (31%, $p < 0.05$ y 96% $p < 0.05$ respectivamente). La actividad de SOD y CAT no mostraron cambios significativos.

Por otro lado, la AF disminuyó la expresión de Drp1 (55%, $p < 0.05$) y se observó una tendencia a aumentar el contenido de Mfn2 (0.5 veces) y AMPK (0.3 veces) en la condición de obesidad sin diferencia significativa. Sin embargo, en el grupo delgado la AF aumentó la expresión de AMPK y Mfn2 (1.3 y 2.4 veces respectivamente, $p < 0.05$), finalmente la expresión de Drp1 solo mostró una tendencia a incrementar y no mostró diferencia significativa.

Se puede concluir que el exceso de nutrimentos en la condición de obesidad eleva la carga metabólica de la célula polarizando la dinámica mitocondrial hacia la fisión, sin embargo cuando se somete a AF la demanda energética aumenta y esto provoca la disminución en la expresión de Drp1 con el concomitante aumento de Mfn2 para favorecer la fusión e incrementar la eficiencia metabólica de la célula. El incremento en la expresión de AMPK, en el grupo ObAF, indica que existe un aumento en la demanda energética y una tendencia a fusionar la red mitocondrial. Por lo tanto, la propensión de los niveles de expresión de las proteínas relacionadas con la dinámica mitocondrial

bajo condiciones de obesidad y posterior a la AF, concuerda con el hecho de que la generación de ERO, secundaria a la contracción muscular, se relaciona con la fusión de la red mitocondrial que se encuentra fragmentada bajo condiciones de obesidad. De manera que la incorporación de AF bajo condiciones de obesidad, puede mejorar el estado metabólico de la célula restaurando la integridad de la red mitocondrial, a partir de la expresión de proteínas relacionadas con la fusión.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Definición del problema

La patología con mayor prevalencia en el mundo, es la obesidad (Ng, Fleming, Robinson & Thomson, 2013), en México se calcula que para el año 2050 más de la mitad de la población adulta padecerá obesidad equivalente al 54% y 57% de hombres y mujeres respectivamente, lo que representa un gasto elevado para el sistema de salud mexicano (Rtveladze, Marsh, Barquera & Sánchez, 2014).

La obesidad es una enfermedad multifactorial, cuya principal etiología se relaciona con el desequilibrio entre la ingesta de nutrimentos y el gasto energético (Marti, Moreno, Hebebrand & Martínez, 2004); desequilibrio que se ha asociado con la resistencia a la insulina, la hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia (Deprés & Lemieux, 2006) afectando directamente al metabolismo celular, donde la mitocondria es uno de los principales sensores metabólicos cuya función es dependiente de la presencia de sustratos oxidables obtenidos de la dieta, de manera que el estudio de la función y los cambios estructurales de la mitocondria ha despertado el interés de muchos investigadores, con el objetivo de diseñar tratamientos que regulen la función mitocondrial.

Al respecto, se ha descrito que la obesidad conlleva a un incremento de la respiración celular, condición que trae como consecuencia un exceso de oxígeno, que al disminuir la función mitocondrial deriva en un incremento de las especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas por la propia mitocondria, alterando sus funciones y provocando cambios morfológicos en la misma que perpetúan el deterioro celular (Youle & van del Blik, 2012).

Por tal razón, la presente investigación centra su interés en la mitocondria como unidad de estudio, ya que es importante para mantener la homeostasis celular (Friedman et al., 2014) en orden de conservar las condiciones que favorezcan el estado de salud óptimo de un individuo.

Por otro lado, uno de los pilares del tratamiento de la obesidad es la incorporación de actividad física (AF) diaria, (Toledo, Watkins & Kelley, 2006) cuyo estudio ha aportado conocimiento acerca de los mecanismos involucrados en dicho proceso, uno de ellos es la función mitocondrial, en donde la estimulación de la contracción del músculo esquelético activa una cascada de señalización que regula la expresión de las proteínas relacionadas con la dinámica mitocondrial (Egan & Zierath, 2012). Sin embargo, no existe evidencia de los efectos de la actividad física y la dinámica mitocondrial en condiciones de obesidad, por lo que el objetivo del presente estudio se centró en analizar la dinámica mitocondrial en condiciones de obesidad y/o AF, a través del análisis de los cambios en la expresión de las proteínas relacionadas con la dinámica mitocondrial en músculo esquelético (gastrocnemio) de ratas con obesidad antes y después de la práctica de AF intensa (natación). Esto, con la finalidad de conocer si la condición de obesidad compromete la regulación de la dinámica y si esta puede ser revertida con solo incrementar la AF. Ya que hasta el momento solo se han realizado estudios en animales de experimentación y pacientes sanos.

2.2 Justificación

La obesidad presenta una etiopatogenia multifactorial directamente relacionada con la nutrición, que en un individuo tiene como consecuencia un grave estado de salud. La mitocondria, es el principal generador de energía a través de los sustratos ingeridos en la dieta y además, regula el metabolismo. Por tal razón la condición de obesidad compromete su función y es de suma importancia estudiar los cambios estructurales y funcionales de la mitocondria

en condiciones de obesidad. Esto con el propósito de fundamentar y comprender los tratamientos y recomendaciones que prevengan las alteraciones metabólicas y por ende las comorbilidades causadas por una nutrición deficiente.

3. ANTECEDENTES

3.1 Etiología y prevalencia de la obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica y multifactorial, cuya principal etiología es una ingesta calórica incrementada con relación al gasto energético total (GET) (Marti et al., 2004). El GET consta de tres componentes, i) la tasa metabólica basal, que es la cantidad de energía necesaria para mantener las funciones vitales del organismo en descanso; ii) el efecto termogénico de los alimentos, que se refiere al costo energético necesario para absorber y metabolizar los alimentos consumidos; y iii) la energía utilizada durante la AF. La alteración de alguno de estos tres componentes resulta en una modificación del peso y la composición corporal.

La obesidad se define como una acumulación excesiva y anormal de grasa que representa un riesgo para la salud (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2015). La Norma Oficial Mexicana NOM-008-SSA-3-2010, para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad, conceptualiza a la obesidad como la enfermedad caracterizada por el exceso de tejido adiposo en el organismo, la cual se diagnostica cuando en las personas adultas existe un índice de masa corporal (IMC) igual o mayor a 30 kg/m^2 . El IMC se calcula dividiendo el peso actual del sujeto entre la estatura en centímetros (OMS, 2015).

Actualmente existe una epidemia de obesidad cuya prevalencia mundial va en aumento. Utilizando datos de encuestas de salud de diferentes países se calculó que el número de individuos con sobrepeso y obesidad a nivel mundial en 1980 era de 857 millones y se incrementó a 2.1 billones en el 2013 (Ng et al., 2013). En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) del 2012, reportó que la prevalencia de obesidad en hombres y mujeres mayores de 20 años era de 26.8% y 37.5% respectivamente (Gutiérrez, Rivera, Shamah & Villalpando, 2012). Se calcula que para el año 2050 la prevalencia de obesidad en México aumentará de 27% a 54% y de 37% a 57% en hombres y mujeres respectivamente (Rtveladze et al., 2013). En el mismo estudio, se realizó una proyección del costo de las enfermedades más comunes relacionadas con la obesidad (diabetes mellitus tipo 2, cáncer y enfermedades cardiovasculares). Se calcula que si la tendencia del IMC de la población mexicana continúa en aumento, se destinarán para el tratamiento de las mismas aproximadamente 1.2 y 1.7 billones de dólares en el año 2030 y 2050 respectivamente (Rtveladze et al., 2013).

El consumo crónico y excesivo de alimentos y bebidas que exceden las necesidades energéticas de un individuo, tienen como consecuencia la acumulación excesiva de tejido adiposo, de manera que una de las estrategias para tratar la obesidad es la restricción calórica. Si bien el resultado es la disminución del peso corporal, una de las consecuencias es el decremento del gasto energético y el aumento en la sensación de hambre (Hill, Wyatt & Peters, 2012). La pérdida del 10% del peso corporal total en sujetos con obesidad, disminuye el GET hasta en un 20%, debido al aumento en la eficiencia energética del músculo esquelético en orden de mantener un peso corporal constante. La principal causa se atribuye a que el movimiento se lleva a cabo con una menor cantidad de masa muscular (Rosenbaum, Vandenborne, Goldsmith & Simoneau, 2003). Aunado a esto, la pérdida de tejido adiposo disminuye la concentración plasmática de leptina, reduciendo la sensación de saciedad, generando como consecuencia, un incremento en la ingesta calórica,

lo que resulta en una alta recidiva en la recuperación del peso perdido. Por lo tanto, la estrategia con mayor beneficio sería tratar de alcanzar el equilibrio energético aumentando el gasto a través de la incorporación de actividad física (AF), ya que el GET durante la AF puede incrementar entre 15 y 25 veces en relación al gasto energético basal (GEB). Debido a que una gran cantidad de energía es utilizada para la contracción del músculo esquelético (Kwak, 2013).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) se considera AF a cualquier movimiento corporal producido por los músculos esqueléticos que exija gasto de energía (OMS, 2015). Se sabe que su incorporación a la vida cotidiana tiene efectos positivos en la salud, como la reducción del riesgo de cardiopatías coronarias, diabetes tipo 2, hipertensión, cáncer de colon, cáncer de mama y depresión. Además es un factor determinante en el consumo de energía, por lo que es fundamental para conseguir el equilibrio energético y el control del peso (OMS, 2010).

Existen estudios epidemiológicos que sostienen que la cantidad de AF está directamente relacionada con el peso corporal (Kyle, Morabia, Schutz & Picard, 2004). La inactividad física es considerada como un factor de riesgo de mortalidad, se asocia con la aparición de enfermedades crónicas como obesidad, hipertensión, dislipidemias y diabetes. En México, la ENSANUT 2012 estimó que 58.6% de los niños y adolescentes entre 10 y 14 años refieren no haber realizado ningún tipo de AF durante los 12 meses anteriores a la encuesta (Gutiérrez et al., 2012). Igualmente, se estimó que la prevalencia de inactividad física en adultos mexicanos de 20 a 69 años de edad, aumentó un 47.3% en 6 años.

Por lo tanto, el estudio de las características metabólicas de las células musculares esqueléticas es fundamental para la comprensión de la relación entre el gasto energético y la obesidad, lo que pudiera conducir a un tratamiento eficaz de la obesidad.

3.2 Músculo esquelético y fibras musculares

En los mamíferos, el músculo esquelético comprende el 40% del peso corporal total y es responsable del 30% del GEB (Egan et al., 2013). La unidad funcional del aparato locomotor está compuesta por una neurona motora, y varias fibras con estructura y propiedades similares (Schiaffino & Reggiani, 2011). El músculo esquelético tiene una apariencia estriada la cual resulta de un arreglo ordenado y regular de sus elementos contráctiles (Hopkins, 2006) conocidos como fibras musculares. La fibra muscular es una célula alargada y multinucleada (Welsch, 2006) que mide alrededor de 40 a 100 μm de diámetro, su longitud es variable y alcanza algunos centímetros de largo, se encuentra delimitada por una membrana celular (sarcolema) la cual forma invaginaciones digitiformes profundas conocidas como túbulos T. Su función es llevar información eléctrica desde la superficie hasta el interior de la fibra muscular, particularmente hacia el retículo sarcoplásmico (Figura 1) (Calderón-Vélez, & Figueroa-Gordon, 2009).

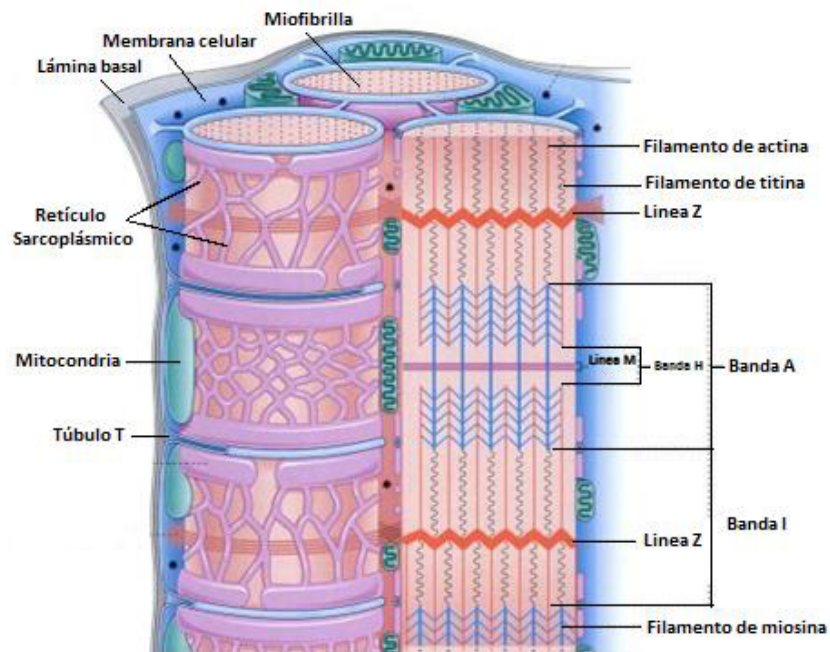


Figura 1. Estructura de la célula muscular esquelética. (Tomado y modificado de Welsch, 2006)

Cada una de las fibras musculares, contiene centenares de finas fibras estriadas y paralelas entre sí llamadas miofibrillas que llenan el sarcoplasma (Geneser, 2000). Las miofibrillas se encuentran ordenadas en estructuras conocidas como sarcómeros (Schiaffino et al., 2011), que consisten en dos tipos de miofilamentos, 1) filamentos finos o de actina (6 a 8 nm de diámetro y 1 μ m de longitud) asociados a dos proteínas, troponina y tropomiosina, las cuales regulan la contracción por medio de su interacción con el calcio. (Geeves & Holmes, 2005) y 2) filamentos gruesos o de miosina (15 nm de diámetro y 1.5 μ m de longitud) (Ross & Pawlina, 2007). La miosina consiste en dos cadenas polipeptídicas (cadenas pesadas) combinadas con cuatro cadenas ligeras, el extremo C-terminal de las cadenas pesadas forman una hélice alfa. La porción N-terminal de las cadenas pesadas junto con las cadenas ligeras, forman dos cabezas globulares y funcionan como ATP-asas (Geeves et al., 2005).

El estriado transversal del músculo esquelético se observa en forma de bandas oscuras a través de cada fibra. Las bandas más oscuras se denominan bandas A (anisotrópicas) formadas principalmente por miosina, las bandas claras se conocen como bandas I (isotrópicas) compuestas por filamentos de actina. Cada banda A posee una zona transversal mejor conocida como banda H. En el centro de la banda H se distingue una línea angosta, la línea M; y cada banda I es cortada por una línea o disco Z en donde se anclan los filamentos de actina. El sarcómero se localiza en el segmento ubicado entre cada disco Z, y se considera la unidad estructural y funcional de la miofibrilla (Figura 2) (Geneser, 2000; Hopkins, 2006).

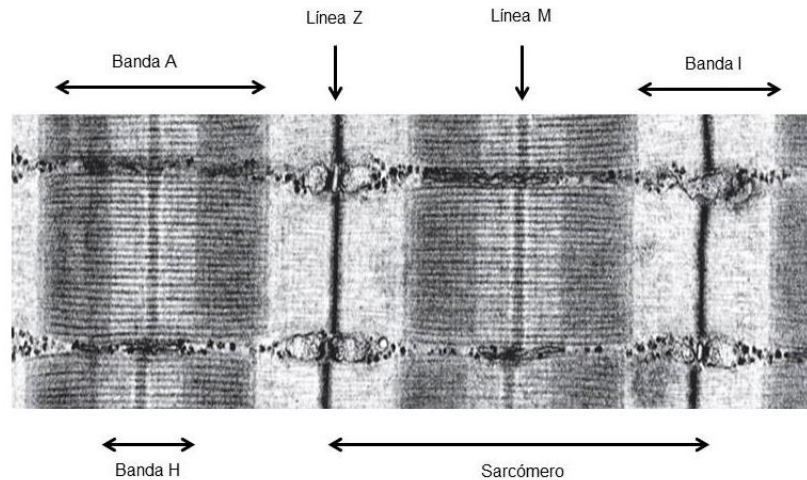


Figura 2. Imagen de microscopio electrónico de un sarcómero de músculo esquelético y sus estructuras. (Tomado y modificado de Craig, 2006)

El músculo esquelético de los mamíferos está compuesto de varios tipos de fibras, su diámetro varía de 10 a 100 μm . La mayoría de los músculos contienen una mezcla de fibras (Hopkins, 2006) que se clasifican en función de las isoformas de miosina que contienen. Los músculos expresan 4 isoformas de la cadena pesada de miosina, una lenta y tres rápidas, la isoforma lenta se conoce como MHC I y las 3 isoformas rápidas se conocen como MHC IIa, MHC IIx y MHC IIb. Histoquímicamente se ha observado que las fibras tipo I expresan MHC I y las fibras rápidas IIA, IIX y IIB expresan MHC IIa, MHC IIx, MHC IIb respectivamente (Staron, Kraemer, Hikida, Fry, Murray & Campos 1999).

Las fibras denominadas tipo I (lentas), sirven para llevar a cabo actividades de duración prolongada y conservan una coloración roja. Poseen un gran contenido de mitocondrias, y un nivel elevado de resistencia aeróbica; por lo tanto son extremadamente eficaces para generar adenosín trifosfato (ATP) a partir de la oxidación de hidratos de carbono y lípidos, se utilizan principalmente en actividades de baja intensidad y tiempo prolongado (Geneser, 2000; Hopkins, 2006; Kwak, 2013). Las fibras tipo II o rápidas, se adaptan a actividades de corta duración y se utilizan en ausencia de oxígeno, juegan un

papel importante en el ejercicio de alta intensidad e intervalos cortos de tiempo (Hopkins, 2006; Kwuan, 2013). Existe una subclasificación de las fibras tipo II (IIa, IIb y IIx) cada una de estas tiene una coloración diferente que se relaciona directamente con la abundancia de oxígeno transportado por la mioglobina, la densidad mitocondrial y la contribución relativa del metabolismo oxidativo en cada una de ellas. (Egan et al., 2012). Las fibras tipo IIa, contienen numerosas mitocondrias, son resistentes al agotamiento y son adecuadas para contracciones fuertes y de escasa duración; las fibras tipo IIb y IIx, se contraen con rapidez, su contenido mitocondrial es escaso, se aprecia una coloración blanca y se precipitan al agotamiento con facilidad (Geneser, 2000; Hopkins, 2006; Egan et al., 2012).

3.3 Mecanismo de contracción del músculo esquelético

El acoplamiento de excitación–contracción del músculo esquelético, se encuentra regulado por calcio, e inicia cuando un potencial de acción despolariza la membrana sarcoplásmica mediante cambios de conductancia dependientes de voltaje. La corriente pasa a lo largo de esta y de los túbulos T, mediante un proceso dependiente de sodio (Schiaffino et al., 2011; Calderón-Vélez et al., 2009) la despolarización es detectada por los receptores de dihidropiridina (RDHP) o canales de calcio tipo L sensibles a voltaje. La magnitud de la señal eléctrica es proporcional al número de RDHP presentes en la membrana. Las proyecciones intracelulares de estos receptores se encuentran en contacto con los canales liberadores de calcio del retículo sarcoplásmico conocidos como receptores de Rianodina tipo 1 (RyR1, por sus siglas en inglés) que se encuentran en la cisterna terminal del retículo sarcoplásmico. Su actividad es regulada por ATP, magnesio, calcio y algunas proteínas como calsecuestrina y calmodulina (Calderón-Vélez et al., 2009). El RDHP activa por contacto directo a RyR1 lo que permite la salida de calcio del retículo sarcoplásmico, siendo este el mecanismo principal del aumento citosólico de calcio (Schiaffino et al., 2011).

Un aumento en la afinidad entre la miosina y la actina ocurre cuando la concentración de calcio intracelular incrementa. El calcio se une a la troponina C lo que suspende la inhibición de la troponina I y la tropomiosina, liberando el sitio de unión entre la actina y la miosina, permitiendo el deslizamiento entre filamentos, generando tensión (Calderón-Vélez et al., 2009).

El acortamiento de un músculo comprende ciclos de contracción rápidos que desplazan los filamentos finos a lo largo de los filamentos gruesos. Al inicio de la contracción, la cabeza de miosina está unida a la molécula de actina del filamento fino. En la siguiente etapa el ATP se une a la cabeza de miosina e induce un cambio conformacional del sitio de unión a la actina, lo que reduce la afinidad de la cabeza de miosina por la molécula de actina desacoplando el filamento fino; posteriormente la hidrólisis del ATP resulta en adenosín difosfato más un fosfato inorgánico ($ADP + Pi$) lo que provoca cambios conformacionales que condicionan la flexión de la cabeza de miosina, provocando un desplazamiento lineal con respecto al filamento fino de aproximadamente 5 nm.

La siguiente etapa es la generación de fuerza, como producto de la liberación del Pi por parte de la cabeza de miosina, uniéndose al filamento fino contiguo y generando fuerza conforme retorna a su posición original (no flexionada). Finalmente la cabeza de miosina vuelve a unirse a una nueva molécula de actina del filamento fino y el ciclo puede repetirse (Ross et al., 2007).

La remoción de calcio intracelular se debe a la acción de la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico (SERCA) ubicada en la región longitudinal de este organelo, su función radica en la recaptura de calcio lo que disminuye su concentración intracelular iniciando el proceso de relajación, regresando a los filamentos a su posición original y disponibles para un nuevo ciclo.

3.4 Regulación energética del músculo esquelético

Una característica importante del músculo esquelético es su capacidad de modular la tasa de producción energética, el flujo sanguíneo y la utilización de sustratos en respuesta a la locomoción (Schiaffino et al., 2011; Egan et al., 2012). El músculo esquelético tiene un papel crítico en el control de la homeostasis metabólica y el control glucémico, además es el órgano que almacena la mayor cantidad de glucógeno, el cual corresponde hasta cuatro veces más comparado con la reserva hepática. (Egan et al., 2012). Las propiedades estructurales y funcionales de las fibras musculares cambian en respuesta a estímulos químicos y mecánicos que requieren una adaptación rápida para responder a las demandas energéticas, esta propiedad se define como plasticidad muscular. (Schiaffino et al., 2011; Egan et al., 2012).

La concentración de ATP en el músculo esquelético es de aproximadamente 25 mmol/kg de músculo seco, es decir no se encuentra almacenado en grandes cantidades, por lo tanto, en orden de satisfacer las necesidades de la célula cuando la demanda energética incrementa el ATP es resintetizado. Por ejemplo, durante la AF, se estimula la contracción de la célula muscular, la cual inicia con la hidrólisis y la síntesis de ATP de manera simultánea. El mantenimiento de la contracción, depende de la tasa de degradación de ATP, y de la capacidad de la célula para utilizar diferentes sistemas en orden de acoplar la síntesis con la tasa de hidrólisis (Ball, 2015).

Para responder a las variaciones en el consumo de ATP, es necesario que el músculo esquelético cuente con mecanismos eficientes. El sustrato energético más inmediato es la fosfocreatina (PCr), su reserva aproximada es de 85 mmol/kg en músculo seco, y sirve para mantener la tasa de recambio de ATP los primeros 7 a 10 segundos de la contracción (Ball, 2015). La enzima creatina cinasa hidroliza las moléculas de PCr consideradas un reservorio para la generación rápida de ATP sin acumulación de ADP (Schiaffino et al., 2011).

Además de la PCr, el músculo esquelético utiliza hidratos de carbono y lípidos como sustratos para la síntesis de ATP, sin embargo su tasa de producción en comparación con la PCr es menor, a pesar de esto, la glucólisis responsable de la generación de piruvato o lactato a partir de glucosa y la fosforilación oxidativa se consideran más eficientes que el sistema creatina cinasa (Schiaffino et al., 2011; Ball, 2015).

3.4.1 Vía de la proteína cinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK)

La mayoría de las funciones celulares necesitan energía que en su mayoría se obtiene gracias a la hidrólisis del ATP. Existen condiciones como la contracción muscular, el ayuno, la isquemia, la hipoxia y el estrés oxidativo o la presencia de algunos fármacos como la metformina, que someten a la célula a un estrés energético, es decir, que la tasa de consumo de ATP supera la síntesis del mismo y por lo tanto, su concentración disminuye (Carling, Mayer, Sanders & Gambin, 2011; Kahn, Alquier, Carling & Hardie, 2005; Hardie, Ross, & Hawley, 2012).

En orden de mantener una cantidad adecuada de ATP, las células necesitan mecanismos que compensen el aporte energético con la demanda (Carling et al., 2011). El sistema encargado de dicha actividad es conocido como la vía de la proteína cinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK), esta proteína está compuesta por una subunidad catalítica (α) y dos subunidades reguladoras (β y γ) (Gwinn et al., 2008). Es considerada un sensor y regulador energético celular, activada por el aumento en las concentraciones de adenosín monofosfato (AMP) acoplada a la disminución de ATP intracelular. (Kahn et al., 2005; Friedrichsen, Mortensen, Pehmoller & Birk, 2013).

La concentración absoluta de ATP, ADP y AMP depende de factores como el estado nutricional y el nivel de estrés energético de la célula (Carling et al.,

2011). La síntesis de ATP debe permanecer en equilibrio con respecto a su utilización, esto significa que cualquier aumento en la relación ADP/ATP se traduce en una caída de la reserva energética (Hardie et al., 2012). Cuando la concentración de ADP incrementa, AMPK es activada con la unión de AMP directamente a la subunidad gamma (γ) gracias a la cinasa LKB1 (Gwinn et al., 2008), promoviendo su fosforilación en un residuo de treonina (Thr172) (Carling et al., 2011).

Bajo condiciones de estrés energético severo, el incremento en la concentración de AMP puede amplificar la activación de AMPK, lo que asegura una respuesta gradual a la actividad de AMPK a través de diferentes requerimientos energéticos (Harie et al., 2012). Además, la tasa de desfosforilación del residuo Thr172 disminuye por la unión de ADP o AMP a la subunidad y optimizando la activación de la enzima (Carling et al., 2011).

La fosforilación de AMPK, desencadena vías catabólicas que sintetizan ATP y apaga las vías biosintéticas que lo consumen. (Hardie et al., 2012). Por ejemplo, la activación de AMPK estimula la oxidación de ácidos grasos al promover la fosforilación e inactivación de la acetil coenzima A carboxilasa. Lo anterior, deriva en la caída de la concentración de su producto (malonil coenzima A) el cual inhibe la entrada de ácidos grasos a la mitocondria (Hardie et al., 2012).

Además de un cambio en la relación AMP/ATP, el sistema AMPK también se ve influenciado (activado) por fármacos como la metformina y las tiazolidinedionas, utilizados en el tratamiento de la diabetes tipo 2, además de extractos vegetales como el resveratrol procedente de las uvas, el galato de epigallocatequina que se encuentra en el té verde, la curcumina proveniente del ajo y la capsaicina contenida en los pimientos y el chile (Hardie et al., 2012). Igualmente, en presencia de concentraciones elevadas de ERO la activación de AMPK es secundaria a la inhibición de la síntesis de ATP, con el consecuente

aumento de AMP y ADP (Hardie et al., 2012). Así mismo, la proteína cinasa dependiente de calcio calmodulina (CaMK) la cual se activa en respuesta a un incremento en la concentración de calcio como sucede en la contracción muscular, promueve la fosforilación del residuo Thr172 de la AMPK con la activación concomitante de la enzima (Carling et al., 2011).

3.5 Actividad física

De acuerdo a la OMS, se considera AF a cualquier movimiento producido por los músculos esqueléticos que exija un gasto de energía. Por otro lado el ejercicio es una variedad de la AF y se refiere a una actividad específica cuyo principal objetivo es la mejora o el mantenimiento de la aptitud física llevando a cabo una actividad planificada, estructurada y repetitiva. (OMS, 2010). Por lo tanto, la utilización de sustratos energéticos para mantener los procesos metabólicos de la célula, varía de acuerdo a la duración, frecuencia e intensidad de la actividad, así como de la cantidad de reservas disponibles (tejido adiposo, glucosa plasmática, glucógeno muscular y hepático) y de la demanda energética del organismo. (Manini, Clark, Nalls, Goodpaster & Ploutz-Snyder, 2007).

Se pueden diferenciar dos condiciones que polarizan los requerimientos energéticos de la célula, la obesidad y la AF (Manini et al., 2007). Estas se encuentran estrechamente relacionadas ya que la ganancia de peso por incremento del porcentaje de grasa corporal, se asocia a una ingesta calórica elevada y a un decremento progresivo de la AF, generando una tasa metabólica basal reducida secundaria a la atrofia muscular (Stenholm, Harris, Rantanen & Visserm, 2008).

La AF se mantiene gracias al aporte energético que se encuentra directamente relacionado con las reservas de glucógeno muscular. La intensidad, es regulada por la activación de AMPK que es estimulada por la

hidrólisis del ATP ya que es sensible a los cambios en la relación AMP/ATP y Cr/PCr (creatina/fosfocreatina). (Kahn et al., 2005; Friedrichsen et al., 2013). Con relación a lo anterior, se ha reportado que cuando la intensidad de la AF es menor al 30% del volumen máximo del consumo de oxígeno (VO_2 máx) (Fletcher et al., 2001), la principal fuente de energía son los ácidos grasos. Cuando la intensidad de la AF, se encuentra entre el 40% y el 65% del VO_2 máx, hay un equilibrio entre los hidratos de carbono y los lípidos; y cuando el VO_2 máx es mayor al 70%, hay un aumento exponencial de la oxidación de hidratos de carbono con el decremento concomitante de la oxidación de ácidos grasos (van Loon, Greenhaff, Constantin-Teodosiu, Saris & Wagenmakers, 2001). Con respecto a lo anterior, es importante describir algunas de las vías de señalización relacionadas con la AF que regulan la demanda energética de la célula muscular.

3.5.1 Actividad física y vías de señalización

Las vías de señalización que desencadena la AF están directamente relacionadas con el proceso de convertir una señal mecánica en eléctrica (contracción muscular). Los eventos moleculares que promueven la activación de mensajeros primarios y secundarios resultan en la estimulación y/o supresión de vías de señalización específicas, regulando la expresión genética y la degradación o síntesis de proteínas inducida por la actividad física. (Coffey & Hawley, 2007).

3.5.1.1 El calcio como regulador energético

En estado de reposo, la concentración citosólica de calcio es de aproximadamente 50 Nm. Después de la despolarización de la membrana sarcoplásmica y la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, el calcio citosólico se eleva hasta 100 veces (Berchtold, Brinkmeier & Müntener, 2000) tanto para regular el ciclo de relajación y contracción muscular como para

activar deshidrogenasas del ciclo de Krebs tales como la piruvato deshidrogenasa, la isocitrato sintasa y la alfa-cetoglutarato deshidrogenasa, cuya actividad es dependiente de la concentración de calcio intramitocondrial, incrementando la oxidación de piruvato y estimulando así la síntesis de ATP (Clapham, 2007). Por lo que se considera al calcio como el primer mensajero que relaciona los procesos de utilización y generación de energía.

Por otro lado, el calcio citosólico se une a CaMK (Tate, Hyek & Taffet, 1991). En el músculo esquelético predomina la isoforma II (CaMK II), la cual aumenta en respuesta a la AF de resistencia de una manera dependiente de la intensidad. Su fosforilación incrementa el transporte de glucosa, la captura y oxidación de lípidos, e influye en la plasticidad muscular (Egan et al., 2012; Coffey et al., 2007). El calcio también activa alostericamente a la fosforilasa cinasa que a su vez fosforila y activa a la enzima fosforilasa b, con la consecuente ruptura del glucógeno muscular para la producción de glucosa.

Otra de las funciones del calcio es activar proteínas reguladoras como la calcineurina. Esta proteína está asociada directamente a la plasticidad de la célula muscular, proporcionándole la capacidad de adquirir un fenotipo metabólicamente más eficiente, transformando las fibras musculares rápidas en lentas. También regula las respuestas adaptativas que inducen el crecimiento y la regeneración de la célula muscular.

Por otro lado, se ha reportado que los transitorios de calcio prolongados y de baja amplitud incrementan la actividad de la calcineurina, la cual desfosforila y activa al promotor transcripcional del factor nuclear de células T activadas (NFAT por sus siglas en inglés) para promover la expresión genética (Coffey et al., 2007) relacionada con la reducción de la formación de ácido láctico, atenuando la pérdida de glucógeno y reduciendo la fatiga muscular (Hood et al., 2006).

Además del calcio, existen otras moléculas que son generadas en la mitocondria por la cadena transportadora de electrones (CTE) como parte de la síntesis de ATP. Estas son conocidas como especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales actúan como segundos mensajeros activando cascadas de señalización que regulan la homeostasis metabólica de la célula.

3.5.1.2 Especies reactivas de oxígeno como segundos mensajeros

La fosforilación oxidativa mitocondrial, es un proceso que utiliza electrones, en su mayoría provenientes del NADH y FADH₂, los cuales derivan de la oxidación de los nutrimentos provenientes de la dieta y de las reservas energéticas del organismo. Estos electrones son transferidos a través de la CTE hacia el oxígeno como aceptor final (Hood et al., 2006). La CTE es una línea de ensamblaje que consiste en 5 complejos: la enzima NADH deshidrogenasa (complejo I), la enzima succinato deshidrogenasa (complejo II), la proteína ubiquinona, complejo-bc (complejo III), citocromo c y citocromo c oxidasa (complejo IV). El transporte de electrones en la CTE está acoplado con el paso de protones a través de la membrana mitocondrial interna (MMI), desde la matriz hacia el espacio intermembranal, de los complejos I, III y IV, lo que genera la fuerza protón motriz. Esta fuerza es utilizada por la ATP sintasa (complejo V) para sintetizar ATP a partir de ADP y Pi. (Hüttemann et al., 2008).

Durante este proceso de respiración celular para la síntesis de ATP, se consume del 95 al 98% del oxígeno. El porcentaje restante puede pasar por una reducción de 1 electrón lo que deriva en la generación de ERO (Hood et al., 2006).

Considerando que la AF requiere de una producción energética elevada a partir de la oxidación de sustratos, se puede inferir que la generación acelerada de ATP, significa que más oxígeno es reducido y que la producción de ERO

aumenta; lo cual genera daño a las proteínas estructurales y funcionales de la mitocondria, así como al ADN mitocondrial (ADNmt) (Clapham, 2007). Para contrarrestar dicho efecto, la célula cuenta con un sistema antioxidantes, activado por la presencia de ERO.

Algunos genes antioxidantes pueden ser activados para lidiar con el estrés agudo y oxidativo infringido por procesos infecciosos, intoxicación y alteraciones metabólicas; mientras que otros se activan en respuesta al estrés crónico como el envejecimiento, enfermedades crónicas y cambios ambientales o demandas energéticas como la AF. El ajuste transitorio a través de mecanismos intrínsecos como la vasodilatación y la activación alostérica o covalente de enzimas, puede no ser suficiente para lidiar con el nivel de estrés oxidativo inducido por la actividad física. Por lo tanto, la estimulación de la expresión genética por vías sensibles a ERO es esencial para que la célula muscular restaure la homeostasis. (Ji, 2008)

Existen vías de señalización asociadas al estrés oxidativo, las cuales utilizan ERO para transferir señales de la membrana celular hacia el núcleo para estimular el crecimiento, la diferenciación, la proliferación y la apoptosis. Entre las principales vías se encuentra la del factor nuclear kappa beta (NFK β), la vía del fosfoinositol 3 cinasa/Akt, p53, así como la vía de las proteínas de choque térmico (HSP por sus siglas en inglés) y de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK). (Ji, 2008).

Las ERO impactan la actividad de MAPK, regulando eventos de transcripción por fosforilación de diversos sustratos localizados en el citoplasma o en el núcleo, incluyendo factores y co-activadores. Por lo tanto, interviene en una gran variedad de procesos fisiológicos como la diferenciación celular, la hipertrofia, la inflamación y la expresión genética (Egan et al., 2012). La activación de MAPK se debe a diferentes señales como la actividad contráctil y factores asociados a la AF, tales como la secreción de hormonas, la

concentración citosólica de calcio, la actividad neural y la fuerza mecánica. Las implicaciones biológicas de MAPK incluyen el transporte de glucosa, la hipertrofia muscular, la angiogénesis, y la adaptación vascular. (Ji, 2008).

Otra vía que se asocia al estrés oxidativo es la del factor de transcripción NFK β que se encuentra inactivo en el citoplasma y está conjugado con proteínas inhibitorias conocidas como I kappa beta (IK β). NFK β es activado por el H₂O₂ y por citosinas proinflamatorias (TNF alfa, IL1 IL6). El H₂O₂ se encuentra involucrado con la activación de la proteína cinasa C (PKC), que a su vez disocia a la cinasa IKB liberando las subunidades P50/P65 de NFK β , provocando la translocación de este hacia el núcleo, donde se une a la secuencia de ADN de genes blanco. Las proteínas mejor conocidas y enzimas que requieren la unión de NFK β al promotor son la enzima MnSOD, glutamilsteína sintasa, NOS inducible (NOSi) COX2 y varias citosinas (Ji, 2008).

La expresión de enzimas antioxidantes permite la regulación del estrés oxidativo que genera daño al ADNmt. Además del sistema antioxidante, la mitocondria lleva a cabo un proceso conocido como dinámica mitocondrial, cuyo principal objetivo, bajo condiciones de estrés, es mantener la funcionalidad de la mitocondria (Liesa & Shirihai, 2013).

3.6 Dinámica Mitocondrial

Las mitocondrias son los organelos encargados de mantener la homeostasis de la célula y el abastecimiento de ATP a través de la fosforilación oxidativa. Posee su propio genoma, el cual codifica para 13 proteínas de la cadena transportadora de electrones y se encuentran interconectadas en una red (Westermann, 2010).

Debido a la importancia de su función, la mitocondria activa procesos que le permiten una adecuada síntesis de ATP, principalmente aquellos donde la demanda de energía se incrementa. Este fenómeno se conoce como dinámica mitocondrial y consiste en la remodelación constante de la red mitocondrial, a través de procesos de unión (fusión) y división (fisión) (Dorn & Kitsis, 2014).

La fisión y la fusión mitocondrial también pueden activarse cuando las células experimentan algún tipo de estrés metabólico (Liesa et al., 2013). Estos procesos son mediados por proteínas guanosin trifosfatasas (GTP-*asas*) pertenecientes a la familia de las dinaminas, encargadas de dividir y fusionar la bicapa lipídica mitocondrial (Otera et al., 2013).

El incremento o la disminución de la demanda energética, provoca estrés metabólico asociado a la producción de ERO. Por ejemplo durante la AF extenuante, debido al aumento en la demanda de oxígeno y la actividad de las vías catabólicas, la AF representa un estímulo capaz de generar altos niveles de ERO. El estado redox puede actuar como mensajero primario a través de un efecto directo en la regulación y la especificidad de unión al DNA de factores de transcripción. Además puede tener un efecto en el metabolismo mitocondrial. (Vernon et al., 2007).

El objetivo principal de la dinámica mitocondrial, es mantener una población de mitocondrias sanas. Lo cual, se logra a partir de la segregación del ADN_{mt}, que puede ser oxidado por las ERO producidas en la CTE, por lo que la fusión y fisión son procesos continuos (Friedman et al., 2014).

3.6.1 Fusión Mitocondrial

La fusión mitocondrial es el proceso mediante el cual dos mitocondrias se unen, esta acción se lleva a cabo con el fin de mezclar el contenido mitocondrial y mantener la conductividad eléctrica (Madhuparma, Hemachandra, Lijima, &

Hiromi, 2015). La fusión requiere de tres pasos, el primero es la interacción entre las membranas externas de dos mitocondrias, el segundo es la unión o fusión completa de las membranas mitocondriales externas (MME), y el tercero es la fusión de la membrana mitocondrial interna (MMI) (Dorn et al., 2014).

Como se representa en la figura 3, la interacción de las MME está mediada por dos proteínas GTPasas, la Mitofusina 1 y 2 (Mfn1 y Mfn2), que interaccionan principalmente con la MME. La región N terminal protruye hacia el citosol y contiene el dominio de GTP-asa. La fusión de las MMI es mediada por la proteína de atrofia óptica (Opa1) perteneciente a la familia de las dinaminas (Chan, 2006).

La fusión mitocondrial, ayuda a mitigar el estrés, intercambiando el material genético y enzimático de mitocondrias sanas y mitocondrias dañadas como mecanismo compensatorio. Manteniendo una distribución uniforme de los componentes solubles de la matriz mitocondrial y del espacio intermembranal (Eisner, György & György, 2013).

3.6.2 Fisión Mitocondrial

Bajo condiciones normales, la fisión es necesaria para crear mitocondrias nuevas, sin embargo bajo condiciones de estrés la fisión se activa para facilitar la muerte celular programada o apoptosis. Es mediada por una proteína llamada Fisina (Fis1) y por la proteína relacionada a dinamina (Drp1) que se localiza en el citosol. Drp1 es reclutada para formar una estructura helicoidal que envuelve la superficie externa de la mitocondria (Figura 3) en sitios de constricción, catalizando la hidrólisis de guanosín trifosfato (GTP) para provocar cambios conformacionales que permiten coordinar la escisión de la membrana interna y externa (Friedman et al., 2014). El mecanismo de reclutamiento de Drp1 no se ha dilucidado por completo, pero se sabe que los puntos de contacto entre la mitocondria y el retículo endoplásmico, se relacionan con los

lugares de constricción mitocondrial (Dorn et al., 2015) ya que pueden ser mediadoras para establecer el contacto entre estos dos organelos.

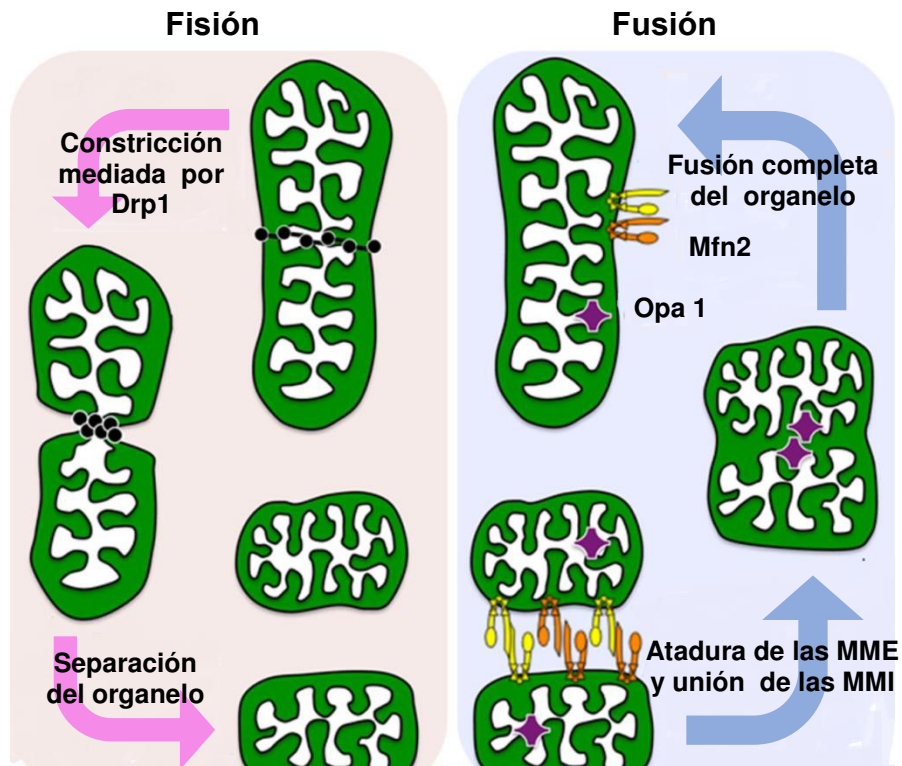


Figura 3. Dinámica mitocondrial. Esquema representativo de la dinámica mitocondrial y las proteínas efectoras de los procesos de fisión (Drp1: proteína relacionada a dinamina) y fusión (Mfn2: mitofusina 2; Opa1: proteína de atrofia óptica 1).

La pérdida de fusión mitocondrial provoca que la red de mitocondrias se fragmente y que el ADNmt se pierda total o parcialmente, lo que se asocia a defectos severos en la fosforilación oxidativa. Sin embargo, cuando un determinado umbral de daño es alcanzado, las mitocondrias son eliminadas a través de la autofagia. La fisión, por su parte, segrega el daño más serio de las mitocondrias para preservar la integridad de la red mitocondrial además de regular su morfología. El ciclo dinámico de fusión y fisión mitocondrial establece un equilibrio entre los dos procesos que compiten: la indemnización del daño por fusión y la eliminación del daño por fisión (Friedman et al., 2014).

3.6.3 Dinámica Mitocondrial y especies reactivas de oxígeno

Actualmente es aceptado que cuando el potencial de membrana mitocondrial es elevado, existe una mayor producción de ERO, evento favorecido en la obesidad. Por otro lado, la inanición está asociada a potenciales de membrana bajos. Estas dos condiciones, determinan si las mitocondrias se fusionan o se fisionan, en orden de abastecer las demandas energéticas de la célula dependiendo de los sustratos disponibles (Liesa et al., 2013). Con respecto a la dinámica mitocondrial y su relación con las ERO, se sabe que la expresión de Mfn2, es dependiente del potencial de membrana de la mitocondria (Zorzano, Liesa & Palacín, 2009) y por lo tanto de la función de la cadena transportadora de electrones. Cuando el potencial de membrana se abate la expresión de Mfn2 disminuye, comprometiendo la fusión.

Además, Jendrach y colaboradores (2008), demostraron que los eventos de la dinámica mitocondrial en células endoteliales humanas, son dependientes del tiempo y de la concentración de H_2O_2 , un radical frecuentemente producido en condiciones de estrés metabólico elevado. Observaron que a mayor dosis (de 3.3 a 22.8 mM) la fusión y la fisión disminuían su frecuencia. La principal diferencia, resultó en el daño al ADNm, el cual era directamente proporcional a la concentración de H_2O_2 . De la misma forma, la recuperación de la tasa de los eventos de fusión y fisión eran dependientes del tiempo, comprobando que el estrés oxidativo regula estos procesos de manera dosis y tiempo dependiente. (Jendrach, Mai, Pohl, Vöth & Bereiter-Hahn, 2008).

En el 2014, Iqbal y colaboradores, evidenciaron que el H_2O_2 induce la migración de Drp1 a la mitocondria, favoreciéndose la fisión mitocondrial y donde la administración de un antioxidante, disminuyó la fisión y aumentó la fusión. Siendo las ERO uno de los principales reguladores de la dinámica mitocondrial (Iqbal & Hood, 2014).

3.6.4 Obesidad, actividad física y dinámica mitocondrial

La regulación de la dinámica mitocondrial está mediada por los cambios en el metabolismo energético. Como resultado de la oxidación de nutrientes, la mitocondria suministra energía a la célula en forma de ATP, que gracias al transporte secuencial de electrones entre los complejos I y II a los complejos III y IV bombea protones desde la matriz hacia el espacio intermembranal. Lo que se traduce en la generación de un gradiente electroquímico que resulta en una diferencia de carga debido a un incremento en la concentración de protones, llamado potencial de membrana. (Liesa et al., 2013)

La dinámica mitocondrial está influenciada por los procesos relacionados al aporte y la demanda energética de la célula. Existe evidencia que sustenta que la mitocondria se fusiona cuando se ve forzada a depender de la fosforilación oxidativa y la glucosa no es la principal fuente de energía. (Youle et al., 2012; Westermann, 2010). El aumento de la fusión maximiza la eficiencia de la fosforilación oxidativa, con el fin de mantener la producción energética en condiciones de estrés; por ejemplo, durante periodos prolongados de restricción calórica (anorexia) (Youle et al., 2012).

Existe una relación entre la arquitectura mitocondrial y la exposición crónica y excesiva a nutrientes, las células expuestas a este ambiente tienden a mantener sus mitocondrias en un estado fragmentado (fisionadas) debido a un aporte exagerado de nutrientes y poca demanda energética (obesidad), esto crea un potencial de membrana elevado, que después es disipado por proteínas desacoplantes (UCP) con la inherente fuga de protones despolarizando la mitocondria (Liesa et al., 2013). Bajo estas condiciones la fisión es estimulada y la fusión es inhibida, proceso que inicia con el reclutamiento de Drp1 y la degradación de Opa1 y Mfn2, lo que sugiere que la fragmentación es una ventaja para un sistema que trabaja a máxima capacidad. (Toledo et al., 2006; Liesa et al., 2013).

En este sentido, Bach y colaboradores (2003), reportaron la presencia de una red mitocondrial fragmentada en el músculo esquelético de ratas con obesidad, además de un descenso del 30% en la expresión de Mfn2. Lo anterior se traduce en la reducción de la oxidación de glucosa, del consumo de oxígeno y del potencial de membrana de la mitocondria, acompañado de un decremento del 34% en la expresión de ARNm (ácido ribonucleico mensajero) (Bach et al., 2003).

Por otro lado, la deficiencia de Mfn2 se ha asociado con un aumento en la concentración de peróxido de hidrógeno y una actividad de enzimas antioxidantes deficiente (Sebastián et al., 2011). Esto se asocia a una disminución (26%) en la expresión de Mfn2 en el músculo esquelético de pacientes bajo condiciones de estrés crónico (obesidad y diabetes mellitus tipo 2) (Hernández-Álvarez et al., 2010).

De manera contraria, cuando la mitocondria enfrenta un incremento en la demanda energética (AF), esta debe sufrir cambios morfológicos para satisfacerla. Se ha descrito que la AF conlleva a un incremento en la expresión de proteínas relacionadas con la fusión mitocondrial, así como la interacción física entre organelos secundario a sesiones de AF aguda (caminata forzada) con diferentes intervalos de tiempo (30, 60, 90, 150 minutos) (Hood et al., 2006; Picard, Gentil, McManus, White & Turnbull, 2013). Por lo que las adaptaciones de la mitocondria en el músculo esquelético son altamente específicas y dependientes del tipo, intensidad y frecuencia de la AF. Dicha relación se ha visualizado con microscopía electrónica de transmisión, en donde el ejercicio agudo incrementa la fusión mitocondrial en fibras musculares (Picard et al., 2013), aunado a un incremento en la expresión de Mfn2 después de una sesión de AF intensa en el músculo esquelético de hombres sanos (Cartoni, Léger, Hock, Praz & Crettenand, 2005).

Bonnard y colaboradores (2008), describieron que el daño en la red mitocondrial (fragmentación) producido por un incremento en las ERO, secundario a hiperglucemia, es reversible con un tratamiento antioxidante, restaurando su integridad (Bonnard et al., 2008). Además, experimentos en mioblastos mostraron que el estrés oxidativo inducido con H₂O₂ resultó en un aumento del 41% en la fragmentación de la red mitocondrial aunado a la reducción del potencial de membrana. Paralelamente, se observó un decremento en los procesos de fusión y fisión, por lo que el estrés oxidativo es vital para la señalización de la motilidad y morfología mitocondrial. (Iqbal et al., 2014), lo que reitera el papel de las ERO en el control de la dinámica mitocondria.

La relevancia biológica de la mitocondria va más allá de mantener la homeostasis energética de la célula, la reestructuración dinámica de la mitocondria influye en la señalización celular, incluyendo la señalización de calcio que controla directamente la contracción muscular. Al respecto, una investigación reciente demostró que la fragmentación de la mitocondria causa alteraciones en los transitorios de calcio alterando el reclutamiento de Drp1 en la MME y perpetuando el ciclo de la fisión mitocondrial aumentada (Eisner, Lenaers & Hajnóczky, 2014).

4. HIPÓTESIS

Si la actividad física promueve cambios en la dinámica mitocondrial que favorecen su función y eficacia, entonces la actividad física activará la dinámica mitocondrial en el músculo esquelético de ratas con obesidad.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar los cambios en la dinámica mitocondrial inducidos por la actividad física en el músculo esquelético de ratas con obesidad.

5.2 Objetivos específicos

5.2.1 Objetivo específico 1

Investigaciones en modelos murinos y humanos han reportado el aumento de la fusión mitocondrial del músculo esquelético secundaria a sesiones agudas de actividad física (Picard et al., 2013; Cartoni et al., 2005; Hood et al., 2006), otros reportes evidencian una red mitocondrial fisionada como resultado del incremento en la generación de ERO debido un ambiente celular con una concentración elevada de nutrientes (Liesa et al., 2013; Sebastián et al., 2011; Bonnard et al., 2008). Por lo tanto, es importante determinar los cambios en la expresión de proteínas involucradas en la dinámica mitocondrial (Mfn2, Drp1), así como la expresión de sensores energéticos como AMPK antes y después de 1 hora de natación forzada (actividad física a la cual se sometieron a los animales) en un tejido que favorezca el metabolismo oxidativo de la mitocondria (gastrocnemio). Consecuentemente el primer objetivo específico de la presente investigación

fue **determinar el nivel de expresión de las proteínas relacionadas con la fisión y fusión mitocondrial en el músculo gastrocnemio de ratas sedentarias con obesidad, sometidas a un periodo extenuante de actividad física.**

5.2.2 Objetivo específico 2

La cascada de señalización que activa la fusión y fisión mitocondrial está determinada por el grado de estrés, principalmente por un incremento en las ERO (radical superóxido) (Navarro, Gómez, López & Boveris, 2004), cuya exacerbación se observa bajo condiciones de obesidad. Por lo tanto, el segundo objetivo fue **determinar el estrés oxidativo presente en las mitocondrias aisladas del músculo gastrocnemio de ratas sedentarias con obesidad, sometidas a un periodo extenuante de actividad física,** midiendo marcadores de estrés oxidativo como son, la actividad de las enzimas aconitasa, catalasa y superóxido dismutasa.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material químico

Los reactivos utilizados para la presente investigación fueron: pentobarbital sódico (Pet's Pharma); HEPES, ácido tetraacético del etilenglicol, sacarosa, inhibidor de fosfatasas, suero de albúmina de bovino, NBT, carbonato de sodio, fosfato monobásico de potasio, cloruro de magnesio, xantina (Sigma - Aldrich®); peróxido de hidrógeno (NADRO®); RIPA (IGEPAL® CA-630); Bis-acrilamida 30%, Tris (BioRad®); SDS (AMRESCO®); anticuerpos primarios: GAPDH policlonal de conejo (Santa Cruz), Drp1 monoclonal de conejo, Mfn2 monoclonal de conejo, AMPK α policlonal (Cell Signaling®); Luminata Forte (Merck Millipore®) y Clarity Western ECL (Substrate Bio-Rad®).

6.2 Material biológico

Se utilizaron diez ratas Zucker obesas de 12 semanas de edad, provenientes del Bioterio de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud del *Tecnológico de Monterrey* (protocolo #2012-003, aprobado por el Comité de Uso y Cuidado de Animales de Experimentación). La principal característica de este modelo es la mutación recesiva en el receptor de leptina (Ob-R), a partir de un cambio de una base en el codón 269 de leptina en el cromosoma 1 (Philips, Liu, Hammond, y Dugan, 1996), de manera que se impide la unión de la leptina (hormona secretada por los adipocitos) con su receptor inhibiendo la sensación de saciedad, lo que resulta en la presencia de obesidad grave. (Debin, Lauzier, Sicard, y Delemasure, 2009).

6.3 Métodos

6.3.1 Diseño del estudio

El presente trabajo se describe como un estudio experimental y transversal, que se realizó de julio de 2014 a julio de 2015. Se eligió como modelo de experimentación a la rata Zucker obesa y como control a la rata Zucker silvestre (delgada). Como parte de la estrategia experimental se formaron dos grupos, el primero, compuesto por animales sedentarios (5 ratas obesas y 5 ratas silvestres) y el segundo conformado por animales sometidos a 60 minutos de natación forzada (5 ratas obesas y 5 ratas delgadas).

Con el fin de cumplir con los objetivos planteados en la presente investigación, se formó un grupo control con ratas Zucker delgadas (Dg) y un grupo experimental de ratas Zucker con obesidad (Ob). Cada uno de estos, se dividió en 2 subgrupos (Figura 4): ratas Dg sedentarias (DgS), ratas Dg sometidas a AF (DgAF), ratas Ob sedentarias (ObS) y ratas Ob físicamente activas (ObAF).

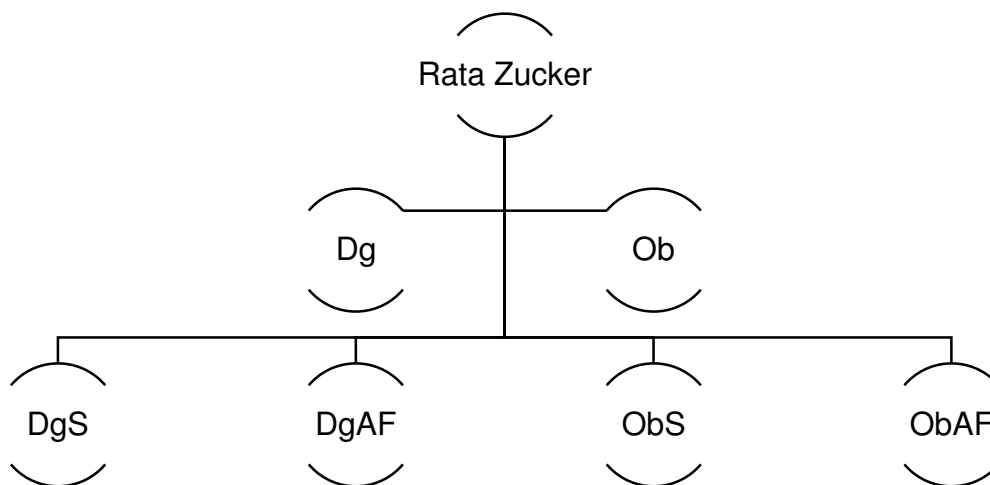


Figura 4. Diagrama de la división de los grupos de estudio

Para la determinación de los niveles de expresión de las proteínas de interés, se llevó a cabo la electroforesis y transferencia de las proteínas del homogenado total del músculo gastrocnemio de todos los animales antes mencionados a membranas de PVDF. Posteriormente se analizó la densidad de pixeles de las bandas detectadas por quimioluminiscencia utilizando el programa ImageJ®.

La medición de la actividad enzimática se realizó utilizando mitocondrias del músculo gastrocnemio, las cuales se obtuvieron mediante centrifugación diferencial. La actividad de la superóxido dismutasa y aconitasa se midió espectrofotométricamente. Finalmente la actividad de la enzima catalasa se obtuvo por el método de oximetría. Los valores obtenidos de cada uno de los experimentos se analizaron con el software GraphPad® Prism 6.

Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio del Instituto de Cardiología y Medicina Vascular del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey.

6.3.2 Medición del peso

Se pesó a cada uno de los animales de experimentación en una balanza granataria y este se registró en gramos.

6.3.3 Actividad física

Los animales se sometieron a una prueba de natación forzada por 60 minutos. Este tipo de actividad física es ampliamente utilizada para identificar respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares al estrés que produce el ejercicio agudo (Kramer, Dijkstra & Bast, 1993; Hédou, Pryce, Di Iorio & Heidbreder, 2001). La natación forzada en animales de experimentación no altera los parámetros cardiovasculares que pudieran influenciar el rendimiento. (Kregel, Allen, Booth & Fleshner, 2006). Dicha prueba consistió en introducir a la rata en un balde (37x28x18 cm) con agua precalentada (35°C), considerando que si la temperatura del agua excedía o era menor a la temperatura corporal de la rata podría influenciar el rendimiento del animal. A lo largo de la prueba la temperatura del agua se mantuvo constante, entre 33 y 36°C.

6.3.4 Disección del músculo gastrocnemio

La disección se llevó a cabo después aplicar una dosis letal de pentobarbital sódico al animal vía intraperitoneal (≥ 60 mg/kg), ya que de acuerdo a la Asociación Americana de Medicina Veterinaria, una sobredosis de ácido barbitúrico inicia con una anestesia profunda que progresa a apnea debido a la depresión del centro respiratorio, seguido de un paro cardíaco y finalmente se observa una pérdida de la conciencia total, además de que la eutanasia se lleva a cabo con pocas molestias para el animal. Idealmente los barbitúricos deben ser estables en solución, potentes, de larga duración y baratos, el pentobarbital sódico cumple con dichos criterios y es el más utilizado en modelos de experimentación animal. (Leary, Underwood, Anthony & Cartner, 2013). Una

vez que el animal ya no mostró reflejos o signos de alerta (movimientos voluntarios o involuntarios), se colocó en posición ventral sobre una superficie plana y se aseguraron las extremidades superiores e inferiores. Se inició la disección con tijeras de punta roma, con un corte de la piel en la parte posterior y distal de la extremidad inferior derecha, ingresando a la fascia del músculo, se localizó el músculo gastrocnemio y se procedió a pinzar el tendón distal, posteriormente se cortó el tendón proximal y se retiró con cuidado el músculo completo cortando el tendón distal (MacIntosh, Esau, Holash & Fletcher, 2011). Una vez obtenidos los músculos se pesaron en una balanza de precisión, aproximadamente la octava parte del tejido total se utilizó para homogenizarlo, el músculo restante se colocó en solución de extracción mitocondrial (4°C) los reactivos utilizados para su preparación fueron (en unidades de molaridad (M)): sacarosa 0.25, HEPES 0.01 y EGTA (ácido tetraacético del etilenglicol) 0.001, pH 7.3 (SHE).

6.3.5 Extracción de mitocondrias

La extracción de mitocondrias se realizó por homogenización y centrifugación diferencial. Una vez obtenido el músculo se cortó con tijeras en pedazos pequeños y se retiraron los residuos de tendón y tejido adiposo con varios recambios de solución (SHE). Posteriormente el tejido se incubó con nagarse (1 miligramo/gramo (mg/g) de tejido) por 10 minutos (min) a 4 grados centígrados (°C), lo que facilitó la homogenización. Una vez homogenizado, el extracto se filtró con una gasa y el filtrado se centrifugó a 3 000 revoluciones por minuto (RPM) por 10 min a 4°C; se obtuvo el sobrenadante, se filtró nuevamente con una gasa, el filtrado se centrifugó a 10 000 RPM por 10 min a 4°C. Se procedió a recuperar la pastilla (mitocondrias) y se despegó la pastilla con un pincel y solución SHE con 0.05% de albúmina, para atrapar los ácidos grasos libres y se incubó por 10 min en hielo. Por último, se procedió a realizar la tercera centrifugación a 10 000 RPM por 10 min a 4°C, se resuspendió la

pastilla con solución SHE libre de EGTA y finalmente se realizó la cuantificación de proteínas mitocondriales por el método de Lowry. (García & Chávez, 2007).

6.3.6 Medición del peso y homogenización del músculo gastrocnemio

Una vez extraído el músculo gastrocnemio de ambas patas, el tejido se pesó en una balanza de precisión, posteriormente se cortó en trozos pequeños y se le agregó buffer RIPA 1X (NaCl 150 mM, IGEPAL® CA-630 1%, sodio desoxicólico 0.5%, SDS 0.1%, y Tris 50 mM, pH 8.0), con la adición de inhibidores de proteasas y fosfatasa, el cual permitió la solubilización de proteínas evitando la degradación de las mismas con una relación peso/volumen de 100 mg / 1 mililitro (ml). Posteriormente, se disrumpió el tejido con un aparato de homogenización (Polytron®) hasta obtener una mezcla uniforme, a continuación se centrifugó a 2500 RPM por 5 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se procedió a la cuantificación de proteínas por el método de Lowry (García et al., 2007).

6.3.7 Análisis de la expresión de proteínas por western blot

El homogenado o las mitocondrias se solubilizaron en buffer Laemmli seguido de la separación de las proteínas por electroforesis mediante geles de poliacrilamida al 10%, las proteínas se separaron en función de su peso molecular, se transfirieron a una membrana de PVDF y se bloqueó con 5% de leche descremada con el fin de evitar la unión inespecífica de los anticuerpos que se utilizaron para la detección de las proteínas de interés. Las membranas de PVDF se incubaron con cada uno de los anticuerpos a una dilución de 1:1000 del anticuerpo primario. Los anticuerpos fueron: GAPDH policlonal de conejo (Santa Cruz®), Drp1 monoclonal de conejo (Cell Signaling®), Mfn2 monoclonal de conejo (Cell Signaling®) y AMPK α policlonal (Cell Signaling®), Finalmente se añadió el anticuerpo secundario correspondiente y se detectó

con un sustrato de quimioluminiscencia (Luminata Forte Merck Millipore® o Clarity Western ECL Substrate Bio-Rad®). (Ding, Jiang, Liu, y Liu, 2010).

6.3.8 Análisis semicuantitativo por densidad de pixeles

Para el análisis semicuantitativo de las bandas que corresponden a las proteínas identificadas en la membrana de PVDF, se utilizó el software Image Processing and Analysis in Java (ImageJ®). Se seleccionó un área de la misma magnitud para cada una de las bandas y se registró la densidad de pixeles de cada una para obtener un promedio, el cual determinó de manera indirecta el nivel de expresión de la proteína en cuestión y fue comparable con el análisis de todos los grupos.

6.3.9 Actividad enzimática

La actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y aconitasa se obtuvo por el método calorimétrico. Para la medición de la actividad de la enzima SOD, se colocaron 75 µg de mitocondrias del músculo gastrocnemio en una placa la cual contenía (en mM) xantina 10, EDTA 10, NBT 3, NaCO₃ 500, KH₂PO₄ 50, albúmina 0.5%, pH 7.8, que reaccionó con la enzima, generando una coloración violeta cuya absorbancia fue registrada a 560 nm. La actividad de la aconitasa se midió espectrofotométricamente siguiendo la aparición de su intermediario (cis-aconitato) a 240nm utilizando una solución que contenía: KH₂PO₄ 25mM, Tx-100 0.01%, pH 7.2 con la adición de NADP 4mM, isocitrato deshidrogenasa 1U, citrato 5mM y 100 µg mitocondrias de músculo gastrocnemio. La actividad de la catalasa que hidroliza el H₂O₂ a agua (H₂O) y oxígeno, se midió por el método de oximetría. Se colocó en una placa una muestra de mitocondrias aisladas de músculo gastrocnemio y 1 ml de buffer de KH₂PO₄ 50mM a pH 7, la reacción inició con la adición de 10 mM de H₂O₂ y se midió la generación de oxígeno con un electrodo tipo Clarck.

6.3.10 Procesamiento de los datos

Los datos obtenidos se analizaron en el software Graph Pad® Prism 6 con la prueba t de Student y se consideraron estadísticamente significativas cuando p fue menor o igual a 0.05.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización antropométrica del modelo experimental

La caracterización física del modelo, se llevó a cabo mediante la medición del peso corporal de los grupos controles y experimentales. La tabla 1, muestra el peso obtenido del grupo Dg y Ob, observándose que los animales Ob presentan una ganancia de peso corporal del 42% ($p < 0.05$) en comparación con el grupo Dg. Adicionalmente se pesó el músculo gastrocnemio de las patas traseras de cada uno de los animales, los cuales fueron normalizados con la longitud del fémur, la comparación entre grupos, arrojó una disminución significativa del 17% ($p < 0.05$) en el grupo Ob.

Tabla 1. Peso corporal y peso del músculo gastrocnemio normalizado con la longitud del fémur de ratas con obesidad y delgadas

	Peso corporal (g)	Peso del músculo gastrocnemio (g)	Longitud del fémur (cm)	Peso del músculo gastrocnemio/longitud del fémur (g/cm)
Delgadas (n=5)	297.6 \pm 7.55	4.5 \pm 0.44	2.9 \pm 0.12	1.52 \pm 0.05
Obesas (n=5)	425.2 \pm 11.3*	3.5 \pm 0.33*	2.7 \pm 0.13*	1.25 \pm 0.04*

Los datos representan el promedio \pm desviación estándar. * $p < 0.05$.

7.2 Determinación de la expresión de AMPK como sensor energético.

El AMPK, es una proteína que funge como sensor energético, que responde a cambios en la relación ATP/ADP, y a su vez se relaciona con la dinámica mitocondrial. La Figura 5A, muestra los niveles de expresión de AMPK de los grupos sedentarios (DgS y ObS) y con AF (DgAF y ObAF). Se observa que el subgrupo de animales ObS presentaron un incremento del 69% ($p < 0.05$) con respecto al grupo DgS. Contrastando con los resultados de la expresión de AMPK en el músculo de los animales físicamente activos (DgAF y ObAF), en donde se mantiene prácticamente constante, ya que no presentó diferencia estadísticamente significativa.

Con respecto al efecto de la AF se encontró que en el grupo DgAF la expresión se incrementó 1.3 veces ($p < 0.05$) con respecto a los animales DgS, y que en el grupo de ratas ObAF, hay un aumento en la expresión de AMPK del 34% ($p > 0.05$) comparado con el grupo ObS. La Figura 5B-C, muestra las imágenes del western blot utilizadas para el análisis. Los resultados se obtuvieron normalizando la intensidad de la banda correspondiente a AMPK con la obtenida de GAPDH, utilizada como control de carga

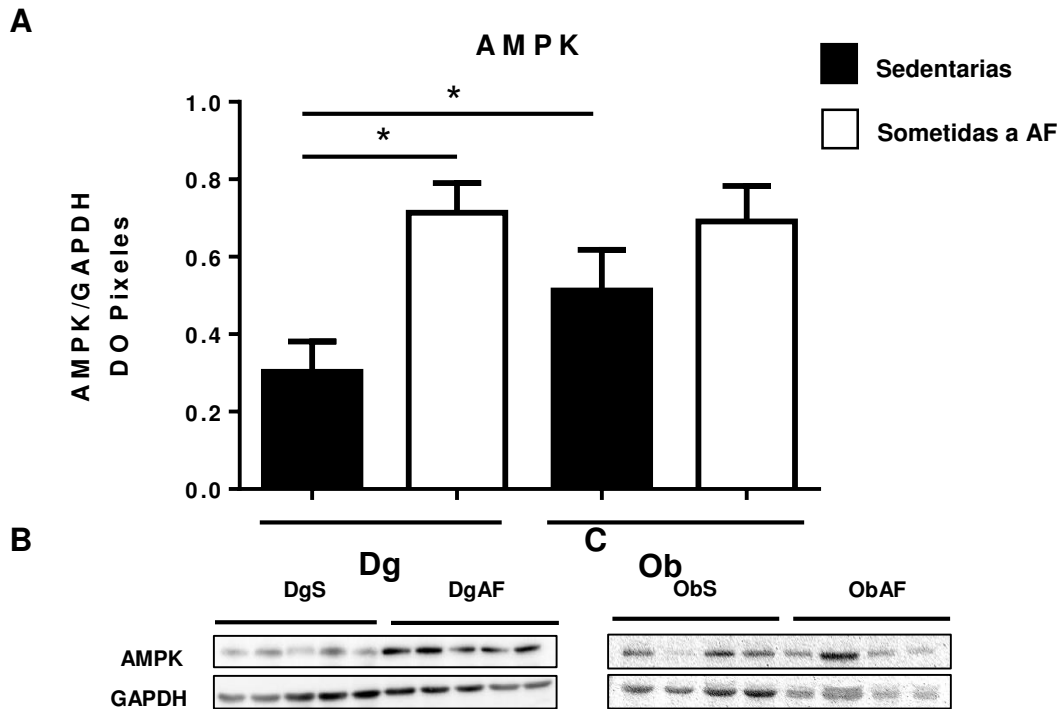


Figura 5. Cambios en la expresión de AMPK en el músculo gastrocnemio de ratas con obesidad y delgadas, sedentarias y sometidas a actividad física. Panel A: cuantificación de la densidad óptica en pixeles AMPK/GAPDH de ratas delgadas sedentarias, DgS, (n=4) y con actividad física, DgAF, (n=4); de ratas obesas sedentarias, ObS, (n=4) y con actividad física, ObAF, (n=4). **Panel B:** western blot representativo de AMPK y GAPDH de ratas delgadas con y sin actividad física. **Panel C:** western blot representativo de AMPK y GAPDH de ratas obesas con y sin actividad física. Los datos representan el promedio \pm error estándar. * $p < 0.05$.

7.3 Análisis de los niveles de expresión de las proteínas relacionadas con la dinámica mitocondrial

Para responder el primer objetivo, se midió el nivel de expresión de las proteínas relacionadas con la dinámica mitocondrial en el homogenado total del músculo gastrocnemio de los cuatro subgrupos, antes mencionados, mediante western blot.

7.3.1 Nivel de expresión de Mfn2

Para conocer la influencia de la obesidad y de la AF sobre la fusión mitocondrial, se determinó el nivel de expresión de Mfn2, utilizando el homogenado total del músculo gastrocnemio de ratas DgS, ObS, DgAF y ObAF.

Los resultados de la figura 6A, muestran que en condiciones de obesidad y sedentarismo (ObS). La expresión de la proteína se vio ligeramente aumentada (19%) en contraste con las ratas DgS pero no presentó diferencia significativa. Cuando se compararon los resultados entre los animales DgAF y ObAF, se observó una disminución del 45% ($p < 0.05$) en la expresión de Mfn2 en el músculo gastrocnemio de las ratas ObAF. En relación al efecto de la AF, la gráfica (panel A) muestra que la expresión de Mfn2 aumentó 2.4 veces ($p < 0.05$) en el músculo de ratas DgAF con respecto a los animales sedentarios (DgS). Por otro lado, el grupo de ratas Ob, mostró una tendencia no significativa a incrementar (0.5 veces) después de la AF. La figura 6B-C muestra las imágenes del western blot utilizadas para el análisis. Los resultados se obtuvieron normalizando la intensidad de la banda correspondiente a Mfn2 con la obtenida de GAPDH, utilizada como control de carga.

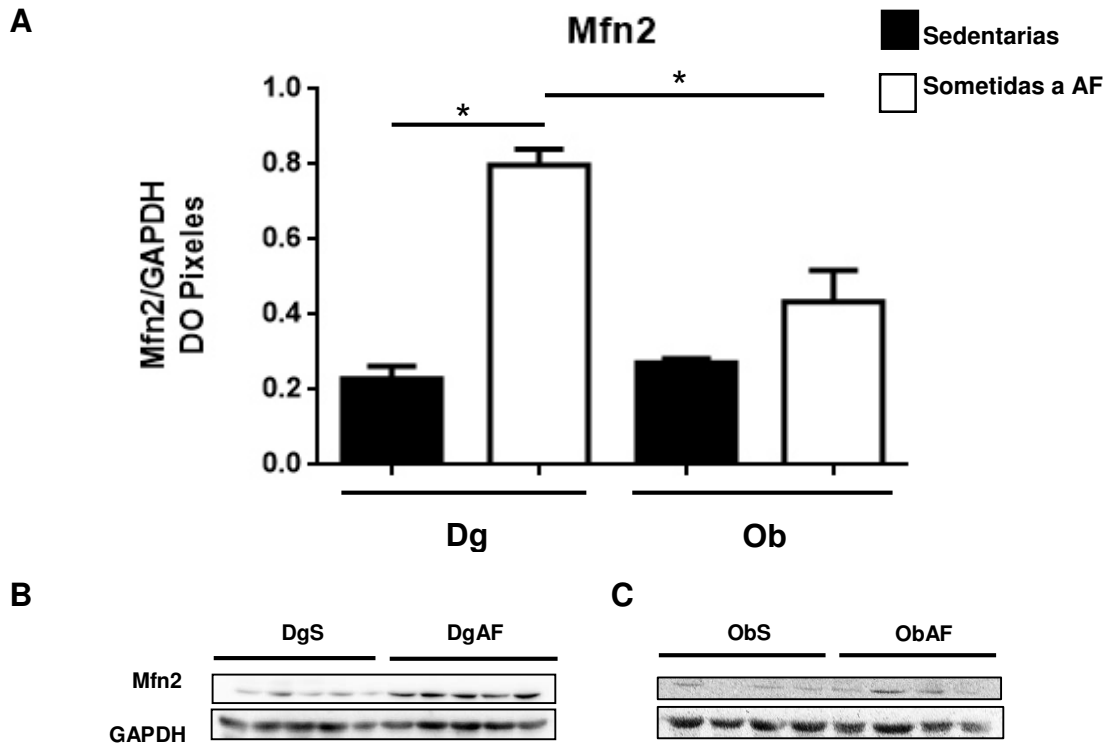


Figura 6. Cambios en la expresión de Mfn2 en el músculo gastrocnemio de ratas con obesidad y delgadas, sedentarias y sometidas a actividad física. Panel A: cuantificación de la densidad óptica en pixeles Mfn2/GAPDH de ratas delgadas sedentarias, DgS, (n=4) y con actividad física, DgAF, (n=4); de ratas obesas sedentarias, ObS, (n=3) y con actividad física, ObAF, (n=4). **Panel B:** western blot representativo de Mfn2 y GAPDH de ratas delgadas con y sin actividad física. **Panel C:** western blot representativo de Mfn2 y GAPDH de ratas obesas con y sin actividad física. Los datos representan el promedio \pm error estándar. * $p < 0.05$.

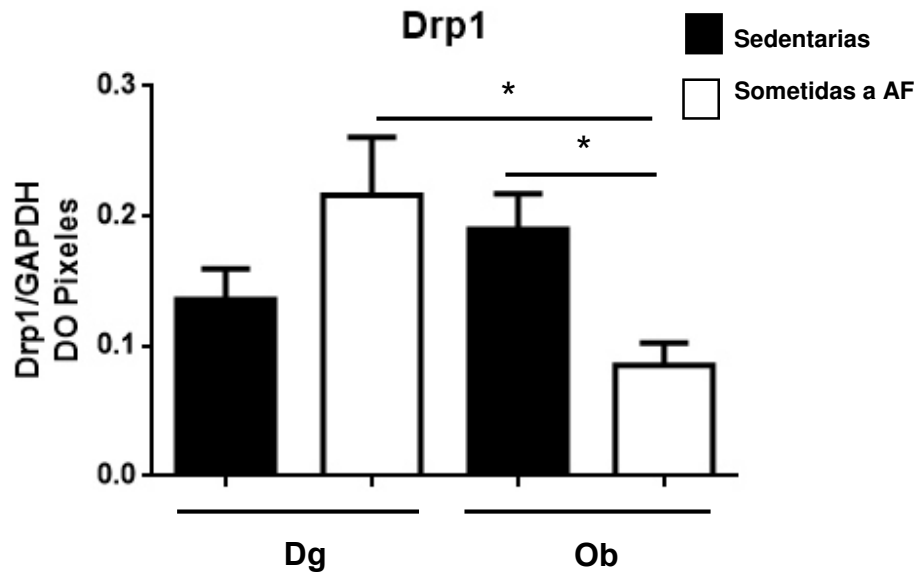
7.3.2 Nivel de expresión de Drp1

A partir del análisis de los western blots, se evaluó el nivel de expresión de la proteína relacionada a la fisión mitocondrial, Drp1. La figura 7, muestra el análisis semicuantitativo, en donde los animales ObS presentaron una tendencia no significativa a incrementar la expresión de Drp1 (39%) cuando se comparó con el grupo DgS.

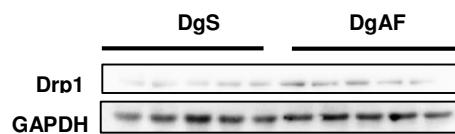
Por otro lado, se encontró que la expresión de Drp1 en el músculo de ratas ObAF, disminuyó drásticamente en un 60% ($p < 0.05$) al compararse con el grupo DgAF. En el caso del grupo de ratas Dg, el resultado indica que la expresión de Drp1 tiene una tendencia a incrementar (0.5 veces) en el músculo de ratas DgAF en contraste con el control (DgS), sin embargo el análisis estadístico no arrojó una diferencia significativa.

También, se observó que el grupo de ratas ObAF presentaba una disminución en la expresión de Drp1 del 55% ($p < 0.05$) al compararse con los animales ObS. La figura 7B-C muestra las imágenes del western blot utilizadas para el análisis. Los resultados se obtuvieron normalizando la intensidad de la banda correspondiente a Drp1 con la obtenida de GAPDH, utilizada como control de carga.

A



B



C

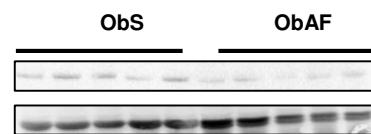


Figura 7. Cambios en la expresión de Drp1 en el músculo gastrocnemio de ratas con obesidad y delgadas, sedentarias y sometidas a actividad física. Panel A: cuantificación de la densidad óptica en pixeles Drp1/GAPDH de ratas delgadas sedentarias, DgS, (n=4) y con actividad física, DgAF, (n=4); de ratas obesas sedentarias, ObS, (n=5) y con actividad física, ObAF, (n=5). **Panel B:** western blot representativo de Drp1 y GAPDH de ratas delgadas con y sin actividad física. **Panel C:** western blot representativo de Drp1 y GAPDH de ratas obesas con y sin actividad física. Los datos representan en promedio \pm error estándar. *p<0.05.

7.4 Análisis del estrés oxidante

Para abordar el segundo objetivo el cual consistió en determinar el estrés oxidativo presente en las mitocondrias del músculo gastrocnemio de ratas ObAF, se midió la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y catalasa. Debido a que esta se incrementa en presencia de una concentración elevada de ERO. Por lo tanto, el cálculo de dicha actividad sirve como marcador indirecto de estrés oxidativo.

7.4.1 Análisis de la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa

Se midió la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD y catalasa mediante ensayos de espectrofotometría. Con respecto a la actividad de la enzima SOD, la figura 8A muestra que el grupo ObS la actividad disminuyó en un 22% en comparación con el grupo DgS ($p>0.05$). En el grupo ObAF, la actividad presentó un decremento del 27% con respecto al grupo DgAF ($p>0.05$). En el grupo DgAF la actividad de esta enzima disminuyó (46%) con respecto al grupo control (DgS), de igual forma se presentó una reducción en el grupo ObAF con respecto al grupo ObS (50%). Sin embargo ninguno de los resultados anteriores presentó significancia estadística.

Con respecto a la enzima catalasa, en la figura 8B, muestra que en el grupo de ratas ObS mostró un aumento en la actividad de la enzima del 50% al compararse con el grupo DgS ($p>0.05$). La actividad de la enzima no mostró diferencia significativa entre el grupo DgAF y DgS (11%). Por otro lado, la actividad de la enzima en el grupo DgAF y ObAF mostró un decremento del 9% ($p>0.05$), decremento que se duplicó (18%, $p>0.05$) cuando se compararon los grupos ObAF y ObS.

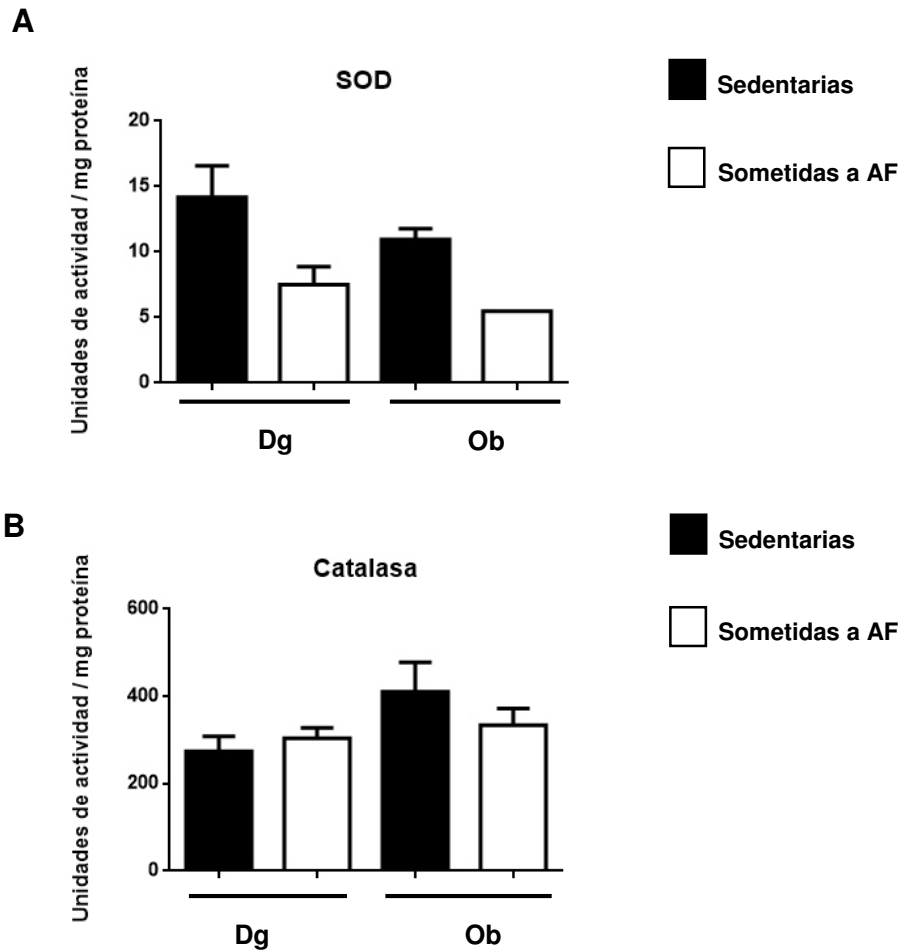


Figura 8. Cambios en la actividad de enzimas antioxidantes de mitocondrias del músculo gastrocnemio de ratas con obesidad y delgadas, sedentarias y sometidas a actividad física. Panel A: actividad de superóxido dismutasa en unidades de ratas delgadas sedentarias, DgS, (n=4), físicamente activas, DgAF, (n=4) y de ratas con obesidad sedentarias, ObS, (n=4) y físicamente activas, ObAF, (n=2). **Panel B:** actividad de catalasa en unidades de ratas delgadas sedentarias, DgS, (n=5), físicamente activas, DgAF, (n=5) y de ratas con obesidad sedentarias, ObS, (n=5) y físicamente activas, ObAF, (n=5). Los datos representan el promedio \pm error estándar. *p<0.05.

7.4.2 Análisis de la actividad de la enzima aconitasa

Se analizó la actividad de la enzima aconitasa, la cual, posee un centro de hierro y azufre que es sensible a la oxidación, esta enzima cataliza la isomerización de citrato en isocitrato vía cis-aconitato en el ciclo del ácido tricarboxílico y la pérdida de su actividad, se considera una medida de daño oxidativo (Cantu, Schaack & Patel, 2009). Dicha actividad, se normalizó con la actividad de la enzima citrato sintasa. La figura 9 muestra que al comparar al grupo DgS con los animales ObS la actividad de la enzima disminuyó en un 31% ($p < 0.05$) en el grupo de ratas con obesidad. Se observó una disminución en la actividad de la enzima en el grupo Dg AF (30%, $p < 0.05$) con respecto al grupo DgS. En el caso del grupo ObAF los resultados mostraron un decremento del 96% ($p < 0.05$) al compararlo con su control (ObS), al igual que el grupo ObAF el cual presentó un decremento en la actividad de la enzima del 97% ($p < 0.05$) en comparación con el grupo DgAF.

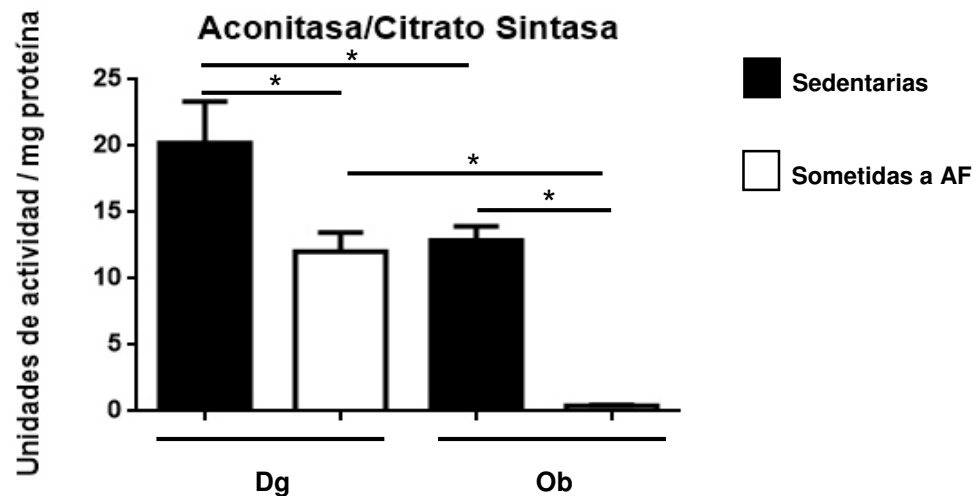


Figura 9. Cambios en la actividad de catalasa/citrato sintasa de mitocondrias del músculo gastrocnemio de ratas con obesidad y delgadas, sedentarias y sometidas a actividad física. Unidades de catalasa/citrato sintasa en unidades de ratas delgadas sedentarias, DgS, (n=5) y físicamente activas, DgAF, (n=5), y de ratas con obesidad sedentarias, ObS, (n=5) y con actividad física, ObAF, (n=4).

8. DISCUSIÓN

La obesidad es una enfermedad multifactorial, cuya principal etiología se relaciona con el desequilibrio entre la ingesta de nutrimentos y el gasto energético (Marti et al., 2004). Afecta directamente al metabolismo celular, donde la mitocondria juega un papel primordial (Egan et al., 2012) cuya función es dependiente de la presencia de sustratos oxidables obtenidos de la dieta.

Uno de los principales tratamientos es la realización de AF, (Toledo et al., 2006), la cual, estimula la contracción del músculo esquelético, generando cambios progresivos que se ven reflejados en la regulación de las vías de señalización específicas relacionadas con el metabolismo celular. (Friedman et al., 2014). Sin embargo, poco se sabe acerca de la influencia de la AF sobre la dinámica mitocondrial bajo condiciones de obesidad.

En orden de contribuir al esclarecimiento de dichos mecanismos, se analizó la expresión de las proteínas relacionadas con la dinámica mitocondrial y del sensor energético por excelencia AMPK. Esta proteína es activada por el aumento de la concentración de AMP acoplada a la disminución de ATP intracelular. (Kahn et al., 2005; Friedrichsen et al., 2013).

Los resultados de la presente investigación concuerdan con lo reportado por Gwinn y cols. (2008), en donde sugieren que el aumento en la expresión de AMPK se debe a un incremento del estrés energético (elevación en la concentración de AMP), suprimiendo vías biosintéticas, para favorecer la síntesis de ATP. Sin embargo, en condiciones de obesidad, la AF, no logró incrementar los niveles de AMPK, pero interesantemente la expresión de dicha proteína se incrementó únicamente por la condición de obesidad, por lo que las alteraciones metabólicas ocasionadas por esta patología pueden incrementar la disponibilidad de la enzima.

Es importante mencionar, que la actividad de la enzima es altamente dependiente de fosforilación en los residuos de Thr172 (Carling et al., 2011) y Ser108 (Warden, 2001), evento que no es posible afirmar en condiciones de AF y la propia condición de obesidad, ya que no se cuenta con evidencia. Sin embargo se ha reportado (Sriwijitkamol et al., 2005) que el entrenamiento físico (7 semanas de caminata forzada) de ratas Zucker obesas, se relaciona positivamente con el aumento en la expresión de AMPK α 1 (60%) que también se fosforila ante el estrés energético.

Por otro lado, se realizó la comparación de los grupos sedentarios (DgS y ObS), y se encontró una diferencia significativa del 69% ($p < 0.05$). De acuerdo a la literatura, en el músculo gastrocnemio de ratas Zucker obesas (Sriwijitkamol et al., 2005) los niveles de AMPK total, bajo condiciones basales no se modifican. Sin embargo, es importante mencionar que ese resultado se refiere a la suma de los niveles en la expresión de las diferentes subunidades de AMPK. En el presente trabajo, se utilizó un anticuerpo que solo reconoce las subunidades α 1 y α 2, de donde podría surgir la diferencia entre ambos reportes.

Con respecto a las proteínas relacionadas con la dinámica mitocondrial, se sabe que la función de Mfn2 en la fusión mitocondrial es dependiente del potencial de membrana (Legros, Lombès, Franchon & Rojo, 2002) la cual se activa para reestablecer el potencial de membrana, cuando este se abate y además favorece el intercambio de material genético. Un ejemplo de ello es la inanición o la alta demanda energética (Youle et al., 2012; Liesa et al., 2013).

Los resultados del presente trabajo mostraron que la AF incrementó la expresión de Mfn2 en condiciones normales (Figura 6), lo cual concuerda con lo reportado por Picard y cols. (2013), en donde observaron que las interacciones entre las MME del músculo esquelético de ratones sometidos a una sola sesión de AF intermitente, incrementaron 1.9 veces. Además, otro estudio (Cartoni et al., 2005) reveló que en el músculo esquelético de ciclistas de alto rendimiento

el RNAm de Mfn2 se incrementó 2.7 veces 24 horas después de una sola sesión de AF extenuante. En ninguno de los dos trabajos mencionados, se encontró diferencia en la expresión total de Mfn2, sin embargo el modelo era distinto y la exposición a la AF fue a diferentes tiempos. Además es importante recordar que las ERO son las principales orquestadoras de la dinámica mitocondrial y la frecuencia e intensidad de la AF modifica sus concentraciones y por lo tanto, la respuesta a las mismas.

Con respecto a la activación de la fisión mitocondrial, los resultados muestran que la condición de obesidad presenta un elevado contenido de Drp1 (Figura 7) debido a que la fragmentación de la red mitocondrial se encuentra presente como consecuencia del estrés oxidante crónico al cual están sometidas (Liesa et al., 2013; Sebastián et al., 2011; Bonnard et al., 2008). Por otro lado, en el grupo Dg se observó una tendencia a aumentar (0.5 veces) después de una sola sesión de la AF, la cual, fue suficiente para observar un incremento en Drp1, comparada con la condición crónica de obesidad.

Estos resultados empatan con lo reportado por Iqbal y cols. (2014), en donde se encontró que la red mitocondrial de mioblastos expuestos a altas concentraciones de H_2O_2 se encontraba fragmentada. Además, con estudios de imagen, observaron que Drp1 se recluta desde el citosol hasta la mitocondria bajo estas condiciones y que en presencia de un antioxidante la tasa de eventos de fisión se restauran mientras que los de fusión incrementa, estableciendo una relación dependiente de la presencia de ERO.

Al respecto, en la presente investigación se llevó a cabo la medición de la actividad de enzimas antioxidantes como marcadores indirectos de estrés oxidativo. Se encontró que la obesidad compromete la actividad de SOD (Figura 8), de manera que la incorporación de la AF no reconstituyó su actividad, debido a que la propia AF promueve una disminución de la actividad de la enzima, incluso en condiciones normales (Figura 8). Sin embargo, la actividad

de la catalasa, no se vio modificada en ninguno de los grupos, lo cual es posible debido a que la actividad de SOD disminuye y por lo tanto, la generación de H_2O_2 es más baja por parte de la mitocondria. Este efecto, permite que el radical superóxido se acumule, afectando enzimas como la aconitasa, la cual es altamente sensible a este radical por tener un centro Fe-S (Cantu et al., 2009), comprometiendo la función mitocondrial, el cual puede fungir como señal que dispara la cascada de señalización relacionada con la dinámica mitocondrial (Iqbal et al., 2014; Bonnard et al., 2008).

Es importante mencionar que los resultados de investigaciones relacionadas con el estrés oxidativo y la AF (Sebastian et al., 2010; Arbogast, Reid, 2004; Navarro et al., 2003) no son concluyentes, ya que dependen del modelo experimental, el tipo (aeróbico o anaeróbico), el tiempo, el tejido, la frecuencia y la intensidad de la AF, así como el método de medición, por lo tanto, nuestros resultados no pueden ser ampliamente comparables con lo reportado en la literatura. Por ejemplo, se ha reportado que la actividad de la SOD durante el entrenamiento de resistencia incrementa, pero los niveles de RNAm disminuyen (Li, 2008).

Otro estudio revela que la expresión de SOD citoplasmática después de una sesión de AF extenuante (6 horas de caminata forzada) incrementa de manera significativa y de igual manera el RNAm de esta enzima pero la SOD mitocondrial no presenta cambios. (Hitomi et al., 2008). Estos resultados no son comparables debido a que solo se aplicó una sesión de AF. Sin embargo, nos permite sugerir que es necesaria más de una sola sesión de AF para que el sistema antioxidante se exprese y logre amortiguar los niveles de EROs.

Con respecto a la actividad de la catalasa, se reportó que en el pulmón, el hígado, el riñón y el corazón de ratas sometidas a 1 hora de natación forzada, la actividad se incrementó significativamente (Terblanche, 2000) lo que se contradice con los resultados del presente trabajo, sin embargo, el efecto que encontramos se realizó en el músculo gastrocnemio y no puede ser comparable con otros órganos.

Por otro lado, la actividad de la enzima aconitasa que normalizada con la actividad de la enzima citrato sintasa, mostró una reducción significativa en todos los grupos (Figura 9). Los resultados indican que las mitocondrias de las ratas con obesidad están expuestas a un estrés oxidativo más elevado que las ratas delgadas (Zorzano et al. 2009). De igual forma la disminución de la actividad de la enzima inducida por la AF (Figura 9), concuerda con la noción de que la AF promueve la formación de ERO y por lo tanto, incrementa la oxidación de proteínas y enzimas sensibles como la aconitasa (Finkel, Holbrook, 2000). Sin embargo, un reporte del 2007 demuestra que la AF en humanos no afecta la actividad de la aconitasa del músculo esquelético, a pesar del incremento del estrés oxidativo (Zhang et al., 2007). Otro estudio, encontró que la expresión genética de la enzima se ve significativamente inhibida en ratones obesos sometidos a un entrenamiento (natación forzada) de 5 semanas. (Petritz, Cunha, Villedt, Mehta, Rocha, Silva, 2012). Los resultados indican que existe un incremento de estrés oxidativo después de la realización de la AF extenuante y que la generación de ERO se encuentra presente.

La principal aportación de esta investigación, es que la AF aplicada a individuos con obesidad, puede llevar a un aumento en la expresión de Mfn2 como respuesta adaptativa que involucra la regulación de los eventos de la dinámica mitocondrial, activando la fusión y disminuyendo la fisión. En este sentido cabe mencionar que al medir la expresión de la proteína relacionada con la fisión mitocondrial se encontró que al analizar el resultado del grupo Ob, la expresión de Drp1 en el grupo ObAF disminuyó de manera significativa en

comparación con el grupo DgAF, esto correlaciona con la hipótesis de que la AF puede favorecer a fusión mitocondrial bajo condiciones de obesidad. La razón de esta respuesta involucra el aumento en la demanda energética, ya que los animales han sido sometidos a una disminución de las reservas de ATP debido al ayuno y a la AF extenuante. Por lo tanto, con el afán de restaurarlo, el potencial de membrana se ve disminuido, obligando a la mitocondria a fusionarse y a inhibir la fisión.

Es importante mencionar que Mfn2 y Drp1, representan solo algunas de las proteínas relacionadas con la fusión y la fisión mitocondrial respectivamente. Por lo tanto, no se puede asegurar que la dinámica mitocondrial se polariza hacia la fusión después de un evento agudo de AF extenuante.

Como parte de las perspectivas del presente trabajo, se debe analizar la expresión de otras proteínas como Opa1 y Fis las cuales interaccionan con la MME, igualmente llevar a cabo experimentos que confirmen la activación de Drp1 (forma fosforilada).

9. CONCLUSIONES

El exceso de nutrimentos en la condición de obesidad eleva la carga metabólica de la célula, polarizando la dinámica mitocondrial hacia la fisión. Sin embargo, cuando se somete a AF la demanda energética aumenta, y esto provoca la disminución en la expresión de Drp1 con el concomitante aumento de Mfn2 para favorecer la fusión e incrementar la eficiencia metabólica de la célula.

El incremento en la expresión de AMPK en el grupo ObAF indica que existe un aumento en la demanda energética y una tendencia a fusionar la red mitocondrial. Por lo tanto, la propensión de los niveles de expresión de las proteínas relacionadas con la dinámica mitocondrial bajo condiciones de obesidad y posterior a la AF, concuerda con el hecho de que la generación de ERO secundaria a la contracción muscular, se relaciona con la fusión de la red mitocondrial que se encuentra fragmentada bajo condiciones de obesidad.

10. LITERATURA CITADA

- Aleixandre, A., y Miguel, M. (2008). Ratas Zucker como modelo experimental para el estudio de diferentes enfermedades. *Endocrinología y Nutrición*, 55 (5), 217-22.
- Arias, J., y Balibrea, J. (2007). Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutrición Hospitalaria*, 22 (2), 160-8.
- Bach, D., Pich, S., Soriano, F., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., y Zorzano, A. (2003). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (19), 17190-97.
- Ball, D. (2015). Metabolic and endocrine response to exercise: sympathoadrenal integration with skeletal muscle. *Journal of Endocrinology*, 224 (2), 79-95.
- Berchtold M, Brinkmeier H, Müntener M. (2000). Calcium ion in skeletal muscle: Its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiological Reviews*, 80 (3), 1216-51.
- Bonnard, C., Durand, A., Peyrol, S., Chanseaux, E., Chauvin, M., Morio, B., y Rieusset, J. (2008). Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 118 (2), 789-800.
- Calderón-Vélez, J., Figueroa-Gordon, L. (2009). El acoplamiento excitación-contracción en el músculo esquelético: preguntas por responder a pesar de 50 años de estudio. *Biomédica*, 29 (1), 140-60.
- Cantu, D., Schaack, J., Patel, M. (2009). Oxidative inactivation of mitochondrial aconitase results in iron and H₂O₂ mediates neurotoxicity in rat primary mesencephalic cultures. *Plos One*, 4 (9), 1-12.
- Carling, D., Mayer, F., Sanders, M., y Gamblin, S. (2011). AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor. *Nature chemical biology*, 7 (8), 512-18.
- Cartoni, B., Léger, B., Hock, B., Praz, M., Crettenand, A., Pich, S., y Russell, A. (2005). Mitofusin 1/2 and ERR α expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *The Journal of Physiology*, 567 (1), 349-58.

- Clapham, D. (2007). Calcium Signaling. *Cell*, 131 (6), 1047-58.
- Coffey, V., y Hawley J. (2007). The molecular bases of training adaptation. *Sports Medicine*, 37 (9), 737-63.
- Debin, R., Lauzier, B., Sicard, P., y Delemasure, S. (2009). Are Zucker obese rats a useful model for cardiovascular complications in metabolic syndrome? *Physical biochemical and oxidative stress considerations. Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique Fundamental & Clinical Pharmacology*, 23 (1), 59–67.
- Deprés, J., y Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, 444 (14), 881-7.
- Ding H, Jiang N, Liu H, Liu D. (2010). Response of mitochondrial fusion and fission protein gene expression to exercise in rat skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800 (3), 250-6.
- Dorn, G., y Kitsis, R. (2014). Dynamism-mitophagy-cell death interactome: multiple roles performed by members of mitochondrial molecular ensemble. *Circulation Research*, 116 (1), 167-82.
- Egan, B., y Zierath, J. (2013). Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metabolism*, 17 (2), 162-84.
- Eisner, V., Csordás, G., Hajnóczky, G. Interactions between sarco-endoplasmic reticulum and mitochondria in cardiac and skeletal muscle-pivotal roles in Ca²⁺ and reactive oxygen species signalling. *Journal of Cell Science*, 126 (14), 2965-78.
- Eisner, V., Lenaers, G., y Hajnóczky, G. (2014). Mitochondrial fusion is frequent in skeletal muscle and supports excitation-contraction coupling. *The Journal of Cell Biology*, 205 (2), 179-95.
- Finkel, T, Holbrook, N. (2000). Oxidants, oxidative stree and the biology of ageing. *Nature*, 408 (6809), 239-47.
- Fletcher, G., Balady, G., Amsterdam, E., Chaitman, B., Eckel, R., y Fleg, J. (2001). Exercise standars for testing and training: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*, 104 (14), 1694-740.

Friedman, J., y Nunnari, J. (2014). Mitochondria form and function. *Nature*, 505 (7483), 335-344.

Friedrichsen, M., Mortensen, B., Pehmoller, C., y Birk, J. (2013). Exercise-induced AMPK activity in skeletal muscle: Role in glucose uptake and insulin sensitivity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 366 (2), 204-14.

García, N., y Chávez, E. (2007). Mitochondrial DNA fragments released through the permeability pore correspond to specific gene size. *Life Sciences*, 81 (14), 1160-6.

Geeves, M., y Holmes, K. (2005). The molecular mechanism of muscle contraction. *Advances in Protein Chemistry*, 71 (4), 161-93.

Geneser, F. (2000). *Histología sobre bases moleculares*. Munksgaard, Copenhagen: Editorial Panamericana.

Gutiérrez J, Rivera D, Shamah T, Villalpando S. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Instituto Nacional de Salud Pública.

Gwinn, D., Shackelford, D., Egan, D., Mihaylova, M., Mery, A., Vasquez, D. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular Cell*, 30 (2), 214-26.

Hardie, D., Ross, F., y Hawley, S. (2012). *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13 (4), 251-62.

Hédou, G., Pryce, C., Di Iorio, L., y Heidbreder, C. (2001). An automated analysis of rat behaviour in the forced swim test. *Pharmacology biochemistry and behaviour*, 70 (1), 65-76.

Hernández-Álvarez M., Thabit, H., Burns, N., Shah, N., Brema, I., Hatunic, M. y Nolan, J. (2010). Subjects with early-onset type 2 diabetes show defective activation of skeletal muscle PGC-1 α /Mitofusin-2 regulatory pathway in response to physical activity. *Diabetes Care*, 33 (3), 645-51.

Hill, J., Wyatt R., y Peters J. (2012). Energy balance and obesity. *Circulation*. 126 (1), 126-32.

- Hitomi, Y., Watanabe, S., Kizaki, T., Sakura, T., Takemasa, T., Haga, S., Oookawara, T., Suzuki, K., Ohno, H. (2008). *Redox Report: communications in free radical research*, 13 (5), 213-16.
- Hood, D., Irrcher, I., Ljubcic, V., y Joseph A. (2006). Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *The Journal of Experimental Biology*, 209 (12), 2265-75.
- Hopkins, P. (2006). Skeletal muscle physiology. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain*, 1 (6), 1-6.
- Hüttemann, M., Lee, I., Pecinova, A., Pecina, P., Przyklenk, K., Doan, J. (2008). Regulation of oxidative phosphorylation the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 40 (5), 445-56.
- Ianniti,, T., Graham, A., Dolan, S. (2012). Increased central and peripheral inflammation and inflammatory hiperalgesia in Zucker rat model of leptin receptor deficiency and genetic obesity. *Experimental physiology*, 97 (11), 1236-45.
- Iqbal, S., y Hood, D. (2014). Oxidative stress-induced mitochondrial fragmentation and movement in skeletal muscle myoblasts. *American Journal of Cell Physiology*, 306 (12), 1176-83.
- Jendrach, M., Mai, S., Pohl, S., Vöth, M., Bereiter.Hahn, J. (2008). Short and long term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress. *Mitochondrion*, 8 (4), 293-304.
- Ji, L. (2008). Modulation if skeletal muscle antioxidant defense by exercise: role of redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 44 (2), 142-152.
- Kahn, B., Alquiler, T., Carling, D., y Hardie, G. (2005). AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metabolism*, 1(1), 15-25.
- Kopelman, P. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature*, 404 (6778), 635-43.
- Kramer, K., Dijkstra, H., y Bast, A. (1993). Control of physical exercise of rats in a swimming basin. *Physiology and Behaviour*, 53 (2), 271-276.

Kregel, K., Allen, D., Booth, F., y Fleshner, M. (2006). Resource book for the design of animal exercise protocols. Recuperado de: <http://www.the-aps.org/mm/SciencePolicy/AnimalResearch/Publications/Animal-Exercise-Protocols/book14824.pdf>.

Kwuak, H. (2013). Exercise and obesity-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Integrative Medicine Research* 2 (4), 131-138.

Kyle, U., Morabia, A., Schutz, Y., y Pichard, C. (2004). Sedentarism affects body fat mass index and at free mass index in adults aged 18 to 98 years. *Nutrition*, 20 (3), 255-60.

Lally, J., Snook, L., Han, X., Chabowski, A.m Bonen, A., Holloway, G. (2012). Subcellular lipid droplet distribution in red and white muscles in the obese Zucker rat. *Diabetologia*, 55 (2), 479-88.

Leary S, Underwood W, Anthony R, Cartner S. (2013). AVMA Guidelines for euthanasia of animals. American Veterinary Medical Association. Recuperado de: <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>

Legros, F., Lombes, A., Frachon, P., Rojo, M. (2002). Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Molecular Biology of the Cell*, 13 (12), 4343-54.

Liesa, M., y Shirihai, S. (2013). Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metabolism*, 17 (4), 491-506.

MacIntosh, B., Esau, S., Holash, J., y Fletcher, J. (2011). Procedures for rat in situ skeletal muscle contractile properties. *Journal of Visualized Experiments*, 15 (56), 3167.

Manini, T., Clark, B., Nalls, M., Goodpaster, B., y Ploutz-Snyder, L. (2007). Reduced physical activity increases intermuscular adipose tissue in healthy young adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85 (2), 377-84.

Marti, A., Moreno, M., Hebebrand, J., y Martínez, J. (2004). Genes, lifestyles and obesity. *Internal Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 28 (3), 29-36.

Matsuda, M., y Shimomura, I. (2013). Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic síndrome, diabetes, hypertension, dislipidemia,

aterosclerosis, and cáncer. *Obesity Research and Clinical Practice*. 7 (5), 330-339.

Youle, R., y Van der Blik, A. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*. 337 (6098), 1062-7.

Navarro, A., Gómez, C., López, J., y Boveris, A. (2004). Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *American Journal of Physiology*, 286 (3), 505-511.

Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Gaetz, N., y Margono, C. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the global burden of disease. *The Lancet*, 384 (9945), 766-81.

Otera, H., Ishihara, N., y Mihara, K. (2013). New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochimica et biophysica acta*, 1833 (5), 1256-68.

Petriz, B., Cunha, V., Villeth, G., Mehta, A., Rocha, L., Silva, O. (2013). Effects of acute exercise over heart proteome from monogenic obese mice. *Journal of physiology*, 228 (4), 824-34.

Philips, M., Liu, Q., Hammond, H., y Dugan, V. (1996). Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nature Publishing Group*, 13 (1), 18-19.

Picard, M., Gentil, B., McManus, M., White, K., Louis, K., Gartside, S... Turnbull, D. (2013). *Journal of Applied Physics*, 115 (10), 1562-71.

Rosenbaum, M., Vandenborne, K., Simoneau, J., Joanisse, D., Hirsch, J., y Murphy, E. (2003). Effects of experimental weight perturbation on skeletal muscle work efficiency in humans subjects. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 298 (1), 79-88.

Ross, M., Pawlina, W. (2007). *Histología Texto y Atlas a color con Biología Celular y Molecular*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Rtveladze, K., Marsh, T., Barquera, S., Sánchez, M., Levy, D., y Melendez, G. (2014). Obesity prevalence in Mexico: impact on health and economic burden. *Public Health Nutrition*, 17 (1), 233-9.

Schiaffino, S., y Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles, *Physiology Review*, 91 (4), 1447-1531.

Sebastián, D., Hernández, M., Segalés, J., Sorianello, E., Muñoz, J., y Sala, D. (2011). Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signalling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (14), 5523-28.

Sriwijitkamol, A., Ivy, J., Christ-Roberts, C., DeFronzo, R., Mandarino, L., Musi N. (2005). LKB1-AMPK signaling in muscle from obese inculin-resistant Zucker rats and effects of training. *American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism*, 290 (5), 925-32.

Staron, R., Kraemer, W., Hikida, R., Fry, A., Murray, J., y Campos, G. (1999). Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochemistry and Cell Biology*, 111 (2), 117-23.

Stefanyk, L., Bonen, A., Dyck, D. (2013). Fatty acid transport proteins chronically relocate to the transverse-tubules in muscle from obese Zucker rats but are resistant to further insulin-induced translocation. *Metabolism Clinical and Eperimental*, 62 (9), 1296-1304.

Stenholm, S., Harris, T., Rantanen, T., y Visser, M. (2008). Sarcopenic obesity-definition, etiology and consequences. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 11 (6), 693-700.

Toledo, F., Watkins, S., y Kelley, D. (2006). Changes induced by physical activity and weight loss in the morphology of intermiofibrillar mitochondria in obese men and women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91 (8), 3224-27.

Van Loon, L., Greenhaff, P., Constantin-Teodosiu, D., Saris, W., y Wagenmakers, J. (2001). The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans. *Journal of Physiology*, 15 (3), 315-24.

Warden S, Richardson C, O'Donnell J, Stapleton D, Kemp B y Witters L. (2001). Post-translational modifications of beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase effect enzyme activity ad cellular localization. *Biochemical Journal*, 354 (1), 275-83.

Welsh, U., y Sobotta, J. (2008). *Histología*. Madrid, España: Editorial Panamericana.

Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature*, 11 (12), 872-84.

Youle, R., y van der Bliek, A. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, 337 (6098), 1062-65.

Zhang, S., Sandstrom, M., Lanner, J., Thorell, A., Westerblad, H., Katz, A. (2007). Activation of aconitase in mouse fast twitch skeletal muscle during contraction mediated oxidative stress. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, 293 (3), 1154-9.

Zorzano, M., Liesa, M., Palacín, M. (2009). Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41 (10), 1846-54.