



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ESPECIALIDAD EN MEDICINA DEL DEPORTE

**“EXPRESION DEL GEN ABCB1 Y DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS
EN TEJIDO MUSCULAR Y ADIPOSO DE RATAS SPRAGUE DAWLEY BAJO
UN ESTIMULO DE EJERCICIO Y/O DIETA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALIDAD EN MEDICINA DEL DEPORTE

PRESENTA:

ROMEO ALEGRIA OCAÑA

DIRECTORES DE TESIS:

DR. EN C. AARON DOMINGUEZ LOPEZ

DR. EN C. ANGEL MILIAR GARCIA



MEXICO, DF. DICIEMBRE 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14 BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F. siendo las 12:00 horas del día 9 del mes de junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de de la E.S.M. para examinar la tesis de titulada:

"EXPRESIÓN DEL GEN ABCB1 Y DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN TEJIDO MUSCULAR Y ADIPOSO DE RATAS SPRAGUE DAWLEY BAJO UN ESTIMULO DE EJERCICIO Y/O DIETA"

Presentada por el alumno:

Alegria

Apellido paterno

Ocaña

Apellido materno

Romeo

Nombre(s)

Con registro:

A	0	8	0	7	9	3
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

ESPECIALIDAD EN MEDICINA DEL DEPORTE

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Aarón Domínguez López

Dr. Ángel Millar García

Dr. Eleazar Lara Padilla

M. en C. Evangelina Muñoz Soria

Dr. Alexandre Kormanovski Kovzova

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
 ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
 SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
 E INVESTIGACIÓN

Dr. Eleazar Lara Padilla



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 20 del mes octubre del año 2011, el que suscribe **Alegría Ocaña Romeo** alumno del Programa de **Especialidad en Medicina del Deporte** con número de registro **A080793**, adscrito a la **Escuela Superior de Medicina**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de **Dr. Ángel Miliar García** y **Dr. Aarón Domínguez López** y cede los derechos del trabajo intitulado **“EXPRESIÓN DEL GEN ABCBI Y DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN TEJIDO MUSCULAR Y ADIPOSO DE RATAS SPRAGUE DAWLEY BAJO UN ESTIMULO DE EJERCICIO Y/O DIETA”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección aeor77te@hotmail.com . Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Romeo Alegría Ocaña

Nombre y firma

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Coordinación General de Estudios de Postgrado e Investigación, a la Coordinación de Medicina del deporte, al Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas Salvador Zubirán, al Dr. Aarón Domínguez y el Dr. Ángel Miliar por el apoyo para realizar este trabajo de tesis.

En especial a Dios por sobre todas las cosas y a mis Padres, Hermanas, Esposa e Hijos, a Mireya conde, que sin su apoyo no habría sido posible la realización de esta meta tan importante en mi vida.

G R A C I A S

TITULO

**EXPRESION DEL GEN ABCB1 Y DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN
TEJIDO MUSCULAR Y ADIPOSO DE RATAS SPRAGUE DAWLEY BAJO
UN ESTIMULO DE EJERCICIO Y/O DIETA GRASA.**

INDICE

Agradecimientos.....	4
Título.....	5
Índice.....	6
Glosario.....	7
Resumen.....	8
Summary.....	9
Introducción.....	10
Justificación.....	17
Hipótesis.....	19
Objetivos.....	20
Material y Métodos.....	21
Resultados.....	30
Discusión.....	35
Bibliografía.....	36

GLOSARIO

ABCB 1: gen responsable de resistencia a sustancias tóxicas dentro del organismo humano. (16)

CITOCINAS: Grupo de polipéptidos de bajo peso molecular producidos por diversas células y que ejercen múltiples efectos sobre el sistema inmunológico. (15)

INTERLEUCINAS: Son proteínas solubles, mediadoras de crecimiento celular, inflamación, inmunidad, entre otras actividades. Producidas por diferentes tipos celulares. (17)

EJERCICIO: Actividad física recreativa que se realiza fuera del trabajo, la cual incluye un conjunto de acciones motoras, musculoesqueléticas como un medio para mejorar la salud. (18)

DIETA: Conjunto de alimentos naturales y preparados que se consumen cada día. (19)

RESUMEN

Introducción: La práctica de ejercicio físico disminuye los riesgos de padecer enfermedades cardiovasculares, proporcionándonos grandes beneficios para nuestra salud. La dieta juega un papel fundamental en nuestra salud ya que el exceso de algunos alimentos favorece el incremento de tejido adiposo como consecuencia podemos cursar con obesidad, el tejido adiposo sufre un proceso inflamatorio crónico y esto favorece el incremento de algunas interleucinas. El objetivo de este trabajo fue analizar la expresión génica de ABCB1 y citocinas pro inflamatorias IL-1B inducidas por el ejercicio y/o dieta grasa en ratas Sprague Dawley. **Material y métodos:** Se realizó un estudio longitudinal, prospectivo de intervención y analítico. En treinta y cinco ratas Sprague Dawley divididas en cuatro grupos. El grupo uno o grupo control con una dieta normal, el grupo dos con dieta grasa, el grupo tres con dieta grasa más ejercicio leve y el grupo cuatro más ejercicio intenso. **Resultados:** Se analizó la expresión de los genes de ABCB1 e IL-1B en tejido adiposo y tejido muscular en donde se apreció que ABCB 1 en tejido adiposo en el grupo de dieta grasa más ejercicio intenso tuvo mayor expresión con respecto a los demás grupos pero sin llegar a tener significancia estadística y en tejido muscular el grupo de dieta grasa más ejercicio leve la expresión de ABCB 1 tuvo menor expresión con respecto a los otros grupos. **Conclusiones:** Aunque el estudio cumplió con el objetivo general no se obtuvieron resultados con significancia estadística, nos da la pauta para abrir nuevas investigaciones encaminadas a determinar cómo incrementan las interleucinas sus valores durante el ejercicio.

Palabras clave gen ABCB1, citocinas, dieta, ejercicio.

SUMMARY

Introduction: physical exercise reduces the risk of cardiovascular disease, providing great benefits to our health. Diet plays a vital role in our health and the excess of some food favors the increase of adipose tissue as a result we can present with obesity, adipose tissue undergoes a chronic inflammatory process and this favors the growth of some interleukins. The aim of this study was to analyze the gene expression of ABCB1 and pro-inflammatory cytokines IL-1B induced by exercise and / or high fat diet in Sprague Dawley rats. **Material and methods:** We performed a longitudinal, prospective and analytical intervention. In thirty-five Sprague Dawley rats were divided into four groups. A group or a control group with normal diet, the fat diet group two, group three with mild fatty diet plus exercise group and four more intense exercise. **Results:** We analyzed the expression of ABCB1 genes and IL-1B in adipose tissue and muscle tissue where it was found that ABCB 1 in adipose tissue in the fat diet group had more intense exercise greater expression with respect to the other groups but without achieving statistical significance and muscle fat diet group exercise more mild expression of ABCB 1 had lower expression compared to other groups. **Conclusions:** Although the study met the overall objective results were not statistically significant, it gives us the pattern to open new research to determine how their values interleukins increase during exercise.

Keywords ABCB1 gene, cytokines, diet, exercise.

INTRODUCCIÓN

El ejercicio físico se ha utilizado para disminuir el riesgo de presentar enfermedades cardiovasculares. Una de las causas por las cuales ha tomado mayor relevancia es debido a su efecto anti-inflamatorio que presenta durante la actividad física constante. (1) (23)

Diferentes estudios epidemiológicos muestran una relación entre el ejercicio físico y los efectos anti-inflamatorios como consecuencia del mismo.

Con el propósito de mantener y promover la salud de los adultos sanos entre 18 a 65 años el Colegio Americano de Medicina del deporte (ACSM por sus siglas en ingles) recomienda realizar actividad física moderada como mínimo durante 30 minutos cinco días a la semana, o bien de intensidad vigorosa durante 20 minutos dos veces a la semana debido a que tiene un efecto benéfico sobre los factores de riesgo en las enfermedades crónico-degenerativas, como hipertensión arterial, aterosclerosis, dislipidemias, etc; causantes de un elevado índice de mortalidad a nivel mundial.

La práctica de actividad física y el fortalecimiento muscular en cantidades mínimas recomendadas proporcionan beneficios favorables a la salud y a mayores niveles brinda una mejor aptitud física. (2)

La actividad física ayuda al individuo a prevenir el aumento de peso en algunas personas las cuales tendrán que superar la actividad física en un balance energético individual tomando en consideración la ingesta de alimentos y otros factores externos.

Podemos definir la actividad física como el movimiento corporal producido por la contracción musculoesquelética que incrementa el gasto de energía por arriba del nivel basal. (3)

Se ha estudiado el papel de la actividad física en el tratamiento de la obesidad, se sabe que si se realiza de forma regular aumenta el gasto del consumo de energía. Es importante considerar la frecuencia y duración del ejercicio al momento de prescribir la intensidad del ejercicio en busca de la salud del individuo.

El ASCM reconoce que el consumo de oxígeno, como el mejor parámetro fisiológico asociado a la intensidad del ejercicio, el cual mide al individuo en reposo y durante una prueba de esfuerzo. (4)

Si bien el ejercicio nos proporciona un estado de salud favorable la dieta forma un eslabón más en este proceso de la búsqueda de la salud. Entendiendo por dieta al conjunto de alimentos y platillos que se consumen cada día.

Esta puede llegar a modificarse como medida preventiva para los individuos con predisposición genética o cierto estado patológico, o pueden corregir un problema agudo o crónico que requiera un plan alimentario con características especiales. (5)

Se han realizado diversos estudios con la finalidad de identificar la relación que tiene la dieta en el proceso inflamatorio, encontrando que la dieta alta en carbohidratos complejos y fibra disminuye los niveles de adiponectinas y citocinas pro-inflamatorias, se encontró que componentes en la dieta como colesterol, grasas poli-insaturadas pueden estar ligadas al proceso inflamatorio. Existen estudios en los que se recomienda una dieta baja en grasa, rica en proteínas y carbohidratos y en fibra. (24) (26)

La inflamación es un estado que consiste en complejos citológicos y reacciones químicas que ocurren en los vasos sanguíneos afectados y tejidos adyacentes como respuesta a una lesión o estimulación anormal causada por agentes físicos, químicos o biológicos. La inflamación sub-clínica persistente, que se da por el aumento de los niveles circulantes de mediadores inflamatorios, es un importante factor de riesgo para desarrollar enfermedades crónicas, así como de discapacidad relacionada con el envejecimiento. (6)

La inflamación puede clasificarse como aguda o crónica de acuerdo al tiempo de aparición, persistencia e histopatología. La inflamación aguda es de inicio rápido la cual puede llegar a ser severa pero solo dura pocos días, histopatológicamente se caracteriza por edema. La inflamación crónica tiene un inicio relativamente lento (va de meses a años) y tiene una terminación baja e indefinida. (6)

La obesidad, la resistencia a la insulina y la Diabetes tipo 2 se encuentran estrechamente asociadas a la inflamación crónica, caracterizada por la producción anormal de citoquinas, y la activación de una red de vías de señalización inflamatorias.

El tejido adiposo no solo es un órgano que sirve para almacenar el exceso de calorías, en el se producen varios factores similares a las hormonas como la adiponectina, resistina, citoquinas y quimiocinas, incluyendo la leptina (la cual pertenece a la familia de las citoquinas), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucinas (IL) como IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 y su receptor antagonista IL-1ra. (7) (25). El Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) se encuentra sobre expresado en el tejido adiposo siendo este el primer vínculo en la diabetes y la inflamación crónica.

La respuesta inflamatoria que surge en presencia de la obesidad reside principalmente en el tejido adiposo y en otros sitios como en el hígado. (8)

Estudios recientes han documentado las propiedades inusuales del adipocito colocando al tejido adiposo como sitio clave para la generación de la inflamación y su respuesta a esta.

Estudios morfológicos de la obesidad muestran la presencia de macrófagos en los adipocitos necróticos. La muerte de adipocitos pudiera ser una respuesta secundaria al proceso inflamatorio y a la infiltración de macrófagos. (8)

Como tal, la vía inflamatoria es un blanco potencial terapéutico para las intervenciones de estilo de vida diseñado para reducir las enfermedades y la discapacidad. El ejercicio físico es reconocido como una importante estrategia para reducir el riesgo de enfermedades crónicas, y las investigaciones recientes se han centrado en su papel en la mejora del perfil inflamatorio. (9)

En un inicio el ejercicio fue contraindicado y no se le consideraba como parte del tratamiento en las enfermedades que cursan con procesos inflamatorios. Aunque en la actualidad no se ha establecido el tipo ni el tiempo de duración del ejercicio físico se observa que los valores de la IL-6 varían con respecto a la realización de este, así como una disminución en los valores del FNT-a.

El descubrimiento del músculo como un órgano productor de citocinas abre un nuevo paradigma, el músculo esquelético es un órgano endocrino que mediante la contracción, estimula la producción y liberación de miocinas, lo que puede influir en el metabolismo y modificar la producción de citoquinas en el tejido y órganos. (10)

El músculo esquelético es productor y secretor de varias citoquinas (miocinas) principalmente la IL-6 la cual interviene en los cambios metabólicos durante el ejercicio.⁸ Durante el año 2000 se demostró que los seres humanos liberan cantidades significativas de IL-6 durante ejercicio prolongado. (11)

Durante la realización de ejercicio de contracción muscular los niveles de liberación de IL-6 aumentan hasta 100 veces como resultado se observa un incremento sistémico de citocinas anti-inflamatorias (IL-1, IL-10). Como respuesta al ejercicio los niveles de IL-6 aumentan a nivel sanguíneo y descienden posterior a este sin observar daño muscular alguno. (22)

La IL-6 es sensible a la intensidad del ejercicio principalmente en la carrera. Durante los últimos años se ha demostrado que la expresión del RNA mensajero de la IL-6 aumenta su expresión durante la contracción musculoesquelética y la tasa de transcripción del gen de IL-6 es mayor durante el ejercicio.¹⁰

El último hallazgo sugiere que el músculo entrenado es más sensible a la IL-6 que el músculo no entrenado. Varias fuentes refieren que la mayor cantidad de IL-6 proviene del ejercicio. (12)

La IL-6 es una citoquina multifuncional que regula la respuesta humoral y celular jugando un papel central en la inflamación y lesiones de tejidos, ésta depende de la intensidad de la actividad física y la cantidad de masa muscular involucrada. (13)

Durante los últimos años se ha demostrado que las alteraciones en la expresión y actividad de los transportadores ABCB (resistencia a múltiples drogas) se observan en diferentes tejidos durante la respuesta inflamatoria. Una respuesta aguda está asociada a muchas condiciones como infecciones, hipoxia, estrés, etc. (6)

Se han descrito varios factores que afectan la función de distintos transportadores de ABC. Algunos de estos transportadores cumplen una participación en la desintoxicación de endo y xenobioticos hacia el plasma, bilis y orina, protegiendo a las células de sustancias toxicas. El gen de ABCB1 pertenece a esta familia el cual codifica una proteína en la membrana celular llamada glicoproteína P (P-gp). (22)

El fenómeno de ABCB se asocia a menudo con la sobreexpresión de genes asociadas a la resistencia a múltiples drogas. Se ha demostrado que citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa e interleucinas modulan el fenotipo ABCB1 en diferentes condiciones experimentales *in vitro* e *in vivo*. (14)

En resumen el ejercicio sin duda se ha convertido fundamental para disminuir el proceso inflamatorio disminuyendo los niveles de citoquinas a nivel de tejido adiposo y músculo esquelético mejorando la función endotelial y una disminución de peso. Pero aun a interacción de las Interleucinas, el factor de necrosis tumoral y el factor ABCB es muy complejo y se requiere de investigaciones adicionales para saber si hay correlación entre ellos.

JUSTIFICACIÓN

La inflamación es precursor de diferentes patologías de gran importancia en la actualidad para la población general, siendo las más importantes, hipertensión arterial, aterosclerosis, osteoporosis, artritis reumatoide, obesidad, etc. La inflamación puede producirse a partir de alimentos ricos en grasas y ejercicio intenso.

El gen ABCB1 codifica una proteína transmembranal de 170 kDa, llamada glucoproteína P (P-gp) que fue identificada como un gen de resistencia a múltiples drogas (ABCB1, por sus siglas en ingles) debido a su sobre expresión en células tumorales resistencia drogas. La investigación actual sobre P-gp involucra la manipulación y valoración de los efectos sobre absorción, distribución y excreción de drogas.

Se tiene información que ABCB1 participa en el proceso inflamatorio, sin embargo, no se conoce si ABCB1 modifica su expresión bajo estímulos de dieta grasa y ejercicio. En cambio, se tiene la suficiente información que pone de manifiesto la presencia de la IL 6 durante el ejercicio de moderado a intenso secretada por el tejido músculo esquelético por lo que es posible sugerir que ABCB1 debe responder a los mismos estímulos.

Por otra parte se ha propuesto que ABCB1 puede interaccionar con interleucinas proinflamatorias, de tal modo que en este trabajo se propuso correlacionar las actividades de expresión génica de ABCB1 a IL1-B e IL-6 bajo estímulos de dieta grasa y ejercicio, iniciando así un proceso de investigación que se enfocó en identificar la participación en procesos

fisiológicos diferentes (dieta y ejercicio) a los del cáncer en los cuales ABCB1 ha sido una molécula clásicamente considerada como un sistema de defensa contra sustancias tóxicas.

HIPÓTESIS

En un modelo de ratas sujetas a ejercicio y/o dieta grasa se induce la expresión génica de ABCB 1 y citocinas pro-inflamatorias (IL1B).

OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión génica de ABCB1 y citocinas pro inflamatorias IL 1B inducidas por el ejercicio y/o dieta grasa en ratas Sprague Dawley.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer un lote de ratas macho con estímulo de ejercicio y dieta.
- 2.- Obtener el RNAm de todos los grupos mencionados para sintetizar cDNA
- 3.- Analizar mediante PCR en tiempo real la expresión de ABCB1 y citocinas pro inflamatoria.
- 4.- Establecer si existe diferencia en la expresión de las citocinas pro-inflamatorias en el grupo sedentario y el grupo con ejercicio.

MATERIAL Y METODOS

Se realizó un estudio Longitudinal, Prospectivo, de Intervención y analítico.

Diseño del estudio

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Gastroenterología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ).

Se contó con una muestra representativa de 35 ratas Sprague Dawley de 2 meses de edad, las cuales se alimentaron con dieta alta en grasa adicionada con manteca de cerdo.

Cumpliendo con los criterios de inclusión, se hizo una rutina de reconocimiento a las ratas y se dividieron en grupos: Grupo Control, Grupo con Dieta Grasa, Grupo con Dieta Grasa y Ejercicio Leve, Grupo con Dieta Grasa y Ejercicio Intenso. Las ratas entrenaron durante los días programados en un período de tiempo establecido, corrieron 5 veces durante 7 días, para proceder al sacrificio.

Las muestras de musculo y tejido adiposo se conservaron en nitrógeno líquido, se realizó la extracción de RNA con la técnica del Trizol, gel de agarosa y lectura en el Nanodrop.

Se realizó cDNA del RNA antes mencionado, analizando las muestras por PCR en tiempo real. El Análisis e Interpretación de Datos se realizó con ayuda del programa SPSS 17.0.

Para este estudio se contó con una muestra representativa de 35 ratas Sprague Dawley de 2 meses de edad con un peso aproximado de 359g a 450g, estuvieron en el bioterio del INNSZ, se mantuvieron dentro de cajas (5 ratas por caja), en un ambiente adecuado para ellas, a una temperatura de 20°-23°C, con luz, de distribución uniforme, se realizó la limpieza de cajas y se les proporcionó de alimento.

Su alimentación fue a base de croquetas tipo RQ 22-5 para todas las ratas, algunas croquetas fueron adicionadas con manteca de cerdo a una relación 1:1 para el grupo de las ratas con Dieta rica en Grasa.

Manejo Dietético

Las croquetas RQ 22-5 contenían una distribución de 22% de proteínas, 5% de lípidos y 62% de hidratos de carbono (el porcentaje restante fue fibra y ceniza) con un aporte energético de 381Kcal/100gr. El grupo control fue alimentado con croquetas integrales, mientras que los grupos de Dieta Grasa (DG), Dieta Grasa Ejercicio Leve (DGEL), Dieta Grasa Ejercicio Intenso (DGEI) fueron adicionadas con manteca de cerdo. Las ratas con dieta alta en grasa fueron alimentadas en relación 1:1 (100g de alimento para rata por 100gr de manteca de cerdo) aportando 1272Kcal/100gr aprox. En el bioterio las ratas tuvieron libre acceso a comida y agua durante todo el día.

Rutina de adaptación

A.- Reconocimiento

Se sometieron a las ratas a un proceso de adaptación en la caminadora durante 3 minutos al día por un período de 4 días a una velocidad de 8.3 cm/seg.

B.- Adaptación

Este proceso consistió en realizar una rutina por 3 Días. En esta etapa se seleccionaron las ratas para conformar los 4 grupos

VELOCIDAD (cm/seg)	TIEMPO (min)
8.3	2
13.3	2
18.3	2
36.6	2

Tabla 1. Proceso de adaptación a la velocidad

Equipo

Para realizar las rutinas de ejercicio se contó con una caminadora Letica Scientific Instruments para el entrenamiento de las ratas durante el período requerido, además de obtener el software Nanodrop 2000, LightCycler® Software 4.1, LightCycler 2.0 Roche, Dual Intensity Transilluminator, GeneAmp PCR System 9600, SPSS 17.0 para Windows. Todo el equipo estuvo disponible con el fin de cumplir los objetivos de esta investigación

Programación del ejercicio

Los dos grupos de ratas (ejercicio leve y ejercicio intenso) corrieron de la siguiente forma, para rutina en ejercicio leve o intenso a la siguiente intensidad:

Ejercicio leve

VELOCIDAD (m/ min)	EQUIVALENTE (cm/seg)	TIEMPO (min)
5	8.3	5
8	13.3	5
11	18.3	20

Tabla 2 Rutina de ejercicio leve

Ejercicio intenso

VELOCIDAD (m/ min)	EQUIVALENTE (cm/seg)	TIEMPO (min)
8	13.3	5
11	18.3	5
22	36.6	20

Tabla 3. Rutina de ejercicio intenso.

Las ratas realizaron sus rutinas a las velocidades y tiempos establecidos, corrieron durante dos semanas y al término de estas se procedió al sacrificio un día después a la realización de su rutina de ejercicio.

	LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES
SEMANA 1	1	1,2	1	2	1
SEMANA 2	1	2, *	2	2	*
Grupo 1.- Dieta Intensidad Leve Grupo 2.- Dieta Intensidad Alta * Sacrificio					

Tabla 4 Días de ejercicio y sacrificio de las ratas SD

Sacrificio

La programación del sacrificio se realizó en horas laborables, se tomó el peso previo al sacrificio, se anestesiaron con Pentobarbital (50mg/kg), se abrió la cavidad abdominal siguiendo la línea media abdominal y se extrajeron muestras de tejido adiposo y de tejido muscular de miembros inferiores (muslo) posteriormente fueron congelado en nitrógeno líquido para poder realizar los estudios de extracción de RNA, cDNA y PCR en tiempo real.

Metodología

Se realizó la extracción total de RNA con técnica de Trizol de tejido adiposo y muscular para lo cual se empleó el siguiente material.

- Campo de Papel
- Hielo
- Hielo Seco
- Bisturí
- Puntas
- Trizol
- Tubos Falcón
- Gradilla
- Polytron
- Caja Petri
- Tubos Eppendorf 2ml y 1.5ml

1. Se pesó 100 mg de tejido en 1ml de trizol dentro del tubo falcón, colocarlo en hielo.
2. Se utilizó el polytron hasta disgregar el tejido.
3. Se centrifugo por 15 minutos, a 4°C en 4000 RPM
4. Se retiró el remanente y se coloca en tubos eppendorf de 2ml

5. Se agregó 200 μ de cloroformo por cada 1ml de trizol
6. Se agitó por 15 segundos. Incubar a 15° o 30° por 3 minutos.
7. Se centrifugó a 12000 RPM por 15 minutos entre 2-8°C.
8. Se retiró el remanente y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5ml
9. Se agregaron 0.5 de Isopropanol por cada 1ml de trizol
10. Las muestras se incubaron a 15°-30°C por 10 minutos y centrifugaron sin exceder de 12000 RPM a 6-8°C formándose un pellet.
11. Se retiró el remanente y se agregó 1000 μ de etanol al 75%. Se mezcló en vortex por 15 segundos hasta que el pellet se desprendiese del fondo
12. Se procedió a centrifugar a 12000 RPM y se apagó la centrifuga cuando se alcanzó la velocidad.
13. El pellet quedó adherido, posteriormente se retiró el remanente.
14. Se dejó secar el pellet hasta que casi desapareciera del tubo
15. Se agregó 25 μ de DEPC y se puso en hielo.

Una vez terminado este proceso se realizó la electroforesis en gel de agarosa para lo cual se empleó el siguiente material:

- Hielo
- Caja Horizon 58
- Cables
- Bromuro de Etidio
- Buffer de Carga
- TBE

El material sirvió para poder realizar el proceso que a continuación se describe:

1. Se colocó 45 mg en 30 ml de TBE y calentó por espacios de 5 segundos hasta que desaparecieron los grumos.
2. Al estar cristalino, se dejó enfriar y agregaron 2 μ de bromuro de etidio, se agregó a la caja Horizon 58, una vez gelificado, se agregó TBE sin cubrir los electrodos
3. Se mezcló buffer de carga y 0.5 μ de RNA y se agregó 2 μ de agua DEPC y se colocó en tubos de 0.75 μ .
4. Se cargaron 4 μ de muestra en los pozos del gel
5. Se conectó el equipo a 70v, por 50 minutos
6. Finalmente, el gel se observó a través de un transiluminador con luz ultravioleta, la radiación UV es absorbida por el ARN y emitida al bromuro de etidio que a su vez remite la radiación a 590 nmd de espectro visible, y finalmente se obtuvo una impresión fotográfica.

Lectura en Espectrofotómetro (Nanodrop).

Para la cuantificación del RNA obtenido y determinar el grado de pureza (en base al contenido de proteínas), la mezcla fue transferida a una celdilla de cuarzo. Posteriormente se midió la densidad óptica en el espectrofotómetro a una absorbancia de 260, 240, 280 nm para determinar la concentración y la pureza de la muestra en base a la siguiente fórmula:

Concentración RNA= absorbancia a 260 nm X 0.04 X dilución (250)= RNA mg/ml.

Pureza:

Exceso de Proteína= D.O a 260 nm / D.O. a 240 nm = ó >2

Exceso de Fenol= D.O a 260 nm / D.O. a 280 nm = ó >2

Material

- Hielo
- Papel cera
- Agua DEPC

Método

1. Se abrió el software en la computadora y programar para leer RNA
2. Se limpió el lector con papel cera
3. Se colocaron 2µl de muestra d RNA
4. Se observó la gráfica de concentración de RNA en la computadora.

Extracción de cDNA (Transcripción Reversa).

La transcripción reversa es una reacción que consiste en la síntesis de ADN monocatenario o complementario (cDNA) a partir de moléculas de ARN monocatenario catalizada por la enzima transcriptasa reversa. Para llevar a cabo esta reacción se utilizó el kit comercial Transcriptor First Strand cDNA Síntesis Kit (Roche).

La mezcla se sometió a un ciclo de síntesis de cDNA a 25°C por 10 minutos seguido de 55°C por 30 minutos y finalmente 85°C por 5 minutos.

PCR en tiempo real

1. Se preparó el Master Mix

Mix 1	PPAR ALFA	MIX 2	PPARBETA	MIX 3	Pparg	Mix 4	Actina B
Taqman	2	Taqman	2	Taqman	2	Taqman	2
Primer L	0.2	Primer L	0.2	Primer L	0.2	Primer L	0.2
Primer R	0.2	Primer R	0.2	Primer R	0.2	Primer R	0.2
Sonda 78	0.1	Sonda 53	0.1	Sonda 7	0.1	Sonda 17	0.1
Agua	2.5	Agua	2.5	Agua	2.5	Agua	2.5
			5		5		5

2. Se colocaron 5µ de Master Mix y se eligió un blanco

3. Se tomaron 5µ de cDNA de la muestra y se colocaron en los capilares

4. Se colocaron en LightCycler 2.0 Roche y se dejó por 30 minutos aproximadamente para realizar la lectura.

RESULTADOS.

De la muestra total de 35 ratas SD se formaron cuatro grupos, el grupo uno se consideró como Dieta Control y estuvo conformado por 9 ratas, el grupo dos fue el de Dieta grasa y lo conformaron 9 ratas, el grupo tres fue el de Dieta grasa con ejercicio leve conformado por 8 ratas y por último el grupo cuatro fue el de Dieta grasa con ejercicio intenso y lo conformaron 9 ratas.

DIETA CONTROL Grupo 1	DIETA GRASA Grupo 2	DIETA GRASA CON EJERCICIO MODERADO Grupo 3	DIETA GRASA CON EJERCICIO INTENSO Grupo 4
9 Ratas	9 Ratas	8 Ratas	9 ratas

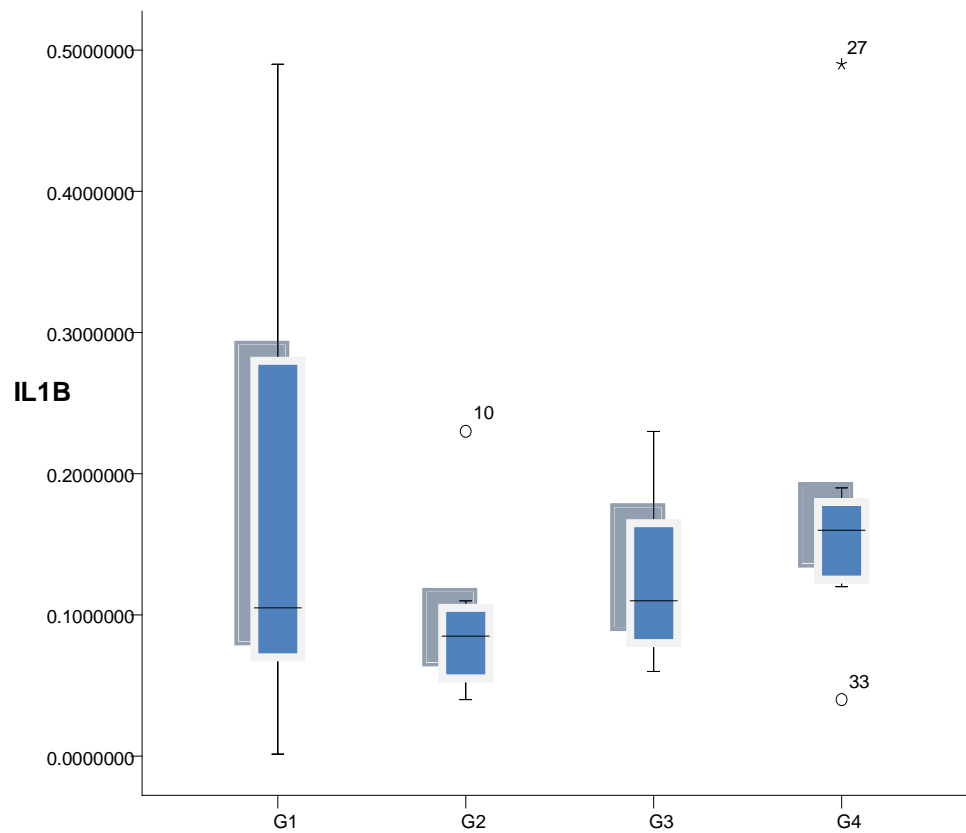
Tabla 5. Grupo de ratas

Se pesó a cada una de las ratas al inicio y al término de la investigación para saber si hubo alguna diferencia en la ganancia de peso de los diferentes grupos conformados.

GRUPOS	PESO INICIAL	PESO FINAL
DIETA CONTROL	383.7	397.2
DIETA GRASA (DG)	402.4	406.2
DG, EJERCICIO LEVE	370	391.5
DG, EJERCICIO INTENSO	394	405.5

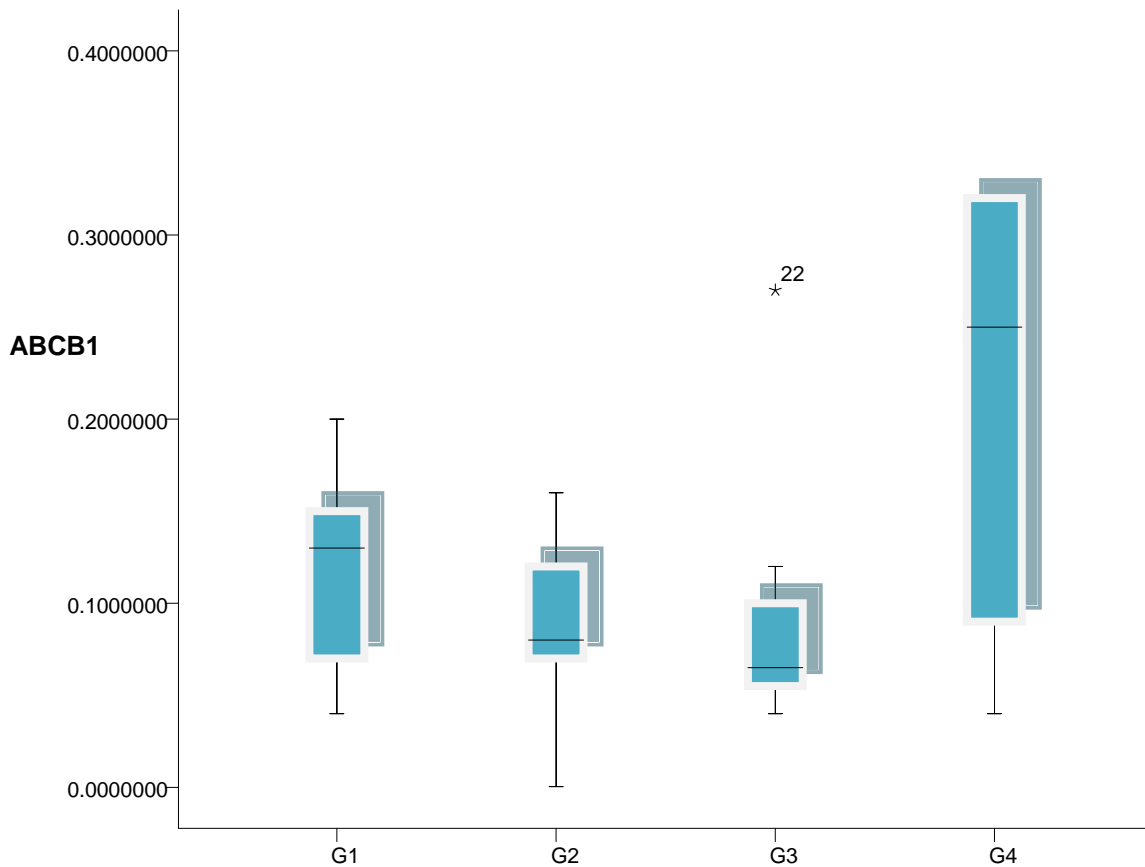
Tabla 6. Control de peso de las ratas.

Con la finalidad de observar la expresión de la Interleucina 1B (IL-1B) en el tejido adiposo en las ratas SD en los diferentes grupos estudiados, se apreció una diferencia, la cual no llegó a ser significativa, en comparación con los grupo de dieta grasa más ejercicio intenso con respecto a los grupos de dieta control, dieta grasa y dieta grasa y ejercicio moderado.



Grafica 1. Expresión de Interleucina 1 en tejido adiposo de Ratas Sprague Dawley.

La forma en la que se expresó ABCB1 en el tejido adiposo de las ratas SD tuvo un comportamiento diferente a las expresiones anteriores, ya que el grupo de ratas con dieta grasa y ejercicio intenso mostro mayor expresión con respecto a los otros grupos. Se observó menos dispersión teniendo un comportamiento más a lo esperado.



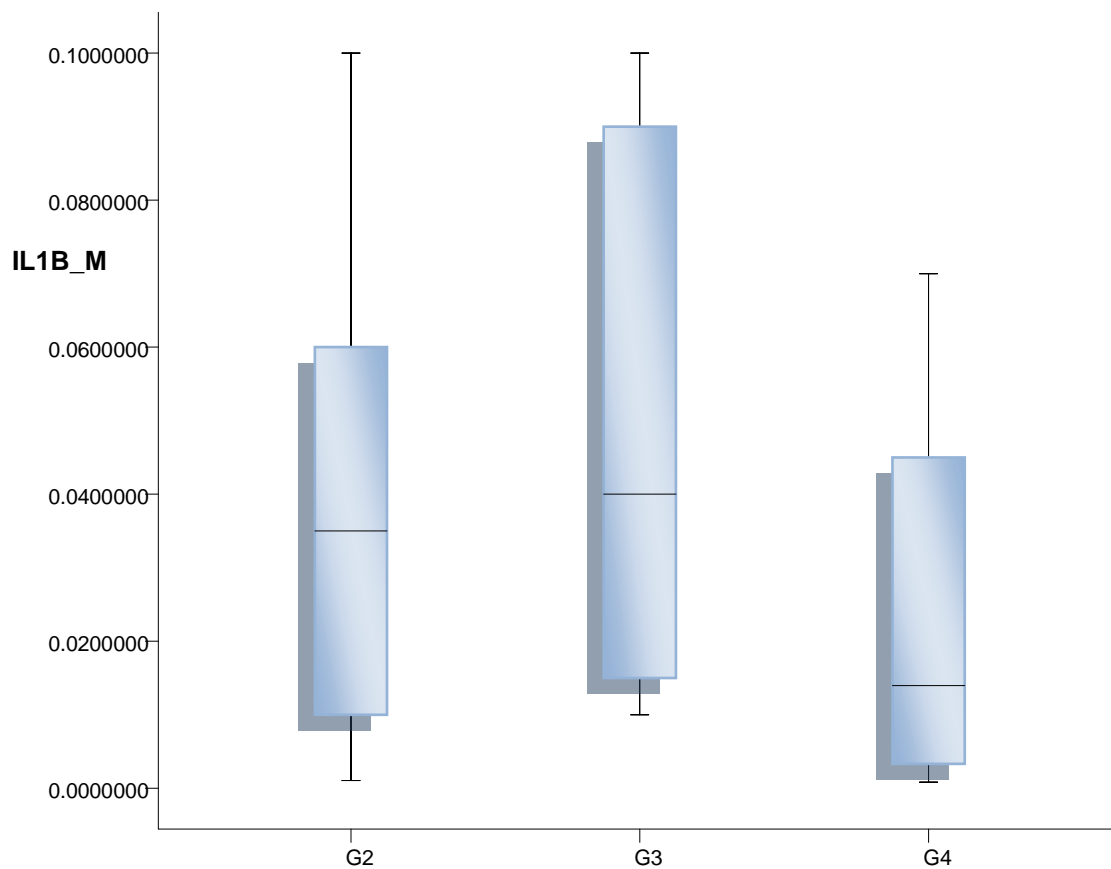
Grafica 2. Expresión de ABCB1 en tejido adiposo de Rata Sprauge Dawley.

Al intentar ver si existía algún tipo de correlación en la expresión de IL-1B con la expresión de ABCB1 en tejido adiposo de las ratas se observó que había una similitud en la manera en la cual se expresó el grupo de dieta grasa y ejercicio intenso.

Expresión de IL 1B y ABCB1 en tejido muscular

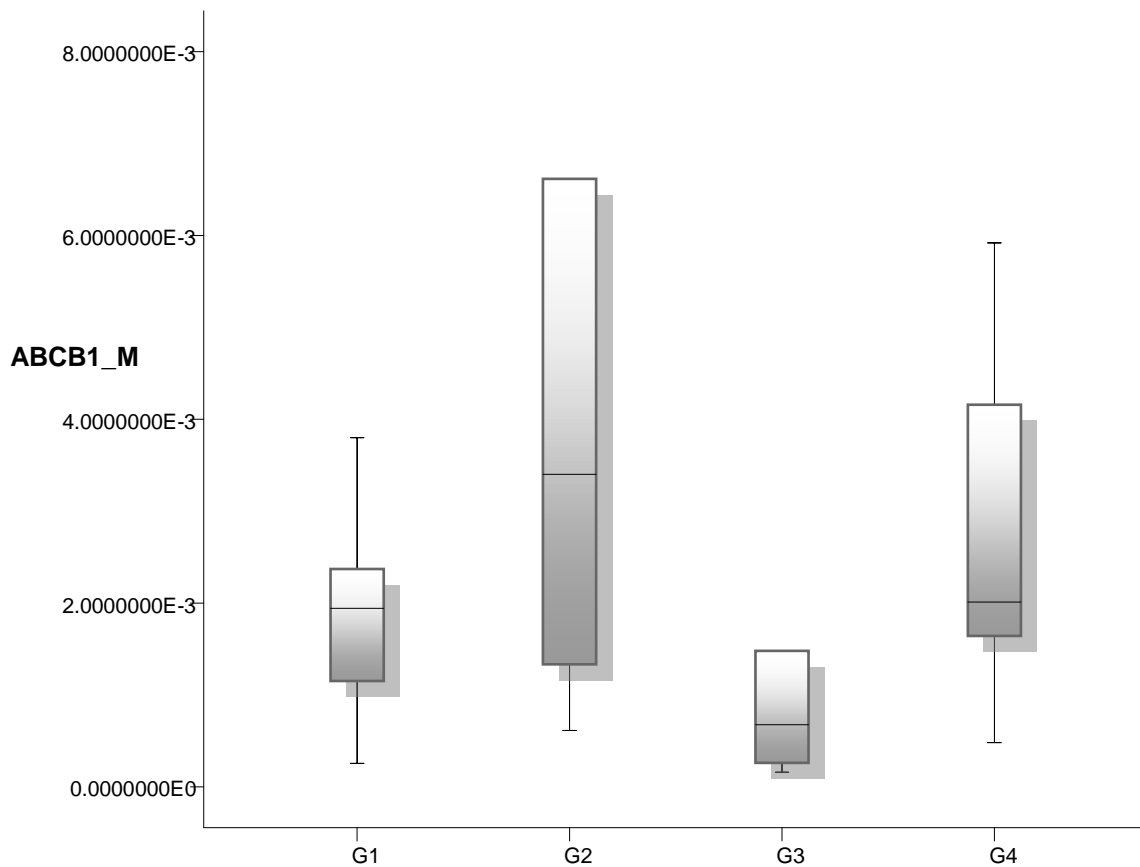
Se observó la manera en la cual se expresó la IL 1B en el tejido muscular sin embargo no se pudo identificar cambios significativos, la expresión fue en forma dispersa en todos los grupos, sin predominio en alguno de ellos.

Llama la atención que el grupo de ratas con dieta grasa más ejercicio intenso tuvo menor expresión en comparación con los demás grupos.



Grafica 3. Expresión de Interleucina 1B en tejido muscular de ratas Sprague Dawley.

La expresión de ABCB1 en el tejido muscular mostro una variación en relación al comportamiento que se observó en las otras graficas ya que se pudo apreciar que el grupo de dieta grasa más ejercicio leve fue el que menor expresión presento en comparación con los otros grupos y el grupo de dieta grasa fue el grupo que más se expresó en comparación con los demás.



Grafica 4. Expresión de ABCB1 en tejido musculo-esquelético de ratas Sprauge Dawley.

DISCUSIÓN

Durante el ejercicio suceden cambios diversos en nuestro organismo, los cuales han sido documentados; dentro de estos cambios se incluyen alteraciones metabólicas, respuesta al stress, alteraciones de tipo estructural, del sistema inmune, todas estas dependen del tipo y la intensidad del ejercicio.

Los cambios que se llevan a cabo al término del ejercicio se deben a la adaptación celular a los estímulos debido a una regulación homeostática. (20)

El estudio nos permitió observar la dieta grasa y el ejercicio intenso en el cual se expresan con una similitud la IL-1B y el ABCB1 aunque no tiene una significancia estadística, estos resultados concuerdan con la bibliografía en la cual se menciona que los niveles de la interleucinas se da en el ejercicio de moderado a intenso, con la observación de que estos niveles fueron registrados en tejido musculo esquelético.

Durante el ejercicio se induce una respuesta inflamatoria subclínica mediada por citocinas pro-inflamatorias como la IL- 1B la cual eleva sus niveles en plasma al final del ejercicio y se mantienen elevados durante las 2 hrs siguiente. (21)

Aunque los resultados no fueron conforme a lo esperado si cumplió con el objetivo del estudio, dándonos la pauta para abrir nuevas investigaciones encaminadas a determinar la forma en la cual las interleucinas incrementan sus valores durante los diferentes tipos de ejercicios con respecto a la dieta y enfocarse a determinar el tipo de ejercicio, la duración del mismo y la dieta adecuada para los pacientes en el tejido adiposo y muscular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 Jonas Andersson. Jon Hákan. J. Effects of heavy endurance physical exercise on inflammatory markers in non-athletes. *Atherosclerosis* 209(2010), 601-605.

2 William R. Haskell, I. Min Lee, et. al. Actividad física y Salud pública; ACSM, AAHP. *Rev. Med. cienciaExerc Sport.*, vol 39, no. 8, 1423-1434.

3 Juan C. Sánchez delgado. Definición y clasificación de la actividad física y salud: Grupo Sobreentrenamiento. *publiCE estándar Grupo Sobreentrenamiento.*

4 Pinet. B. M. Exercise intensity prescription in obese individuals; *Obesity*, vol. 16, no. 9, September 2008: 2088_2095.

5 Arpitia B. >Dietary factors that promote or retard inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol*; May 2006: 995.1001

6 Emmanuel A., Micheline P. M., Regulation of multidrug resistance by pro-inflammatory cytokines, *Current cancer drug targets*; 2006, 6,:89-105

7 Gómez Merino., C. Drogou., Effects of chronic exercise on cytokine production in White adipose tissue and skeletal muscle of rats- *Cytokine*, 40; 2007:23-29.

8 Gökhan S.H., Inflammation and metabolic disorders; *Nature*.vol. 444, Dic. 9 2006:860-867.

9 Beavers K.M., Brinkley T.E., Effects of exercise training on chronic inflammation; *Clin. Chim. Acta*; jun 2010, 3:411 (11-12): 785-93.

10 .- Mathur N, Pedersen BK. Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation. *Mediators of Inflammation* 2008 Nov 11; 1-6.

11 Beten K. P and Christian P. F., Physiological roles of muscle derived interleukin-6 in response to exercise. *Curr Opin Clin. Nutr. Metab. Care*, 10 2007: 265-267.

12 Christian P. K., Interleukin 6 in acute exercise and training, What is the biological relevance?, *Exerc. Immunol. Rev.* 12 2006:6-33.

13 Enrique Z. F., Alexander T., The ubiquitous interleukin-6 a time for reappraisal; *Cardiovascular Diabetologi*, 2010: 9:67.

14 Piquette M. M., Regulation of multidrug resistance by pro-inflammatory cytoquines; *Curr Cancer Drug Targets*. Jun 6 (4): 295-311.

15 Christine F., Mario B., Influence of the pro-inflammatory cytokines on P-glycoprotein expression and functionality; *JPPS*, 7(3):359-371, 2004.

16 Emmanuel A., Micheline P., Regulation of Multidrug Resistance by Pro-Inflammatory Cytokines; *Current Cancer Drug*, 6: 89-105, 2006.

17 Miguel A., Anabell A., Interleucinas e Inmunidad Innata; *Rev. Biomed*, 12:272-280, 2001.

18 Victor P., Devis D., La promoción de la actividad física relacionada con la salud. La perspectiva de proceso y resultado; *Rev. Int. Med. C. Act. Fis. Deporte*, vol 3(10)69-74, Junio 2003.

19 NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-174-SSA1-1998, PARA EL MANEJO INTEGRAL DE LA OBESIDAD.

20 McKenzie M.J., Goldfarh A. H., Aerobic exercise bout effects on Gen transcription in the rat soleus; American College of Sport Medicine, 1515-1521, 2007.

21 Moldoveanu A. I., Shephard R. J., Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1B, IL-6 and TNF- α in blood mononuclear cells; J Appl Physiol, 89: 1499-1504, 2000.

22. Wiellandt A.M., Vollrath V. Polimorfismo del gen de Resistencia a múltiples drogas (MDR1) en población chilena: mapuche, mestiza y maorí. Rev. Méd Chile 2004; 132: 1061-1068.

23 Petersen A. M., Klarlud B.P., The anti-inflammatory effect of exercise; J Appl Physiol. 98: 1154-1162, 2005.

24. Frank W. B. Physical activity and dietary intervention for chronic diseases: quick fix after all?. J Appl. Physiol 100: 1439-1440, 2006.

25 Schaffler A., Muller Ladner U. Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases. Endocrine Reviews, vol: 27, 449-467, 2006.

26. Jens M. B., Jorn W. H.; Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects., Am J Physiol Endocrinol Metab. 290: E961-E967, 2006.