

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



***EFECTO DE UN PROGRAMA DE FORTALECIMIENTO MUSCULAR
SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA MEDIADA POR TLR9,
EN RATAS OBESAS y DIABÉTICAS***

ALEX HUMBERTO BARHAM GALLARDO

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN FISIOLÓGÍA

Directores de tesis:

**Prof. Dra. Julia Guerrero Peralta
Prof. Dr. Marcelo Cano Cappellacci**

2018

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

ALEX HUMBERTO BARHAM GALLARDO

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Fisiología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 29 de Noviembre de 2018

Prof. Dra. Julia Guerrero P.

Prof. Dr. Marcelo Cano C.

Directores de Tesis

Facultad de Medicina de la Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Fernando Carrasco

Prof. MSc Edgardo Opazo

Prof. Dra. Karin Papapietro

**Prof. Dra. Alejandra Espinosa
Presidente de la Comisión**

Dedicatoria

A mis seres queridos.....gracias por su apoyo

Agradecimientos

Julia Guerrero

Marcelo Cano

Rosario Flores

Cecilia Montero

Macarena Rojas

Luis Michea

Manuel Estrada

Manuel Ruz

Diego García

Álvaro Pérez

Kharen Espinoza

Juana Codoceo

Jedy Vivero

Laboratorio de Inmunomodulación Neuroendocrina, U. de Chile

Laboratorio de Ciencias de la Actividad Física, U. de Chile

Laboratorio de Fisiología Integrativa, CEMC, U. de Chile

Laboratorio de Endocrinología Celular, U. de Chile

Financiamiento parcial Fondecyt n°1160792

Índice

Resumen.....	6
Abstract.....	8
Introducción.....	10
Planteamiento del problema.....	23
Objetivos de investigación.....	25
Métodos experimentales.....	26
Resultados.....	33
Discusión.....	47
Bibliografía.....	59
Anexos.....	70

Resumen

La obesidad, condición caracterizada por la presencia de un estado inflamatorio crónico, está estrechamente relacionada al desarrollo de diabetes tipo 2 (DM2), patología de alta prevalencia en individuos sedentarios. Se sabe que la actividad física regular es una de las medidas más eficaces para evitar los efectos deletéreos asociados a la obesidad y DM2, ya que además de reducir la actividad proinflamatoria, induce un ambiente antiinflamatorio.

Proponemos en nuestra investigación que el entrenamiento de fortalecimiento muscular generará una disminución de la respuesta inflamatoria en la que participa el receptor de respuesta inmune TLR9, en un modelo de ratas obesas y DM2. Para tales efectos 8 ratas Wistar, macho, adultas, obesas y diabéticas fueron sometidas a un programa de entrenamiento de fortalecimiento muscular por 12 semanas (grupo entrenado (GE)), mediante el agarre, en sentido vertical, a una rejilla, por un tiempo predeterminado y con una carga externa sujeta a sus colas. 7 ratas de iguales características, no sometidas al entrenamiento, sirvieron como grupo control (GC).

Al término del programa, se evaluó la fuerza muscular (tiempo máximo de agarre (segundos) sin carga externa) en todas las ratas. Luego, estas fueron sometidas a eutanasia y se cuantificó en el bazo la expresión del mRNA de genes implicados en la cascada de señalización de TLR9 y en la inducción de citocinas pro y antiinflamatorias. En el suero sanguíneo, se valoró la actividad inflamatoria sistémica por medio de la cuantificación de citocinas pro y antiinflamatorias y además, se midió la presencia de cfDNA (DNA de doble cadena, libre), ligando endógeno de TLR9. Adicionalmente, se midió masa corporal y grasa, parámetros de control glicémico y lipídico.

En relación al GC, el GE mostró mayor fuerza muscular (47[16-139] segundos v/s 18 [10-22] segundos; $p=0,01$). Del total de ratas del GE, aquella mitad con valores de fuerza por sobre la mediana del grupo, las denominamos "respondedoras" (GR) al entrenamiento, mientras que al resto, las denominamos "subrespondedoras"(GSR).

El GR mostró mayor fuerza respecto del GC y del GSR, presentando también una disminución significativa de su masa corporal respecto a los otros grupos. Además, el GR presentó menores valores en la expresión del mRNA de las citocinas proinflamatorias, TNF- α e IL-6, y de la proteína TNF- α valorada en el suero sanguíneo. No observamos modificaciones en la expresión del mRNA y proteína de la citokina antiinflamatoria IL-10. Por otra parte, se encontró en el GR una disminución significativa de la expresión de mRNA de las moléculas implicadas en la vía de señalización del receptor TLR9, así como menores concentraciones de cfDNA. Asociado a estos hallazgos, se observó en este grupo, menores valores en los parámetros metabólicos de control glicémico y mejoras en su perfil lipídico.

En resumen, ratas obesas y diabéticas tratadas con un programa de entrenamiento de fortalecimiento muscular y que logran un aumento significativo en su fuerza muscular, presentan cambios también significativos en su composición corporal, marcadores metabólicos y de inflamación sistémica, así como una regulación negativa de la vía de señalización del receptor TLR9. Esto sugiere la necesidad de considerar las diferencias individuales en la capacidad de respuesta al entrenamiento de fortalecimiento muscular, al momento de su prescripción en pacientes obesos y diabéticos.

Abstract

Obesity, a condition characterized by the presence of a chronic inflammatory state, is closely related to the development of type 2 diabetes (T2D), a pathology of high prevalence in sedentary individuals. It is known that regular physical activity is one of the most effective measures to avoid the deleterious effects associated with obesity and T2D, since in addition to reducing proinflammatory activity, it induces an anti-inflammatory environment.

We propose in our research that muscle strengthening training will generate a decrease in the inflammatory response in which the immune response receptor TLR9 participates, in a model of obese rats and T2D.

For this purpose 8 Wistar rats, male, adult, obese and diabetic rats were subjected to a muscle strengthening training program for 12 weeks (trained group (GE)), by gripping vertically to a grid, for a predetermined time and with an external load attached to their tails. 7 rats with the same characteristics, not subjected to training, served as a control group (CG).

At the end of the program, muscle strength (maximum holding time (seconds) without external load) was evaluated in all rats. Then, they were euthanized and quantified in spleen the mRNA expression of genes involved in the TLR9 signaling cascade and induction of pro and anti-inflammatory cytokines. In the blood serum, the systemic inflammatory activity was assessed by means of the quantification of pro and anti-inflammatory cytokines and, in addition, the presence of cfDNA (free double-stranded DNA), endogenous ligand of TLR9, was measured. Additionally, body mass and fat, glycemic and lipid control parameters were measured.

In relation to GC, the GE showed greater muscle strength (47 [16-139] seconds v / s 18 [10-22] seconds, $p = 0.006$). Of all the GE rats, which half with force values above the group median, we call them "responders" (GR) to training, while the rest, we call them "subresponders" (GSR).

The GR showed greater strength with respect to the GC and the GSR, also presenting a significant decrease in their body mass with respect to the other groups. In addition, the GR presented lower values in the mRNA expression of the proinflammatory cytokines, TNF- α and IL-6, and TNF- α protein valued in the blood serum. We did not observe modifications in the mRNA and protein expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10. On the other hand, a significant decrease in the mRNA expression of the molecules involved in the TLR9 signaling pathway was found in the GR, as well as lower concentrations of cfDNA. Associated with these findings, we observed in this group, lower values in the metabolic parameters of glycemic control and improvements in their lipid profile.

In summary, obese and diabetic rats treated with a muscular strengthening training program that achieve a significant increase in their muscular strength, present also significant changes in their body composition, metabolic markers and systemic inflammation, as well as a negative regulation of the signaling path of the TLR9 receiver. This suggests the need to consider individual differences in the capacity to respond to muscle strengthening training, at the time of prescription in obese and diabetic patients.

INTRODUCCIÓN.

- Obesidad y Diabetes Mellitus 2 (DM2)

La regulación normal del metabolismo de la glucosa está dada por un circuito de retroalimentación que involucra a las células β pancreáticas y a los tejidos sensibles a la insulina, situación en la cual esta sensibilidad determinará la magnitud de la respuesta de las células β (Kahn et al., 2014). Sin embargo, cuando existe resistencia a la acción de esta hormona, las células β aumentan la producción de insulina para mantener el ingreso de glucosa al tejido en forma normal, y por tanto, sólo cuando la célula β es incapaz de liberar insulina de acuerdo a su demanda, los niveles de glucosa aumentan anormalmente (Cantley et al, 2015; Kahn et al, 2014).

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad que comprende una serie de trastornos caracterizados principalmente por la presencia de hiperglicemia crónica, resultante del deterioro de la secreción de insulina y / o de alteraciones de su actividad en los tejidos diana (Muniyappa et al., 2008; Kahn et al., 2014; American Diabetes Association, 2016). Los pacientes diabéticos están predispuestos a la disfunción y falla de varios órganos a largo plazo, en especial ojos, riñones, corazón y vasos sanguíneos (Forbes et al., 2013)

La resistencia a la insulina junto con la hiperinsulinemia compensatoria, es considerada la etapa previa a la DM2 (Stancakova et al., 2009). La progresión de resistencia a la insulina hacia DM2 está relacionada con alteraciones de la secreción de esta hormona, conduciendo primero a hiperglicemias en ayunas y postprandiales, dada una disfunción de las células β pancreáticas para secretar insulina (Stancakova et al., 2009; Kahn et al., 2014), afectando en especial la señalización de esta hormona en el tejido adiposo, músculo esquelético e hígado (Guo et al., 2014)

La DM2 está fuertemente asociada a la presencia de obesidad (Menegazzo et al., 2015), la cual es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud.

Una persona con un índice de masa corporal igual o superior a 30 kg/m² es considerada obesa (OMS, 2018). Existe amplia evidencia que indica que el tejido adiposo y los adipocitos que lo conforman, son piezas claves en instaurar y/o perpetuar las características de la resistencia a la insulina (Chawla et al., 2011).

El crecimiento del tejido adiposo, en especial el visceral (TAV) - como consecuencia de un estilo de vida sedentario y una elevada ingesta energética- se asocia con inflamación persistente de éste, lo que conduce a la disfunción del tejido adiposo y a la infiltración de células inmunes, tales como macrófagos (Masoodi et al., 2015). Estas células perpetúan la inflamación e inducen incrementos locales y sistémicos de citokinas y adipocinas proinflamatorias tales como TNF- α e IL-6, las cuales están relacionadas a la disminución de la sensibilidad a la insulina (Sell et al., 2012)

Se sabe que la regulación positiva del factor de transcripción NF-kB, conduce a la inducción de factores proinflamatorios (Wada et al., 2016), siendo la activación de la cascada de señalización de los receptores tipo Toll (Toll like receptors (TLR)- a través de la proteína adaptadora MyD88- un mecanismo conocido de activación de NF-kB (Kawasaki et al., 2014). Modelos de ratones WT (wild type) para MyD88 a los cuales se les induce disminuciones de la captación de glucosa y de la sensibilidad a la insulina a través de inactividad física (Kwon et al., 2015) o de una dieta alta en grasas (HFD) (Yu et al., 2014), muestran aumentos de marcadores proinflamatorios, situación que no ocurría en sus homólogos KO (knock out) para MyD88 en células musculares (Kwon et al., 2015) o en células mieloides (Yu et al., 2014). Esto sugiere que la señalización mediada por TLR y MyD88 sería necesaria para el desarrollo y amplificación de la respuesta proinflamatoria, lo que contribuye a las alteraciones del metabolismo de la glucosa que acompañan a la inactividad física y a la HFD (Kawasaki et al., 2014; Kwon et al., 2015; Yu et al., 2014)

- Receptores tipo Toll (Toll like receptors o TLR)

El sistema inmune innato tiene la capacidad de reconocer los distintos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares derivados de células dañadas (DAMPs) a través de receptores de reconocimiento de estos patrones (PRR) (Kawai et al., 2010). La detección de agentes extraños y de señales de daño celular, activan cascadas de señalización intracelular que conducen a la activación de las células inmunes con la consecuente transcripción de genes que participan en la amplificación y función efectora de éstas, tales como la producción de citocinas proinflamatorias (Kumar et al, 2011; Kawasaki et al., 2014).

Los mamíferos poseen distintos tipos de PRR, siendo los receptores tipo Toll (Toll-like receptors, TLRs) los mejor caracterizados. Estos comprenden 10 tipos (TLR1-10) en humanos y 12 (TLR1-9 y TLR11-13) en roedores (Kawai et al., 2011). Los TLRs están expresados en células inmunes, tales como las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés, peripheral blood mononuclear cells) (Karlsen et al., 2017; Wang et al., 2010), como también en células no inmunes, como fibroblastos, células epiteliales y endoteliales (Takeuchi et al., 2010). Los TLRs siempre están asociados a membranas y de acuerdo a su localización, se clasifican en dos subfamilias:

a) TLRs de superficie celular asociados a la membrana plasmática (TLR 1, 2, 4, 5, 6 y 10): reconocen principalmente componentes de membrana microbiana tales como lípidos, lipoproteínas y proteínas (Kawai et al., 2010).

b) TLRs intracelulares asociados a organelos con membrana (TLR 3, 7, 8, 9, 11, 12 y 13): reconocen ácidos nucleicos derivados de bacterias y virus, y también ácidos nucleicos propios derivados de condiciones patológicas como la autoinmunidad (Kawai et al., 2010).

TLR9 reconoce DNA bacteriano y viral rico en moléculas CpG-DNA no metiladas (Kawai et al., 2010; Kawai et al., 2011; Kumar et al., 2011). Existe evidencia de que TLR9 es expresado en las principales células que componen la fracción PBMC, es decir, linfocitos B (Mortezaghali et al., 2016; Hornung et al., 2002), linfocitos T

(Mortezaghali et al., 2016), células asesinas naturales (natural killers, NK) (Hornung et al., 2002) y monocitos (Huang et al., 2014). Además, se expresan en macrófagos (Shi et al., 2011; Hornung et al., 2002) y células dendríticas (Hubert et al., 2006; Lester et al., 2014), las cuales son células diferenciadas a partir del ingreso de los monocitos a tejidos diana (Auffray et al., 2009).

En general, cada TLR se compone de un dominio extracelular con secuencias ricas en leucina que median el reconocimiento de los PAMP/DAMPs, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático denominado Toll / IL-1 (TIR) que inicia la cascada de señalización (Kumar et al., 2011; Kawai et al., 2010). Tras el reconocimiento de PAMPs y DAMPs, los diferentes tipos de TLRs reclutan a su dominio intracelular, en forma diferencial, proteínas adaptadoras que contienen dominios TIR, tales como MyD88 (Kumar et al., 2011). Estas vías de señalización conducen a la activación de factores de transcripción tales como NF- κ B (Wada et al., 2016) y STAT-1 (Liang et al. 2017), los cuales una vez activados, se translocan al núcleo para unirse a dominios específicos del DNA iniciando la transcripción de genes relevantes para la respuesta inmune tales como citocinas y quimiocinas (Wada et al., 2016; Kawasaki et al., 2014). Se sabe que SOCS-1 (suppressor of cytokine signaling 1) previene la activación de STAT-1, inhibiendo así la expresión de MyD88 (Ferreira et al. 2014) y, por tanto, reprimiendo la expresión de moléculas proinflamatorias.

- TLR9, inflamación y alteraciones metabólicas

En el tejido adiposo, la hipertrofia y proliferación de los adipocitos, la angiogénesis y la contribución de las células inmunes están altamente coordinadas (Nishimoto et al., 2016). Sin embargo, la obesidad interrumpe este equilibrio generando cambios estructurales y funcionales que favorecen el desarrollo de la respuesta inflamatoria en el tejido adiposo. Al respecto, se sabe que el aumento de la producción de citocinas inflamatorias, tales como TNF- α e IL-6 puede inducir directamente resistencia a la insulina (Dou, 2013). Se ha visto, por otra parte, que en animales obesos

resistentes a la insulina, la supresión de la activación del receptor de insulina (InsR) y su asociación con los sustratos de este receptor (IRS), inhibe la vía de señalización de esta hormona, explicando el desarrollo de insulinoresistencia (Chawla et al., 2011) y de DM2 (Menegazzo et al., 2015).

El incremento de la inflamación del tejido adiposo, en conjunto con otras condiciones relacionadas a la obesidad - alto grado de estrés oxidativo (Furukawa et al., 2004) y menor presión de oxígeno tisular (Sung et al., 2013), entre otras- pueden inducir liberación de diversos productos de degeneración celular asociada a la inflamación (Nishimoto et al., 2016). Se ha descrito, entre estos elementos, a los ácidos grasos libres, los que al actuar como ligandos endógenos de TLR2 y TLR4, pueden contribuir a incrementar y perpetuar la inflamación del tejido adiposo (Suganami et al., 2005)

Adicionalmente, se ha descrito la participación de otros receptores TLR en enfermedades metabólicas, incluida la obesidad, entre ellos TLR9 (Nishimoto et al., 2016). Este receptor requiere de la unión de DNA para su activación, describiéndose múltiples fuentes de DNA responsables de la activación de TLR9:

a) DNA mitocondrial circulante: tiene un origen hepático y se encuentra elevado en modelos de ratones y pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Por ello se ha propuesto que este DNA puede promover el desarrollo de esta patología mediante la activación de TLR9 (García-Martínez et al., 2016).

b) DNA exógeno: se sabe que la obesidad está asociada con una composición alterada de la microbiota intestinal (Tremaroli et al., 2012). Es posible que los motivos CpG no metilados encontrados en el DNA bacteriano puedan promover inflamación e insulinoresistencia inducida por la obesidad (Revelo et al., 2016). Estudios experimentales en ratones han demostrado que los niveles de DNA bacteriano de origen intestinal están aumentados en la sangre y en el TAV después de una semana de alimentación con una HFD (Amar et al., 2011), los cuales podrían tener efectos sistémicos y locales en el TAV y en el hígado (Henao-Mejía et al., 2012). Por lo tanto, los cambios inducidos por la obesidad en la microbiota intestinal podrían

potencialmente promover resistencia a la insulina a través del reconocimiento de estos CpG DNA por TLR9 (Revelo et al., 2016).

c) DNA constituyente de trampas extracelulares (extracellular traps, ET): durante un tipo especial de muerte celular programada llamada NETosis (Brinkmann et al., 2004; Menegazzo et al., 2015; Revelo et al., 2016), en la que ocurre desintegración de las membranas intracelulares de los neutrófilos, seguida por la descondensación de la cromatina, existe extrusión del material nuclear. Este DNA - ahora extracelular- forma complejos con histonas y enzimas granulares, formando redes o trampas (llamada NETs por neutrophil extracellular traps), las cuales pueden atrapar partículas y moléculas endógenas y exógenas, proporcionando un mecanismo de defensa contra la inflamación (Menegazzo et al., 2015). También se han descrito estructuras liberadas por los macrófagos llamadas METs (macrophage extracellular traps), con un rol similar a las NETs, presentes en el tejido adiposo subcutáneo (Mohan et al., 2013) y visceral (Revelo, 2016) de ratones. Se ha propuesto que estados de hiperglicemia pueden estimular el proceso de NETosis (Menegazzo et al., 2015; Revelo et al., 2016). En humanos, se ha descrito que en pacientes con DM2 existe un aumento de la formación de NETs plasmáticos (Menegazzo et al., 2015). Por otra parte, un estudio en el que se utilizó un modelo de ratones con una dieta alta en grasas y DM2 inducida por obesidad (DIO/HFD), demostró incrementos de las liberación de NETs y METs tanto en el TAV como en el plasma asociado a liberación de IL-1 β y TNF- α por parte de macrófagos y a inflamación del TAV (Revelo et al., 2016). Este estudio demostró que la inhibición de la formación de ETs en el TAV, determinaba una mejora en la tolerancia a la glucosa y a la insulina. Sin embargo, este efecto no se observó en los ratones KO para TLR9 alimentados con HFD, lo que sugiere que los efectos las ETs en el metabolismo de la glucosa estarían mediados, al menos en parte, por TLR9 (Revelo et al., 2016).

d) DNA libre en el plasma (cell free DNA, cfDNA) asociado a la degeneración de adipocitos: Nishimoto (Nishimoto et al., 2016) trabajó con un modelo de ratones C57BL/6 obesos, alimentados con una HFD y observó degeneración de adipocitos en el TAV, consistentes con aumentos del número de estructuras del tipo

coronas(crown like structures) en el tejido adiposo (Nishimoto et al., 2016). Estos hallazgos se correlacionaron con mayores niveles plasmáticos de DNA monocatenario (ssDNA), bicatenario (dsDNA) y de nucleosomas, lo que es interpretado como cfDNA originado de adipocitos muertos. Además, este mismo autor constató acumulaciones de ssDNA en el citoplasma de los macrófagos reclutados hacia el TAV y un aumento de la expresión de TLR9 en esta población celular (Nishimoto et al., 2016). Adicionalmente, demostraron que en un cultivo de macrófagos peritoneales tratados con cfDNA incrementó la expresión de la proteína quimioattractante de monocitos-1 (MCP-1), efecto que fue mediado por TLR9 (Nishimoto et al., 2016). Estos resultados sugieren que la activación de TLR9 por cfDNA liberado desde los adipocitos degenerados, induce la expresión de citocinas proinflamatorias y acumulación de macrófagos, promoviéndose la respuesta inflamatoria y participando en la patogénesis de la insulinoresistencia. Datos adicionales de este mismo estudio, indican que también en humanos el nivel plasmático de ssDNA se asocia con obesidad visceral y resistencia a la insulina (Nishimoto et al., 2016).

- Actividad física y entrenamiento físico

Existe consenso en que la realización de actividad física en forma regular genera beneficios para la salud (American Diabetes Association, 2016). Sin embargo, es necesario aclarar el significado de los diversos términos asociados con la actividad física.

La actividad física se define como cualquier movimiento corporal producido por la contracción musculoesquelética, que conlleve un aumento del gasto energético (Balducci et al., 2014). Cuando la actividad física se convierte en un proceso sistemático, con una planificación, progresión y estructura definida, con el objetivo de mejorar o mantener uno o más de los componentes de la condición física de un individuo -como por ejemplo la condición cardiorrespiratoria y/o la fuerza muscular- hablamos entonces de entrenamiento físico (Balducci et al., 2014)

A modo general se distinguen dos tipos principales de entrenamiento:

a) entrenamiento cardiorrespiratorio: el que involucra a un amplio grupo de músculos en una actividad dinámica, resultando en mejoras de la función cardiovascular y musculoesquelética para la extracción y utilización del oxígeno por parte de los tejidos en contracción (Balducci et al., 2014). Este tipo de entrenamiento determinará principalmente un fenotipo caracterizado por poseer una alta capacidad para realizar episodios prolongados de actividad física, retrasando la aparición de la fatiga y con una recuperación rápida posterior al ejercicio (Krüger et al., 2013)

b) entrenamiento de fortalecimiento muscular: el que involucra la actividad de un grupo o grupos de músculos en una actividad dinámica o isométrica, a través de la variación de la resistencia externa, el número de veces en que esta resistencia es movida y/o el intervalo de descanso entre ellas. (Balducci et al., 2014). Este tipo de entrenamiento tiende a generar hipertrofia muscular y un mayor desarrollo de fuerza máxima (Krüger et al., 2013). Otorga una alta capacidad de realizar programas de ejercicio de alta intensidad a corto plazo, pero con poca resistencia a la fatiga (Krüger et al., 2013)

- Entrenamiento físico como tratamiento para la obesidad y la DM2

El tratamiento de la DM2 está orientado a corregir la hiperglicemia, aumentando la secreción de insulina y/o su sensibilidad, siendo el entrenamiento de la condición física un elemento primordial en el tratamiento de los pacientes diabéticos, asociado al conjunto de cambios o modificaciones en los patrones de alimentación, y a la terapia farmacológica (American Diabetes Association, 2016).

Aunque las adaptaciones de los distintos tejidos asociadas al entrenamiento físico, son específicas respecto al tipo de ejercicio (fortalecimiento muscular versus cardiorrespiratorio), frecuencia, intensidad y duración de éste (Balducci et al., 2014), tanto el entrenamiento cardiorrespiratorio como el de fortalecimiento muscular mejoran la acción de la insulina y el control de la glucosa (Umpierre et al., 2011). Sin

embargo, este último tiene la ventaja de aumentar la masa muscular esquelética optimizando y prolongando las respuestas beneficiosas (Mounier et al., 2015). La contracción del músculo esquelético aumenta la captación de glucosa de una manera dependiente de la intensidad del ejercicio, para sostener la demanda de energía causada por el aumento del gasto de ATP. En este efecto participan, tanto el aumento de la perfusión sanguínea, como la translocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) a la membrana plasmática de la célula muscular (Mounier et al., 2015).

Por otra parte, el entrenamiento de fortalecimiento muscular, desde un punto de vista mecánico, puede ser de tipo dinámico, si la contracción muscular genera movimiento del segmento en actividad, o isométrico, si la contracción muscular no genera movimiento del segmento (Balducci et al., 2014).

En particular, los efectos del entrenamiento de fortalecimiento muscular de tipo isométrico, sobre parámetros funcionales y músculo esqueléticos, demostrados tanto en modelos humanos como en modelos murinos, incluyen mejoras en fuerza muscular e hipertrofia de las fibras tipo II (Farup et al., 2012; Krüger et al., 2013), sin cambios en el fenotipo de las fibras musculares (Krüger et al., 2013) y también, aumento de la translocación de GLUT4 en las membranas musculares (Holten et al., 2004) lo que se asocia a mejoras en la regulación de la glicemia.

En comparación a otros modelos de entrenamiento de fortalecimiento muscular, el entrenamiento de tipo isométrico tiene como ventaja no requerir una etapa de aprendizaje previo a su ejecución (Krüger et al., 2013). Además, permite controlar eficazmente las variables de carga, tiempo, repeticiones e intervalo de descanso (Krüger, 2013). Otra ventaja del entrenamiento de tipo isométrico es que las adaptaciones específicas inducidas por éste, no generan ningún tipo de interferencia o superposición funcional con el entrenamiento de resistencia, afectando los parámetros de evaluación de la capacidad cardiorrespiratoria sólo marginalmente (Karavirta et al., 2011).

- Actividad física e inflamación

La prevalencia de la obesidad sigue incrementándose en todo el mundo, asociado a un aumento proporcional de la incidencia de DM2 y enfermedades cardiovasculares (American Diabetes Association, 2016), condiciones caracterizadas por la presencia de un estado de inflamación sistémica crónica de bajo grado (Ouchi et al., 2011). Además, el sedentarismo aumenta el riesgo de desarrollar este tipo de afecciones (American Diabetes Association, 2016), en la que una mayor acumulación de grasa, principalmente visceral, está acompañada de una mayor infiltración de células proinflamatorias y liberación de adipocinas en el tejido adiposo, incrementando o perpetuando este estado inflamatorio (Ouchi et al., 2011; Osborn et al., 2012), el cual está asociado al desarrollo de resistencia a la insulina (Gleeson et al., 2011; Chawla et al., 2011).

En este contexto, la actividad física constituye una herramienta terapéutica y de prevención con efectos a corto y largo plazo, que no solo se remiten a la reducción de los factores proinflamatorios, sino también a la inducción de un ambiente antiinflamatorio (Strasser et al., 2013; Gleeson et al., 2011). Se han descrito los siguientes mecanismos asociados a los efectos del ejercicio en la inflamación:

- a) Reducción de la masa grasa visceral, lo cual se asocia a la disminución de las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α liberadas desde ésta (Gleeson et al., 2011; Peake et al., 2015)
- b) Liberación de IL-6 desde los músculos esqueléticos en contracción, la cual, en este contexto, tienen un rol antiinflamatorio (Pedersen et al., 2012), protegiendo al músculo esquelético de la infiltración de macrófagos y del aumento de citocinas proinflamatorias (Hong et al., 2009). Se ha visto que, además, es responsable del aumento de las citocinas antiinflamatorias IL-10 e IL-1RA (Gleeson et al., 2011; Peake et al., 2015).

c) El ejercicio estimula la liberación de cortisol (Pedersen et al., 2007), hormona que posee potentes efectos antiinflamatorios sistémicos. El aumento de los niveles circulantes de cortisol, media, entre otras funciones, la inhibición de la inducción de citokinas proinflamatorias (Gleeson et al., 2011).

d) Inhibición de la infiltración en el tejido adiposo por macrófagos M1 proinflamatorios, los cuales liberan TNF- α , IL-6 y óxido nítrico a nivel tisular, favoreciendo por tanto el desarrollo de estados proinflamatorios (Gleeson et al., 2011; Kawanishi et al., 2010). Se ha observado que el ejercicio tiende a reducir la expresión de moléculas de adhesión celular, tales como ICAM-1 y también quimiocinas, tales como MCP-1, las cuales reclutan este tipo celular al tejido adiposo (Kawanishi et al., 2010).

e) Polarización de los macrófagos desde el fenotipo M1 proinflamatorio hacia el fenotipo antiinflamatorio M2, el cual produce citokinas antiinflamatorias y arginasa, controlando así la inflamación en el tejido adiposo (Kawanishi et al., 2010). Estudios han demostrado que los glucocorticoides interfieren con el reclutamiento de macrófagos al tejido adiposo (Patsouris et al., 2009) y además, favorecen la diferenciación de macrófagos a un fenotipo antiinflamatorio (Coutinho et al., 2011). Al respecto, Kawanishi (Kawanishi et al., 2010) demostró que en ejercicio, ratones obesos presentaron un cambio en la predominancia del subtipo de macrófagos en el tejido adiposo, de M1 a M2, proponiendo que el cortisol secretado durante el ejercicio, pudiera ser responsable de esta observación.

f) Reducción del número de monocitos proinflamatorios en la sangre, los cuales están asociados a la patogénesis de la DM2 (Giulietti et al., 2007). Timmerman (Timmerman et al., 2008) demostró que el ejercicio disminuye los monocitos proinflamatorios circulantes y plantea que los incrementos transientes de cortisol durante el ejercicio pudieran jugar un rol en esta observación.

g) Aumento del número circulante de células T reguladoras, cuya función es disminuir la expresión de citokinas proinflamatorias y aumentar las antiinflamatorias (Wang et al., 2011)

h) Modulación de la función y expresión de los receptores TLR: existe evidencia que demuestra que los PBMC de sujetos físicamente activos, presentan una menor expresión de los receptores TLR2 (Durrer et al., 2017) y TLR4 (Lancaster et al., 2005) y que frente al estímulo con LPS in vitro, estas células liberan menor cantidad de citocinas proinflamatorias (Lancaster et al., 2005; Durrer, 2017)

Nos planteamos si esta situación ocurre con otros receptores involucrados en la respuesta inmune, tales como TLR9. No hay antecedentes en relación a si el ejercicio modifica de alguna manera la respuesta inflamatoria mediada por TLR9. Además, la evidencia en torno al efecto antiinflamatorio del ejercicio de fortalecimiento muscular está limitada a ejercicios que implican contracción muscular de tipo dinámica, por lo que nos parece interesante evaluar el rol del entrenamiento de fortalecimiento muscular de tipo isométrico en la modulación de la respuesta inflamatoria.

- Efecto del entrenamiento físico en el cfDNA

Los mecanismos de liberación del cfDNA hacia la circulación son una materia de discusión (Snyder et al., 2016; Raymond et al., 2017). Al respecto, algunos autores sugieren que en sujetos sanos su aparición se debe principalmente a la apoptosis de células hematopoyéticas normales, con una mínima contribución de otros tejidos (Snyder et al., 2016; Diehl et al., 2011) y en una menor proporción a la liberación espontánea de DNA recién sintetizado desde células vivas, como parte de un mecanismo homeostático de regulación de los fragmentos de DNA circulantes (Tamkovich et al., 2006; Qin et al., 2016; Stroun et al., 2001)

El ejercicio, como inductor de injuria, genera daño celular en forma aguda, el cual trae consigo la liberación de moléculas tales como el cfDNA, elevando por tanto, las concentraciones plasmáticas de ésta (Breitbach et al., 2012). El tiempo en que los niveles de cfDNA circulantes se mantienen por sobre sus niveles basales parece depender de la severidad del daño celular (Fatouros et al. 2010). La interacción entre la duración e intensidad del ejercicio pareciera afectar los niveles de cfDNA, ya que

ambos parámetros generan diferentes formas de estrés mecánico, oxidativo y metabólico en leucocitos y tejido muscular (Fehrenbach et al., 2006; Shockett et al., 2016).

La evidencia muestra que en individuos sanos las concentraciones plasmáticas de cfDNA tienen incrementos casi inmediatos luego de iniciado el ejercicio y se mantienen elevados respecto a su basal, en un rango de tiempo que va desde 30 minutos posteriores a un ejercicio cardiorrespiratorio de mediana duración y alta intensidad (Velders et al. 2014; Fatouros et al., 2010), 2 horas post ejercicios cardiorrespiratorios de larga duración y mediana intensidad (Atamaniuk et al., 2004) y 48 horas luego de realizar ejercicios cardiorrespiratorios de muy larga duración (Margeli et al., 2006).

Fatouros (Fatouros et al. 2006), además, estudió el efecto de un programa de sobreentrenamiento muscular (definido como una acumulación de excesivo entrenamiento a lo largo del tiempo, el cual determina una disminución en su rendimiento y eventual daño muscular (Fatouros et al. 2006)) de 12 semanas de duración, con mediciones de cfDNA cada 4 semanas. Este autor demostró aumentos significativos de hasta 96 horas en la concentración de cfDNA. Además, observó rápidos aumentos y descensos en las concentraciones plasmáticas de cfDNA, las que fueron acompañados de incrementos tardíos en los niveles de proteína C reactiva, marcador de respuesta inflamatoria de fase aguda, incluso 48 horas posteriores al término del ejercicio (Fatouros et al, 2010; Margeli et al., 2006), sugiriendo que los mecanismos de liberación de cfDNA son independientes a los procesos que dan pie a los marcadores inflamatorios clásicos inducidos por el ejercicio (Breitbach et al., 2012; Fatouros et al., 2010)

Hacemos notar que la cinética de los niveles plasmáticos de cfDNA inducidos por el ejercicio, ha sido valorada en sujetos sanos sometidos a sobreentrenamiento de fortalecimiento muscular o a ejercicios cardiorrespiratorios de alta intensidad y/o larga duración. Hasta la fecha, no existe evidencia de los efectos del entrenamiento de fortalecimiento muscular en los niveles circulantes de cfDNA en patologías metabólico -inflamatorias, tales como obesidad y DM2.

Es por esto, que nos parece interesante preguntarnos si un programa de ejercicio de fortalecimiento muscular genera cambios en las concentraciones plasmáticas de cfDNA en sujetos obesos y DM2, modificando la respuesta inflamatoria mediada por TLR9.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La prevalencia de obesidad y sedentarismo, y de las condiciones asociadas a ellas, tales como la DM2, están en permanente incremento en todo el mundo (American Diabetes Association, 2016). Un rasgo distintivo de la obesidad es la presencia de un estado inflamatorio crónico de bajo grado, tanto a nivel sistémico como en el tejido adiposo (Ouchi et al., 2011), condición relacionada, entre otras, con la liberación de diversos productos de degeneración celular desde los adipocitos, tales como el cfDNA, el cual ha sido identificado como ligando endógeno del receptor TLR9 (Nishimoto et al., 2016). Por lo tanto, la mayor disponibilidad de cfDNA podría favorecer la activación de TLR9 y su participación en la mantención del estado proinflamatorio asociado a la obesidad (Nishimoto et al., 2016; Revelo et al., 2016).

La actividad física aparece como una herramienta útil para la prevención y tratamiento de las condiciones deletéreas asociadas a la obesidad, disminuyendo la respuesta proinflamatoria y favoreciendo un ambiente antiinflamatorio (Gleeson et al., 2011). Se sabe que los PBMC de sujetos sanos físicamente activos tienen una menor expresión de receptores TLR2 (Durrer et al., 2017), y TLR4 (Lancaster et al., 2005) y una capacidad significativamente inferior para producir citocinas proinflamatorias mediadas por ellos, en comparación a sujetos sanos inactivos (Lancaster et al., 2005; Durrer, 2017). Por esta razón, nos parece interesante preguntarnos si este efecto ocurre también en otros receptores involucrados en la activación inmune.

Además, la evidencia disponible señala que existen aumentos en las concentraciones plasmáticas de cfDNA, en forma constante, en sujetos sanos sobreentrenados (Fatouros, 2006), o en forma aguda, en individuos sometidos a

entrenamientos de alta intensidad y/o larga duración (Velders et al. 2014; Fatouros et al., 2010; Margeli et al., 2006; Atamaniuk et al., 2004) sin que esto implique una mayor actividad proinflamatoria sistémica mediada por su receptor, TLR9.

Por otra parte, en obesidad e insulinoresistencia, condiciones caracterizados por un estado proinflamatorio sistémico, se ha observado aumento de las concentraciones plasmáticas de cfDNA (Nishimoto, 2016). Se desconoce si el entrenamiento de fortalecimiento muscular genera cambios en los niveles circulantes de cfDNA en patologías metabólico - inflamatorias, tales como obesidad y DM2.

Por lo tanto, nos parece interesante evaluar si un programa de entrenamiento de fortalecimiento muscular de tipo isométrico podría inducir modificaciones en la respuesta inflamatoria mediada por TLR9. Estudiar el efecto del entrenamiento isométrico permitiría ampliar la evidencia acerca del rol antiinflamatorio del entrenamiento de fortalecimiento muscular y adicionarlo a la serie de indicaciones no farmacológicas para este tipo de pacientes.

Por estas razones, hipotetizamos que *"un programa de fortalecimiento muscular de tipo isométrico de 12 semanas de duración, inducirá una disminución de la respuesta proinflamatoria mediada por TLR9, en un modelo de ratas obesas/ DM2"*.

Para ello proponemos aplicar un programa de entrenamiento de fortalecimiento muscular de tipo isométrico de 12 semanas de duración, a un modelo de ratas Wistar adultas obesas/DM2, alimentadas con una dieta alta en grasas (HFD). Una vez terminado el periodo de entrenamiento, compararemos la respuesta inflamatoria en este grupo respecto a otro grupo de ratas con las mismas características, pero no sometidas al programa de entrenamiento.

Esperamos demostrar que el ejercicio de fortalecimiento muscular induce una disminución de la respuesta proinflamatoria en este modelo, valorada como una modificación del perfil inflamatorio de los mediadores humorales dependientes de la vía de TLR9.

OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN.

- Objetivo General:

"Evaluar el efecto de un programa de fortalecimiento muscular de tipo isométrico de 12 semanas de duración, en un modelo de ratas obesas y diabéticas (DM2), sobre la respuesta inflamatoria mediada por TLR9"

- Objetivos específicos:

1. Comparar la expresión de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias entre el grupo de ratas obesas/DM2 entrenadas y el de ratas obesas/DM2 no entrenadas
2. Comparar los niveles plasmáticos de cfDNA entre el grupo de ratas obesas/DM2 entrenadas y el de ratas obesas/DM2 no entrenadas
3. Determinar si el programa de entrenamiento de fortalecimiento muscular de tipo isométrico modifica la expresión del receptor TLR9.
4. Determinar si el programa de entrenamiento de fortalecimiento muscular de tipo isométrico induce cambios en la expresión de la proteína adaptadora de TLR9, MyD88 y de su supresor SOCS1

MÉTODOS EXPERIMENTALES.

- Contexto del desarrollo de la investigación

La presente investigación está enmarcada dentro del proyecto Fondecyt n°1160792, titulado "Interaction between supplemental zinc and muscle strength training as a key element to improve type-2 diabetes therapy" desarrollado en el Departamento de Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Una parte de dicho proyecto contempló trabajar con un modelo de ratas Wistar a las que se les indujo en forma acelerada el desarrollo de DM2 y que posteriormente fueron asignadas aleatoriamente en grupos experimentales, constituidos por el mismo número de animales cada uno (ver cálculo del tamaño muestral en sección "análisis estadístico"). De los grupos experimentales definidos en el proyecto primario, nos enfocamos en el grupo control (sin intervenciones adicionales) y el grupo sometido al programa de fortalecimiento muscular. Nuestro estudio, por tanto, tiene las características de un diseño cuasiexperimental con análisis post test y grupo control, en el cual los grupos experimentales son definidos antes del experimento.

- Protocolo de alimentación e inducción de DM2/obesidad

Se utilizaron ratas Wistar machos, adultas de cuatro meses de edad, a las cuales se les indujo en forma acelerada el desarrollo de DM2 de acuerdo a los procedimientos sugeridos por Skovso (Skovso et al., 2014) y Holmes (Holmes et al., 2015) alimentándolos desde los dos meses de edad con una dieta alta en grasas (HFD: high fat diet), descrita por García-Díaz (García- Díaz et al., 2009), lo cual produce resistencia a la insulina en un período de dos meses. De acuerdo al protocolo, dicha dieta fue preparada en el Departamento de Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, utilizando paté de cerdo, chocolate blanco, papas fritas, galletas, tocino, pellet estándar en una proporción 2:1:1:1:1:1. Su composición en términos de macronutrientes fue de 16,93% proteína, 62,91%, grasa y 20,15%

carbohidratos, a diferencia del pellet estándar, el que está compuesto por 59,42 % proteína, 26,09 % grasa y 14,49 % carbohidratos (expresados en % de kilocalorías totales).

Al cabo de dos meses con esta dieta HFD, se evaluó a las ratas de acuerdo con los criterios diagnósticos de DM2 propuestos: se fijó un valor de 126 mg/dl de glicemia en ayuno o de 250 mg/dl de glicemia a los 120 minutos durante un test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (inyección intraperitoneal de 1mg de glucosa por kilogramo de masa corporal). Si las ratas no cumplían con esta condición, se procedió a realizar una inyección lenta (durante 10 minutos) de una cantidad pequeña de estreptozotocina (15 mg / kg de peso corporal) por vía intraperitoneal y se reevaluó el desarrollo de DM2 al cabo de 96 horas si cumplían con los mismos criterios antes señalados.

Las ratas que cumplieron con los criterios diagnósticos de DM2, fueron distribuidos aleatoriamente en los grupos experimentales antes descritos, y se mantuvieron en sus jaulas (compartidas con otras 2 o 3 ratas) por un periodo de 12 semanas, recibiendo la dieta descrita y agua "ad libitum", con temperatura ($22 \pm 2,5$ ° C) y luz (12:12 horas de ciclo luz-oscuridad) ambiental controlada, lo cual cumplió plenamente con las instrucciones del Comité Ético de Cuidado de Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (ver "certificación del comité de bioética" en anexos). Las instalaciones para el cuidado, alimentación y entrenamiento de las ratas, fueron otorgadas por el Bioterio del Departamento de Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, y los costos involucrados en este proceso estuvieron contemplados en el financiamiento del proyecto Fondecyt número 1160792.

- Programa de entrenamiento de fortalecimiento muscular

Se implementó un programa de entrenamiento de fortalecimiento muscular a través de contracciones isométricas, similar al propuesto por Krüger (Krüger et al., 2013), el cual consistió en un sistema de agarre activo del animal a una rejilla, utilizando tanto

sus patas delanteras como traseras, en sentido vertical y cabeza arriba. La rejilla, confeccionada de plástico, tenía un tamaño de 1cm x1cm de separación entre las celdas y 1 mm de diámetro para facilitar el máximo agarre posible, y estaba dispuesto en forma vertical sobre una plataforma de madera, de 15 cm de ancho y 30 cm de largo.

El protocolo de entrenamiento, contempló medir la masa de los animales (balanza digital Radwag modelo WTB 2000 (2000g x 0,01 g)) en forma previa al inicio de cada sesión, para calcular la carga externa de trabajo que se añadió a la cola, la cual está basada en cierto porcentaje de la masa corporal medida en cada sesión de entrenamiento. En cada sesión se realizaron 3 ó 4 series de 2 repeticiones cada una en la cual cada repetición tenía una duración de 45 segundos, permitiéndoles descansar 30 segundos entre cada repetición y 2 minutos entre cada serie (ver pauta de entrenamiento en anexos) . La carga externa, asegurada a la base de la cola a través de cinta adhesiva, no generó lesiones en su cuerpo y tampoco intolerancias ni limitaciones del movimiento.

El programa de entrenamiento tuvo una duración de 12 semanas, con una frecuencia de sesiones de 3 veces a la semana, contemplando al menos un descanso de 48 horas entre cada una de ellas. Durante los periodos inter entrenamientos, las ratas se mantenían en sus jaulas, sin realizar actividad física en forma planificada.

Para valorar la progresión en la capacidad de desarrollar fuerza isométrica, se adaptó el protocolo utilizado por Krüger (Krüger et al., 2013), el cual está definido por el tiempo máximo de agarre (maximum holding time (MHT)), en segundos, que pueda realizar el animal, consistente en posicionar a las ratas cabeza arriba en posición vertical en la malla, tanto con sus patas traseras como con las delanteras. Se midió el tiempo, en segundos, hasta que retiraron sus patas traseras de la malla, considerando el mejor de tres intentos, con un periodo de descanso de 3 minutos entre cada intento. Este test fue aplicado al inicio y al final del periodo de entrenamiento de 12 semanas.

- Eutanasia de los animales y aislación de tejidos

Finalizado el periodo de protocolo de 12 semanas, tanto las ratas entrenadas como las no entrenadas fueron mantenidas en ayuno, con acceso libre al agua, por 8 horas, antes de la realización de una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT)(inyección intraperitoneal de 1mg de glucosa por kilogramo de masa corporal). Posterior a esta medición, se sometió a eutanasia a todos los animales ,por apertura de su caja torácica, previa sedación con ketamina (90 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) administrada por vía intraperitoneal. Bajo la supervisión del médico veterinario a cargo del Bioterio del Departamento de Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, se procedió a la extracción de sangre por punción cardíaca y a la aislación del bazo y grasas parda, subcutánea, retroperitoneal, mesentérica y epididimal, de todos los animales.

De la sangre extraída, una porción fue recogida en tubos con anticoagulante EDTA, de la cual se aisló plasma (centrifugación de la sangre anticoagulada por 5 minutos a 3000 rpm/RT, rescatando el sobrenadante). Otra porción de sangre fue incubada en un tubo de vidrio durante 1 hora a 37°C, de la cual se extrajo posteriormente el suero sanguíneo (se dejó a 4°C overnight, hasta retirar el coagulo al día siguiente y se centrifugó, el resto de la sangre por 20 minutos a 4000 rpm y 4°C, rescatando el sobrenadante). Del suero obtenido, una porción se destinó para realizar perfiles glicémicos y lipídicos, y el resto fue almacenado a -20°C, hasta posteriores análisis de citokinas a través de la técnica de ELISA y extracción y cuantificación de cfDNA. Los tejidos grasos extraídos fueron pesados en balanza digital (Radwag modelo AS220C2 (220 g x 0,1 mg)) en forma similar a Leopoldo (Leopoldo et al., 2016). De los bazos extraídos, 2 trozos de 25 mm² fueron embebidos en 500ul de RNA Later (RNA Later Stabilization Solution, ThermoFisher) por 24 horas a 4°C. Posteriormente se eliminó la fase líquida y se almacenaron a -80°C hasta la posterior extracción de RNA por técnica de Trizol (Invitrogen), detección de RNA en gel de agarosa al 2% (lectura de gel en espectrofotómetro marca Biotek, 320nm), descontaminación y transcripción reversa para la obtención del cDNA.

- Cuantificación de la abundancia del mRNA de TLR9, MyD88, SOCS1 y de las citokinas TNF α , IL-10 e IL-6 en el bazo, mediante RT-PCR.

Se cuantificó la abundancia del mRNA de TLR9, MyD88, SOCS-1 y de las citokinas TNF- α , IL-10 e IL-6, en el bazo, mediante técnica de RT-PCR (Stone One Plus Real-Time PCR System, Applied Biosystems) y uso de Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems), utilizando los siguientes partidores (IDT Inc., EEUU):

GADPH forward: 5' - GCC AGC CTC GTC TCA TAG ACA- 3'

GADPH reverse: 5' - TGG TAA CCA GGC GTC CGA TA- 3'

β - Actina forward: 5' - CTG TCC CTG TAT GCC TCT G -3'

β - Actina reverse: 5' - ATG TCA CGC ACG ATT TCC -3'

TLR 9 forward: 5' - CTA GAC GTG AGA AGC AAC CCT CTG- 3'

TLR9reverse: 5' - CAG CTC GTT ATA CAC CCA GTC GGC- 3'

MyD88 forward: 5' - GAT AGG CAT GTC AGG GGA GA- 3'

MyD88reverse: 5' - GCT GAC TTG GAG CCT GAT TC- 3'

SOCS-1 forward: 5' - GAA GGT GCG GAA GTG AGT GT- 3'

SOCS1 reverse: 5' - TGG TAG CAC GTA ACC AGG TG- 3'

IL-6 forward: 5' -TAG TCC TTC CTA CCC CAA TTT CC- 3'

IL-6 reverse: 5' -TTG GTC CTT AGC CAC TCC TTC- 3'

TNF- α forward: 5' -TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT -3'

TNF- α reverse: 5' - ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC- 3'

IL-10 forward: 5' - ATT TGA ATT CCC TGG GTG AGA AG-3'

IL-10 reverse: 5' - CAC AGG GGA GAA ATC GAT GAC A-3'

- Análisis de citocinas presentes en el suero sanguíneo:

El análisis de los niveles de las citocinas TNF- α e IL-10 presentes en el suero sanguíneo fueron realizados por técnica de ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay) utilizando los kits comerciales “Quantikine Rat TNF- α ” y “Quantikine Rat IL-10” (R&D Systems, Inc., EEUU). Las concentraciones son obtenidas a través de una curva de concentraciones, con límites de detección de 5 y 10 pg/ml para TNF- α e IL-10, respectivamente.

- Extracción y cuantificación de cfDNA

Se purificó el cfDNA presente en el suero sanguíneo de acuerdo a las instrucciones del kit comercial “NucleoSpin Plasma XS para purificación de dsDNA (DNA de doble cadena)” (Macherey-Nagel, Alemania)

La determinación de la concentración de dsDNA en las muestras fue realizada mediante medición de fluorescencia por SYBR Green, con un equipo lector de multiplaca “Glomax Multi Detection System” (Promega, EEUU). Se realizó una curva estándar a partir de un producto de PCR o DNA de concentración conocida y las diluciones seriadas se hicieron con el mismo Buffer de Elución del kit y SYBR Green (8,55: 1) en volumen dependiente de la cantidad de muestras a analizar.

El volumen final por pocillo fue de 200 μ l en placa de fluorescencia de 96 pocillos. En este caso, se utilizó el filtro Azul (Ex: 490 nm – Em 510/570nm) para la detección del SYBR Green y se utilizó el protocolo estándar de fluorescencia del equipo. Los resultados numéricos fueron analizados en Excel y a través de la ecuación de la recta de dicha curva, se calculó la concentración de dsDNA de cada muestra.

- Análisis estadístico

Para estimar el tamaño muestral apropiado de los grupos planteados en nuestra investigación y por tanto, detectar diferencias estadísticamente significativas entre estos, requerimos establecer los valores promedio esperados para el grupo control (X_c) y grupo experimental (X_e), estimar un valor para la varianza de una variable crítica para el estudio (DE), en este caso TNF- α (estimador de inflamación, según nuestra hipótesis de estudio), el error alfa y el error beta, según la siguiente fórmula:

$N = 2\{[(Z\alpha + Z\beta) * s] / (X_c - X_e)\}^2$, según García (García et al.2013) con:

N = tamaño muestral ;

$Z\alpha = 1,96$ (constante asociada al intervalo de confianza del 95%);

$Z\beta = 0,842$ (constante asociada a la mínima potencia estadística esperable, es decir 80%),

s = varianza que tiene el grupo de referencia para la variable crítica del estudio ($X_c - X_e$)= diferencia mínima esperada entre el grupo control y el grupo experimental para la variable crítica de estudio

Un estudio similar al nuestro, reportó valores de TNF- α del orden de $12,19 \pm 1,48$ (media \pm varianza) pg/ml, en ratas obesas y diabéticas (Wu et al., 2016). Esperamos una diferencia de al menos 3 pg/ml entre el grupo control y el grupo experimental. Al reemplazar los valores en la fórmula descrita, obtenemos que un mínimo de 4 ratas por grupo experimental es un valor apropiado para nuestra investigación.

Se determinó la distribución normal de los datos mediante el test de Shapiro- Wilks. Los parámetros sin distribución normal fueron analizados mediante la prueba de Kruskal Wallis y las pruebas de diferencias de medianas de Wilcoxon o de U de Mann Whitney, según corresponda el caso. Se utilizó además, el criterio de Pierce para eliminación de outliers y datos dudosos. Los datos son presentados como mediana [mínimo -máximo] con un nivel de significancia estadística de $p < 0,05$, los cuales fueron analizados a través del software estadístico IBM SPSS Statistics versión 24.

RESULTADOS.

1) Características de los animales en estudio:

8 Ratas Wistar macho, de 4 meses de edad (adultos) alimentadas desde los 2 meses, con una dieta alta en grasas (high fat diet (HFD)), fueron sometidas a un programa de entrenamiento de fortalecimiento muscular por un periodo de 12 semanas (grupo entrenado (GE)). Otras 7 ratas con las mismas características, pero no sometidas al programa de entrenamiento durante este periodo, sirvieron como grupo control (GC). Ambos grupos continuaron recibiendo la dieta HFD hasta el término del periodo de 12 semanas.

Previo al programa de entrenamiento, todas las ratas se encontraban en la categoría de obesidad, según el normograma de peso para ratas Wistar sanas, del laboratorio Charles River (Charles River Laboratories, 2018) (Figura 1) y cumplían con el criterio diagnóstico de DM2: glicemia de 250 mg/dl a los 120 minutos post carga aguda de glucosa durante un test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (Figura 2)

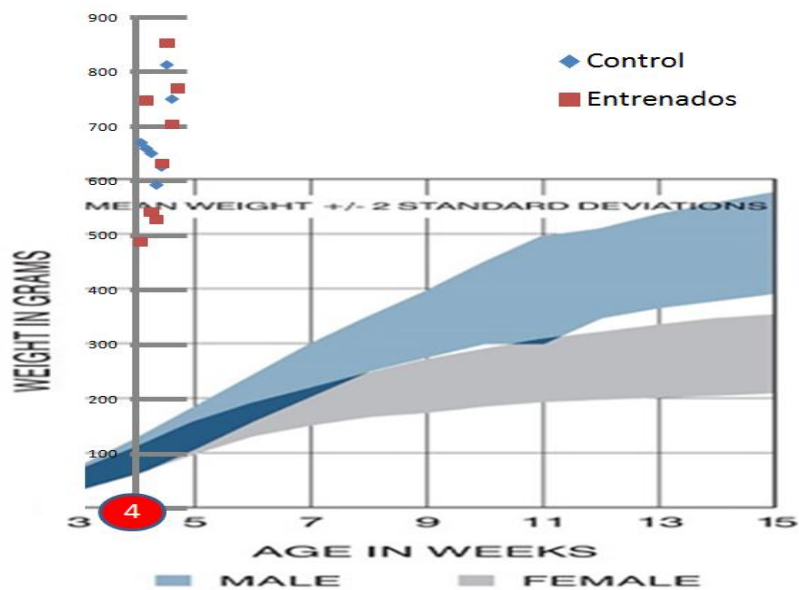


Figura 1: Distribución de los valores de masa corporal de las ratas Wistar control y entrenadas en forma previa al programa, comparado a normograma de masa corporal de ratas Wistar sanas. Se destaca la edad de las ratas al inicio del protocolo (4 meses)

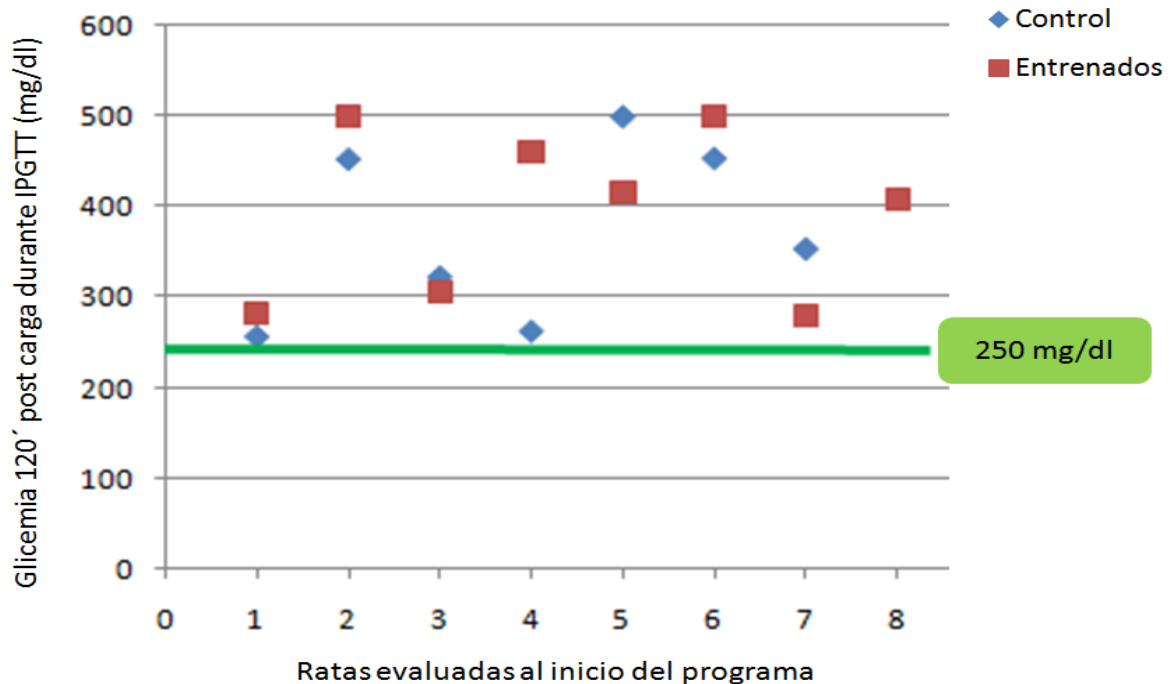


Figura 2: Distribución de valores de glicemia post carga aguda de glucosa medida a los 120 minutos durante un test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal de las ratas Wistar control y entrenadas, en forma previa al programa. Se destaca el valor de 250 mg/dl de glicemia como criterio diagnostico de DM2

Al evaluar la fuerza muscular al final de periodo de 12 semanas, se observó que el GE mostró mayores valores de MHT absoluto y relativo a su respectiva masa corporal (47[16-139] segundos y 65,45[15,18- 263,26] segundos/kilogramos) respecto al GC (18[10-22] segundos; $p=0,01$ y 27,82[11,96- 30,05] s/kg; $p= 0,02$) (tabla 1, anexos). Sin embargo, las ratas del GE mostraron una alta dispersión en la distribución de sus resultados, por lo que subdividimos el GE, en un grupo "respondedor al entrenamiento de fortalecimiento muscular "(GR), los cuales presentaron valores de MHT por sobre la mediana total del grupo, y el resto, con valores bajo ésta, las denominamos "subrespondedoras al entrenamiento de fortalecimiento muscular" (GSR). (Figuras 3 y 4). Para posteriores análisis consideraremos tres grupos experimentales: grupo control (GC) (n=7), grupo respondedor al ejercicio (GR) (n=4) y grupo subrespondedor al ejercicio (GSR) (n=4).

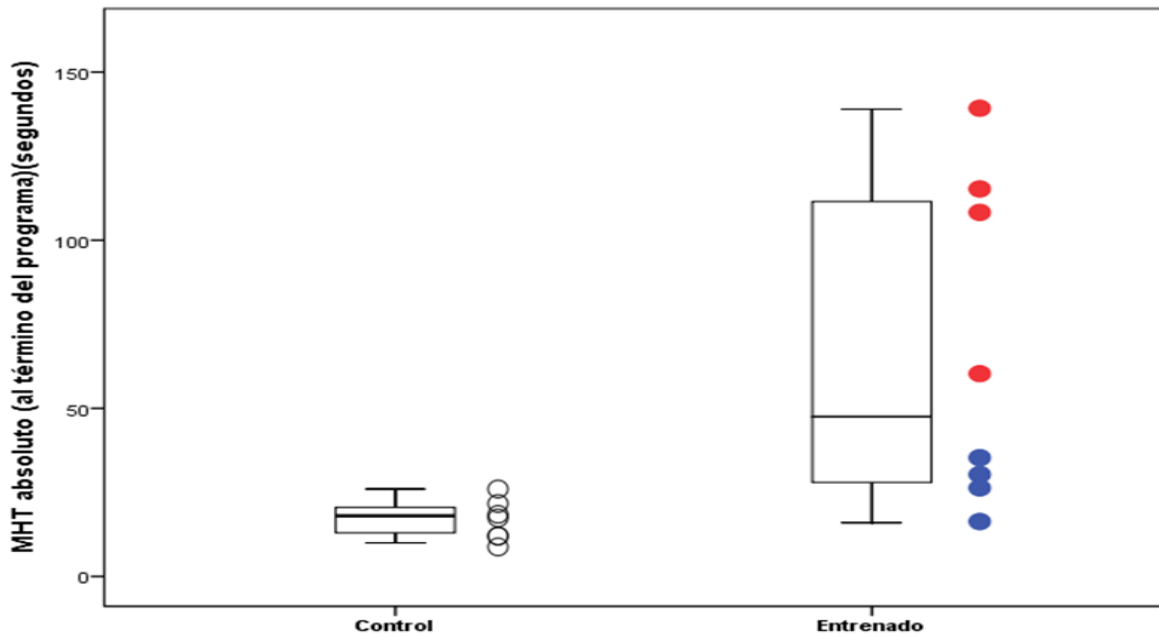


Figura 3: Distribución de los valores absolutos de MHT(en segundos) de ratas Wistar obesas y diabéticas no entrenadas (control) y entrenadas al término del programa de entrenamiento. En el grupo de ratas entrenadas se destacan aquellas que presentan valores de MHT absoluto sobre la mediana del grupo (GR) y las que presenta valores bajo este (GSR).

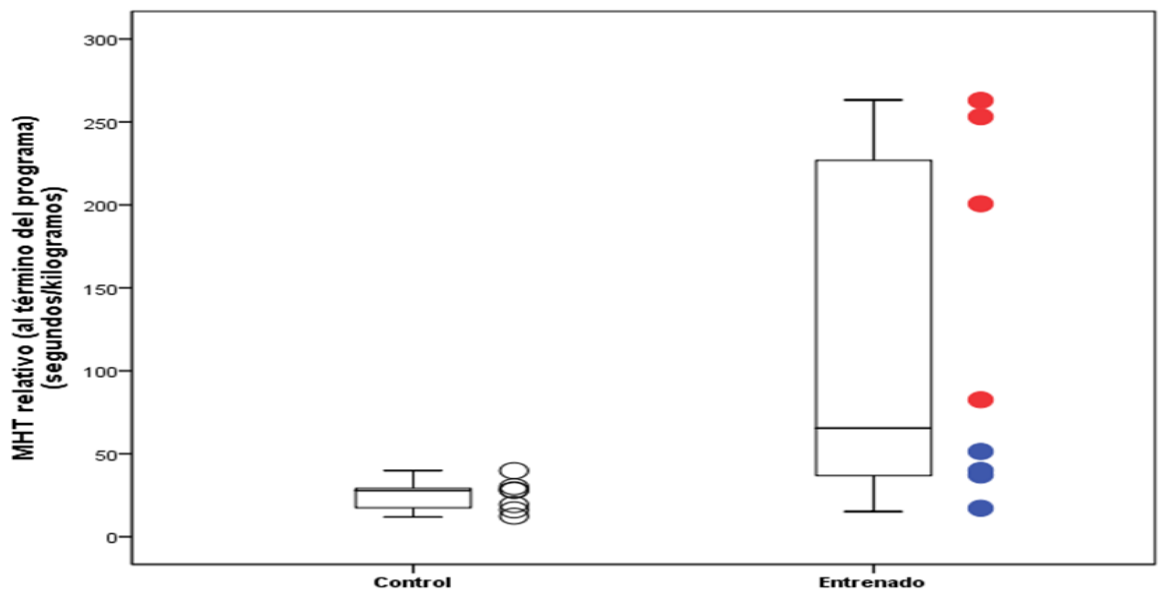


Figura 4: Distribución de valores de MHT relativos a masa corporal (en segundos/kilogramos) de ratas Wistar obesas y diabéticas no entrenadas (control) y entrenadas al término del programa de entrenamiento. En el grupo de ratas entrenadas se destacan aquellas que presentan valores de MHT relativo sobre la mediana del grupo (GR) y las que presenta valores bajo este (GSR).

2) Efecto del programa de entrenamiento de fortalecimiento muscular en la concentración de citocinas en el suero sanguíneo:

Se determinó la concentración de la citocinas TNF- α e IL-10 presentes en el suero sanguíneo al final del periodo de entrenamiento, tanto para el grupo entrenado como para el grupo no entrenado mediante técnica de ELISA. Los resultados son expresados como "TNF- α " (en pg/ml) e "IL-10" (en pg/ml). Nuestros resultados muestran que el GR presentó menores valores de TNF- α (17,65[14,71- 20,59] pg/ml), respecto del GC (41,17[26,47- 138,24] pg/ml; $p=0,017$) y del GSR {(33,82 [23,53-150] pg/ml). IL-10 no fue detectada en las muestras de los grupos experimentales (figura 5) (tablas 2a y 2b, anexos).

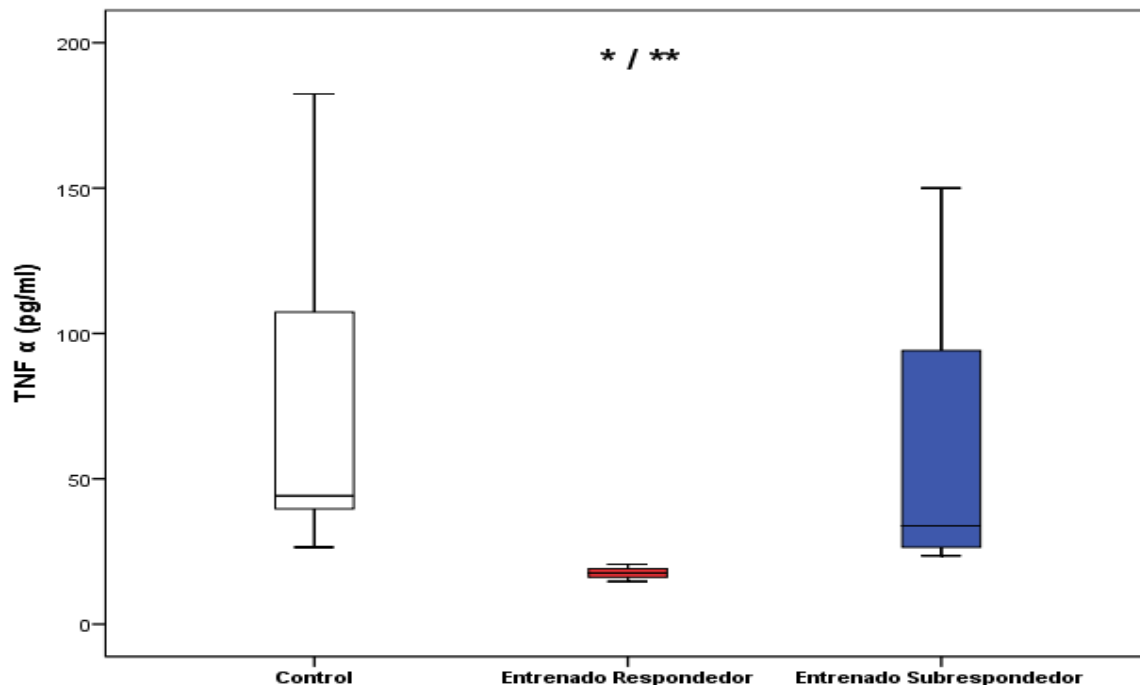


Figura 5: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la concentración de TNF- α en el suero sanguíneo de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. Medido en forma posterior al programa de entrenamiento. * $p < 0,05$ respecto a GC; ** $p < 0,05$ respecto a GSR

3) Efecto del programa de entrenamiento de fortalecimiento muscular en la expresión del mRNA de citocinas en el bazo:

Considerando que el gen de control interno (housekeeping gene) no debe cambiar entre las condiciones experimentales planteadas, determinamos si los genes de control interno GADPH y/o β actinas son adecuados para su uso. Comparamos los valores de 2^{-Ct} entre los grupos experimentales para ambos genes, según lo planteado por Schmittgen (Schmittgen et al., 2008).

Nuestros resultados muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p > ns$) para ambos genes, es decir, no hay cambios dados las distintas situaciones experimentales. Sin embargo, al evaluar la razón de los promedios de los valores de 2^{-Ct} del grupo entrenado respecto al control, observamos que para β actinas este valor es cercano a 1, indicando que los valores de 2^{-Ct} son similares entre el grupo control y el grupo entrenado, es decir, este gen de control interno cambia muy escasamente entre las condiciones experimentales; en cambio, al hacer este mismo análisis para GADPH, el valor de la razón de 2^{-Ct} entre grupos es cercana a 2, es decir, la expresión de GADPH es casi el doble en el grupo entrenado respecto al control.

Otro método para evaluar el cual es el mejor housekeeping gene, es el propuesto por Mane (Mane et al., 2008), el cual considera analizar el promedio de los Ct para cada condición experimental: aquellos que muestren menores desviaciones estándar, indican menores diferencias en la expresión del control interno entre las condiciones experimentales. En este caso, las desviaciones estándar para β actinas fueron menores comparado al análisis de GADPH. Por estas razones, decidimos utilizar β actinas como gen de control interno (tablas 3a, 3b, 3c y 3d, anexos).

Posterior a este análisis, se determinó la expresión del mRNA relativa a β actinas, para los genes TNF α , IL-6 e IL-10 en los grupos estudiados mediante técnica de PCR. Los resultados son expresados como "veces de cambio de la expresión del mRNA de un gen de interés respecto a β actinas", para cada condición experimental. Para ello, se calculó las veces de cambio respecto al control interno (β actinas)), de

la expresión de mRNA de un gen en particular dada la condición experimental (GC, GR o GSR) definida como:

"(-1 / Diferencia de expresión entre condición experimental y β actinas del mRNA para un gen de interés)", siendo la diferencia de expresión de mRNA para un gen de interés: $2^{-\Delta\Delta C_t}$ gen de interés condición experimental : $(Ct_{\text{gen de interés condición experimental}} - Ct_{\beta\text{-actinas condición experimental}}) - (Ct_{\text{gen de interés blanco}} - Ct_{\beta\text{ actinas blanco}})$ (Schmittgen et al., 2008).

Observamos que el GR presentó menores valores de expresión del mRNA de las citocinas proinflamatorias IL-6 respecto al GC (-9,2 [-29- -5,1] v/s -3,1 [-9 - -0,92]; $p=0,023$). En el caso de TNF- α , el GR también mostro menores valores de expresión respecto al GC, sin embargo, no alcanzó significación estadística. No observamos diferencias en los valores de IL-10 entre los grupos (figuras 6, 7 y 8) (tablas 4a y 4b, anexos).

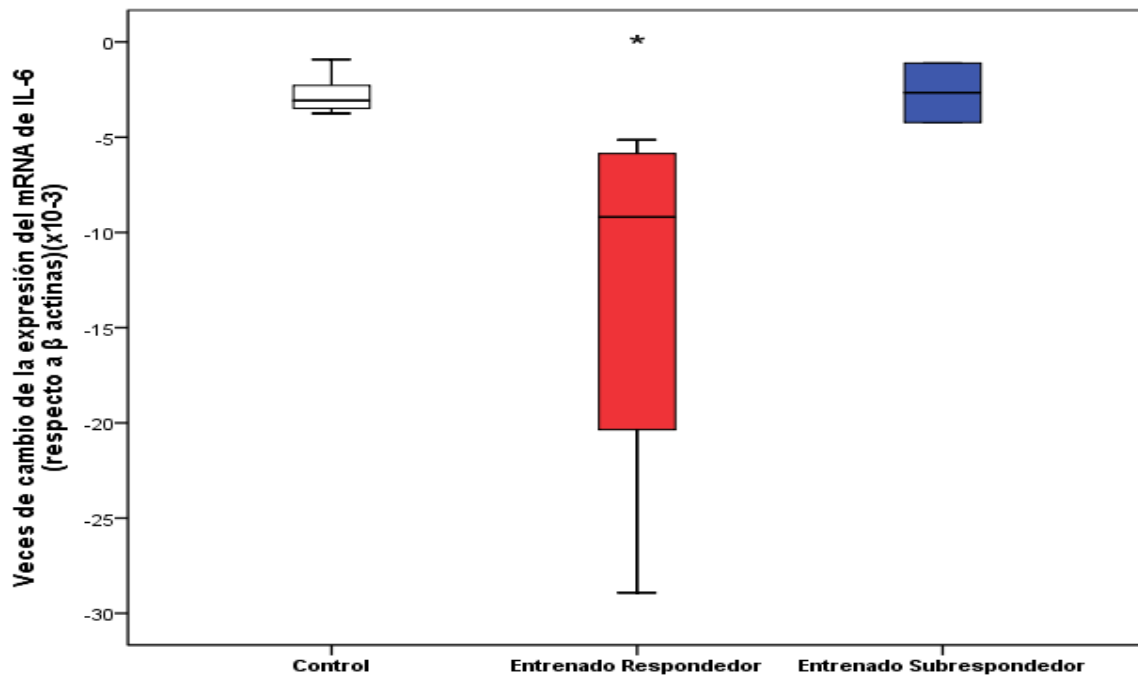


Figura 6: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la expresión del mRNA de IL-6 de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. El análisis fue realizado al finalizar el programa de entrenamiento. * $p < 0,05$ respecto a GC.

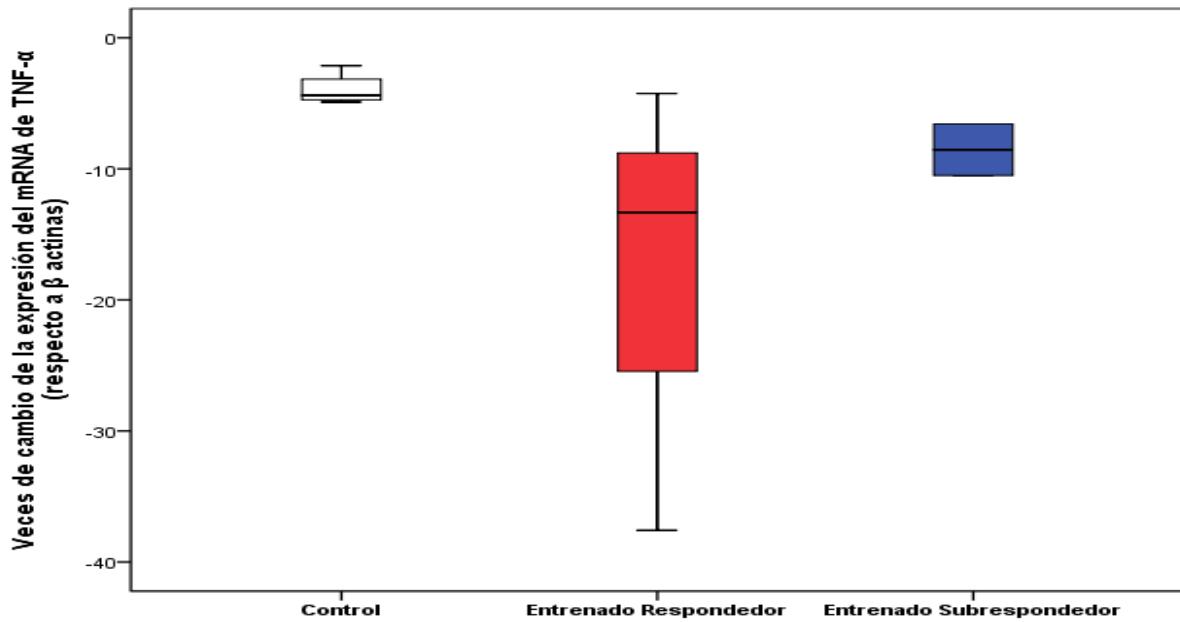


Figura 7: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la expresión del mRNA de TNF- α de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. El análisis fue realizado al finalizar el programa de entrenamiento.

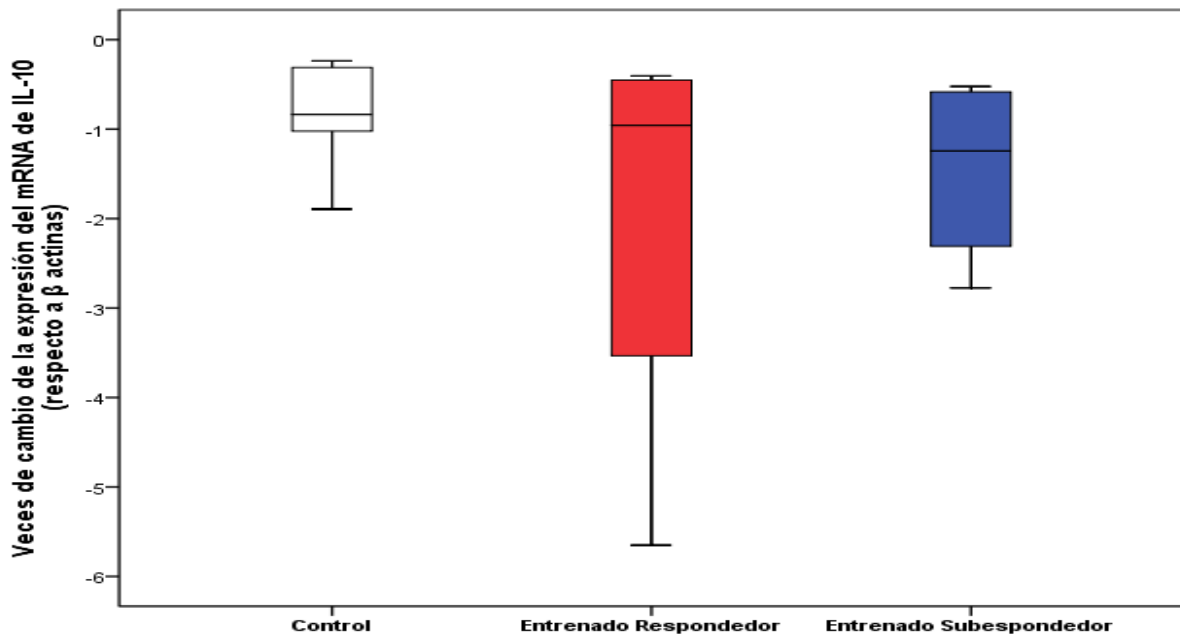


Figura 8: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la expresión del mRNA de IL-10 de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. El análisis fue realizado al finalizar el programa de entrenamiento.

4) Efecto del programa de entrenamiento de fortalecimiento muscular en la concentración de cfDNA en el suero y plasma sanguíneo:

Se compararon los valores de cfDNA en suero y plasma sanguíneo, al finalizar el programa de entrenamiento entre el grupo entrenado y el no entrenado. Los resultados fueron analizados como "pool del conjunto de individuos para cada tipo de muestra y condición experimental" y son mostrados como "concentración cfDNA" y como "% de cambio en entrenados respecto a control". Como se observa en la figura 9, los sujetos entrenados tuvieron una concentración casi 50% menor de cfDNA en el suero respecto a los no entrenados. Esta cuantificación de cfDNA también fue realizado en muestras de plasma e interesantemente se encontró que aún cuando se trataba de los mismos individuos, las diferencias observadas fueron mínimas entre los grupos (figura 9)(tabla 5, anexos).

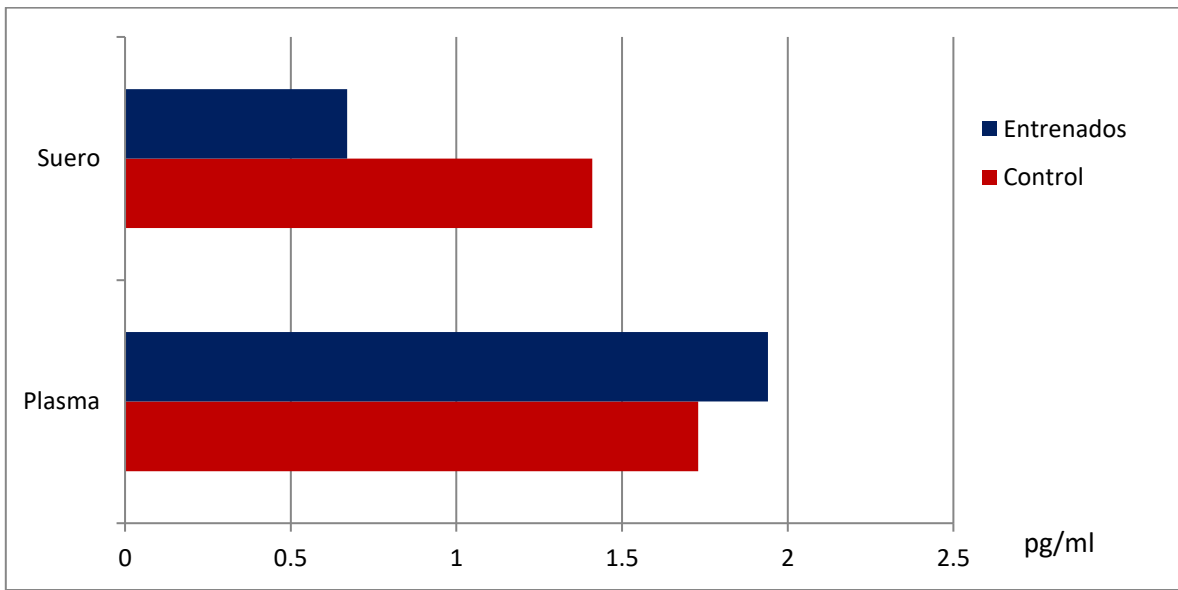


Figura 9: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la concentración de cfDNA en el suero y plasma sanguíneo de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. El análisis fue realizado al finalizar el programa de entrenamiento. Cada animal contribuyó en forma equivalente al volumen final del pool de los respectivos grupos analizados.

5) Efecto del programa de entrenamiento de fortalecimiento muscular en la expresión del mRNA de la vía de señalización de TLR9 en el bazo:

Considerando las diferencias observadas entre los grupos experimentales, en la expresión de las citocinas inflamatorias y la presencia de cfDNA, nos propusimos, entonces, evaluar si en estas condiciones, existía alguna modificación en la vía de señalización de TLR9. Para ello, se determinó la expresión del mRNA de los genes TLR9, MyD88 y SOCS1 por técnica de PCR. Los resultados son expresados como "veces de cambio de la expresión del mRNA de un gen de interés respecto a β actinas " para cada condición experimental, según el cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito en el ítem 4 de resultados. Como se observa en la figura 10, los grupos entrenados (GR y GSR) tienen una menor expresión del mRNA del receptor TLR9 en relación al GC, sin embargo, no alcanzan significancia estadística. Además, se observaron menores expresiones de MyD88 en los grupos entrenados, en especial del GSR respecto al GC (87,07[-96,71- -11,42] v/s 1,90 [-5,99 - -0,12]; p= 0,0167) (figura 11). Finalmente, la expresión de SOCS-1, inhibidor de la vía, fue mayormente inhibida en el GR respecto al GC(-0,68[-0,98- -0,61] v/s -0,42[-0,53- -0,09]; p= 0,0167) (figura 12) (tablas 6a y 6b, anexos)

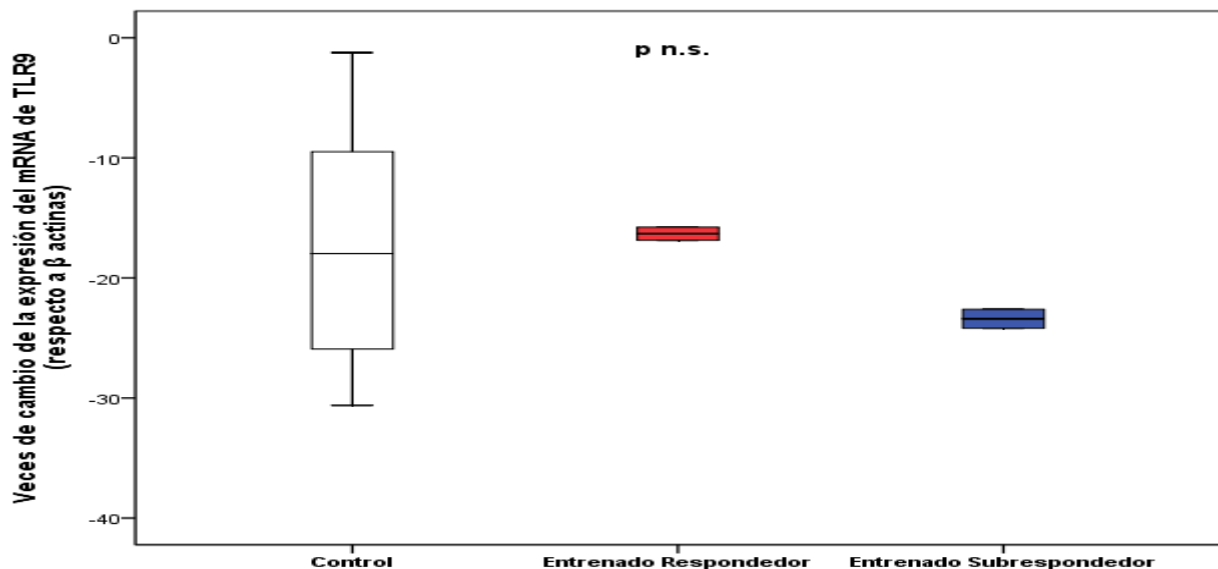


Figura 10: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la expresión del mRNA de TLR9 de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. El análisis fue realizado al finalizar el programa de entrenamiento. p=ns

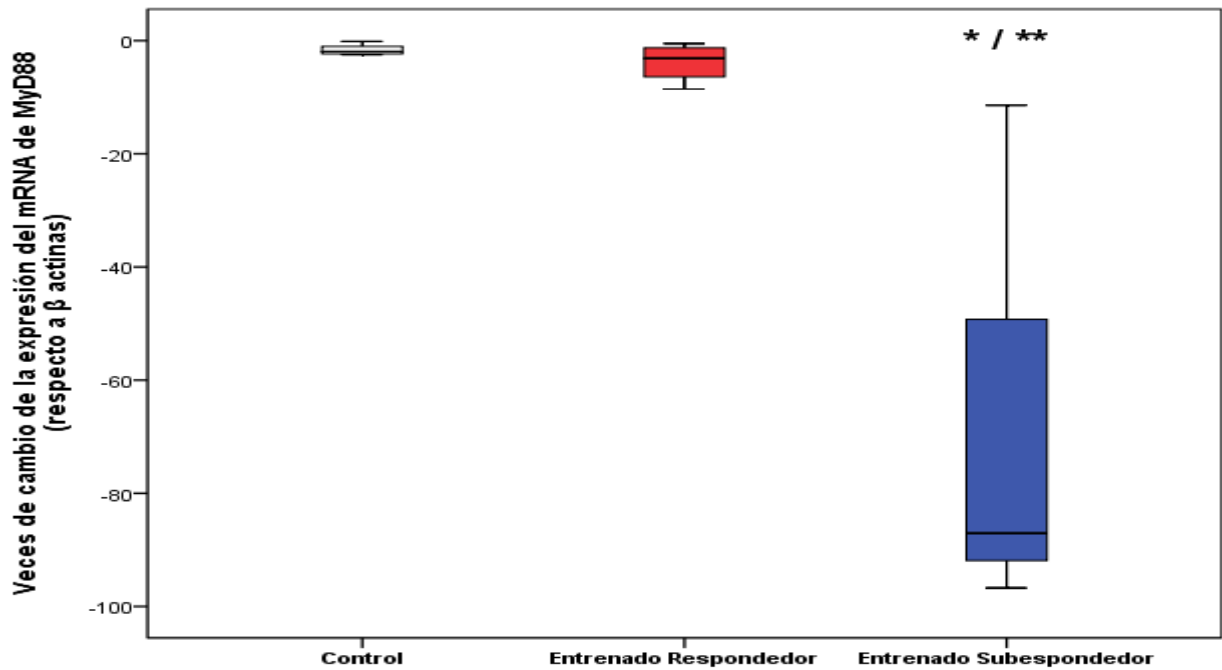


Figura 11: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la expresión del mRNA de MyD88 de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. El análisis fue realizado al finalizar el programa de entrenamiento. * $p < 0,05$ respecto a GC; ** $p < 0,05$ respecto a GR

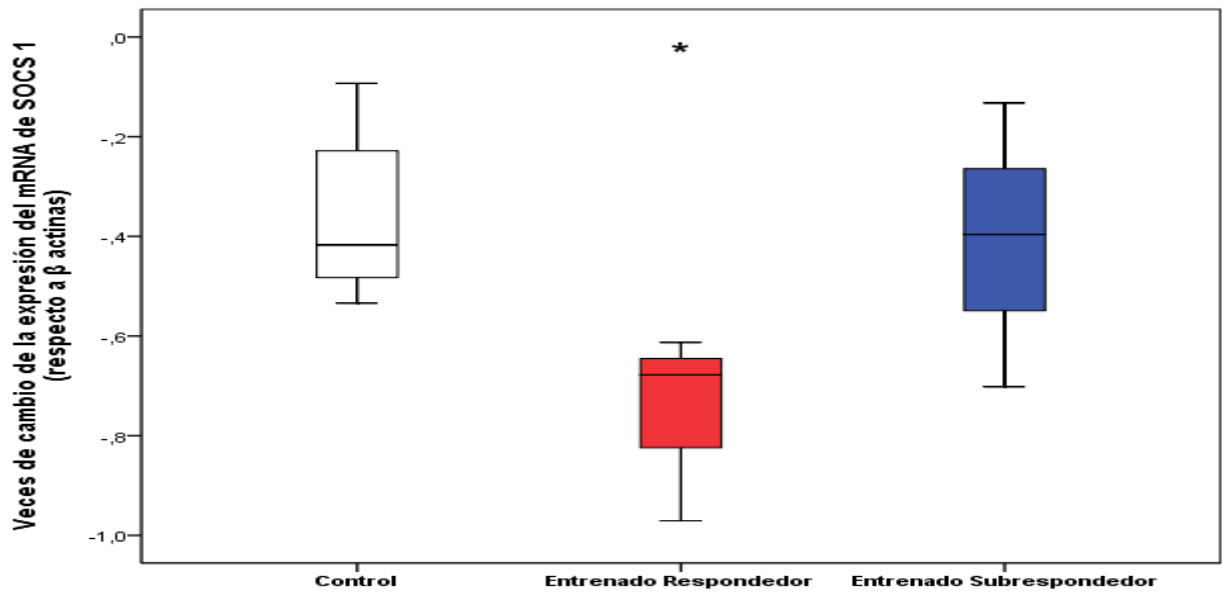


Figura 12: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la expresión del mRNA de SOCS-1 de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. El análisis fue realizado al finalizar el programa de entrenamiento. * $p < 0,05$ respecto a GC.

6) Efecto del programa de entrenamiento de fortalecimiento muscular sobre parámetros funcionales:

Se evaluó la capacidad de sujeción de los animales a una superficie, expresado como el tiempo máximo de agarre (MHT), ya sea de manera absoluta (en segundos) o normalizado por su masa corporal (en kilogramos). Los resultados son mostrados como "Fuerza absoluta = MHT (en segundos)" y "Fuerza relativa= MHT (en segundos)/masa corporal (en kilogramos)". Interesantemente, observamos que el GR mostró mayores valores de fuerza absoluta (115 [108-139]s) y relativa (253,3 [200,37-263,26] s/kg) respecto del GC(18 [10-22]s; p=0,008) (27,82 [11.96-30,05] s/kg; p=0,008) y del GSR (28 [16-35]s; p=0,021) (36,80 [15,1849,72]s/kg ;p=0,021). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el GC y el GSR tanto en términos absolutos como relativos (tablas 7a y 7b, anexos).

7) Efecto del programa de entrenamiento de fortalecimiento muscular sobre parámetros biométricos:

a) Masa corporal: se midió la masa corporal total de cada animal, con balanza digital para todos los grupos experimentales, en forma previa al protocolo de entrenamiento y en forma posterior a este periodo, calculando además, los cambios en la masa corporal de cada individuo a lo largo del programa. Los resultados son mostrados como "Masa corporal previa al programa", "Masa corporal posterior al programa" y "diferencia de masa: masa corporal posterior a programa -masa corporal previo a programa" (en gramos). Nuestros resultados muestran que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en forma previa al programa. Sin embargo, al final del periodo observamos que el GR presentó una disminución significativa de su masa corporal(-5[-35- -2]g) mientras que el GC y GSR mostraron incrementos de éste (GC: 24[9-85]g; p=0,008 y GSR: 50,5 [16- 201]g; p=0,021) (tablas 8a y 8b, anexos).

b) Masa grasa: con balanza digital se cuantificó la masa de la grasa parda, grasa subcutánea, sumatoria (SUM) de grasa visceral (compuesta por la grasa retroperitoneal, mesentérica y epididimal) con posterioridad a la eutanasia de los animales (todos los tejidos de ambos grupos son extraídos por el mismo operador). Los resultados son mostrados en términos absolutos o en forma relativa a su masa corporal total. Nuestros resultados muestran que el GR presentó menores valores de grasa visceral relativa (29,24 [25,94- 31,54] g/kg), grasa subcutánea relativa (7,44 [7,24- 9,54] g/kg) y grasa parda absoluta (0,35 [0,21- 0,40] g), respecto al GC {(58,25 [45,52- 69,07] g/kg; p=0,038) (16,23 [13,26- 30,86] g/kg; p= 0,038) (0,66 [0,51- 0,90] g; p=0,023). También se observó en el GR menores valores tanto de masa grasa visceral relativa (29,24 [25,94- 31,54] g/kg) como absoluta (15,44 [11,78- 17,00] g) respecto al GSR {(61,16 [57,97-71,55] g/kg; p=0,021) (51,31 [40,81- 62,33] g; p=0,043) (tablas 9a y 9b, anexos).

8) Efecto del programa de entrenamiento de fortalecimiento muscular sobre parámetros metabólicos de control lipídico:

Se compararon los valores de triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL, y colesterol LDL (expresados en mg/dl) medidos en el suero sanguíneo posterior a 6 horas de ayuno. Además se evaluaron diferencias en los índices "colesterol no HDL= colesterol Total - colesterol HDL", "Colesterol total/colesterol HDL" y "colesterol HDL/colesterol LDL". Nuestros resultados muestran que en el GR hubo valores mayores de colesterol HDL (19,26[19,04- 21,67] mg/dl) respecto del GC (15,48[15,37- 15,71 mg/dl]; p= 0,014). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales para el resto de los análisis de los lípidos señalados (tablas 10a y 10b).

9) Efecto del programa de entrenamiento de fortalecimiento muscular sobre parámetros metabólicos de control glicémico

a) HbA1c: se compararon los porcentajes de glicosilación de la fracción A1c de la hemoglobina (HbA1c), al finalizar el programa de entrenamiento entre los grupos de trabajo. Los resultados son mostrados como "% HbA1c" (en porcentaje). Nuestros resultados muestran que este programa de entrenamiento tiene efectos en el control metabólico de la glicemia valorado a través de la cuantificación de HbA1c, dado que en el GR se observaron valores significativamente menores de HbA1c (3,7[3,5-4,0]%) respecto del GSR (4,3[3,9- 4,9]%; $p=0,042$) (tablas 11a y 11b, anexos).

b) Glicemias de ayuno (6 horas de ayuno, previo a test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal): se compararon los valores de glicemia de ayuno (en mg/dL) entre los grupos experimentales, en forma previa y al finalizar el programa de entrenamiento. Los resultados son mostrados como "Glicemia de ayuno" (en mg/dL). No habían diferencias entre los grupos previo al programa. Sin embargo, se observó que al finalizar el programa de entrenamiento, el GR presentó menores valores de glicemia de ayuno (70[69- 86]mg/dl) respecto del GC (99[82- 119] mg/dl; $p=0,033$) y del GSR (96[90-112]mg/dl; $p=0,021$) (tablas 11a y 11b, anexos) demostrando que este programa de entrenamiento tiene efectos benéficos en el control metabólico de la glicemia.

c) Glicemias post carga a los 120 minutos (test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal): se compararon los valores de glicemia a los 120 minutos posteriores a la inyección intraperitoneal de 1mg de glucosa / kilo de masa corporal, entre los grupos entrenado y no entrenado, en forma previa y posterior al programa de entrenamiento. Nuestros resultados muestran que el GR presentó menores valores de glicemia post carga de glucosa a las 2 horas(183[131- 312]mg/dl), respecto del GC (383[338-424]; $p=0,011$) y del GSR (434[371-500]mg/dl; $p=0,021$) (tablas 11a y 11b, anexos), demostrando, nuevamente, que este programa de entrenamiento tiene efectos benéficos en el control metabólico glicémico.

d) Índice de resistencia a la insulina a través de HOMA: se compararon los valores de glicemia (mg/dL) de ayuno e insulinemia (ng/dL) en ayuno, medidos en el suero sanguíneo, posterior a 6 horas de ayuno, entre los grupos experimentales, en forma posterior al programa de entrenamiento. Estos valores permitieron calcular el Índice de resistencia a la insulina según el modelo HOMA, basado en la fórmula "HOMA IR= {[Glicemia ayuno suero (mg/dl) x Insulina suero(ng/dl)] / 405} (Roza et al., 2016). Interesantemente, pese a los efectos previamente observados en los marcadores de metabolismo glicémico (HbA1c, glicemia en ayunas y glicemia a los 120 minutos durante prueba de tolerancia), el índice HOMA IR no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (tabla 11c, anexos).

DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en esta investigación permiten sostener que el entrenamiento de fortalecimiento muscular de tipo isométrico tiene un rol en el tratamiento y posiblemente también en la prevención de patologías metabólicas con un componente inflamatorio sistémico, tales como la obesidad y DM2. Es decir, nuestros resultados permiten fundamentar la prescripción de esta estrategia de tratamiento no farmacológica en estos individuos.

El programa de fortalecimiento muscular utilizado en nuestro estudio fue anteriormente reportado en la literatura internacional. El grupo de Mardare (Mardare et al, 2016) estudió ratones obesos C57BL/6 machos, alimentados con una dieta HFD, y los sometió a un programa de fortalecimiento muscular de tipo isométrico, consistente en la sujeción en sentido vertical a una malla, realizándose sesiones 5 veces por semana, con una dosificación de 3 series de un minuto y un minuto de descanso entre ellas, por sesión, durante 10 semanas. Sin embargo, los ratones obesos de aquel estudio no eran diabéticos, diferencia fundamental con el estudio realizado en esta tesis.

Este mismo estudio, al igual que el nuestro, mostró que los ratones entrenados con este protocolo de fortalecimiento muscular, mostraron una ganancia de peso menor comparada a los no entrenados y una reducción significativa de los valores de glicemia frente al desafío de postcarga aguda de glucosa (Mardare et al, 2016). En nuestro grupo experimental, observamos que aquellas ratas que presentaron mejoras en los parámetros del control glicémico también lograron mejoras significativas en los tiempos máximos de sujeción.

Kruger (Kruger et al, 2013) reportó previamente que los incrementos en el tiempo máximo de sujeción están asociados a hipertrofia muscular de fibras musculares tipo II e incremento del contenido de la proteína de GLUT4 y lo que podría explicar el impacto benéfico del entrenamiento de fortalecimiento muscular, observado en el control metabólico glicémico. Si bien la valoración de estas variables (hipertrofia muscular y/o expresión de GLUT4) no fueron parte los objetivos de nuestro estudio,

sus modificaciones inducidas por el ejercicio resultan una explicación plausible respecto de las mejoras en los parámetros de control glicémico inducidas por el entrenamiento de fortalecimiento muscular observada en nuestro estudio.

A diferencia de los mayores valores de colesterol HDL para el GR reportados en nuestra investigación, el estudio de Mardare (Mardare et al, 2016) reportó que las variables bioquímicas relativas al control lipídico no fueron modificadas en forma significativa por el protocolo de entrenamiento utilizado. Se sabe que los efectos benéficos del entrenamiento de fortalecimiento muscular sobre las vías metabólicas e inflamatorias, están asociados a la disminución de los niveles de los marcadores proinflamatorios circulantes en el suero sanguíneo, y estos mismos autores (Mardare et al, 2016) demostraron disminución de la actividad inflamatoria sistémica a través de la valoración de marcadores proinflamatorios CD40, IL-18, MIP-1 y Timp-1, en los animales del grupo entrenado. En nuestro estudio, encontramos una disminución significativa de la concentración de la citokina proinflamatoria TNF- α en el suero del grupo de ratas GR. Esta disminución significativa de la respuesta proinflamatoria, inducida por el entrenamiento de fortalecimiento muscular en ratas obesas y diabéticas, valorada por esta citokina, fue también reportada por otros autores (Strasser et al., 2013; Gleeson et al., 2011).

Interesantemente, la disminución de la concentración de TNF- α observada en el suero sanguíneo del GR respecto al GC y GSR, estuvo acompañada solo de una tendencia a la disminución de la abundancia de su mRNA en el GR, sin alcanzar significación estadística. Sin embargo, observamos una disminución significativa de la abundancia del mRNA de otra citokina proinflamatoria: IL-6, donde los niveles de su expresión fueron significativamente menores en el GR respecto a los otros.

Esta ausencia de correlación entre los niveles de mRNA y la expresión de la proteína TNF- α , puede ser explicado, al menos en parte, por la variedad y complejidad de los mecanismos involucrados en la traducción del mRNA a proteína, comenzando por la estabilidad del mRNA y seguidos por la estabilidad de la proteína y las técnicas para pesquisar la presencia de la proteína (Liu et al. 2016). Se ha observado que durante ciertas condiciones especiales, como el estrés celular, la

célula inicia la traducción de algunos mRNA en forma preferencial (Dever, 2002), por lo que no necesariamente el mRNA cuantificado se traduce en una cantidad proporcional de proteína. Además, la producción de proteínas posterior a la transcripción del mRNA, está regulada por la asociación del mRNA a los ribosomas. Se sabe que a mayores porcentajes de mRNA asociados a ribosomas, la correlación entre los niveles de expresión de mRNA y su correspondiente proteína, será mayor, lo que representa un mecanismo celular para controlar la producción de proteínas (Greenbaum et al. 2003).

Otro aspecto que puede explicar la falta de correlación entre los niveles de mRNA y proteínas, es que las proteínas pueden tener distintos tiempos de vida media, resultado de las distintas tasas de síntesis y degradación a las que están sometidas, incluso al comparar proteínas que tienen funciones semejantes (Glickman et al., 2004). Además, modificaciones a nivel post traduccional como fosforilaciones, acetilaciones y glicosilaciones pueden modificar la estabilidad de la proteína y por tanto también afectar su vida media (Liu et al., 2016). Incluso, la tasa de degradación de las proteínas pareciera tener una relación directa con la concentración a la cual se encuentra en el lugar evaluado. Existe evidencia de que la presencia de mayores concentraciones de TNF- α en el suero determinan una vida media mayor, en comparación a valores más bajos (Lee et al., 2016)

Finalmente, no podemos obviar los errores, sesgos y ruidos que pueden tener las técnicas de cuantificación de proteínas y mRNA, lo que limita nuestra capacidad de obtener una imagen clara de lo que realmente está ocurriendo a nivel del mRNA y de la proteína (Greenbaum et al. 2003).

Si bien encontramos en nuestras ratas obesas y diabéticas una disminución significativa de la respuesta proinflamatoria inducida por el entrenamiento de fortalecimiento muscular, no observamos cambios en la actividad antiinflamatoria. En nuestro estudio, la actividad antiinflamatoria fue valorada por medio del análisis de la abundancia del mRNA IL- 10, para el cual no encontramos diferencias significativas entre los grupos estudiados. La valoración de la expresión de la proteína de esta citokina en muestras de suero en los diferentes grupos resultó en valores por bajo el

umbral de detección del ensayo utilizado (10 pg/ml). Esta ausencia de cambio en la expresión de IL-10 podría ser explicado por la corta vida media de esta citokina en sangre. Pedersen (Pedersen et al. 2010) reportó un vida media de menos de 60 minutos post ejercicio agudo en humanos (maratón). Sin embargo, Batista (Batista et al., 2010) observó en ratas que entrenaban 5 días a la semana por 8 semanas al 55% - 65% VO₂peak, incrementos de IL10 en los sóleos, aun 24 horas posteriores a la última sesión de entrenamiento, planteando un posible patrón diferencial de estabilidad de esta citokina según el sitio de liberación y el programa de entrenamiento.

Para explicar los efectos del entrenamiento de fortalecimiento muscular en la disminución de la actividad proinflamatoria, planteamos que uno de los mecanismos involucrados sería la regulación de la expresión y funcionalidad de la vía de señalización del receptor TLR9 inducida por el ejercicio físico, tal como ocurre con otros receptores tipo TLR. Se sabe que los PBMC de sujetos sanos físicamente activos tienen una menor expresión de receptores TLR2 (Durrer et al., 2017), y TLR4 (Lancaster et al., 2005) y una capacidad significativamente inferior para producir citokinas proinflamatorias mediadas por ellos, que los sujetos sanos inactivos (Lancaster et al., 2005; Durrer et al., 2017). Hasta el momento, no existe evidencia de si el ejercicio físico modifica o no la expresión y actividad de TLR9.

Nuestros resultados muestran en el GR una menor abundancia del mRNA del receptor TLR9, en las células inmunes estudiadas, como también de la proteína adaptadora de señalización de esta vía, MyD88, comparado al GC. Esta menor cantidad de receptores de TLR9 disponibles y una menor expresión de las moléculas envueltas en su cascada de señalización, tales como MyD88, explicarían que la activación de la vía de señalización de TLR9 podría ser menor, es decir, favorecería un ambiente con menor presencia de citokinas proinflamatorias.

Tal como esperábamos, aquellos sujetos que mostraron mayores aumentos en su fuerza muscular secundario al programa de entrenamiento muscular (GR), mostraron una menor expresión del mRNA de TLR9 y de la proteína MyD88, lo cual parece estar relacionados con la disminución de la actividad proinflamatoria observada,

valorada como menores valores de la citokina proinflamatorias TNF- α circulante y del mRNA de IL6, sin cambios en la citokina antiinflamatoria estudiada. Asociado a este mejor desempeño funcional (fuerza) y a la disminución de la actividad proinflamatoria, los animales del GR lograron además mejoras en los parámetros de control glicémico medidos (glicemia en ayuno y post carga aguda de glucosa y HbA1c) respecto al grupo no entrenado y al grupo subrespondedor al ejercicio.

Observamos además en el GR una menor expresión del mRNA de la proteína SOCS-1, reguladora negativa de la actividad de MyD88. A partir, de nuestra hipótesis esperábamos encontrar una mayor expresión SOCS-1 inducida por el entrenamiento, como mecanismo que explicaría la inhibición de la respuesta proinflamatoria de la vía TLR9. Sin embargo, la menor expresión de SOCS-1 inducida por el entrenamiento, podría reflejar, más que ser causal de la inhibición de la actividad inflamatoria mediada por TLR9, una consecuencia de ella. Es decir, la menor actividad proinflamatoria observada en el GR, podría implicar la existencia de una retroalimentación negativa de la expresión de SOCS-1, postulado que nos parece interesante evaluar en el futuro.

Interesantemente, la menor expresión de SOCS-1 podría tener implicancias más o menos directas en la mejoría del control glicémico. Se sabe que el aumento de la producción de citokinas inflamatorias, tales como TNF- α e IL-6 pueden inducir directamente resistencia a la insulina. Se ha visto, por otra parte, que en animales obesos resistentes a la insulina, la supresión de la activación del receptor de insulina (InsR) y su asociación con los sustratos de este receptor (IRS), inhibe la vía de señalización de esta hormona, explicando el desarrollo de insulinoresistencia (Dou, 2013). Ante la exposición a citokinas, las células inmunes pueden expresar supresores de la señalización de citokinas (suppressors of cytokine signaling -SOCS) los cuales actúan como reguladores negativos de estas moléculas (Feng, 2014). Sin embargo, además de este rol fisiológico, los SOCS pueden actuar como reguladores negativos de la vía de transducción de la insulina pudiendo contribuir al desarrollo de resistencia a la insulina y de DM2 (Wada, 2011). Se sabe que la sobreexpresión de SOCS-1 inducida por aumentos de las citokinas inflamatorias (Feng, 2014) puede

alterar la interacción entre InsR y IRS-1, causando así resistencia a la acción de esta hormona en el hígado (Rui, 2002), adipocito (Zheng, 2013) y/o músculo (Lu, 2013) de ratas. Es decir, altos niveles de citokinas proinflamatorias conducen a la sobreexpresión de SOCS-1 en tejidos sensibles a la insulina, los cuales inducen resistencia a esta hormona por inhibición de su vía de señalización. Por lo tanto, proponemos que la menor expresión de SOCS1 observada en nuestro estudio en los animales del GR permitiría explicar una vía involucrada en la mejoría del control glicémico observada en este grupo.

Nuestros resultados muestran que menores niveles de citokinas proinflamatorias conducen una menor expresión de SOCS-1, limitando su acción inhibitoria en la vía de señalización de la insulina y favoreciendo, por otra parte, el control metabólico glicémico observado.

En la vía de señalización de TLR9, su ligando endógeno es el cfDNA, el cual se sabe está aumentando en trastornos metabólicos tales como obesidad y DM2 (Nishimoto et al. 2016). Por otra parte, la evidencia muestra que la realización de ejercicio de tipo cardiorrespiratorio en humanos sanos (Velders et al. 2014; Fatouros et al., 2010; Atamaniuk et al., 2004; Margeli et al., 2006) y a corto plazo, determina aumentos de los niveles circulantes de cfDNA. Sin embargo, no existen antecedentes en relación a los efectos del entrenamiento de fortalecimiento muscular en los niveles circulantes de cfDNA en patologías metabólico -inflamatorias, tales como la obesidad y la DM2.

Nuestros resultados muestran una disminución de la concentración de cfDNA en el suero del grupo entrenado respecto al no entrenado. En la literatura, existe evidencia de concentraciones de cfDNA en el rango de: menos de 0,1 ng/ml hasta incluso mayores a 100 ng /ml (Chiu et al. 2006; Chun et al. 2006; Fatouros et al. 2006; Lazar et al. 2006; Rainer et al. 2006; Rhodes et al. 2006; Schmidt et al. 2005).

Este amplia diferencia de valores en el contenido de cfDNA de las muestras de plasma o suero, depende entre otras cosas, de la condición clínica del donante, del método de extracción y manejo de la sangre, de la separación del plasma o suero sanguíneo, del método de aislamiento del DNA y el método de cuantificación de

DNA. (Manual de uso NucleoSpin Plasma XS, Macherey-Nagel, 2018). A la fecha no existen valores de referencia para ratas obesas diabéticas entrenadas.

Fatouros (Fatouros et al. 2006), ha mostrado en humanos sanos valores del orden de $1,66 \pm 0,73$ pg/mL de cfDNA en el plasma, en condiciones basales, el cual aumenta hasta $31,98 \pm 6,15$ pg/m, en aquellos sometidos a un programa de entrenamiento de fortalecimiento muscular de 12 semanas. Por su parte, Nishimoto (Nishimoto et al. 2016) comparó ratones normopeso con ratones obesos sedentarios alimentados con una dieta HFD por 8 semanas reportando concentraciones de cfDNA entre 10 y 60 ng/ml para las ratones no obesos y entre 15 y 80 ng/ml para los obesos. Nuestros resultados, tanto en plasma como suero, variaron entre 0,7 y 2 ng/ml, asemejándose a los valores de estados previos a la realización de actividad física y situación de normopeso antes señalados, los que nos hace sugerir que el entrenamiento de fortalecimiento muscular a largo regularía los niveles de cfDNA circulantes, disminuyendo la disponibilidad de ligandos para el receptor TLR9.

Cabe destacar, que la evidencia disponible en relación al efecto del entrenamiento físico sobre las concentraciones circulantes de cfDNA, se remite a estudios con humanos sanos sobreentrenados (Fatouros, 2006), o en forma aguda en individuos sometidos a entrenamientos de alta intensidad y/o larga duración (Velders et al. 2014; Fatouros et al., 2010; Margeli et al., 2006; Atamaniuk et al., 2004), por lo que se desconocen los efectos del entrenamiento de fortalecimiento muscular a largo plazo sobre este parámetro. Además, si bien se sabe que en estados de obesidad y DM2, caracterizados por un estado proinflamatorio sistémico, existen aumentos de las concentraciones de cfDNA, se desconoce el efecto que puede tener el entrenamiento de fortalecimiento muscular sobre la regulación de niveles circulantes de cfDNA en esta condiciones. Dada el efecto inhibitor que tiene el ejercicio físico sobre la actividad proinflamatoria, planteamos que si bien liberación la aguda de cfDNA inducida por el ejercicio en nuestras ratas diabéticas y obesas, puede ser incluso mayor- por un efecto sumatorio- la presencia de cfDNA en el suero o plasma a largo plazo, sería menor en el grupo entrenado.

Apoyando nuestra hipótesis, observamos que la concentración de cfDNA presente en el suero de las ratas obesas/diabéticas entrenadas es aproximadamente un 50% menor comparado a aquellas no entrenadas. Una razón para explicar esta situación puede ser la disminución de la masa visceral (absoluta y relativa a la masa corporal) que observamos al término del periodo de entrenamiento, tejido que esta positivamente correlacionado con mayores liberaciones de cfDNA, según Nishimoto (Nishimoto et al., 2016). Además, Velders (Velders et al., 2013) demostró que el ejercicio cardiorrespiratorio agudo estimula una mayor actividad de las DNAasas presentes en el suero, enzimas que hidrolizan al cfDNA, y por tanto disminuyen sus concentraciones. No hay antecedentes de si esto ocurre en ejercicios de fortalecimiento muscular a largo plazo, como el utilizado en nuestro protocolo. Podríamos especular que los efectos de una mayor actividad DNAasa asociada a cada sesión ejercicio dentro de un programa de fortalecimiento muscular a largo plazo, tienen un carácter sumatorio y persistente en el tiempo, dando cuenta de los valores observados en nuestro resultados.

Interesantemente, observamos que la disminución de cfDNA inducida por el entrenamiento de fortalecimiento muscular y cuantificada en el suero, no es consistente con lo observado al analizar los valores de cfDNA en muestras de plasma. Nuestros resultados muestran que los niveles plasmáticos de cfDNA son similares entre el grupo entrenado y el no entrenado, e incluso ambos valores son alrededor de un 40% mayores a los observados en el suero del grupo no entrenado. Este hallazgo podría explicarse por el efecto inhibitorio que tiene el anticoagulante EDTA -utilizado durante la preservación de la muestra de sangre hasta su procesamiento hasta la obtención del plasma- sobre la actividad de la DNAasa. Este efecto fue demostrado por Barra (Barra et al, 2015), el cual observó que la actividad de la DNAasas endógenas fue muy superior en el suero, en comparación con el plasma de muestras tratadas con EDTA. La adición de dosis crecientes de EDTA a plasma no anticoagulado y a suero, dio como resultado una inhibición similar de la actividad de las nucleasas, sugiriendo que iguales concentraciones de este anticoagulante son capaces de provocar los mismos efectos inhibitorios en ambas muestras. Además el tratamiento con DNAasas exógenas no alteró la concentración

de cfDNA en el plasma con EDTA pero sí degradó el DNA completamente en el suero. Podríamos especular entonces, que el potencial efecto del ejercicio a largo plazo en la inducción de una mayor actividad en las DNAasas, es inhibido por el uso de EDTA, explicando la diferencia de valores observados en el plasma respecto al suero de nuestros grupos experimentales.

En suma, el programa de entrenamiento de fortalecimiento induce disminuciones de la expresión de citokinas proinflamatorias sin modificación de las citokinas antiinflamatorias. Este resultado puede ser explicado porque este programa induce disminución de la concentración de cfDNA valorado en el suero, secundario al aumento de las DNAasas, explicado por otros y/o por disminución de la masa del tejido graso visceral la cual está implicado en la liberación de cfDNA (Nishimoto et al., 2016) y en la génesis de insulinoresistencia. (Revelo et al. 2016). Por lo tanto, la disminución de masa grasa visceral nos permitiría explicar la disminución de la liberación de cfDNA y por tanto su efecto en la patogenia de la insulinoresistencia.

Interesantemente, asociada a esta disminución del tejido graso visceral (formado por células adiposas blancas) encontramos también una disminución del tejido adiposo pardo en el GR, inducido por el entrenamiento de fortalecimiento muscular. Se sabe que el tejido adiposo blanco (TAB) está especializado en almacenar energía y que el tejido adiposo pardo (TAP) tiene una gran capacidad para disipar energía en forma de calor, utilizando glucosa y ácidos grasos a través de la proteína mitocondrial desacoplante (UCP-1), reduciendo así, la disponibilidad de sustratos para el almacenamiento en el TAB (Cannon et al. 2004).

En humanos, se han identificado dos poblaciones diferentes de adipocitos pardos: los del tipo "pardo clásico", similar los encontrados en los roedores, activados tras la exposición al frío, y los del tipo "beige", los cuales se encuentran inactivos y dispersos dentro del TAB (particularmente en el TAB subcutáneo), pero que pueden ser inducidos a adquirir un fenotipo termogénico "pardo" y aumentar potencialmente el gasto de energía de todo el cuerpo (Wu et al. 2013).

A pesar de que existe evidencia que muestra que el entrenamiento a largo plazo tiene la habilidad de promover la expresión de genes termogénicos en el TAB, tales como PGC1 y UCP1 (De Matteis et al. 2013), se ha cuestionado la contribución del "pardeamiento" del TAB inducido por el ejercicio, al gasto de energía y producción de calor de todo el cuerpo, en especial debido a que el ejercicio es termogénico en sí mismo. Al respecto, Wu (Wu et al., 2014) reportó reducciones significativas de la masa total, expresión de los genes termogénicos PGC-1 α y UCP-1 y de la oxidación de ácidos grasos en el TAP interescapular (iTAP) de ratas sometidas a entrenamientos de tipo cardiorrespiratorio de 8 semanas de duración en comparación a otras sedentarias alimentadas con una dieta HFD. Además mostró en estas ratas sedentarias alimentadas con una dieta HFD aumentos significativas de los parámetros antes mencionados en el iTAP, en las. en comparación a ratas alimentadas con una dieta normal (Wu et al., 2014).

Según este autor, estos hallazgos reafirmarían el rol del TAP en la termogénesis inducida por la dieta y en la homeostasis energética, reduciendo la eficiencia metabólica en términos de almacenamiento de energía como TAB y sugiere además que la respuesta compensatoria que regula negativamente la termogénesis en las ratas, está dada por la exposición crónica de calor inducida por el ejercicio, limitando la producción redundante de calor en esta condición (Wu et al., 2014). Si bien, no existen antecedentes respecto a los efectos del entrenamiento de fortalecimiento muscular, en humanos o ratas, en la regulación del TAP, podríamos esperar que la gran cantidad de calor producido como consecuencia de las contracciones musculares, a largo plazo, regulara negativamente la termogénesis en las ratas entrenadas, explicando la disminución de la masa de grasa parda interescapular observada en el GR respecto al GC y GSR.

Nuestros resultados muestran que el entrenamiento de fortalecimiento muscular es una medida efectiva para tratar los efectos metabólicos deletéreos asociados a la obesidad y DM2. Incluso considerando el hecho de que nuestras ratas, a pesar de catalogadas como diabéticas y obesas, tenían un buen control glicémico previo al programa, expresado como valores normales de HbA1c y glicemia en ayuno,

observamos que el entrenamiento aun así logró determinar mejoras en parámetros metabólicos e inflamatorios. Estas mejoras, sin embargo, no fueron extensibles a todos los sujetos entrenados.

Al respecto, se sabe que la capacidad individual de respuesta al ejercicio, de un parámetro fisiológico específico, difiere significativamente (Sparks, 2017). Existe evidencia de que al menos un 20% de individuos con DM2 no responden favorablemente al entrenamiento físico en términos de control glicémico y función mitocondrial en musculo esquelético (Stephens et cols., 2015). Si bien algunos investigadores utilizan el término 'No respondedor' para abordar la falta de respuesta a una intervención de ejercicio físico en un resultado especificado a priori, existe evidencia en este ámbito, que más que no existir respuesta frente al estímulos que genera la actividad física, esta respuesta depende de la dosis de actividad física a la que se expone un individuo (Montero, 2017). Por lo tanto, proponemos que un término más preciso para describir esta falta de respuesta bajo una dosis determinada de ejercicio, pudiera ser el de "subrespondedor al ejercicio", ya que si bien pueden ocurrir adaptaciones a nivel molecular dadas por una determinada dosis de ejercicio, éstas no consiguen modificaciones fisiológicas clínicamente evidenciables al momento de su evaluación.

Nuestros resultados muestran diferencias significativas en la capacidad de respuesta individual frente a un mismo tipo de ejercicio de fortalecimiento muscular, sugiriendo que las características del programa de entrenamiento propuesto pueden determinar cambios en una o más variables fisiológicas en forma particular, los cuales no son extensibles a todos los sujetos bajo el mismo régimen de entrenamiento. El entrenamiento físico en el grupo subrespondedor no generó diferencias en los parámetros evaluados respecto al grupo control. Es decir, en estos sujetos el entrenamiento no tuvo un impacto en la variables fisiológicas evaluadas. En cambio, el entrenamiento de fortalecimiento muscular de tipo isométrico por un periodo de 12 semanas en sujetos con un perfil "respondedor", determinó un aumento de la fuerza muscular, lo está asociado a la disminución de la respuesta proinflamatoria, sin modificaciones de la actividad antiinflamatoria y, paralelamente, una disminución de

la masa grasa (parda, subcutánea y visceral) y mejoras en los parámetros de control glicémico (Hba1c, glicemia en ayuna y a los 120 minutos post carga aguda de glucosa) y lipídico (colesterol HDL)

Pareciera ser que si bien el ejercicio de fortalecimiento muscular es beneficioso para la salud, determinando mejoras en la capacidad funcional, composición corporal, control metabólico e inflamatorio, para alcanzar estas mejoras no bastaría solo con someterse a un programa de ejercicio por un periodo de tiempo determinado, sino que es necesario alcanzar un aumento en la fuerza muscular significativo para lograr mejoras significativas también en su salud.

Los resultados de nuestra investigación aquí reportados, constituyen evidencia para fundamentar la prescripción del entrenamiento de fortalecimiento muscular de tipo isométrico en el tratamiento y prevención de patologías metabólicas con un componente inflamatorio sistémico y adicionarlo a la serie de indicaciones no farmacológicas.

BIBLIOGRAFÍA.

- Akkaya, M., Akkaya, B., Kim, A. (2018). Toll-like receptor 9 antagonizes antibody affinity maturation. *Nature immunology*, 19(3), 255.
- Amar, J., Chabo, C. (2011). Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Mol. Med.* 3, 559–572.
- American Diabetes Association (2016). Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care* 2016;39(Suppl. 1):S47–S51
- Atamaniuk J, Vidotto C, Tschan H.(2004). Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clin Chem*;50(9):1668–70.
- Atamaniuk J., Stuhlmeier KM. (2008). Effects of ultra-marathon on circulating DNA and mRNA expression of pro- and anti-apoptotic genes in mononuclear cells. *Eur J Appl Physiol*; 104 (4): 711-7
- Atamaniuk J, Vidotto C. (2010) Cell-free plasma DNA and purine nucleotide degradation markers following weightlifting exercise. *Eur J Physiol*;110 (4): 695-701
- Auffray, C., Sieweke, M. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology*, 27, 669-692.
- Balducci, S., Sacchetti, M. (2014). Physical exercise as therapy for type 2 diabetes mellitus. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 30(S1), 13-23.
- Barra, G. B.(2015). EDTA-mediated inhibition of DNases protects circulating cell-free DNA from ex vivo degradation in blood samples. *Clinical biochemistry*, 48(15), 976-981.
- Batista, M. L. (2010). Exercise training changes IL-10/TNF- α ratio in the skeletal muscle of post-MI rats. *Cytokine*, 49(1), 102-108.
- Bio-Rad Laboratories Inc. (2017). Cell Frequency. Recuperado de [www. bio-rad-antibodies.com/cell-frequency](http://www.bio-rad-antibodies.com/cell-frequency)
- Breitbach,S., Tug,S. (2012) Circulating Cell-Free DNA: An Up-Coming Molecular Marker in Exercise Physiology. *Sports Med*; 42 (7): 565-586

- Brinkmann, V. Reichard, U. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303: 1532-35
- Cantley, J., Ashcroft, F. (2015). Q&A: insulin secretion and type 2 diabetes: why do β -cells fail? *BMC Biology*, 13:33.
- Cavalié, H., Horcajada-Molteni, M. (2003). Progressive isometric force training and bone mass in rats. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 3(1), 47-52.
- Chawla, A., Nguyen, K. (2011). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 738–749
- Corkum, C. P., Ings, D. P., Burgess, C.(2015). Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT™) and standard density gradient. *BMC immunology*, 16(1), 48.
- Coutinho, A., Chapman, K. E. (2011). The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and cellular endocrinology*, 335(1), 2-13.
- Dever, T. E. (2002). Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell*, 108(4), 545-556.
- Diehl, F., Schmidt, K., Choti, M. (2008). Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008;14(9):985– 90. doi:10.1038/nm.1789
- Dou, L. (2013) miR-200s contribute to interleukin-6 (IL-6)-induced insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem* 288:22596–22606
- Durrer, C., Francois, M., Neudorf, H. (2017). Acute high-intensity interval exercise reduces human monocyte Toll-like receptor 2 expression in type 2 diabetes. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 312(4), R529-R538.
- Faerch, K., Borch-Johnsen, K. (2009). Pathophysiology and aetiology of impaired fasting glycaemia and impaired glucose tolerance: does it matter for prevention and treatment of type 2 diabetes?. *Diabetologia*, 52(9), 1714-1723.

- Farup, J., Kjølhede, T. (2012). Muscle morphological and strength adaptations to endurance vs. resistance training. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 26(2), 398-407.
- Fatouros IG, Destouni A. (2006). Cell-free plasma DNA as a novel marker of aseptic inflammation severity related to exercise overtraining. *ClinChem*; 52 (9): 1820-4
- Fatouros, I. G., Jamurtas, A. Z., Nikolaidis, M. G.(2010). Time of sampling is crucial for measurement of cell-free plasma DNA following acute aseptic inflammation induced by exercise. *Clinical biochemistry*, 43(16), 1368-1370.
- Fehrenbach E, Schneider ME.(2006). Trauma-induced systemic inflammatory response versus exercise-induced immunomodulatory effects. *Sports Med*; 36 (5): 373-84
- Feng, X., Tang, H., Leng, J., & Jiang, Q. (2014). Suppressors of cytokine signaling (SOCS) and type 2 diabetes. *Molecular biology reports*, 41(4), 2265-2274.
- Ferreira, A. E., Sisti, F. (2014). PPAR- γ /IL-10 axis inhibits MyD88 expression and ameliorates murine polymicrobial sepsis. *The Journal of Immunology*, 192(5), 2357-2365.
- Forbes JM, Cooper ME. (2013) Mechanisms of diabetic complications. *Physiological Reviews*, Volume 93;1:137–88.
- Furukawa, S., Fujita, T. (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 114, 1752–1761
- García-Díaz, D. Milagro, F. (2009). High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J PhysiolBiochem*, 65 (1), 1-10
- García-García, J. A., Reding-Bernal, A. (2013). Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. *Investigación en educación médica*, 2(8), 217-224.
- Garcia-Martinez, I., Santoro, N. (2016). Hepatocyte mitochondrial DNA drives nonalcoholic steatohepatitis by activation of TLR9. *J. Clin. Invest.* 126, 859–864.
- Giuliatti, A. (2007) Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile: 1,25-dihydroxyvitamin D3 works as anti-inflammatory. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 77, 47–57.

- Gleeson, M. Bishop, N. (2011). The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nature Reviews Immunology*. Volume 11: 607
- Glickman, M. H., & Adir, N. (2004). The proteasome and the delicate balance between destruction and rescue. *PLoS biology*, 2(1), e13.
- Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K., & Gerstein, M. (2003). Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome biology*, 4(9), 117.
- Gu, L., Xiong, X., Wei, D. (2013). T cells contribute to stroke-induced lymphopenia in rats. *PLoS One*, 8(3), e59602.
- Guo, S. (2014). Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *Journal of Endocrinology*, 220(2), T1-T23
- Henao-Mejia, J., Elinav, E. (2012). Inflammasome mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* 482, 179–185.
- Holmes, A., Coppey, L. (2015). Rat Models of Diet-Induced Obesity and High Fat/Low Dose Streptozotocin Type 2 Diabetes: Effect of Reversal of High Fat Diet Compared to Treatment with Enalapril or Menhaden Oil on Glucose Utilization and Neuropathic Endpoints. *Journal of Diabetes Research*, Volume 2015, Article ID: 307285
- Holten, M., Zacho, M. (2004). Strength training increases insulin-mediated glucose uptake, GLUT4 content, and insulin signaling in skeletal muscle in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 53(2), 294-305.
- Hong, E. (2009). Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. *Diabetes* 58, 2525–2535.
- Hornung, V., Rothenfusser, S. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1–10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *The Journal of Immunology*, 168(9), 4531-4537.

- Huang, Y. W., Hsu, C. (2014). Reduced Toll-like receptor-9 expression on peripheral CD14+ monocytes of chronic hepatitis B patients and its restoration by effective therapy. *Antivir Ther*, 19(7), 637-43.
- Hubert, F. X., Voisine, C.(2006). Differential pattern recognition receptor expression but stereotyped responsiveness in rat spleen dendritic cell subsets. *The Journal of Immunology*, 177(2), 1007-1016.
- Invitrogen Corporation (2008). Cell concentrations in human and mouse samples. Recuperado de www.invitrogen.com/immunology.
- Kabat-Koperska, J., Kolasa-Wołoskiuk, A. (2016). Changes in the Immune System of Female Wistar Rats After Exposure to Immunosuppressive Treatment During Pregnancy. *Scandinavian journal of immunology*, 83(6), 418-426
- Kahn, S.Cooper, M. (2014). Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present and future. *Lancet* 383(9922): 1068–1083. Doi:10.1016/S0140-6736(13)62154-6.
- Karavirta, L., Häkkinen, K. (2011). Individual responses to combined endurance and strength training in older adults. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 43(3), 484-490.
- Karlsen, M., Jakobsen, K. (2017). Expression of Toll-Like Receptors in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Primary Sjögren's Syndrome. *Scandinavian journal of immunology*, 85(3), 220-226.
- Kawai,T. Akira, S. (2010). The role of pattern recognition receptors in innate immunity: update on toll like receptors. *NatImmunol*.11:373–84.doi:10.1038/ni.1863
- Kawai, T, Akira, S. (2011).Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34(5), 637-650.
- Kawanishi, N., Yano, H. (2010). Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc. Immunol. Rev.* 16, 105–118
- Kawasaki, T. Kawai,T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology*. Vol. 5: 461

- Krüger, K, Gessner, D. (2013). Functional and Muscular Adaptations in an Experimental Model for Isometric Strength Training in Mice. PLoS ONE 8(11): e79069. doi:10.1371/ journal.pone.0079069
- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. International reviews of immunology, 30(1), 16-34.
- Kwon, O. Tanner,R. (2015). MyD88 regulates physical inactivity-induced skeletal muscle inflammation, ceramide biosynthesis signaling, and glucose intolerance. Am J PhysiolEndocrinolMetab309: E11–E21.
- Lancaster, G. (2005).The physiological regulation of Toll-like receptor expression and function in humans. J. Physiol. 563, 945–955
- Lee, R. E., Qasaimeh, M. A., Xia, X., Juncker, D., & Gaudet, S. (2016). NF-κB signalling and cell fate decisions in response to a short pulse of tumour necrosis factor. Scientific reports, 6, 39519.
- Lester, S. N., & Li, K. (2014). Toll-like receptors in antiviral innate immunity. Journal of molecular biology, 426(6), 1246-1264.
- Liang, Y. B., Tang, H. (2017). Downregulated SOCS1 expression activates the JAK1/STAT1 pathway and promotes polarization of macrophages into M1 type. Molecular medicine reports, 16(5), 6405-6411.
- Liu, J., Qian, C., & Cao, X. (2016). Post-translational modification control of innate immunity. Immunity, 45(1), 15-30.
- Mane, V. P., Heuer, M. A., Hillyer, P., Navarro, M. B., & Rabin, R. L. (2008). Systematic method for determining an ideal housekeeping gene for real-time PCR analysis. Journal of biomolecular techniques: JBT, 19(5), 342.
- Mardare, C., Krüger, K.(2016). Endurance and resistance training affect high fat diet-induced increase of ceramides, inflammasome expression, and systemic inflammation in mice. Journal of diabetes research, 2016.
- Margeli A, Skenderi K, Tsironi M.(2006). Dramatic elevations of interleukin-6 and acute-phase reactants in athletes participating in the ultra distance foot race spartathlon: severe systemic inflammation and lipid and lipoprotein changes in protracted exercise. J Clin Endocrinol Metab;90: 3914–8.

- Masoodi, M., Kuda, O. (2015). Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(4), 503-518.
- McFarlin, B., Flynn, M. (2004) TLR4 is lower in resistance-trained older women and related to inflammatory cytokines. *MedSci Sports Exerc* 36(11): 1876-1883
- Menegazzo, L. Ciciliot, S. (2015). NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes. *Acta Diabetol* 52:497–503
- Mohanan, S., Horibata, S. (2013). Identification of macrophage extracellular trap-like structures in mammary gland adipose tissue: a preliminary study. *Front. Immunol.* 4, 67
- Montero, D., & Lundby, C. (2017). Refuting the myth of non-response to exercise training: 'non-responders' do respond to higher dose of training. *The Journal of physiology*, 595(11), 3377-3387.
- Mortezaigholi, S., Babaloo, Z. (2016). Evaluation of PBMC distribution and TLR9 expression in patients with systemic lupus erythematosus. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 15(3), 229-236.
- Mounier, R., Theret, M. (2015) Expanding roles for AMPK in skeletal muscle plasticity. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, Elsevier, 26 (6), pp.275-286.
- Muniyappa, R., Lee, S., Chen, H. (2008). Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 294(1), E15 E26.
- Murakami, Y., Fukui, R., Motoi, Y. (2017). The protective effect of the anti-Toll-like receptor 9 antibody against acute cytokine storm caused by immunostimulatory DNA. *Scientific Reports*, 7, 44042.
- Nelson, M., Bowers, J. (2016). Toll-like receptor agonist therapy can profoundly augment the antitumor activity of adoptively transferred CD8+ T cells without host preconditioning. *Journal for immunotherapy of cancer*, 4(1), 6.
- Nickel, T., Emslander, I. (2012). Modulation of dendritic cells and toll-like receptors by marathon running. *European journal of applied physiology*, 112(5), 1699-1708.

- Nishimoto, S. Fukuda, D. (2016). Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Sci. Adv.*; 2 : e1501332
- Osborn, O. (2012). The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nature medicine*, 18(3), 363-374.
- Ouchi, N., Parker, J. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Rev. Immunol.* 11, 85–97
- Patsouris, D., Neels, J. G. (2009). Glucocorticoids and thiazolidinediones interfere with adipocyte-mediated macrophage chemotaxis and recruitment. *Journal of Biological Chemistry*, 284(45), 31223-31235.
- Peake, J., Della Gatta, P., Suzuki, K. (2015). Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exercise immunology review*, 21, 8-25.
- Pedersen, B. K., Febbraio, M. A. (2012). Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nature Reviews Endocrinology*, 8(8), 457.
- Pedersen, B., Fischer, C. (2007). Beneficial health effects of exercise: the role of IL-6 as a myokine. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 152–156
- Pedersen BK, Steensberg A. (2002). Exercise and hypoxia: effects on leukocytes and interleukin-6-shared mechanisms. *Med Sci Sports Exerc*; 34 (12): 2004-13
- Qin, Z., Ljubimov, V. A., Zhou, C. (2016). Cell-free circulating tumor DNA in cancer. *Chinese journal of cancer*, 35(1), 36.
- Raymond, C. K., Hernandez, J. (2017). Collection of cell-free DNA for genomic analysis of solid tumors in a clinical laboratory setting. *PloS one*, 12(4), e0176241.
- Revelo, X. (2016). Nucleic Acid-Targeting Pathways Promote Inflammation in Obesity-Related Insulin Resistance. *Cell Reports* 16, 717–730
- Roza, N. A., Possignolo, L. (2016). Effect of long-term high-fat diet intake on peripheral insulin sensibility, blood pressure, and renal function in female rats. *Food & nutrition research*, 60(1), 28536.
- Sell, H. Habich, C. (2012). Adaptive immunity in obesity and insulin resistance. *Nat. Rev. Endocrinol.* 8, 709–716

- Shi, C., Pamer, E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 11(11), 762
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *Nature protocols*, 3(6), 1101.
- Shockett, P. E., Khanal, J., Sitaula, A. (2016). Plasma cell-free mitochondrial DNA declines in response to prolonged moderate aerobic exercise. *Physiological reports*, 4(1), e12672.
- Silver, A. C., Buckley, S. M., Hughes, M. E., Hastings, A. K., Nitabach, M. N., & Fikrig, E. (2018). Daily oscillations in expression and responsiveness of Toll-like receptors in splenic immune cells. *Heliyon*, 4(3), e00579
- Skovsø, S. (2014). Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *J Diabetes Invest*; 5: 349–358
- Snyder, M. W., Kircher, M., Hill, A. (2016). Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell*, 164(1), 57-68.
- Stancakova A, Javorsky M. (2009). Changes in insulin sensitivity and insulin release in relation to glycemia and glucose tolerance in 6,414 Finnish men. *Diabetes*; 58:1212–1221. [PubMed: 19223598]
- Stanford, K., Goodyear, L. (2016). Exercise regulation of adipose tissue. *Adipocyte*, 5(2), 153-162.
- STEMCELL Technologies Inc. (2017). Frequencies & Percentages of Mouse Immune Cell Types. Recuperado de: https://www.stemcell.com/media/files/wallchart/WA10011_Frequencies_Percentages_Mouse_Immune_Cell_Types.pdf
- Stewart, L., Flynn, M. (2005) Influence of exercise training and age on CD14+ cell surface expression of toll-like receptor 2 and 4. *Brain Behav Immunol* 19: 389-397
- Strasser, B. (2013). Physical activity in obesity and metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1281(1), 141-159.
- Stroun, M., Lyautey, J.(2001). About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta.*;313(1–2):139–42.

- Suganami, T. Nishida, J. (2005). Paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: Role of free fatty acids and tumor necrosis factor α . *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2062–2068.
- Sung, H., Doh, K (2013) Adipose vascular endothelial growth factor regulates metabolic homeostasis through angiogenesis. *Cell Metab.* 17, 61–72
- Takeuchi, O., Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010;140:805–820.
- Talebi-Garakani, E. (2012). Resistance training decreases serum inflammatory markers in diabetic rats. *Endocrine*. DOI 10.1007/s12020-012-9786-9
- Tamkovich, S., Cherepanova, A. (2006) Circulating DNA and DNase activity in human blood. *Ann N Y Acad Sci*; 1075: 191-6
- Thierry, A. (2016). Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer and Metastasis Reviews*, 35(3), 347-376.
- Timmerman, K. L., Flynn, M. G., Coen, P. M., Markofski, M. (2008). Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14+ CD16+) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise?. *Journal of leukocyte biology*, 84(5), 1271-1278.
- Tremaroli, V., Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489, 242–249.
- Umpierre, D., Ribeiro, P. A., Kramer, C. (2011). Physical activity advice only or structured exercise training and association with HbA1c levels in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Jama*, 305(17), 1790-1799.
- Velders, M., Treff, G., Machus, K., Bosnyák, E. (2014). Exercise is a potent stimulus for enhancing circulating DNase activity. *Clinical biochemistry*, 47(6), 471-474.
- Wada T, Hoshino M (2011) Both type I and II IFN induce insulin resistance by inducing different isoforms of SOCS expression in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300:E1112–E1123
- Wada, J., Makino, H. (2016). Innate immunity in diabetes and diabetic nephropathy. *Nature reviews. Nephrology*, 12(1), 13.

- Wang, J. (2011). Effect of exercise training intensity on murine T -regulatory cells and vaccination response. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 16 (doi:10.1111/j.1600-0838.2010.01288.x).
- Wu, M. (2014). Thermogenic Capacity Is Antagonistically Regulated in Classical Brown and White Subcutaneous Fat Depots by High Fat Diet and Endurance Training in Rats
- Yu, X., Lin, J., Yu, Q. (2014). Activation of Toll-like receptor 9 inhibits lipopolysaccharide-induced receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand expression in rat B lymphocytes. *Microbiology and immunology*, 58(1), 51-60.
- Yu, M. Zhou,H. (2014). MyD88-dependent interplay between myeloid and endothelial cells in the initiation and progression of obesity-associated inflammatory diseases. *J. Exp. Med.* 2014. Vol. 211 No. 5 887-907

Anexos: Tablas

	Control (n=7)	Entrenado (n=8)	p value
Fuerza Absoluta al término del programa(segundos)	18[10-22]	47[16-139]	0,01
Fuerza Relativa al término del programa(segundos/kilogramos)	27,82[11,96- 30,05]	65,45[15,18- 263,26]	0,02

Tabla 1: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la fuerza de las ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. (Total del grupo entrenado). Análisis realizado con *Test de U de Mann Whitney*.

	Control (n=7)	Entrenado Respondedor (n=4)	Entrenado Subrespondedor (n=4)	p value
TNF α (pg/ml)	41,17 [26,47-138,24]	17,65[14,71-20,59]	33,82[23,53-150]	0,03
IL-10 (pg/ml)	No detectado	No detectado	No detectado	

Tabla 2a : Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la concentración de citocinas en el suero sanguíneo de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. Esta evaluación fue realizada al finalizar el programa de entrenamiento. Análisis realizado con *Test de Kruskall Wallis*.

	Control (n=7)	Entrenado Respondedor (n=4)	Entrenado Subrespondedor (n=4)	p GC/GR	p GC/GSR	p GR/GSR
TNF α (pg/ml)	41,17 [26,47-138,24]	17,65 [14,71-20,59]	33,82 [23,53-150]	0,02	0,30	0,03

Tabla 2b :Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la concentración de citocinas en el suero sanguíneo de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. Esta evaluación fue realizada al finalizar el programa de entrenamiento. Análisis realizado con *Test de U de Mann Whitney*.

	2 ^{-Ct} GC (n=7)	2 ^{-Ct} GR (n=4)	2 ^{-Ct} GSR (n=4)	p value
GADPH	4,88 x10 ⁻⁹ [7,84 x 10 ⁻¹¹ - 1,93 10 ⁻⁸]	7,59 x10 ⁻⁹ [1,73 x10 ⁻¹¹ - 9,68 x10 ⁻⁸]	5,01x 10 ⁻⁹ [1,64 x10 ⁻⁹ -1,01 x10 ⁻⁸]	0,95
β actinas	6,63 x10 ⁻⁸ [3,39 x10 ⁻⁸ - 9,03 x10 ⁻⁸]	10,74 x10 ⁻⁸ [4,87 x10 ⁻⁸ -1,09 x10 ⁻⁷]	7,82 x10 ⁻⁸ [4,87 x10 ⁻⁸ -1,10 x 10 ⁻⁷]	0,25

Tabla 3a: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la expresión de mRNA de los genes de control interno GADPH y β actinas de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. Esta evaluación fue realizada al finalizar el programa de entrenamiento en muestras de bazo. Análisis realizado con *Test de Kruskall Wallis*.

	2^{-Ct} GC (n=7)	2^{-Ct} GE (n=8)	p value
GADPH	4,88 x10 ⁻⁹ [7,84 x 10 ⁻¹¹ - 1,93 10 ⁻⁸]	5,01 x 10 ⁻⁹ [1,73 x10 ⁻¹¹ - 9,68 x10 ⁻⁸]	0,75
β actinas	6,63 x10 ⁻⁸ [3,39 x10 ⁻⁸ - 9,03 x10 ⁻⁸]	10,49 x10 ⁻⁸ [4,87 x10 ⁻⁸ -1,09 x10 ⁻⁷]	0,14

Tabla 3b: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la expresión de mRNA de los genes de control interno GADPH y β actinas de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. Esta evaluación fue realizada al finalizar el programa de entrenamiento en muestras de bazo. Análisis realizado con *Test de U de Mann Whitney*.

	Promedio 2^{-Ct} GC (n=7)	Promedio 2^{-Ct} GE (n=8)	Promedio 2^{-Ct} GE Promedio 2^{-Ct}GC
GADPH	8,46 x10 ⁻⁹	1,67 x10 ⁻⁸	1,98
β actinas	3,21 x10 ⁻⁸	3,94 x10 ⁻⁸	1,22

Tabla 3c: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la expresión de mRNA de los genes de control interno GADPH y β actinas de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. Esta evaluación fue realizada al finalizar el programa de entrenamiento en muestras de bazo.

	Ct promedio	D.E. de Ct promedio	Rango
GADPH control	27,97	2,65	[25,63- 33,57]
β actinas control	23,99	0,63	[23,40- 24,81]
GADPH entrenados	28,20	3,61	[23,30- 35,75]
β actinas entrenados	23,70	0,64	[23,12- 24,29]

Tabla 3d: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la expresión de mRNA de los genes de control interno GADPH y β actinas de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. Esta evaluación fue realizada al finalizar el programa de entrenamiento en muestras de bazo. n=7 grupo control y n=8 grupo entrenado

	Veces de cambio de la expresión del mRNA del gen respecto a β actinas GC	Veces de cambio de expresión del mRNA de gen respecto a β actinas GR	Veces de cambio de expresión del mRNA de gen respecto a β actinas GSR	p value
IL-6 (x10⁻³)	-3,1 [-9 - -0,92] (n=7)	-9,2 [-29- -5,1] (n=4)	-2,7 [- 4,2- -1,1] (n=3)	0,05
IL-10	-0,84 [-1,90- -0,24] (n=7)	--0,96 [--5,65 - -0,41] (n=4)	-1,24 [-2,78- --0,52] (n=4)	0,55
TNF alfa	- 4,39[-10,00 --2,13] (n=7)	-13,33[-37,58 --4,25] (n=3)	-8,54 [-10,51 --6,58] (n=3)	0,13

Tabla 4a: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la expresión del mRNA de citocinas inflamatorias de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas en muestras de tejido esplénico. Esta evaluación fue realizada al finalizar el programa de entrenamiento. Análisis realizado con *Test de Kruskal Wallis*.

	Control (n=7)	Entrenado Respondedor (n=4)	Entrenado Subrespondedor (n=3)	p GC/GR	p GC/GSR	p GR/GSR
IL-6 (x10 ⁻³)	-3,1 [-9 - -0,92]	-9,2 [-29- -5,1]	-2,7 [- 4,2- -1,1]	0,02	1,00	0,06

Tabla 4b: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la expresión de mRNA de vía TLR9 y citocinas inflamatorias de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas en muestras de tejido esplénico. Esta evaluación fue realizada al finalizar el programa de entrenamiento. Análisis realizado con *Test de U de Mann Whitney*.

Tipo de muestra	Condición experimental	n	Concentración cfDNA (pg/ul)	% cambio en entrenados respecto a control
Suero	Control	7	1,41	Disminuye 47, 51 %
	Entrenado	8	0,67	
Plasma	Control	7	1,73	Aumenta 12, 14 %
	Entrenado	8	1,94	

Tabla 5: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la concentración de cfDNA en el suero y plasma sanguíneo de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas (grupo Entrenado). Esta evaluación fue realizada al finalizar el programa de entrenamiento. La muestra analizada corresponde a pool, es decir, una mezcla de volúmenes equivalentes obtenidas de cada uno de los animales que componen cada grupo en estudio.

	Veces de cambio de expresión del mRNA de gen respecto a β actinas GC	Veces de cambio de expresión del mRNA de gen respecto a β actinas GR	Veces de cambio de expresión del mRNA de gen respecto a β actinas GSR	p value
TLR9	-13,42[-30,61- -1,23] (n=7)	-15,77[-16,87- -10,19] (n=3)	-23,40[-24,19- -22,61] (n=4)	0,41
MyD88	-1,90 [-5,99 - -0,12] (n=7)	-3,13[-8,57- -0,52] (n=4)	-87,07 [-96,71-11,42] (n=3)	0,03
SOCS1	-0,42[-0,53 --0,09] (n=7)	-0,68[-0,98--0,61] (n=3)	--0,40 [--0,70--0,13] (n=4)	0,08

Tabla 6a: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la expresión del mRNA de TLR9 y de su vía de señalización en ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas en muestras de tejido esplénico. Esta evaluación fue realizada al finalizar el programa de entrenamiento. Análisis realizado con *Test de Kruskal Wallis*.

	Control	Entrenado Respondedor	Entrenado Subrespondedor	p GC/GR	p GC/GSR	p GR/GSR
MyD88	-1,90 [-5,99 - -0,12] (n=7)	-3,13[-8,57- -0,52] (n=4)	-87,07 [-96,71- -11,42] (n=3)	0,34	0,02	0,03
SOCS1	-0,42[-0,53 --0,09] (n=7)	-0,68[-0,98--0,61] (n=3)	--0,40 [--0,70--0,13] (n=4)	0,02	1,00	0,15

Tabla 6b: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la expresión del mRNA de la vía de señalización de TLR9 de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas en muestras de tejido esplénico. Esta evaluación fue realizada al finalizar el programa de entrenamiento. Análisis realizado con *Test de U de Mann Whitney*.

	Control (n=7)	Entrenado Respondedor (n=4)	Entrenado Subrespondedor (n=4)	p value
Fuerza Absoluta al término del programa(segundos)	18[10-22]	115[108-139]	28[16-35]	0,01
Fuerza Relativa al término del programa(segundos/kilogramos)	27,82[11,96- 30,05]	253,3[200,37- 263,26]	36,79[15,18- 49,72]	0,01

Tabla 7a: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la fuerza de las ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. Análisis realizado con *Test de Kruskal Wallis*.

	Control (n=7)	Entrenado Respondedor (n=4)	Entrenado Subrespondedor (n=4)	p GC/GSR	p GC/GSR	p GC/GSR
Fuerza Absoluta al término del programa(segundos)	18 [10-22]	115 [108-139]	28 [16-35]	0,01	0,07	0,02
Fuerza Relativa al término del programa (segundos/kilogramos)	27,82 [11,96- 30,05]	253,3 [200,37- 263,26]	36,79 [15,18- 49,72]	0,01	0,26	0,02

Tabla 7b: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la fuerza de las ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. Análisis realizado con *Test de U de Mann Whitney*.

	Control (n=7)	Entrenado Respondedor (n=4)	Entrenado Subrespondedor (n=4)	p value
Masa corporal previa al programa (gramos)	660 [626- 751]	530[489-544]	737[633-853]	0,10
Masa corporal posterior al programa (gramos)	680[647- 836]	528[454 -539]	760[704 -1054]	0,08
Diferencia de masa (gramos)	24[9- 85]	-5[-35 - -2]	51[16-201]	0,01

Tabla 8a: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la masa corporal de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. Análisis realizado con *Test de Kruskal Wallis*

	Control (n=7)	Entrenado Respondedor (n=4)	Entrenado Subrespondedor (n = 4)	p GC/GR	p GC/GSR	p GR/GSR
Diferencia de masa (gramos)	24[9- 85]	-5[-35 - -2]	51[16-201]	0,01	0,45	0,02

Tabla 8b: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la masa corporal de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. Cuantificación realizada al finalizar el programa de entrenamiento. Análisis realizado con *Test de U de Mann Whitney*.

	Control (n=7)	Entrenado Respondedor (n=4)	Entrenado Subrespondedor (n=4)	p value
Grasa parda (absoluta) (gramos)	0,66[0,51- 0,90]	0,35[0,21- 0,40]	0,43[0,23- 1,07]	0,05
Grasa parda(relativa) (gramos/kg)	0,82[0,75- 1,23]	0,65[0,46- 0,74]	0,57[0,22- 1,51]	0,30
Grasa subcutánea (absoluta) (gramos)	10,5[9,01- 25,80]	3,93 [3,90- 4,33]	16,5 [7-44,64]	0,11
Grasa subcutánea(relativa) (gramos/kg)	16,23[13,26- 30,86]	7,44[7,24- 9,54]	23,12[8,91- 42,35]	0,11
SUM Grasa visceral (absoluta) (gramos)	39,32[29,45- 57,75]	15,44[11,78- 17]	51,31[40,81- 62,33]	0,05
SUM Grasa visceral(relativa) (gramos/kg)	58,25[45,52- 69,07]	29,24[25,94- 31,54]	61,16[57,97- 71,55]	0,04

Tabla 9a: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la masa grasa de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. Análisis realizado con *Test de Kruskal Wallis*.

	Control (n=7)	Entrenado Respondedor (n=4)	Entrenado Subrespondedor (n = 4)	p GC/GR	p GC/GSR	p GR/GSR
Grasa parda (absoluta) (gramos)	0,66[0,51- 0,90]	0,35[0,21- 0,40]	0,43[0,23- 1,07]	0,02	0,57	0,08
Grasa subcutánea(relativa) (gramos/kg)	16,23[13,26- 30,86]	7,44[7,24- 9,54]	23,12[8,91- 42,35]	0,04	0,71	0,15
SUM Grasa visceral (absoluta) (gramos)	39,32[29,45- 57,75]	15,44[11,78- 17]	51,31[40,81- 62,33]	0,06	0,26	0,04
SUM Grasa visceral(relativa) (gramos/kg)	58,25[45,52- 69,07]	29,24[25,94- 31,54]	61,16[57,97- 71,55]	0,04	0,45	0,02

Tabla 9b: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en la masa grasa de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. Análisis realizado con *Test de U de Mann Whitney*.

	Control	Entrenado Respondedor	Entrenado Subrespondedor	p value
Triglicéridos (mg/dl)	117,71[103,55- 130,1] (n=5)	144,26[121,25- 155,76] (n=3)	130,10[114,17- 153,99] (n=4)	0,21
Colesterol total (mg/dl)	51,29[45,11- 56,85] (n=5)	63,03 [53,15- 67,98] (n=3)	56,86 [50,06- 67,36] (n=4)	0,21
Colesterol HDL (mg/dl)	15,48[15,37- 15,71] (n=5)	19,26[19,04- 21,67] (n=4)	18,29[15,37- 22,48] (n=4)	0,05
Colesterol LDL (mg/dl)	25,32[20,72- 30] (n=6)	31,39[23,25- 32,71] (n=3)	28,17[22,73- 31,41] (n=4)	0,69
Colesterol total/HDL	3,23[2,87- 3,67] (n=6)	3,22[2,76- 4,52] (n=4)	3,15 [2,89- 3,46] (n=4)	0,99
Colesterol no HDL (col Total - HDL)	51,21[44,97- 56,71](n=6)	62,95[52,96- 67,83](n=4)	57,99[49,83- 67,83](n=4)	0,25
Colesterol HDL/LDL	0,63[0,52-0,77] (n=6)	0,63[0,38-0,82] (n=4)	0,66[0,57- 0,76] (n=4)	0,99

Tabla 10a: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en parámetros de control lipídico de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. Cuantificación realizada en forma posterior al programa de entrenamiento. Análisis realizado con *Test de Kruskal Wallis*.

	Control (n=7)	Entrenado Respondedor (n=4)	Entrenado Subrespondedor (n = 4)	p GC/GR	p GC/GSR	p GR/GSR
Colesterol HDL (mg/dl)	15,48[15,37- 15,71]	19,26[19,04- 21,67]	18,29[15,37- 22,48]	0,01	0,22	0,31

Tabla 10b: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en parámetros de control lipídico de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. Medido en forma posterior al programa de entrenamiento. Análisis realizado con *Test de U de Mann Whitney*.

	Control (n=7)	Entrenado Respondedor (n=4)	Entrenado Subrespondedor (n=4)	p value
HbAc1 (%)	4,00[3,9- 4,5]	3,7[3,50-4,00]	4,3[3,9-4,9]	0,05
Glicemia ayuno previo a programa (mg/dL)	135[101- 168]	97[84- 113]	113[91- 155]	0,31
Glicemia ayuno posterior a programa (mg/dL)	99[82- 119]	70[69- 86]	96[90- 112]	0,04
Glicemia 120' IPGTT previo a programa (mg/dL)	354[257-500]	306[282-461]	412[279-500]	0,84
Glicemia 120' IPGTT posterior a programa (mg/dL)	383[338-424]	183[131- 312]	434[371- 500]	0,02

Tabla 11a: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en parámetros de control glicémico de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas.. Análisis realizado con *Test de Kruskal Wallis*.

	Control (n=7)	Entrenado Respondedor (n=4)	Entrenado Subrespondedor (n = 4)	p GC/GR	p GC/GSR	p GR/GSR
HbAc1 (%)	4,00[3,9- 4,5]	3,7[3,50-4,00]	4,3[3,9-4,9]	0,07	0,20	0,04
Glicemia ayuno posterior a programa (mg/dL)	99[82- 119]	70[69- 86]	96[90- 112]	0,03	0,59	0,02
Glicemia 120' IPGTT posterior a programa (mg/dL)	383[338-424]	183[131- 312]	434[371- 500]	0, 01	0,59	0,02

Tabla 11b: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en parámetros de control glicémico de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. Medido al finalizar el programa de entrenamiento. Análisis realizado con *Test de U de Mann Whitney*.

	Control (n=5)	Entrenado Respondedor (n=4)	Entrenado Subrespondedor (n=4)	p value
Glicemia ayuno suero (mg/dl)	257,27[248,36- 295,8]	312,04[250,91- 317,45]	318,41[219,06- 382,09]	0,30
Insulina suero(ng/dl)	0,14[0,08- 0,15]	0,15[0,09- 0,19]	0,14[0,12- 0,23]	0,83
HOMA IR	0,09[0,05- 0,11]	0,09[0,07- 0,14]	0,12[0,10- 0,23]	0,25

Tabla 11c: Efecto del programa de fortalecimiento muscular en parámetros de control glicémico de ratas Wistar obesas y diabéticas entrenadas. Medido en forma posterior al programa de entrenamiento. Análisis realizado con *Test de Kruskal Wallis*.

Anexos: Programa de entrenamiento de fortalecimiento muscular

Semana/ Día	N° repeticiones x series	Resistencia externa añadida (% masa corporal)	Semana/ Día	N° repeticiones x series	Resistencia externa añadida (% masa corporal)
Evaluación inicial					
S1/ D1	2x3	0	S7/ D1	2x3	40
S1/ D2	2x4	0	S7/ D2	2x4	15
S1/ D3	2x3	5	S7/ D3	2x3	45
S2/ D1	2x4	5	S8/ D1	2x4	40
S2/ D2	2x3	0	S8/ D2	2x3	15
S2/ D3	2x4	10	S8/ D3	2x4	45
S3/ D1	2x3	15	S9/ D1	2x3	45
S3/ D2	2x4	5	S9/ D2	2x4	20
S3/ D3	2x3	20	S9/ D3	2x3	50
S4/ D1	2x4	20	S10/ D1	2x4	45
S4/ D2	2x3	5	S10/ D2	2x3	20
S4/ D3	2x4	25	S10/ D3	2x4	50
S5/ D1	2x3	35	S11/ D1	2x3	50
S5/ D2	2x4	10	S11/ D2	2x4	25
S5/ D3	2x3	40	S11/ D3	2x3	55
S6/ D1	2x4	35	S12/ D1	2x4	50
S6/ D2	2x3	10	S12/ D2	2x3	25
S6/ D3	2x4	40	S12/ D3	2x4	55
Evaluación Final					

Programa de fortalecimiento muscular a través de la contracción muscular de tipo isométrica



CERTIFICACIÓN

El Comité de Bioética Sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, certifica que en el Proyecto de Investigación titulado “**Interacción entre la suplementación con zinc y entrenamiento de fuerza como elementos claves para mejorar el tratamiento de la diabetes tipo-2. (Interaction between supplemental zinc and muscle-strength training as a key element to improve type-2 diabetes therapy)**”, cuyo Investigador Responsable es el **Prof. Manuel Ruz Ortíz** del Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, no se plantean acciones que contravengan las Normas Bioéticas Básicas de Manejo y Cuidados de los Animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (Protocolo CBA **0869 FMUCH**).

El Prof. Ruz se ha comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar modificación alguna sin previa notificación y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación por **48** meses, tiempo estimado de ejecución del proyecto, el cual será financiado por **FONDECYT REGULAR 1160792**.

*El Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile está constituido por 13 miembros con experiencia en bioética asociada a experimentación animal: 3 veterinarios, 8 académicos de diversas disciplinas y 2 personas ajenas a la academia. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “**PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADOS DE ANIMALES DE LABORATORIO**” después de un estudio acucioso por sus miembros y de la acogida de los investigadores o jefes de Bioterios, de las observaciones exigidas por el Comité.*

C. Valenzuela

Dr. Carlos Valenzuela Y
Presidente (S)

Comité de Bioética sobre Investigación en Animales



Santiago, 14 de junio de 2016.

Comité de Bioética sobre Investigación en Animales

Facultad de Medicina - Universidad de Chile

Avda. Independencia 1027, Independencia 8380453, Santiago, Chile

Fono: 2 978 6923, Email: cba@med.uchile.cl