



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

**Efecto de la apertura de los canales K_{ATP} y el ejercicio
sobre el funcionamiento muscular en la obesidad”**

TESIS

Que presenta:

BIOL. MARIANA GÓMEZ BARROSO

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS EN
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

ASESOR DE TESIS: D. en C. Rocío del Carmen Montoya Pérez

CO-ASESOR DE TESIS: D. en C. Christian Cortés Rojo

Morelia, Michoacán, Junio 2018

INDICE	PAGINA
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
I. INTRODUCCIÓN	9
II. ANTECEDENTES	10
2.1 Músculo.....	10
2.2 Músculo esquelético.....	11
2.3 Estructura del músculo esquelético	12
2.3.1 La fibra muscular.....	13
2.3.1.1 Clasificación de las fibras musculares.....	13
2.3.1.1.1 Fibras oxidativas lentas.....	14
2.3.1.1.2 Fibras glucolíticas oxidativas	15
2.3.1.1.3 Fibras glucolíticas rápidas	15
2.3.2 El sarcolema.....	16
2.3.3 El sarcoplasma.....	16
2.3.4 Retículo sarcoplásmico	17
2.3.5 Miofibrilla.....	18
2.4 Función del músculo esquelético	20
2.4.1 La contracción muscular	21
2.4.2 Acople excitación-contracción	22
2.5 Obesidad	23
2.6 Fatiga muscular.....	25
2.7 Especies reactivas de oxígeno	27
2.8 Canales de potasio sensibles a ATP	30
2.9 Papel de los canales K_{ATP} en la fatiga	32
2.10 Regulación farmacológica de los canales K_{ATP}	33
2.11 El diazóxido.....	35
2.12 El Ejercicio	36
III. HIPÓTESIS	40
IV. OBJETIVO GENERAL	40

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	41
6.1 Material biológico	41
6.2 Disección de los músculos	41
6.3 Registro de tensión	42
6.4 Determinación de los niveles de especies reactivas de oxígeno	43
6.5 Evaluación de la peroxidación lipídica	43
6.6 Evaluación del estado redox del glutatión	44
6.7 Análisis de datos	45
VII. RESULTADOS	46
7.1 Efecto del diazóxido y el ejercicio sobre el peso corporal y los niveles de glucosa de ratas obesas..	46
7.2 Efecto del diazóxido y el ejercicio sobre la tensión máxima y la tensión total de músculo esquelético de ratas obesas..	49
7.3 Efecto del diazóxido y el ejercicio sobre el tiempo de resistencia a la fatiga en músculo esquelético de ratas obesas.	53
7.4 Efecto del diazóxido y el ejercicio sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno en músculo esquelético de ratas obesas	56
7.5 Efecto del diazóxido y el ejercicio sobre los niveles de peroxidación lipídica en músculo esquelético de ratas obesas.	60
7.6 Efecto del diazóxido y el ejercicio sobre el estado rédox del glutatión en músculo esquelético de ratas obesas.....	65
7.6.1 Glutatión total <i>GSH</i> + <i>GSSG</i>	65
7.6.2 Glutatión reducido <i>GSH</i>	70
7.6.3 Glutatión oxidado <i>GSSG</i>	74
VIII. DISCUSIÓN	78
IX. CONCLUSIÓN	91
X. REFERENCIAS	92

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Los tres tipos de músculos presentes en vertebrados	11
Figura 2. Representación de las fibras musculares esqueléticas	12
Figura 3. Estructura formada por los túbulos T y el retículo sarcoplásmico	20
Figura 4. Estructura y nivel de organización del músculo esquelético	24
Figura 5. Acople excitación-contracción.....	30
Figura 6. Sitios de acción de ERO en el músculo.....	33
Figura 7. Estructura del canal K_{ATP} y las subunidades que lo conforman	37
Figura 8. Estructura del diazóxido.....	45
Figura 9. Peso corporal y niveles de glucosa sanguínea.....	50
Figura 10. Tensión máxima y tensión total	54
Figura 11. Tiempo de establecimiento de la fatiga muscular.....	57
Figura 12. Niveles de especies reactivas de oxígeno	61
Figura 13. Niveles de peroxidación lipídica	65
Figura 14. GSH+GSSG.....	69

Figura 15. GSH.....	73
Figura 16. GSSG.....	77
Figura 17. Modelo de estudio que muestra el efecto de la apertura de los canales K_{ATP} y el ejercicio sobre el funcionamiento muscular en la obesidad.....	90

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia Tecnología por el otorgamiento de la beca gracias a la cual pude llevar a cabo mi trabajo de maestría para la obtención de mi grado académico.

A mi Asesora la Dra. Rocío Montoya por su dirección, enseñanzas, consejos y sobre todo su apoyo en todo momento y en especial durante la realización de este proyecto y a mi Co-asesor el Dr. Christian Cortés, por su dirección y apoyo en la realización de esta tesis.

A cada uno de los miembros del comité sinodal por sus revisiones, correcciones y enriquecimiento en la realización de esta tesis.

A mi familia y amigos por su apoyo y comprensión durante la realización de este proyecto, en especial a mi mamá por siempre estar a mi lado y a Fernando por su apoyo no solo emocional, si no por contribuir en la realización de mi tesis, a mis compañeras y compañeros de laboratorio por sus enseñanzas y consejos.

RESUMEN

La obesidad es un importante problema de salud pública a nivel mundial, se considera una patología sumamente importante ya que está relacionada con una gran cantidad de trastornos metabólicos e induce numerosas enfermedades como: desórdenes cardiovasculares y respiratorios, diabetes tipo 2 (resistencia a la insulina), enfermedades neurodegenerativas, osteoartritis y cáncer. El músculo esquelético cumple con una amplia variedad de funciones fisiológicas, por lo tanto, el deterioro del tejido muscular resulta en una disfunción física y deterioro metabólico. Actualmente, se ha reconocido que la obesidad provoca atrofia significativa y disfunción del músculo esquelético, lo que produce disminución de la fuerza de contracción y una reducida capacidad para evitar la fatiga, así como resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, lo que provoca un incremento en el estrés oxidante, lo que desencadena el deterioro de la función mitocondrial y celular y eventualmente del organismo en general.

Con la finalidad de contrarrestar los efectos negativos de la obesidad, en este trabajo se analizó el efecto del abridor de los canales K_{ATP} , el diazóxido, por un periodo de 14 días, en el músculo esquelético de ratas wistar macho sometidas a un protocolo de obesidad, ya que es bien sabido, que la activación farmacológica de los canales K_{ATP} con diazóxido, mejora la contracción muscular, favorece la resistencia a la fatiga e inhibe la secreción de insulina, con el mismo objetivo, se analizó la utilización de un protocolo de ejercicio, aplicado durante 5 semanas, como un valioso tratamiento no farmacológico para los trastornos metabólicos asociados con la obesidad y de manera independiente se analizó su efecto sinérgico con el abridor de los canales K_{ATP} .

Los datos obtenidos en este trabajo mostraron cómo una dieta alta en grasa indujo obesidad e incrementó los niveles de glucosa en sangre y cómo durante la obesidad la contracción muscular se deterioró y el músculo presentó menor resistencia a la fatiga, así como un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) y de peroxidación de lípidos. No obstante, se demostró cómo los tratamientos con el abridor de los canales K_{ATP} y el ejercicio de manera independiente, restauraron el correcto funcionamiento de los músculos al incrementar la contracción muscular, brindar resistencia a la fatiga, reducir los niveles de ERO, la disminución la peroxidación de lípidos y el aumento la defensa antioxidante. Por su parte, la combinación de ambos tratamientos mostró un efecto sinérgico durante la obesidad.

PALABRAS CLAVE: Músculo esquelético, obesidad, fatiga, estrés oxidante, Diazóxido, Ejercicio.

ABSTRACT

Obesity is a worldwide major public health problem, it is considered an extremely important pathology since it is related to a large number of metabolic disorders and induces several diseases; cardiovascular and respiratory, type 2 diabetes (insulin resistance), neurodegenerative diseases, osteoarthritis and cancer. Skeletal muscle complies with a wide variety of physiological functions, therefore, the deterioration of muscle tissue results in physical dysfunction and metabolic impairment. Currently, it has been recognized that obesity causes significant atrophy and dysfunction, which produces decreased muscle contraction strength and a reduced capacity to withstand fatigue, alike insulin resistance and hyperinsulinemia which causes oxidative stress triggering mitochondrial and cellular dysfunction and eventually general organism failure.

In order to counteract the negative effects of obesity, in this work we analyzed the effect of the of the K_{ATP} channels opener, diazoxide, for 14 days, in obese skeletal muscle male Wistar rats, since pharmacological activation of K_{ATP} channels with diazoxide, improves muscle contraction, favors resistance to fatigue and inhibits insulin secretion. With the same objective the use of an exercise protocol was analyzed for 5 weeks, as a non-pharmacological treatment for metabolic disorders associated with obesity. Also, the synergistic effect of exercise with the K_{ATP} channel opener was analyzed.

Data obtained in this work showed how a high fat diet induced obesity and increased blood glucose levels, deteriorating muscle contraction showing less resistance to fatigue, as well as an increased reactive oxygen species (ROS) levels and lipid peroxidation. However, was demonstrated that K_{ATP} channel opener treatment and exercise restored the correct function of muscles by increasing their contraction providing fatigue resistance. Also ROS levels were decreased, which diminished lipid peroxidation and increased antioxidant defense. On the other hand, combination of both treatments showed a synergistic effect during obesity.

KEY WORDS: Skeletal muscle, obesity, fatigue, oxidative stress, diazoxide, exercise.

I. INTRODUCCIÓN

El estudio de la contracción muscular ha ayudado a establecer la organización del mecanismo contráctil del músculo, ha brindado información acerca de los procesos de contracción muscular, de la producción de fuerza y de la capacidad que el músculo tiene de fatigarse y recuperarse. Los músculos se clasifican desde el punto de vista morfológico y funcional (López-Chicharro y Fernández-Vaquero 2010).

La obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial prevenible, es el quinto factor principal de riesgo de defunción humana en el mundo La obesidad es un estado patológico que deteriora el funcionamiento del músculo esquelético provoca aparición de la fatiga y el daño celular (Abrigo et al., 2016).

La fatiga muscular es el proceso en el cual los músculos que se utilizan intensivamente muestran una disminución progresiva del rendimiento, que en gran parte se recupera después de un periodo de descanso, generalmente dentro de la primera hora (Allen et al., 2008). Un mecanismo de defensa que se activa en el músculo durante la fatiga es la apertura de los canales de potasio sensibles a ATP (canales K_{ATP}), tanto del sarcolema como de la mitocondria, los cuales contienen el potencial de membrana sarcolemal y el estado redox mitocondrial (Flagg et al., 2010).

Farmacológicamente, los canales K_{ATP} pueden activarse o inhibirse. Uno de los activadores del canal K_{ATP} más utilizado es el diazóxido, la apertura de los canales K_{ATP} mediante este fármaco mejora la contracción muscular durante la obesidad, promueve la disminución del peso corporal y mejora la tasa metabólica basal al disminuir los niveles sanguíneos de glucosa y lípidos (Alemzadeh et al., 2008).

Además, el ejercicio es un tratamiento no farmacológico para los trastornos metabólicos asociados con la obesidad, aumenta la expresión de los canales K_{ATP} y promueve diversas adaptaciones metabólicas en el músculo esquelético (Pattanakuhar et al., 2016).

II. ANTECEDENTES

2.1 MÚSCULO

Toda capacidad que los seres vivos poseen para realizar los distintos tipos de movimientos que serán útiles en la realización de las actividades cotidianas, están regidos por los mecanismos de contracción muscular. Son aproximadamente 750 músculos que los seres humanos coordinamos y controlamos a cada momento, lo cual nos ha permitido adaptarnos al medio que nos rodea, así como procesarlo e incluso modificarlo (López-Chicharro y Fernández-Vaquero, 2010). Debido a que el músculo representa alrededor del 40% de la masa corporal total del ser humano, es evidente la importancia de su estudio (Baynes y Dominiczak, 2011).

Todos los mecanismos relacionados con el movimiento están regidos por el funcionamiento de los músculos los cuales han sido clasificados en relación a su anatomía y fisiología con la finalidad de brindar una visión y perspectiva más amplia para su estudio. Los músculos se clasifican en dos tipos principales, músculo liso y músculo estriado, a su vez el músculo estriado es dividido en músculo esquelético y músculo cardiaco (Fig. 1) (Randall et al., 2002).

Cada uno de los tres tipos de músculo: liso, esquelético y cardiaco, juegan un papel fisiológico único, su principal función es convertir la energía química en energía mecánica. Estos tres tipos de músculo a pesar de tener finalidades muy similares, se diferencian principalmente uno del otro por los mecanismos de inicio de la contracción, la velocidad del desarrollo de la fuerza, la duración de la contracción y la utilización de los sustratos (Baynes y Dominiczak, 2011).

Una de las principales características que relaciona a los tres tipos de músculo, es su capacidad contráctil, los miocitos cardiacos, las células del musculo liso y las miofibrillas esqueléticas poseen un citoplasma lleno de proteína contráctil (Baynes y Dominiczak, 2011).

Tipos de músculos

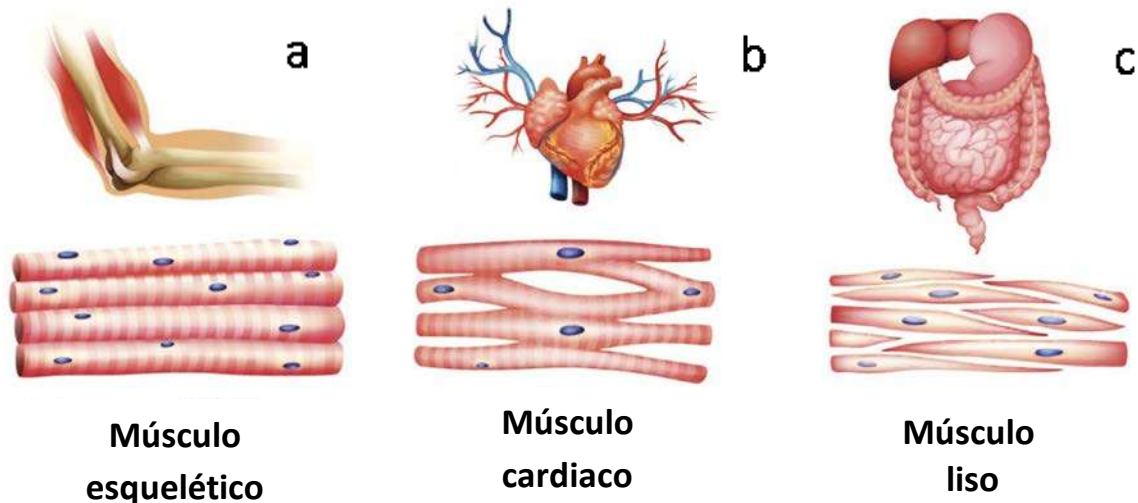


Figura 1. Los tres tipos de músculos presentes en vertebrados. Se aprecian las diferentes características morfológicas de los músculos. a) músculo esquelético, b), músculo cardíaco, c) músculo liso (modificado de Baynes y Dominiczak, 2011).

2.2 MÚSCULO ESQUELÉTICO

El músculo esquelético se considera como un órgano que se compone de células de múltiples tejidos, es decir, tejido nervioso, tejido conectivo. Etc. Y por supuesto, las células de tejido muscular en sí (Fig. 2). En este contexto, el músculo esquelético es considerado el órgano más grande del cuerpo humano (Maclaren y Morton, 2012).

Los músculos esqueléticos son los responsables de la postura y de los movimientos del sistema óseo (López-Chicharro y Fernández-Vaquero, 2010). Los músculos pueden mover partes de un organismo vertebrado ya que cada extremo del músculo está unido a alguna otra estructura y cuando el músculo se acorta cambia la relación entre los puntos de anclaje. Normalmente, un músculo se halla anclado en cada extremo por una resistente banda de tejido conectivo llamado tendón. Cada músculo está constituido por un complejo multinucleado (Randall et al., 2002).

El músculo esquelético es un tejido heterogéneo que contiene fibras con diversas características morfológicas y funcionales. Uno de los parámetros más importantes que determinan las propiedades funcionales del músculo es su composición de fibras (Grasa et al., 2014).

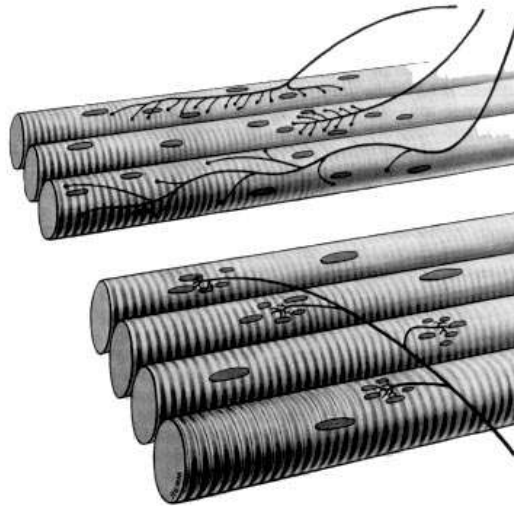


Figura 2. Representación de las fibras musculares esqueléticas (Modificado de Randall et al., 2002).

2.3 ESTRUCTURA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

La estructura del músculo esquelético es muy compleja ya que lo conforma una cantidad variada de estructuras. El tejido conectivo exterior que rodea a todo el músculo es el epimisio, el cual lo mantiene unido. A su vez el epimisio está formado por pequeños haces de fibras envueltos en una vaina de tejido conectivo, estos haces reciben el nombre de fascículos, lo que conforma el perimisio. Por último el perimisio se encuentra formado por fibras musculares, que son las células musculares individuales. Cada una de las fibras musculares esta también cubierta por una vaina de tejido conectivo, denominada endomisio (Wilmore y Costill, 2010; López-Chicharro y Fernández-Vaquero, 2010; Maclaren y Morton, 2012).

2.3.1 LA FIBRA MUSCULAR

Las células del músculo esquelético se conocen comúnmente como fibras musculares y se diferencian de muchas otras células en el organismo por numerosas razones. Las fibras musculares tienen una forma única: son largas y cilíndrica y generalmente se extienden por toda la Longitud del músculo (Maclaren y Morton, 2012). El número de fibras musculares por cada músculo varía considerablemente, dependiendo del tamaño y de la función de este (Wilmore y Costill, 2010), cada músculo esquelético está formado por estas fibras que tienen como promedio un diámetro de 50 a 100 μm y una longitud entre 2 y 6 cm (Drucker, 2005).

Las células musculares se componen de aproximadamente de un 75% agua, 20% de proteína y 5% de sustancias tales como vitaminas, minerales, aminoácidos, hidratos de carbono y lípidos (Maclaren y Morton, 2012).

2.3.1.1 Clasificación de las fibras musculares

El músculo esquelético realiza una amplia gama de actividades, desde soportar el peso del cuerpo durante largos períodos de pie en posición vertical, hasta realizar movimientos explosivos en respuesta a una amenaza inesperada. Para hacer frente a estas actividades los músculos están compuestos por células musculares con grandes diferencias en su perfil metabólico, su velocidad de contracción y su respuesta al Ca^{2+} (Allen et al., 2008; Westerblad et al., 2010). Las fibras musculares se pueden clasificar en grupos basados en las propiedades tales como la velocidad contráctil, la expresión de la cadena pesada de la miosina (MHC; por sus siglas en ingles) y la capacidad metabólica (Grasa et al., 2014).

En términos generales, las fibras musculares de humanos se pueden clasificar en tres tipos: fibras tipo I (fibras oxidativas lentas), tipo IIa (fibras rápidas glucolíticas oxidativas) y tipo IIx (fibras glucolíticas rápidas) (Maclaren y Morton, 2012), clasificación basada en las isoformas de MHC (Allen et al., 2008; Westerblad et al.,

2010). Además, Los músculos de roedores expresan los tres tipos de MHC mas la isoforma IIb, la cual, no se expresa en el músculo humano (Westerblad et al., 2010).

Los diferentes tipos de fibras se encuentran en proporciones variables dentro de cada músculo. Los distintos tipos y subtipos de fibras, además de presentar diferentes isoformas de miosina y velocidad de contracción, se diferencian en aspectos tales como su metabolismo, capacidad de almacenamiento de calcio, distribución etc. (López-Chicharro y Fernández-Vaquero, 2010).

Las células musculares estriadas generalmente se clasifican por sus propiedades fisiológicas contráctiles (rápidas frente a lentas) y por el tipo principal de metabolismo (oxidativo frente a glucolítico) (Baynes y Dominiczak, 2011).

Las diferencias entre las fibras musculares rápidas y lentas se atribuyen con frecuencia a la forma en que cada una de ellas maneja el Ca^{2+} celular (Tavi y Westerblad, 2011).

2.3.1.1.1 Fibras oxidativas lentas

Las fibras de tipo I o fibras oxidativas de contracción nerviosa lenta, se denominan así debido a que la isoforma de la miosina ATPasa presente en estas fibras hidroliza ATP a una velocidad relativamente lenta. Como resultado, las contracciones ocurren a un ritmo lento, la fuerza máxima producida es relativamente pequeña (en comparación con las fibras de tipo II) y su producción de ATP se apoya principalmente por el metabolismo oxidativo de los carbohidratos y lípidos. Estas fibras son las más pequeñas de diámetro de todas las fibras musculares y aparecen de color rojo debido a la presencia de grandes almacenes de mioglobina. Estas fibras contienen una gran cantidad de mitocondrias y por lo tanto son capaces de producir ATP aeróbicamente durante períodos prolongados de tiempo. Como resultado, estas fibras son altamente resistentes a la fatiga y participan activamente en eventos como ejercicios de

resistencia: correr maratones, ciclismo, etc. (López-Chicharro y Fernández-Vaquero, 2010; Tavi y Westerblad 2011; Maclaren y Morton, 2012).

2.3.1.1.2 Fibras rápidas glucolíticas oxidativas

Las fibras tipo IIa se conocen como fibras rápidas glucolíticas oxidativas, dada su capacidad para producir ATP por el metabolismo aeróbico y anaeróbico. Como tal, a menudo son vistas como intermediarias entre el tipo I y tipo IIx. La isoforma de la miosina ATPasa presente dentro de estas fibras es capaz de hidrolizar ATP a un ritmo más rápido (aproximadamente 3-5 veces más rápido) que las fibras de tipo I. También contienen una cantidad moderada de la mioglobina y mitocondrias, lo que las hace un tanto resistente a la fatiga. Teniendo en cuenta su capacidad para hidrolizar ATP a un ritmo más rápido (y por lo tanto con una mayor tasa de contracción y relajación), estas fibras pueden producir una mayor fuerza de la que las fibras de tipo I y son muy activas durante las actividades de alta intensidad como actividades de capacidad aeróbica máxima o carreras de velocidad (López-chicharro y Fernández-Vaquero, 2010; Tavi y Westerblad 2011; Maclaren y Morton, 2012).

2.3.1.1.3 Fibras glucolíticas rápidas

Las fibras tipo IIx/b contienen una menor cantidad de mioglobina y mitocondrias (por lo tanto son de color blanco). Tienen una capacidad limitada para el metabolismo oxidativo y por lo tanto son menos resistentes a la fatiga de todos los tipos de fibras.

Sin embargo, la isoforma de la miosina ATPasa presente en estas fibras puede hidrolizar ATP a un ritmo rápido. Por estas razones, las fibras de tipo IIx/b están fuertemente utilizadas durante las actividades que requieren tasas máximas de producción de fuerza y la formación de enlaces cruzados, tales como carreras de velocidad. La producción de ATP se lleva a cabo a través de la glucólisis anaeróbica

o del metabolismo de la fosfocreatina. Estas fibras también tienen una gran capacidad para la hipertrofia durante los programas de entrenamiento de fuerza, a través de la acumulación de proteínas miofibrilares (López y Fernández, 2010; (Tavi y Westerblad 2011; Maclaren y Morton, 2012).

2.3.2 EL SARCOLEMA

A la membrana celular de la fibra muscular se le denomina sarcolema (López-Chicharro y Fernández-Vaquero, 2010). En el extremo de cada fibra muscular, su sarcolema se funde con el tendón, que se inserta en el hueso (Wilmore y Costill, 2010).

El sarcolema consiste esencialmente de una bicapa lipídica y de la lámina basal, que se extiende perpendicularmente desde la superficie del sarcolema a través del interior de cada fibra de canales membranosos conocidos como túbulos transversales (túbulos-T) (Maclaren y Morton, 2012).

Igualmente se encuentra entre el sarcolema y la lámina basal un conjunto de células no diferenciadas o células mononucleares conocidas como satélite. Estas células son importantes para el músculo esquelético, ya que son capaces de experimentar diferenciación para convertirse en fibras musculares maduras durante lesiones, crecimiento muscular o bien durante el entrenamiento (Hawke y Garry, 2001).

2.3.3 EL SARCOPLASMA

El citoplasma de las células musculares se denomina sarcoplasma (López-Chicharro y Fernández-Vaquero, 2010), el sarcoplasma llena los espacios existentes entre las miofibrillas (Wilmore y Costill, 2010).

2.3.4 RETÍCULO SARCOPLÁSMICO

Dentro de las fibras musculares se hallan también una red longitudinal de túbulos, conocida como retículo sarcoplásmico (RS), estos canales membranosos están ubicados de manera paralela a las miofibrillas y dan vueltas alrededor de ellas (Wilmore y Costill, 2010).

En íntima relación con el RS, se encuentran los túbulos-T o túbulos transversos. Estas estructuras son invaginaciones del sarcolema que penetran hacia el interior de la fibra perpendicular a la superficie (Fig. 3) (López-Chicharro y Fernández-Vaquero, 2010).

El RS funciona como un sitio de almacenamiento de iones de Ca^{2+} a concentraciones en el rango milimolar. La liberación de Ca^{2+} del RS en el sarcoplasma es esencial para la contracción muscular (Maclaren y Morton, 2012).

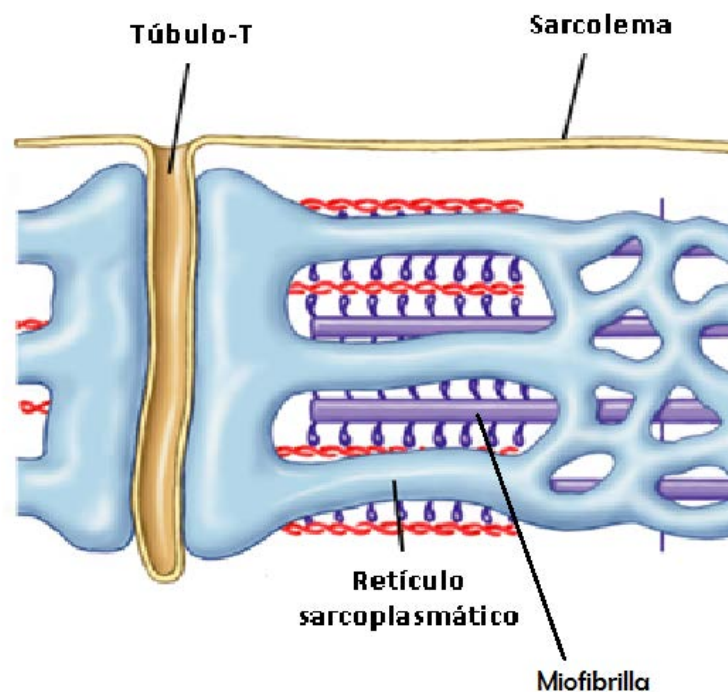


Figura 3. Estructura formada por los Túbulos T y el retículo sarcoplásmico (modificado de Silverthorn, 2009).

2.3.5 MIOFIBRILLA

Las fibras musculares esqueléticas son heterogéneas respecto a su metabolismo y función contráctil. También tienen una alta capacidad de adaptación y plasticidad (Tavi y Westerblad, 2011).

Cada fibra muscular individual contiene entre varios centenares y varios miles de miofibrillas. Estas son los elementos contráctiles del músculo esquelético (Wilmore y Costill, 2010). Las miofibrillas son estructuras en forma de varilla que se extienden en toda la longitud de las de la fibra muscular (Maclaren y Morton, 2012). El número de miofibrillas presentes dentro de una célula muscular puede ser muy variado, pero se cree que son alrededor de 2000 en una fibra de músculo adulto. Las miofibrillas pueden ser consideradas como el aparato contráctil de la fibra muscular, ya que contienen las proteínas contráctiles actina y miosina. En conjunto, la actina y la miosina constituyen 85% de la proteína muscular total, siendo la miosina la más abundante (60%). La actina tiene un tamaño de 42 kDa y se conoce como el filamento delgado, mientras que la miosina se conoce como el filamento grueso, ya que tiene un tamaño de 480 kDa (Maclaren y Morton, 2012).

En el músculo se pueden observar bandas oscuras alternadas con bandas claras, las bandas oscuras son anisotrópicas, por lo que se denominan bandas A y corresponden a toda la longitud de un filamento grueso. En los extremos de la banda A, los filamentos finos y gruesos se encuentran traslapados. La porción central solo está ocupada por filamentos gruesos. Las bandas claras son isotrópicas, y de aquí su denominación de bandas I, y representan a la región que está ocupada solo por filamentos finos. Las bandas I se acortan durante la contracción, mientras que la longitud de las bandas A permanece constante. En la mitad de una banda I se aprecia una delgada línea transversal: es la línea Z, esta es una estructura en zigzag compuestas por proteínas de anclaje para los filamentos finos, cada extremo del sarcómero es una línea Z (Fig. 4). el sarcómero es la unidad funcional de la miofibrilla y en él ocurren todos los cambios que acontecen en el ciclo de relajación-contracción, en el sarcómero se encuentran traslapados los filamentos gruesos de miosina con los

filamentos delgados de actina. En el sarcómero también se puede distinguir la zona H la cual corresponde a la porción central de la banda A que está ocupada únicamente por filamentos gruesos y las líneas M que son las zonas de inserción de los filamentos gruesos y dividen en dos partes iguales a la banda A. Las bandas I y A están constituidas por filamentos finos de actina y filamentos gruesos de miosina (Fig. 4) (Wilmore y Costill, 2010; López-Chicharro y Fernández-Vaquero, 2010; Maclaren y Morton, 2012).

Los filamentos gruesos se componen de miosina (Baynes y Dominiczak, 2011) Los filamentos de miosina están formados por alrededor de 200 moléculas de miosina (Drucker, 2005) y alrededor de dos tercios de las proteínas de los músculos esqueléticos son miosina (Wilmore y Costill, 2010). La miosina actúa como un verdadero motor molecular (López-Chicharro y Fernández-Vaquero, 2010).

Los filamentos finos se componen principalmente de actina (Baynes y Dominiczak., 2011), los filamentos de actina están formados por tres componentes proteicos: actina, tropomiosina y la troponina (Drucker, 2005). Cada uno de los filamentos de actina tiene uno de los extremos insertado en una línea Z, con el extremo contrario extendiéndose hacia el centro del sarcómero, cada filamento de actina contiene un punto activo al que puede adherirse la cabeza de miosina (Wilmore y Costill, 2010).

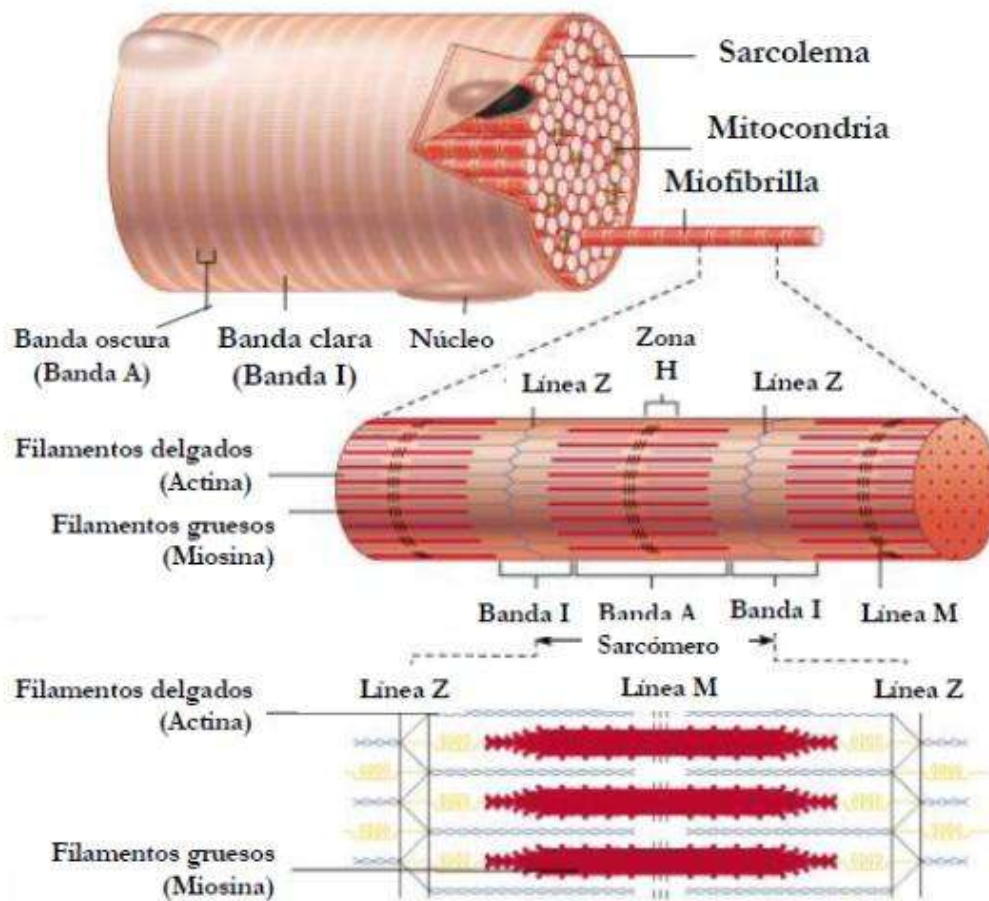


Figura 4. Estructura y niveles de organización del músculo esquelético. El sarcómero es la unidad estructural y funcional del músculo esquelético. Contiene una matriz de filamentos de actina y de miosina. Los filamentos gruesos de miosina se encuentran traslapados con los filamentos delgados de actina, que formarán los puentes cruzados para dar origen a la contracción muscular (modificado de Wilmore y Costill, 2010; López-Chicharro y Fernández-Vaquero, 2010; Maclaren y Morton, 2012).

2.4 FUNCIONAMIENTO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

Para que las células musculares funcionen requieren ser inervadas, para lo cual el músculo esquelético está bien provisto de impulsos neurales por parte del sistema nervioso y específicamente, a través de la acción de las α -neuronas motoras (Maclaren y Morton, 2012).

Cada fibra muscular esta inervada por un solo nervio motor, que finaliza cerca de la mitad de la fibra muscular. El único nervio motor y todas las fibras musculares a las que inerva reciben colectivamente la denominación de unidad motora (Wilmore y Costill, 2010).

Una unidad motora se define como una sola α -neurona motora y todas las fibras musculares que inerva. Para los grupos de músculos pequeños, como los del ojo o la mano, una unidad motora puede contener sólo unas pocas fibras, mientras que para aquellas unidades motoras que inervan los músculos grandes de la pierna normalmente hay unos pocos miles de fibras. El punto de comunicación entre la neurona y la fibra muscular se conoce como la unión neuromuscular. Es importante tener en cuenta que las dos células no se encuentran físicamente en contacto, sino más bien, hay un pequeño espacio entre ellos conocido como la hendidura sináptica (Maclaren y Morton, 2012).

2.4.1 La contracción muscular

Los procesos que provocan que una fibra muscular actúe son complejos (Wilmore y Costill, 2010). La contracción del músculo esquelético es un proceso que permite generar fuerza para mover o resistir una carga y se define como la activación de las fibras musculares con tendencia a que estas se acorten (López-Chicharro y Fernández-Vaquero. 2010).

El proceso de contracción inicia por el impulso de un nervio motor. El impulso nervioso llega a las terminaciones del nervio, denominadas axones terminales. Cuando el impulso llega, estas terminaciones nerviosas secretan el neurotransmisor acetilcolina que se une a receptores muscarínicos en el sarcolema. Si se une una cantidad suficiente de acetilcolina a los receptores, se transmitirá una carga eléctrica a todo lo largo de la fibra muscular que permitirá que el sodio traspase la membrana celular del músculo hacia el interior. A este mecanismo se le conoce como potencial de acción y se debe generar en la célula muscular antes de que ésta pueda actuar (Wilmore y Costill, 2010; Maclaren y Morton, 2012).

2.4.2 Acoplamiento excitación-contracción

El proceso de excitación-contracción (EC) se refiere colectivamente a las etapas que conectan la excitación muscular y la contracción del músculo en sí. Si bien hay varios pasos de este proceso, la liberación de Ca^{2+} del RS es un componente integral (Maclaren y Morton, 2012).

Para que ocurra el acoplamiento excitación-contracción tienen que suceder una serie de eventos: la liberación del neurotransmisor acetilcolina, la activación de canales muscarínicos, la apertura de canales iónicos que permite la entrada de grandes cantidades de Na^+ al interior de la fibra muscular, lo que inicia un potencial de acción el cual se propaga por el sarcolema internándose en la fibra a través de los túbulos T. Los cambios en el potencial de membrana son detectados por los receptores de dihidropiridinas (DHPR) que generan una transmisión de la señal a los receptores de rianodina (RyR) del retículo sarcoplásmico. Esto provoca la apertura de los canales de calcio lo cual produce la liberación de grandes cantidades de Ca^{2+} hacia el citosol y su unión a la troponina C, la cual sufre un cambio conformacional que permite la interacción entre la actina y la miosina (golpe de poder) y en presencia de ATP provocan el deslizamiento y el acortamiento del sarcómero llevando a cabo el proceso de la contracción (Fig. 5) (Lamb y Westerblad 2011).

Mientras que la contracción muscular se desencadena por un aumento del calcio, la relajación muscular depende de que el calcio sea bombeado activamente de nuevo hacia el RS (Baynes y Dominiczak, 2011; Maclaren y Morton, 2012). Al terminar el potencial de acción el Ca^{2+} regresa al interior del RS gracias a una bomba de calcio dependiente de ATP situada en la membrana del retículo. (López-Chicharro y Fernández-Vaquero, 2010). El calcio debe ser bombeado de nuevo al RS para que esté disponible para unirse a las proteínas contráctiles en un subsecuente potencial de acción. (Fig. 5) (Periasamy y Kalyanasundaram, 2007).

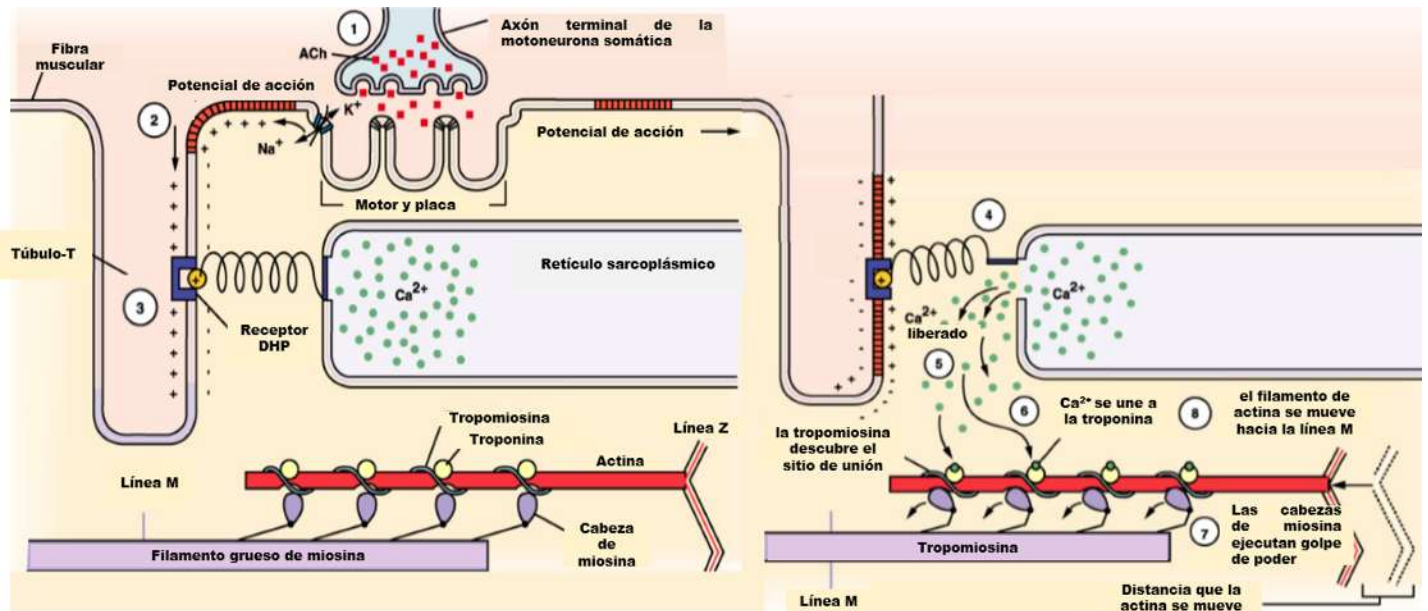


Figura 5. Acople excitación-contracción. 1) Se genera un potencial de acción provocado por la liberación del neurotransmisor (acetilcolina). 2) El potencial de acción es propagado por el sarcolema y por los túbulos T. 3) La despolarización de los túbulos T causa la activación de los receptores de dihidropiridina, 4) lo que provoca la apertura de los canales de calcio del RS los receptores a rianodina. 5) Ocurre la liberación de grandes cantidades de calcio por parte del RS. 6) El calcio se une con la troponina, 7) liberando las cabezas de miosina las cuales ejecutan el golpe de poder, 8) con ello permitiendo que los filamentos de actina se muevan a través de la línea M para que en presencia de ATP ocurra la contracción muscular. (Modificado Lamb y Westerblad 2011).

2.5 LA OBESIDAD

Se considera como obesidad a la acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Normalmente es producto de una alimentación exagerada o desordenada alimentación o bien por alteraciones metabólicas u hormonales y se debe principalmente a un desequilibrio crónico entre el consumo y el gasto de energía. La obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial prevenible, es el quinto factor principal de riesgo de defunción humana en el mundo (Pompeani et al 2014).

En el 2014 1900 millones de adultos mayores de 18 años (39%) tenían sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones (13%) eran obesos- De igual modo 41

millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso o eran obesos. En México, el 70% de los mexicanos padece sobrepeso y casi una tercera parte sufre de obesidad. Mientras que en el estado de Michoacán también alrededor del 70% de la población la padece (OMS, 2016).

La obesidad está estrechamente relacionada con el desarrollo del síndrome metabólico (Martínez-Huenschullan et al., 2018), lo cual desencadena numerosas enfermedades como la diabetes mellitus tipo II, accidentes cerebrovasculares y enfermedades cardiovasculares (Brown et al., 2015).

En la década reciente, se ha reconocido cada vez más a la disfunción del músculo esquelético como otro efecto perjudicial de la obesidad, la cual se caracteriza por una disminución de la fuerza muscular y una capacidad reducida para soportar la fatiga (Martínez-Huenschullan et al., 2018). En el músculo esquelético la obesidad produce atrofia significativa (Pompeani et al., 2014), provoca retrasos en la regeneración del músculo, lo que impide una correcta reparación y remodelación de los músculos dañados, además de presentarse un aumento de la proteólisis y una disminución en el diámetro de las fibras musculares y con ello pérdida de tejido muscular (Brown et al., 2015).

En la obesidad se produce un aumento de triglicéridos, diacilglicéridos, y ceramidas que se almacenan en el músculo esquelético (Choi et al., 2015). La grasa intramuscular se acumula adentro (intramiocelular) y afuera (extramiocelular) de las fibras musculares. El músculo sano contiene aproximadamente 1.5 % de grasa intramiocelular y esto puede aumentar a más del 5% en las personas obesas (Rahemi et al., 2015). Esta acumulación de grasa local intramiocelular altera el metabolismo de carbohidratos y lípidos lo que perjudica la producción de energía metabólica, la cual es esencial para el mantenimiento de la función contráctil normal del músculo esquelético (Espinosa et al., 2016), provocando disminución en la fuerza de contracción y favoreciendo el desarrollo de fatiga, lo que a su vez produce un incremento en el estrés oxidante (Choi et al., 2015). La obesidad está asociada con el deterioro de la función mitocondrial, lo que incluye una disminución de la respiración

mitocondrial y de la producción de ATP, así como un aumento en la producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Heo et al., 2017).

De igual manera, el incremento de la grasa almacenada en el tejido muscular provoca disminución en la captación de glucosa y deterioro de la vía de señalización de la insulina, provocando resistencia a la insulina, que es la reducción de la respuesta de los tejidos diana periféricos a una concentración fisiológica de insulina lo que genera hiperinsulinemia (Bae et al., 2016) y produce disfunción mitocondrial; se reduce la biogénesis mitocondrial, se altera la mitofagia y se promueve la apoptosis, con lo que se induce estrés celular y mitocondrial y se altera la homeostasis (Heo et al., 2017).

El estrés oxidante se ha relacionado con varios modelos de atrofia muscular, incluyendo la inducida por la obesidad. Durante este proceso se incrementa la producción ERO, lo que produce daño a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos y disminuye las defensas antioxidantes, lo que se asocia con la disminución en la fuerza de contracción y favorece el desarrollo de fatiga (Abrigo et al., 2016).

2.6 FATIGA MUSCULAR

La palabra fatiga es utilizada para describir cualquier reducción en el desarrollo mental o físico. En fisiología, sin embargo tiene un significado más específico, y se le definen como “la falla en mantener la fuerza requerida o esperada” (MacIntosh et al., 2006). También se le define como una disminución transitoria y recuperable de la fuerza muscular o la potencia en las contracciones musculares repetidas o continuas (Scott et al., 2016). La fatiga en el músculo esquelético normalmente se desarrolla durante las contracciones de acortamiento repetidas, como al caminar o correr (Halvorsen et al., 2013). Se ha propuesto que alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} y en la producción de ERO en el sarcoplasma son responsables de la fatiga muscular (García et al., 2009; Kuwahara et al., 2010).

La fatiga se caracteriza principalmente por una pérdida de la fuerza muscular que se manifiesta con la disminución tanto de la fuerza como de la velocidad y para distinguir la fatiga de la debilidad muscular o de algún tipo de daño, es importante tener en cuenta que la pérdida de energía con la fatiga es siempre reversible con el reposo (Fitts, 2007).

La fatiga es generalmente provocada por una activación intensa del músculo esquelético y como ya se mencionó, generalmente trae como resultado una disminución de la función contráctil que se invierte después de un período de reposo. Esta disminución es en la mayoría de los casos altamente dependientes de la capacidad del sistema metabólico aeróbico y por ende, del tipo de fibras que el músculo posea. Por consiguiente, bajo condiciones normales, las fibras musculares oxidativas lentas son marcadamente más resistente a la fatiga que las fibras glucolíticas rápidas (Westerblad et al., 2010).

Por otro lado, algunos estudios revelan que el desarrollo de fatiga es significativamente mayor durante las contracciones isotónicas (acortamiento) en comparación con las contracciones isométricas, lo que sugiere que el desarrollo de la fatiga depende también del tipo de contracción que el músculo desarrolle (Halvorsen et al., 2013), como se describió anteriormente, la contracción del músculo esquelético es controlada por una sucesión de eventos, por lo que la fatiga puede ser debida también a alteraciones o fallo en uno o más de los muchos pasos implicados en la secuencia del acople excitación-contracción (Lamb y Westerblad, 2011).

La fatiga puede ser de dos tipos: central, que se refiere a algún daño en la α -motoneurona; periférica, que se refiere a cada uno de los eventos subsecuentes de la contracción muscular (Westerblad et al., 2010).

Debido a la fatiga muscular ocurren cambios en la composición química del mioplasma tales como:

- Acumulación de H⁺ y lactato por la hidrólisis de glucógeno muscular.
- Aumentan los niveles de fosfato inorgánico (Pi) y ADP por la hidrólisis de ATP, y un aumento en el fosfato diprotonado debido al amortiguamiento del ácido láctico por el sistema bicarbonato/fosfato.
- Disminución de la fosforilación de la creatina, produciéndose poco ATP.
- Aumento en la concentración de calcio, debido a la reducción de su bombeo hacia el RS.
- Activación de los canales de potasio sensibles a ATP del sarcolema y de orgánulos intracelulares como la mitocondria.
- entrada de agua.
- Aumento en los niveles de ERO (Allen et al., 2008)

2.7 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las ERO son detectables en prácticamente todos los órganos y tejidos su producción se relaciona ampliamente con la actividad metabólica (Hernández et al., 2012). Se ha sugerido que el músculo esquelético es la principal fuente de generación de ERO (Powers et al., 2011).

La mitocondria es considerada comúnmente como la principal fuente de ERO en las células del músculo esquelético. La generación mitocondrial de ERO aumenta durante la actividad contráctil intensa (Barbieri y Sestili, 2011; Jackson, 2011).

Las ERO han sido tradicionalmente consideradas como subproductos tóxicos del metabolismo, con el potencial de causar daños a los lípidos, carbohidratos, proteínas y ADN (Beckendorf y Linke, 2015); Por ello, han sido durante mucho tiempo consideradas como especies nocivas para el tejido muscular esquelético (Barbieri y Sestili 2011).

Las ERO se generan en el músculo esquelético con la actividad normal y también en condiciones patológicas y se cree que afectan la función muscular tanto

a corto como a largo plazo (Dutka et al., 2011), existe evidencia de que las ERO son factores causales de varias enfermedades musculares (Barbieri y sestili 2011).

Debido a que las ERO se producen en los músculos activos se ha sugerido su participación en el desarrollo de la fatiga. Se ha observado que su formación masiva en respuesta al desarrollo de fatiga muscular afecta negativamente a la contractilidad (Zuo et al., 2011) y existe una relación dosis dependiente entre los niveles de ERO y la reducción de la contractibilidad muscular y la ocurrencia de fatiga (Fernández et al., 2009).

Como se muestra en la figura 5, las ERO modulan una variedad de procesos celulares que pueden limitar la contracción. Esto incluye la función del sarcolema, la regulación del calcio, la interacción de los miofilamentos y el metabolismo mitocondrial. A nivel molecular; las ERO alteran una serie de proteínas reguladoras en el músculo esquelético incluyendo los canales de potasio del sarcolema, los canales liberadores de calcio del retículo sarcoplásmico, la ATPasa, la troponina, la tropomiosina, el sitio activo de actina, las cadenas de miosina, las proteínas que regulan el metabolismo de la glucosa (Reid, 2008).

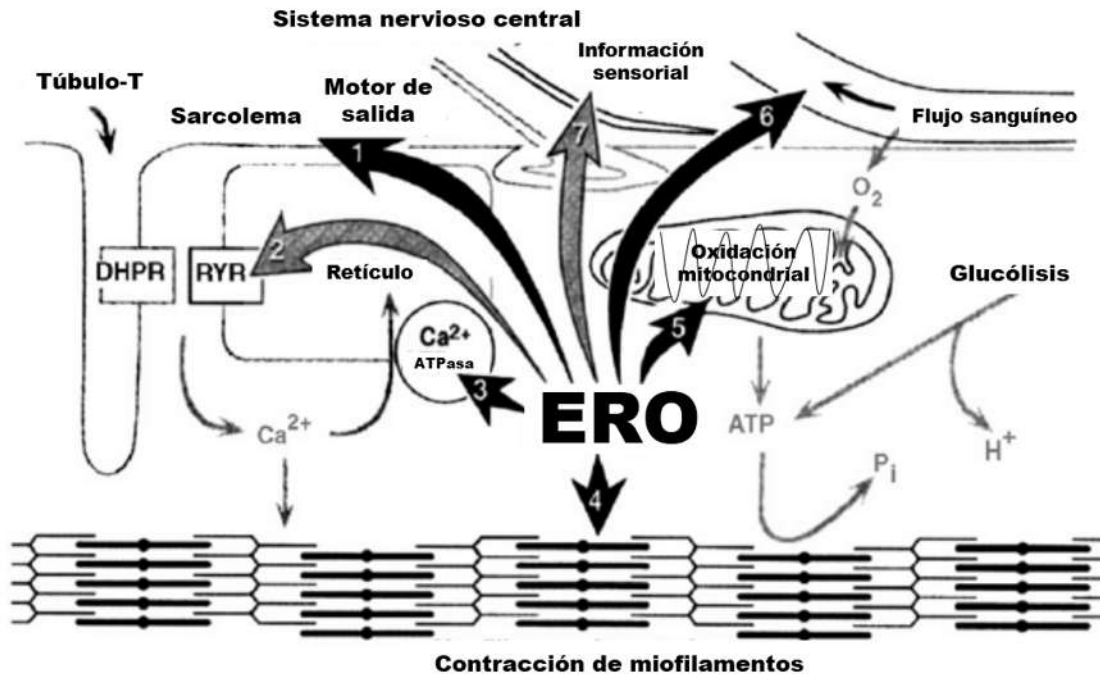


Figura 6. Sitios de acción de ERO en el músculo. El diagrama del tejido muscular ilustra mecanismos sensibles a ERO que pueden promover la fatiga in vivo al inhibir un proceso (flechas grises) o estimulando un proceso (flechas negras). 1) función sarcolemal; 2) liberación de calcio RS a través del canal de liberación de calcio sensible a rianodina (RyR); 3) recaptación de calcio del RS a través de la ATPasa sensible al calcio; 4) contracción del miofilamento; 5) metabolismo mitocondrial; 6) control microvascular; 7) retroalimentación aferente al sistema nervioso central (modificado de Reid 2008).

No obstante lo anterior las ERO no son necesariamente perjudiciales, ya que median una amplia gama de procesos fisiológicos, incluida la señalización y la regulación celular (Beckendorf y Linke, 2015).

A este respecto, las ERO, al menos a concentraciones fisiológicas normales, desempeñan un papel funcional en los procesos fisiológicamente relevantes de las células musculares (barbieri y sestili, 2011), ya que se ha demostrado que tienen efectos complejos sobre la producción de fuerza muscular (Jackson, 2009).

Por ello, las ERO a bajos niveles son esenciales en el músculo esquelético durante condiciones basales para la producción de fuerza normal. De hecho, su agotamiento en el músculo esquelético, resulta en la disminución de la producción de

la fuerza muscular; en contraste, un aumento moderado en su producción aumenta la producción de fuerza (Powers et al., 2011).

La sobreproducción de ERO, provoca cambios en la composición química del mioplasma, como la activación de los canales de potasio sensibles a ATP del sarcolema y de orgánulos intracelulares como la mitocondria. Lo anterior con la finalidad de contrarrestar los efectos perjudiciales del estrés oxidante en la maquinaria contráctil muscular (Allen et al., 2008).

2.8 CANALES DE POTASIO SENSIBLES A ATP

Se han identificado canales de potasio regulados por variaciones en las concentraciones intracelulares de ATP en numerosos tejidos. Los canales de potasio sensibles a ATP (canales K_{ATP}), se han identificado, en la membrana celular y en la membrana interna de las mitocondrias. Varios estudios han demostrado que los canales K_{ATP} desempeñan un importante papel en la protección de los tejidos (Constant-Urban et al., 2013). Los canales K_{ATP} fueron descritos por vez primera en 1987 por Akinori Noma en parches aislados de membrana plasmática de cardiomiocitos ventriculares y desde entonces se ha profundizado en el estudio de su modulación por el ATP, la activación por ADP, la modulación farmacológica, su apertura, su regulación, la comprensión de su estructura molecular y su función fisiológica en músculo cardíaco, esquelético y liso. Esto ha permitido identificar roles específicos de los canales K_{ATP} en el músculo, incluida la protección isquémica en el corazón, la protección contra el daño de la fibra en el músculo esquelético, y el control de tono vasomotor en el músculo liso (Flagg et al., 2010).

Los canales K_{ATP} sirven como sensores metabólicos, que se abren en situaciones de estrés y transducen cambios metabólicos en alteraciones del potencial de membrana y flujos de iones trans sarcolemáticos (Kraijevic et al., 2015).

Actualmente, se sabe que los canales K_{ATP} contienen el potencial de membrana sarcolemal y regulan el estado redox mitocondrial, además juegan un papel importante como sensores de ATP y ADP intracelular (Hibino et al., 2010), cerrándose cuando los niveles de ATP son altos y abriéndose cuando aumentan los niveles de ADP (Szabo y Zoratti 2014).

En el músculo esquelético estos canales se activan durante la fatiga y el estrés metabólico, por lo que su función ha adquirido importancia biomédica como blando terapéutico para tratar algunas enfermedades tales como la diabetes, la isquemia cardiaca y neuronal y la fatiga muscular, donde en esta última afección, el canal se vuelve crucial en la prevención de la disfunción contráctil y daño en las fibras (Scott et al., 2016).

A nivel molecular estos canales se componen de un receptor a sulfonilureas, la subunidad SURx (SUR1, SUR2A O SUR2B), acopladas a un canal de potasio tipo rectificador entrante, la subunidad Kir6.x (Kir6.1 o Kir6.2), la subunidad Kir6.x consta de una disposición tetramérica de subunidades, cada una compuesta de 2 hélices transmembranales, una región formadora de poro, un amino terminal y un carboxilo terminal. Se ha descrito, que la subunidad Kir6.x más abundante en las fibras musculares esqueléticas es Kir6.2. Por otro lado la subunidad SURx posee 17 regiones transmembrana agrupadas en 3 dominios transmembranales TMD0, TMD1 Y TMD2, cada unidad SURx cuenta con dos dominios de unión a nucleótidos, NBD1 y NBD2 (figura 6) (Flagg et al., 2010; Hibino et al., 2010; Szabo y Zoratti 2014).

La subunidad SURx actúa como reguladora del canal y le confiere la sensibilidad al ADP y las características farmacológicas distintivas de los canales K_{ATP} . La subunidad Kir6.x forma el poro del canal, el cual media la inhibición dependiente de ATP de estos canales. El canal K_{ATP} integrado por las estructuras de las subunidades Kir6.x y SURx en conjunto forman un octámero con una estequiometría 4:4 (Figura 6) (Flagg et al., 2010; Hibino et al., 2010; Szabo y Zoratti 2014).

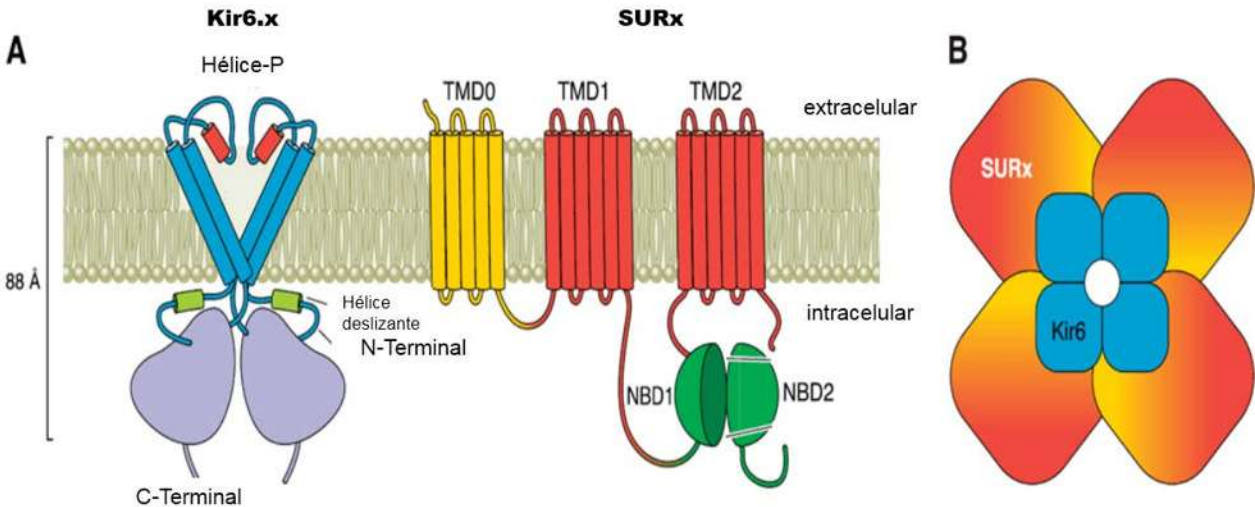


Figura 7. Estructura del canal K_{ATP} y las subunidades que lo conforman. El canal K_{ATP} es un complejo heterooctámero que comprende dos tipos de subunidades: un poro formado por subunidades Kir6.x (Kir6.1 o Kir6.2) y la subunidad reguladora SUR (SUR1, SUR2A O SUR2B) (Modificado de Flagg et al., 2010).

La función de los canales K_{ATP} del sarcolema (sarco K_{ATP}) depende de la concentración de ATP. Este tipo de canales tiene baja probabilidad de apertura en condiciones de reposo, pero incrementan su apertura cuando bajan las concentraciones de ATP, promoviendo la entrada de potasio, con lo cual aleja a las células del umbral de excitación. Así, la actividad electrofisiológica de los canales K_{ATP} contienen el estado metabólico de la célula, mientras que la función principal de los canales K_{ATP} de la mitocondria (mito K_{ATP}) es el control del volumen de la matriz mitocondrial y en menor proporción actúan en la regulación de la actividad eléctrica (Tricarico et al., 2010).

2.9 PAPEL DE LOS CANALES K_{ATP} DURANTE LA FATIGA

Durante la fatiga, los canales sarco K_{ATP} se activan cuando descienden los niveles de ATP y cuando se incrementan los niveles de ADP y H^+ . La salida de K^+ incrementa la concentración en el exterior, como consecuencia, la membrana se hiperpolariza y se inactivan los canales de Na^+ , lo que disminuye el potencial de acción y la liberación de calcio por el retículo sarcoplásmico, lo que a su vez disminuye la tensión

desarrollada por el aparato contráctil, la activación de puentes cruzados y la actividad de la miosina ATPasa. Todo ello contribuye a preservar los niveles de ATP (Andrade et al., 2011).

Respecto al canal mitoK_{ATP}, sus funciones principales son el control del volumen de la matriz mitocondrial y la modulación de la producción de ATP. Cuando la respiración se inhibe, como ocurre durante la fatiga y la isquemia, el volumen mitocondrial disminuye (Montoya-Pérez et al., 2010). El aumento en los niveles de ATP en la mitocondria inducida por la apertura de los canales mitoK_{ATP} está involucrada en la protección del músculo durante la fatiga como se describe a continuación. La entrada de K⁺ a la matriz por la apertura de los canales mitoK_{ATP}, está acompañada de la entrada de agua, causando un aumento del volumen mitocondrial. El flujo de K⁺ está regulado por el intercambiador K⁺/H⁺, el cual permite el ingreso de H⁺ y la salida de K⁺ para mantener el volumen de la matriz. La disminución de los niveles de ATP provoca la apertura de los canales mitoK_{ATP}, la entrada de K⁺ y un aumento de la turgencia de la matriz; esto incrementa la respiración mitocondrial y aumenta la síntesis de ATP, lo que favorece la contracción muscular y disminuye la fatiga (Andrukhiv et al., 2006; Costa et al., 2006).

Se ha propuesto que la apertura de los canales mitoK_{ATP} confiere protección mediante un aumento moderado en la producción mitocondrial de ERO en cardiomiocitos y células de músculo liso vascular y corazones perfundido. Las ERO mitocondriales producidas en respuesta a la apertura de los canales mitoK_{ATP} sirven como segundos mensajeros para activar cinasas que participan en la ruta de señalización que confiere cardioprotección en eventos de isquemia-reperusión cardioprotectora (Costa et al., 2006).

2.10 REGULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS CANALES K_{ATP}

Desde el descubrimiento de los canales K_{ATP}, diversos trabajos se han enfocado en definir sus propiedades electrofisiológicas y su farmacología, incluyendo sus

propiedades biofísicas a nivel de canal unitario, la regulación por los nucleótidos y su respuesta a abridores y bloqueadores (Constant-Urban et al., 2013).

Farmacológicamente, los canales K_{ATP} son receptores para los abridores y bloqueadores, ya que estos canales, pueden activarse (abrirse con agonistas del canal) o inhibirse (cerrarse con antagonistas del canal). Una variedad de moléculas funcionan como activadores del canal lo que incluye al diazóxido, nicorandil, el BMS191095, cromakalim, levcromakalim, el EMD60480, el EMD57970, pinacidil, el RP66471, minoxidil y el KRN2391. Sin embargo, de acuerdo con los hallazgos encontrados en células cardiacas y en mitocondrias aisladas, los compuestos más selectivos para los canales mito K_{ATP} son el diazóxido, el nicorandil y el BMS191095 los cuales tienen una actividad muy baja sobre los canales del sarcolema (Garlid et al., 2006).

La apertura de los canales mito K_{ATP} por los agentes antes mencionados dan como resultado la despolarización de la membrana intramitocondrial por entrada de K^+ , lo que simultáneamente produce una reducción de la sobrecarga de calcio mitocondrial (Jasova et al., 2016).

Los abridores de los canales K_{ATP} protegen al corazón contra la lesión por isquemia-reperfusión mientras que los bloqueadores previenen esta protección. Por otra parte, se ha demostrado que los abridores de canales K_{ATP} como el cromakalim y el diazóxido son protectores en modelos cerebrales de isquemia-reperfusión (Bajar et al., 2001). De igual modo, el diazóxido retrasa la aparición de la fatiga en las fibras de músculo esquelético rápido de mamíferos (García et al., 2009) y aumenta la tensión post-fatiga en el músculo esquelético lento del pollo (Sánchez-Duarte et al., 2012). El nicorandil otro abridor de los canales K_{ATP} , protege al músculo esquelético contra la lesión por isquemia-reperfusión (Cahoon et al., 2013).

Como se mencionó anteriormente, el diazóxido es uno de los activadores de canal mito K_{ATP} más utilizado, activa al canal mito K_{ATP} con una potencia mil veces

mayor que al canal K_{ATP} del sarcolema, lo que lo hace una herramienta farmacológica que permite discriminar entre los canales K_{ATP} sarcolemales y los mitocondriales, aumentando así el tiempo para el desarrollo de contractura y mejorando la recuperación funcional (Garlid et al., 2006).

La activación farmacológica de los canales K_{ATP} con diazóxido, mejora la contracción muscular, favorece la resistencia a la fatiga (García et al., 2009), reduce los niveles de ERO, disminuye la peroxidación lipídica, y aumenta las defensas antioxidantes (Moghtadaei et al., 2012).

2.11 EL DIAZÓXIDO

El diazóxido (7-cloro-3-metil-4H-1,2,4-benzotiadiazina 1,1-dióxido, $C_8H_7ClN_2O_2S$) es un derivado de benzotiadiazina (figura 7) que aumenta el tiempo de apertura de los canales $mitoK_{ATP}$. Tiene afinidad por la subunidad SUR del canal, específicamente actúa sobre SUR2A Y 2B del músculo cardíaco y esquelético (Constant-Urban et al., 2013).

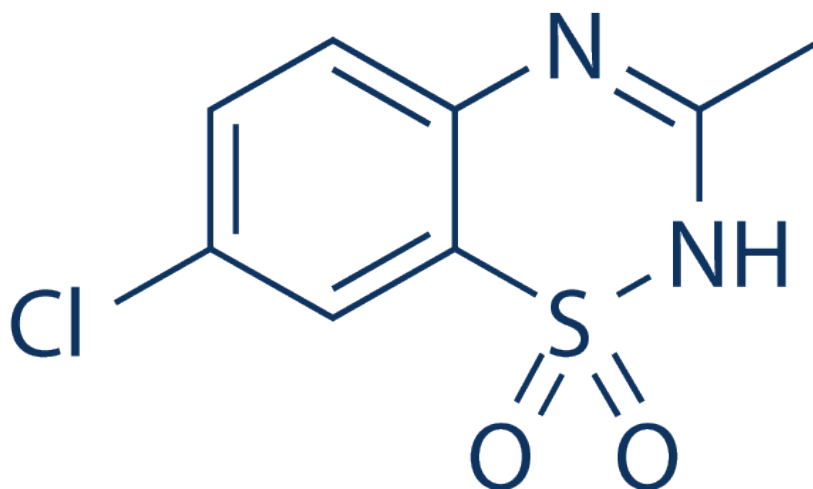


Figura 8. Estructura del diazóxido. 7-cloro-3-metil-4H-1,2,4-benzotiadiazina 1,1-dióxido ($C_8H_7ClN_2O_2S$) (Constant-Urban et al., 2013).

Además de tener efecto protector en los tejidos al ser un abridor del canal mitoK_{ATP}, el diazóxido es un vasodilatador, un inhibidor de la secreción de insulina, al interactuar con los canales K_{ATP} de las células beta de los islotes pancreáticos. Se considera un fármaco que resulta benéfico para algunas patologías, como la obesidad, ya que reduce la ingesta de alimentos y el aumento de peso, evita la hiperinsulinemia, mejora la sensibilidad a la insulina, mejora la glucemia y el perfil lipídico, lo que en conjunto contrarresta la difusión mitocondrial (Alemzadeh et al., 2008).

Es probable que la atenuación de la liberación de insulina por parte del diazóxido esté mediado por la hiperpolarización de las células, proporcionando así un descanso celular al reducir la liberación de insulina (Alemzadeh y Tushaus, 2004).

La utilización de diazóxido durante la obesidad es una alternativa eficaz para contrarrestar los efectos negativos de dicha patología, ya que mejoran el funcionamiento muscular, con lo que se evita el daño celular, se incrementan las defensas antioxidantes y se retrasa la aparición de la fatiga (Alemzadeh et al., 2008; García, 2009, Moghtadaei et al., 2012).

2.12 EJERCICIO

La inactividad física se considera en la actualidad un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular y una variedad cada vez mayor de otras enfermedades crónicas, tales como la diabetes, el cáncer (de colon y mama), la obesidad, la hipertensión, enfermedades osteoarticulares como la osteoporosis y la osteoartritis y la depresión. Por el contrario, se considera que la actividad física regular produce efectos saludables, incluido aumento en el metabolismo tisular debido a proliferación mitocondrial e incremento en la sensibilidad a la insulina y de la capacidad cardiorrespiratoria (Di meo et al., 2017).

El ejercicio es un conjunto de acciones motoras músculo-esqueléticas, que mejoran de manera no farmacológica el funcionamiento muscular, La actividad física

promueve diversas adaptaciones metabólicas y funcionales en el músculo esquelético. El ejercicio de resistencia se recomienda para el tratamiento y prevención de diversas patologías, ya que promueve la biogénesis mitocondrial, proporciona una mejora significativa en la función del músculo esquelético, mejora la contracción muscular y brinda resistencia a la fatiga (Lambertucci et al., 2006).

Por el contrario, los bajos niveles de actividad física diaria están asociados con un fenotipo de músculo esquelético más glucolítico y altos niveles de actividad física diaria promueven un tipo de fibra muscular esquelética más oxidativa, así como un aumento en el contenido mitocondrial intramuscular y antioxidantes (Hyatt et al., 2015)

La respuesta al ejercicio depende de la intensidad, la duración y el tipo de ejercicio, ya que cuando el ejercicio es de muy alta intensidad, causa una generación excesiva de ERO, provoca estrés oxidante, inflamación y daño estructural a las células musculares. Por tal motivo, para que un régimen de ejercicio resulte benéfico y no perjudicial, se deben mantener niveles de intensidad y duración de medios a bajos (Lu, et al., 2016).

Sin embargo, se necesitan bajas concentraciones de ERO durante el ejercicio, para que se establezcan ciertas adaptaciones en los tejidos musculares (Bidi et al., 2015), La relación dosis-respuesta entre la producción de ERO y la adaptación muscular no ha sido fácil de determinar. El concepto de hormesis, derivado del campo de la toxicología, describe la relación de respuesta a la dosis cuando un factor de estrés es benéfico en niveles moderados y perjudicial a altos niveles, se ha propuesto que el modelo de hormesis dependiente de ERO podría explicar algunas de las respuestas al ejercicio (Espinosa et al., 2016). Se ha demostrado que las ERO pueden aumentar la expresión y actividad de ciertas enzimas antioxidantes, por activación de vías de señalización en el músculo esquelético (Wang et al., 2016).

Se ha demostrado que la activación de los canales K_{ATP} aumenta la vasodilatación en respuesta a la isquemia, lo que indica la posibilidad de que los

canales de K_{ATP} contribuyan sustancialmente al suministro de O_2 al músculo esquelético durante el ejercicio (Holdwoth et al., 2015).

Por otro lado, el ejercicio aumenta la expresión de los canales K_{ATP} sarcolemales lo que mejora la función de los cardiomiocitos y ha sido asociado con un aumento en la expresión de la subunidad SUR2A del canal K_{ATP} en la isquemia cardíaca, lo cual mejora la velocidad y magnitud del acortamiento del potencial de acción que ocurre en respuesta a la aceleración de la frecuencia cardíaca. Esta adaptación en la excitabilidad de la membrana es crítica para optimizar el consumo de energía cardíaca y este mecanismo, posiblemente podría ser extrapolable al músculo esquelético (Brown et al., 2005; Zingman et al., 2011; Kraljevic et al., 2015).

Por lo anterior, el ejercicio es un valioso tratamiento no farmacológico para los trastornos metabólicos asociados con la obesidad. La prevención del aumento de peso mediante el aumento de la actividad física es una estrategia clave para prevenir la epidemia mundial de la obesidad. Sin embargo, el 58% de los niños de entre 6-11 años y aproximadamente el 92% de los adolescentes de 12-19 años no cumplen con las dosis recomendadas de actividad física diaria (Hyatt et al., 2015). La actividad física regular desempeña un papel clave en la reducción del riesgo de obesidad al aumentar el gasto energético. El músculo esquelético es el principal órgano diana que participa en el ejercicio. Es ampliamente aceptado, que un factor de motilidad se libera durante la contracción del músculo esquelético, lo que puede mejorar la función muscular (Bae et al., 2016).

Uno de los principales efectos de la obesidad se presenta en la dinámica de las fibras del músculo esquelético, ya que altera la distribución normal de las fibras musculares y se ha demostrado que algunos protocolos de ejercicio pueden revertir la distribución anormal de dichas fibras (Pattanakuhar et al., 2016).

El ejercicio disminuye la grasa almacenada en el músculo, con lo que se mejora la contracción muscular, aumenta la sensibilidad a la insulina de las células de todo el

organismo, principalmente del músculo esquelético, lo que evita la hiperinsulinemia y estimula el transporte de glucosa hacia el interior de la célula (Cartee et al., 2016).

La captación de glucosa en el músculo en contracción experimenta una regulación compleja dependiente de varios factores: la administración de glucosa, el transporte de glucosa y el metabolismo de la glucosa a nivel de tejido. Durante el ejercicio, hay un aumento de hasta 20 veces en el flujo sanguíneo que mejora la entrega de glucosa al músculo que se ejercita. El músculo entrenado utiliza combustibles de manera más eficiente que el músculo no entrenado. El ejercicio regular mejora la absorción total de glucosa en el músculo esquelético estimulada por la insulina y la contracción (Mcgarrah et al., 2016).

Además, como ya se mencionó, se ha documentado que el ejercicio de resistencia aumenta las defensas antioxidantes, a través de un mecanismo hormético lo que vuelve al músculo más resistente al estrés oxidativo (Ji et al., 2006). Todos estos mecanismos en conjunto, protegen contra la disfunción mitocondrial producida por la obesidad, disminuyendo los niveles de ERO, mejorando la respiración y promoviendo la beta oxidación de ácidos grasos (Lambertucci et al., 2006).

Algunos estudios han demostrado que la inhibición de la respiración mitocondrial por la obesidad se puede atenuar mediante el entrenamiento aeróbico. De igual modo, el aumento en la producción de ERO inducida por la obesidad puede disminuir mediante el entrenamiento aeróbico, el cual estimula la producción y la actividad de los sistemas antioxidantes miocelulares (Heo et al., 2017).

La obesidad es un estado patológico que deteriora el funcionamiento del músculo esquelético, provoca la aparición de la fatiga y el daño celular. Se ha documentado que el tratamiento con los abridores de los canales K_{ATP} y el ejercicio regular mejoran el funcionamiento muscular, con lo que se evita el daño celular, se incrementa la defensa antioxidante, se retrasa la aparición de la fatiga y se reduce la sintomatología causada por la obesidad.

III. HIPÓTESIS

La apertura de los canales K_{ATP} y el ejercicio mejoran de manera sinérgica el funcionamiento muscular en la obesidad al disminuir el estrés oxidante.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la apertura de los canales K_{ATP} y el ejercicio de manera sinérgica mejoran el funcionamiento muscular en la obesidad al disminuir el estrés oxidante.

V. Objetivos específicos

- Determinar si la apertura de los canales K_{ATP} y el ejercicio regular mejoran la contracción y la resistencia a la fatiga en músculo esquelético de ratas obesas.
- Evaluar el efecto de la apertura de los canales K_{ATP} y el ejercicio sobre el estrés oxidante y la peroxidación lipídica en el músculo esquelético de ratas obesas.
- Evaluar el efecto de la apertura de los canales K_{ATP} y el ejercicio sobre los niveles de glutatión en músculo esquelético de ratas obesas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Se utilizaron ratas macho Wistar de aproximadamente 300 g, las cuales se dividieron en 8 diferentes grupos: control (C), diazóxido (D), ejercitadas (E), obesas (O), obesas con diazóxido (OD), obesas ejercitadas (OE), obesas ejercitadas con diazóxido (OED) y ejercitadas con diazóxido (ED). Para los grupos a los que se les indujo la obesidad les fue suministrada una dieta alta en grasas al 50% (pellet, manteca vegetal, manteca animal) por un periodo de 5 semanas, a los grupos tratados con diazóxido les fue administrado el fármaco a una dosis de 35 mg/kg por un periodo de catorce días vía intraperitoneal, finalmente, los grupos ejercitados fueron sometidos a un protocolo de ejercicio por un periodo de 5 semanas el cual consistió en: para ratas control 10 m/min x 10 min/1 semana, 10 m/min x 10 min, 16 m/min x 5 min/1 semana, 10 m/min x 5 min, 16 m/min x 5 min, 22 m/min x 5min/2 semana y 10 m/min x 5 min, 16 m/min x 5 min, 22 m/min x 10 min/1 semana y para ratas obesas de 10 m/min x 10 min/1 semana, 10 m/min x 10 min, 16 m/min x 5 min/1 semana, 10 m/min x 5 min, 16 m/min x 10 min/2 semanas y 10 m/min x 5 min, 16 m/min x 15 min/1 semana (Bae et al., 2016).

Durante el establecimiento de los protocolos se determinaron el peso y la glucosa utilizando una báscula y un glucómetro Accu Check Performa ®.

6.2 Disección de los músculos

Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical, una vez concluidos los tratamientos y se realizó la disección y obtención tanto del músculo lento, el músculo sóleo, como del músculo rápido, el músculo extensor digitorio longus (EDL), de las dos patas traseras. Los músculos de una de las patas se mantuvieron con solución fisiológica Krebs-Ringer, para posteriormente, ser llevados a registro de tensión. Por otro lado,

los músculos de la otra pata fueron almacenados en ultra congelación (-70 °C) para posteriormente ser homogenizados para la realización de pruebas bioquímicas.

6.3 Registro de tensión

Los músculos Sóleo y EDL fueron colocados en una caja de Petri revestida con fondo de resina transparente (Sylgard) donde se fijaron con ayuda de alfileres entomológicos inmersos en solución Krebs-Ringer (118 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 1.18 mM MgSO₄, 24.8 mM NaHCO₃, 1.18 mM KH₂PO₄, 10 mM Glucosa y 2.54 mM CaCl₂) (Steward et al., 2011) y se suministró gas carbógeno (95 % de CO₂ y 5 % O₂). El exceso de tejido graso y conectivo se retiró bajo el microscopio estereoscópico.

El músculo se montó en una cámara para el registro de tensión isométrica, con su extremo proximal sujeto al fondo de la cámara y el extremo distal al gancho de un transductor óptico (World precisión instruments), el cual se conectó a un amplificador (World precisión instruments) y este a su vez a una interfase analógico-digital (World precisión instruments) que permitió adquirir la tensión generada por el músculo en una computadora, mediante el software Axoscope (Axon Instruments, USA). Se colocaron dos electrodos de platino dentro de la cámara de registro, los cuales se encontraban conectados a una unidad aisladora de estímulos (Grass) con la finalidad de aplicar el protocolo para inducir fatiga, el cual consistió en pulsos de 100 V, 300 ms de duración y frecuencia de 45 Hz para músculo soleo y 50 Hz para músculo EDL. La estimulación fue detenida una vez presentada la fatiga.

El músculo fue estirado 1.3 veces su longitud de reposo y se dejó en perfusión en la solución fisiológica por espacio de 30 min antes de proceder al registro de tensión isométrica.

6.4 Determinación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO)

Los niveles de ERO fueron determinadas evaluando la oxidación de la sonda fluorescente diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA). Se colocó en tubos de ensaye 0.5mg/ml de homogenado de cada músculo y se incubó a 4 °C en agitación constante durante 20 minutos en buffer con 10mM HEPES, 100mM KCl, 3mM MgCl₂, 3mM KH₂PO₄ (pH 7.4) y 1.25 mM de H₂DCFDA en un volumen total de 2 ml. Esta suspensión se colocó en una celda de cuarzo y se determinó la fluorescencia basal. Un minuto después se le añadió 10 mM de glutamato/malato como sustrato del complejo I y los cambios en la fluorescencia fueron determinados por 20 min adicionales (Ortíz-Ávila et al. 2013).

Los cambios en la fluorescencia fueron medidos en un espectrofluorómetro Shimadzu RF- 5301PC (λ_{ex} 485 nm; λ_{em} 520 nm). Los datos se expresaron como la diferencia de fluorescencia obtenida restando las unidades de fluorescencia obtenidas al final de los 20 min con el sustrato menos la fluorescencia obtenida previo a la adición del sustrato. El resultado se expresó como unidades arbitrarias de fluorescencia/min.

6.5 Evaluación de la peroxidación de lípidos

Los músculos sóleo y EDL obtenidos de una de las patas traseras fueron homogenizados y utilizados para esta determinación, la cual se realizó midiendo los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Buege and Aust 1978). 0.5mg/ml del homogenado se re-suspendió en 1 ml de buffer de fosfato (50 mM KH₂PO₄, pH 7.6) y se incubaron con 50 μ M de FeSO₄ durante 30 minutos a 4°C para inducir la peroxidación de lípidos, dado que el ion Fe²⁺ es capaz de inducir la producción de radical hidroxilo (OH[•]) (Cortés-Rojo et al 2009).

Una vez concluido el tiempo de incubación, se agregó a cada muestra 2 ml de solución acida (ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico y ácido clorhídrico), y se

incubaron en baño María durante 30 minutos. Posteriormente, los tubos se colocaron en hielo por 5 minutos se centrifugaron a 7500 rpm durante 5 min. La absorbancia de cada muestra se determinó a 532nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV/VIS. Los datos se expresaron como nmolas de TBARS/mg de proteína.

6.6 Evaluación del estado redox del glutatión

A 0.5mg/ml de homogenado de músculo se le adicionó ácido sulfosalicilico al 5% (v/v) y se sometió a dos ciclos de congelación y descongelación. Posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos y se extrajo el sobrenadante.

El glutatión total (GSH + GSSG) y el glutatión oxidado (GSSG) se determinaron por un método enzimático. Los niveles de GSH+GSSG se determinaron usando 90 μ l del sobrenadante, el cual fue re-suspendido en buffer de fosfatos (K_2HPO_4 , 0.1M pH 7.5) y mezclado con 3mM de ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico (DTNB) y 0.115 u/ml de glutatión reductasa en un volumen final de 1mL. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadió 2mM de NADPH y la cinética de la reacción se determinó por 15 minutos. El incremento de la absorbancia a 412 nm fue convertida a concentración de GSH usando una curva estándar con valores conocidos de GSH (Akerboom y Sies, 1981).

Para la determinación del GSSG, el mismo ensayo de reciclaje de DNTB fue aplicado después de incubar con 1 hora a temperatura ambiente con 4- vinilpiridina al 3% (v/v) para derivatizar el GSH reducido (Ortíz-Ávila et al. 2015). El glutatión reducido (GSH) se determinó restando la concentración de GSH+GSSGH menos la del GSSG. Los datos se expresaron como μ Molas/mg de proteína.

6.7 Análisis de datos

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de una $n=8$ experimentos independientes usando muestras de diferentes animales. Las diferencias estadísticas entre los grupos fueron determinados por un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba post-hoc de Tukey. Se estableció una $P < 0.05$. El análisis se realizó con el software Sigma Plot, v.10.0 (Systat Software Inc. Erkrath, Alemania).

VII. RESULTADOS

7.1 Efecto del diazóxido y el ejercicio sobre el peso corporal y los niveles de glucosa en sangre de ratas obesas

Se evaluó el efecto del diazóxido, el ejercicio y su combinación sobre el peso corporal (Fig. 9 panel A) y los niveles de glucosa sanguínea (Fig. 9 panel B) al final de cada tratamiento.

En la Fig. 9A no se observaron cambios significativos en las mediciones de peso entre los grupos tratados de manera individual con diazóxido (322.12 ± 2.27 g) y ejercicio (324.28 ± 5.37 g) vs el grupo control (323.80 ± 2.80 g), mientras que en el grupo de ratas obesas se observó un incremento del peso corporal del 70.6 % (552.57 ± 3.61 g) vs el control (323.80 ± 2.80 g), lo que corrobora el establecimiento del modelo experimental de obesidad, no obstante, en los grupos de ratas obesas tratadas con diazóxido, ejercicio y la combinación de ambos, se observó reducción del peso corporal, del 18.35 % (451.16 ± 19.34 g) , del 17.62 % (455.19 ± 21.66 g) y del 22.69 % (427.16 ± 14.89 g) respectivamente vs el grupo de ratas obesas sin tratamientos (552.57 ± 3.61 g). Esto indica, que cada uno de los tratamientos disminuyó por igual el peso corporal de los grupos de ratas obesas, ya que no se apreció un efecto sinérgico o aditivo entre ambos.

En la Fig. 9B se pudo apreciar como los niveles de glucosa en sangre se encontraron incrementados un 10.55 % (85 ± 1.56 mg/dl) en el grupo tratado con diazóxido vs el grupo control (77 ± 1.13 mg/dl), mientras que el grupo ejercitado presentó una disminución del 8.94 % (70 ± 1.47 mg/dl) vs el grupo control (77 ± 1.13 mg/dl). Por otra parte, se observó como la obesidad incrementó los niveles de glucosa en sangre un 28.08 % (98 ± 1.25 mg/dl) en el grupo de ratas obesas vs el grupo control (77 ± 1.13 mg/dl), sin embargo, se pudo apreciar una reducción de dichos niveles del

13.95 % (84 ± 1.65 mg/dl) en el grupo de ratas obesas tratadas con diazóxido vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (98 ± 1.25 mg/dl) y una disminución aún mayor en los grupos de ratas obesas ejercitadas y obesas ejercitadas con diazóxido, con una disminución del 21.49 % (77 ± 1.51 mg/dl) para el caso de las ejercitadas vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (98 ± 1.25 mg/dl) y del 26.12 % (72 ± 1.84 mg/dl) para el grupo de ratas obesas ejercitadas con diazóxido vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (98 ± 1.25 mg/dl). En resumen cada uno de los tratamientos por separado disminuyó los niveles de glucosa en sangre en ratas obesas con respecto al grupo de ratas obesas sin tratamiento, siendo mayor este efecto en el grupo de ratas obesas ejercitadas y obesas ejercitadas con diazóxido en relación al grupo de ratas obesas tratadas únicamente con diazóxido, sin embargo, no se apreció un efecto sinérgico o aditivo entre la combinación de diazóxido y el ejercicio.

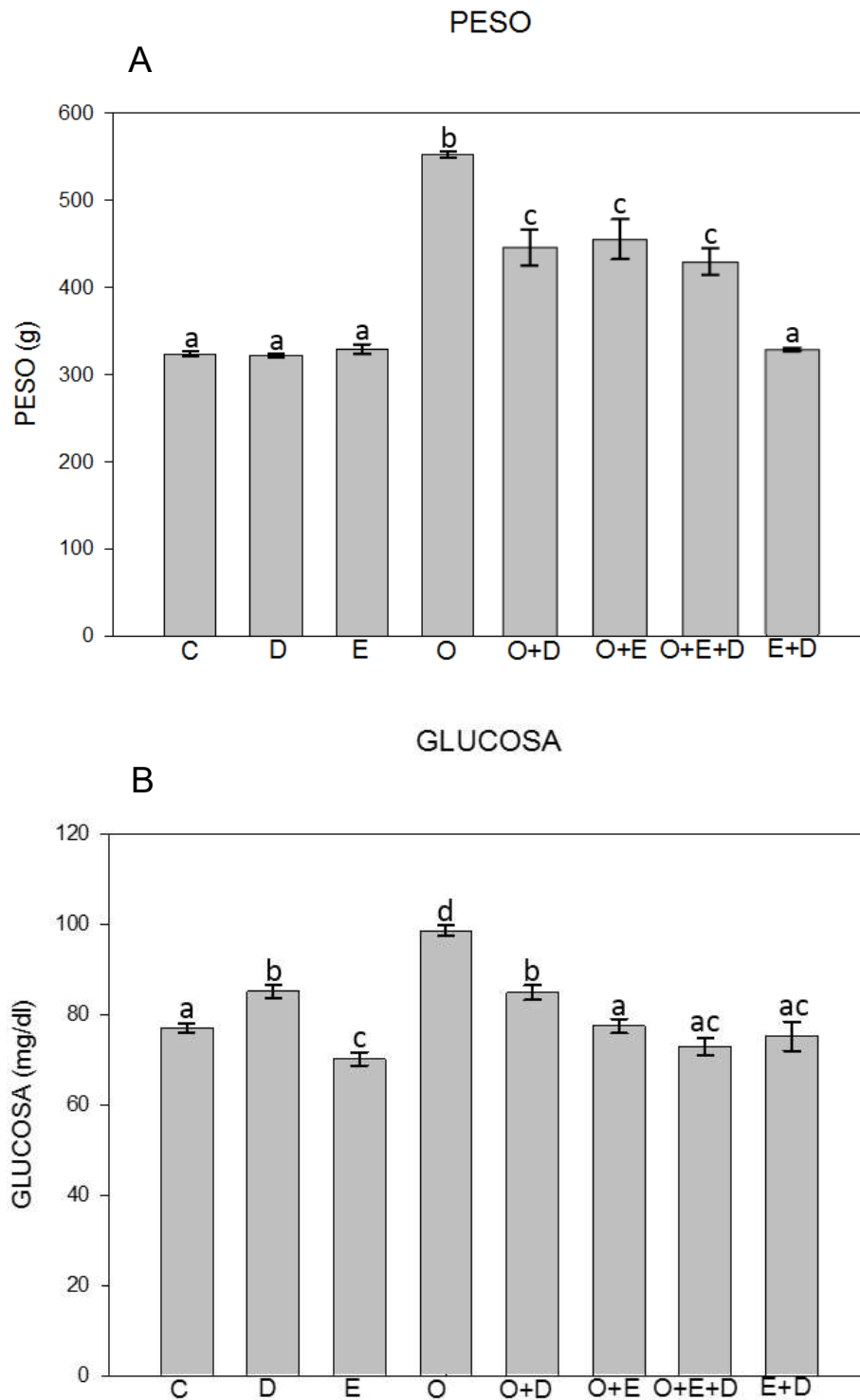


Figura 9. Peso corporal y niveles de glucosa sanguínea en los diferentes grupos de ratas. En el panel A se muestra el peso corporal, mientras que en el panel B los niveles de glucosa en sangre. C: control; D: diazóxido; E: ejercitadas; O: obesas; OD: obesas diazóxido; OE: obesas ejercitadas; OED: obesas ejercitadas con diazóxido; ED: ejercitadas diazóxido. Los datos se representan como la media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($P < 0.05$) ANOVA de 1 vía, Tukey prueba post-hoc, $n=8$.

7.2 Efecto del diazóxido y el ejercicio sobre la tensión máxima y la tensión total de músculo esquelético de ratas obesas

Anteriormente, se ha identificado que la obesidad disminuye la fuerza de contracción, provoca disfunción mitocondrial e induce la aparición de la fatiga muscular (Choi et al., 2015), no obstante, se ha observado que el diazóxido y el ejercicio promueven la participación de los canales K_{ATP} con la finalidad de contrarrestar la fatiga muscular y el estrés metabólico (Garcia et al., 2009; Kraljevic et al., 2015). Con el objetivo de determinar si la modulación de los canales mito K_{ATP} mejoran la contracción y disminuyen la fatiga muscular durante la obesidad, se evaluó el efecto del diazóxido (abridor de canales K_{ATP}), el ejercicio y la combinación de ambos sobre la tensión máxima y la tensión total de las fibras musculares lentas (músculo sóleo) y rápidas (músculo EDL) de ratas obesas.

En la Fig. 10 se muestra la tensión máxima y la tensión total de músculo sóleo (Fig. 10 panel A) y EDL (Fig. 10 panel B). En el músculo sóleo (Fig. 10A) Se observó un incremento en el grupo que fue tratado de manera individual con diazóxido del 76.60 % (271.89 ± 23.44 g) en la tensión máxima y un incremento del 51.32 % (472.72 ± 29.27 g) para la tensión total vs el grupo control (TMAX 153.95 ± 7.72 g; TTOTAL 312.38 ± 15.74 g), mientras que el grupo de ratas ejercitadas mostró un incremento del 40.02 % (215.56 ± 20 g) en la tensión máxima y un incremento del 28.54 % (401.56 ± 208.49 g) para la tensión total vs el grupo control (TMAX 153.95 ± 7.72 g; TTOTAL 312.38 ± 15.74 g), sin embargo, entre estos dos grupos no se apreciaron diferencias.

Por otro lado, se observó en el grupo de ratas obesas una disminución del 41.22 % (90.48 ± 12.01 g) en la tensión máxima y del 50.18 % (155.61 ± 12.54 g) para la tensión total vs el grupo control (TMAX 153.95 ± 7.72 g; TTOTAL 312.38 ± 15.74 g). Sin embargo, se apreció un incremento de ambas tensiones con cada uno de los tratamientos por separado, diazoxido y ejercicio, y un aumento más marcado con la combinación de ambos ya que se pudo observar en el grupo de ratas obesas tratados con diazóxido, un incremento del 108.58 % (188.73 ± 12 g) para la tensión máxima y

del 115.03 % (334.62 ± 10.74 g) en la tensión total vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (TMAX 90.48 ± 12.01 g; TTOTAL 155.61 ± 12.54 g), mientras que el grupo de ratas obesas ejercitadas presentó un aumento de la tensión máxima del 85.94 % (168.25 ± 8.44 g) y del 82.64 % (284.22 ± 16.04 g) en la tensión total vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (TMAX 90.48 ± 12.01 g; TTOTAL 155.61 ± 12.54 g). Finalmente en el grupo de ratas obesas ejercitadas con diazóxido, se observó un incremento del 162.12 % (237.18 ± 9.01 g) para la tensión máxima y del 102.77 % (471.17 ± 19.80 g) para la tensión total vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (TMAX 90.48 ± 12.01 g; TTOTAL 155.61 ± 12.54 g). Estos resultados mostraron como cada tratamiento por separado incrementaron la tensión máxima y la tensión total en el músculo sóleo de ratas obesas con respecto al grupo de ratas obesas sin tratamiento, siendo aún mayor este efecto en el grupo de ratas obesas ejercitadas con diazóxido mostrando un efecto sinérgico entre la combinación de diazóxido mas el ejercicio.

En el músculo EDL (Fig. 10B), el grupo tratado únicamente con diazóxido experimentó un incremento del 33.66 % (357.19 ± 23.32 g) en la tensión máxima y del 17.05 % (584.61 ± 17.79 g) para la tensión total vs el grupo control TMAX 267.29 ± 18.87 g; TTOTAL 499.43 ± 16.10 g), mientras que en el grupo de ratas ejercitadas, se pudo apreciar un incremento del 22.73 % (328.05 ± 18.85 g) en la tensión máxima y un incremento del 11.56 % (557.18 ± 21.64 g) para la tensión total vs el grupo control (TMAX 267.29 ± 18.87 g; TTOTAL 499.43 ± 16.10 g), sin embargo, entre ambos grupos no se observaron diferencias.

En el grupo de ratas obesas se observó una disminución del 49.15 % (135.89 ± 11.50 g) en la tensión máxima y del 56.17 % (218.89 ± 22.78 g) para la tensión total vs el grupo control (TMAX 267.29 ± 18.87 g; TTOTAL 499.43 ± 16.10 g), empero, se presentó un incremento de ambas tensiones con cada uno de los tratamientos por separado y un efecto mayor con la combinación de ambos, ya que se apreció en el grupo de ratas obesas tratados con diazóxido un incremento del 74.97 % (237.77 ± 18.49 g) para la tensión máxima y del 105.70 % (450.27 ± 19.33 g) en la tensión total

vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (TMAX 135.89 ± 11.50 g; TTOTAL 218.89 ± 22.78 g), mientras que el grupo de ratas obesas ejercitadas mostró un aumento de la tensión máxima del 29.28 % (175.68 ± 11.74 g) y del 63.28 % (357.42 ± 24.41 g) en la tensión total vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (TMAX 135.89 ± 11.50 g; TTOTAL 218.89 ± 22.78 g). Finalmente, en el grupo de ratas obesas ejercitadas con diazóxido se observó un incremento del 111.30 % (287.15 ± 9.01 g) para la tensión máxima y del 146.93 % (540.53 ± 8.38 g) para la tensión total vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (TMAX 135.89 ± 11.50 g; TTOTAL 218.89 ± 22.78 g). Estos resultados mostraron como cada tratamiento por separado incrementaron la tensión máxima y la tensión total en el músculo EDL de ratas obesas con respecto al grupo de ratas obesas sin tratamiento, se pudo apreciar que el tratamiento con diazóxido presentó mayor eficiencia que el tratamiento con ejercicio, mientras que el tratamiento de ejercicio más diazóxido mostró mayor incremento con un efecto sinérgico.

Estos resultados indican que independientemente del músculo, el tratamiento con diazóxido o el ejercicio aumentan la tensión máxima y la tensión total en los grupos control así como en los grupos de ratas obesas que fueron tratadas, siendo mayor este incremento en el grupo de ratas obesas donde ambos tratamientos fueron combinados con un efecto sinérgico.

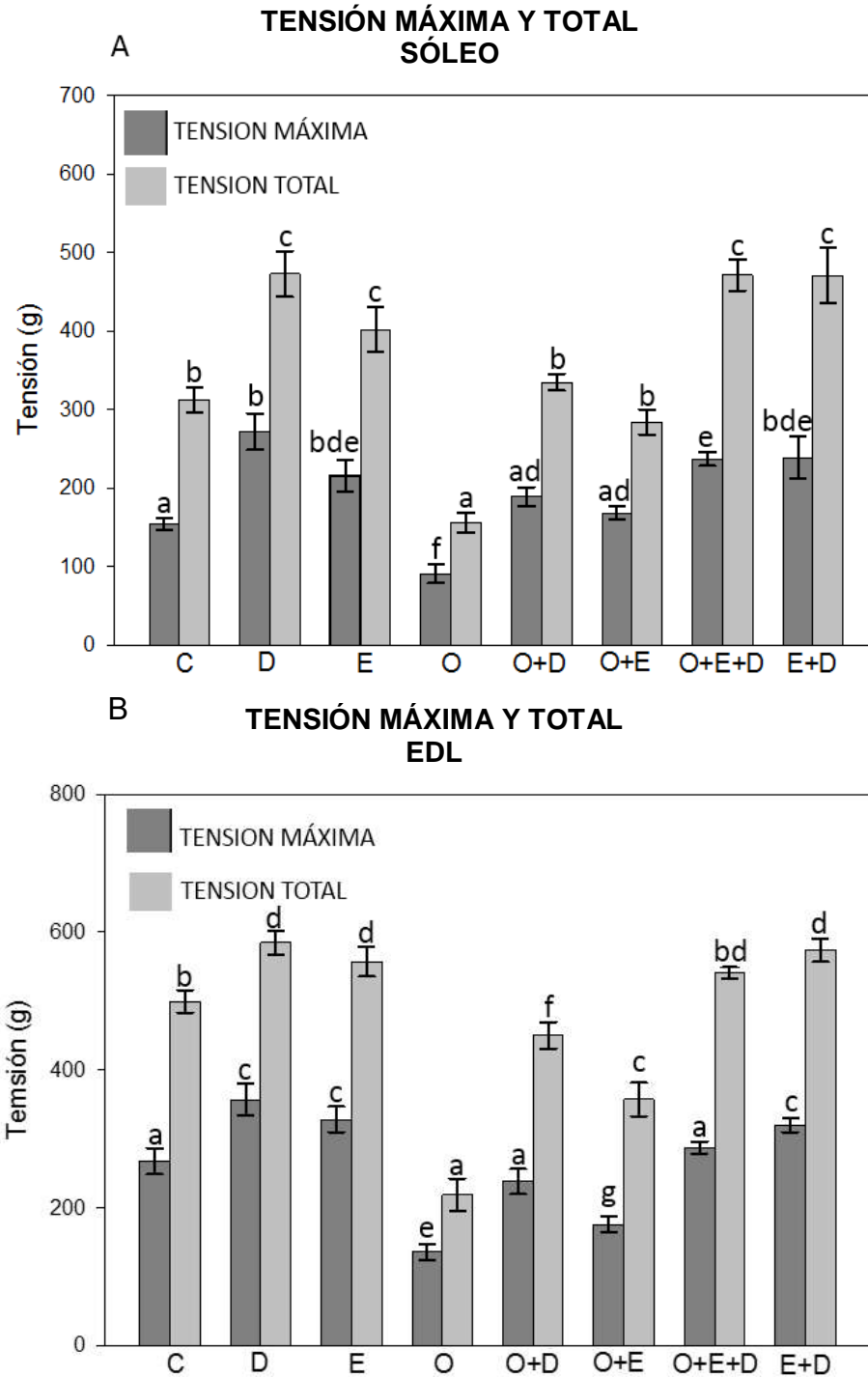


Figura 10. Tensión máxima y tensión total de músculo sóleo y EDL en cada grupo de ratas. En el panel A se muestra la tensión máxima, mientras que en el panel B se muestra la tensión total. C: control; D: diazóxido; E: ejercitadas; O: obesas; OD: obesas diazóxido; OE: obesas ejercitadas; OED: obesas ejercitadas con diazóxido; ED: ejercitadas diazóxido. Los datos se representan como la media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($P < 0.05$) ANOVA de 1 vía, Tukey prueba post-hoc, $n=8$.

7.3 Efecto del diazóxido y el ejercicio sobre el tiempo de resistencia a la fatiga de músculo esquelético de ratas obesas

Con el objetivo de verificar si el diazóxido, el ejercicio y la combinación de ambos modifican la resistencia a la fatiga, se procedió a evaluar el tiempo en el que se estableció la fatiga muscular con los registros de tensión isométrica.

En la Fig. 11, se observó en el panel A los resultados para músculo sóleo y en el panel B los resultados para el músculo EDL. En el grupo de ratas tratado únicamente con diazóxido hubo un incremento del 18.20 % (176.71 ± 3.34 s) para el músculo sóleo y del 16.75 % (135 ± 4.39 s) para el músculo EDL, en el tiempo de resistencia a la fatiga vs el grupo control (sóleo: 149.5 ± 4.59 s; EDL: 115.62 ± 2.21 s), mientras que en el grupo de ratas ejercitadas se observó un incremento del 35.78 % (203 ± 23.64 s) para el músculo sóleo y del 63.33 % (188.85 ± 2.21 s) para el músculo EDL vs el grupo control (sóleo: 149.5 ± 4.59 s; EDL: 115.62 ± 2.21 s). Estos resultados indican que ambos tratamientos por separado aumentaron el tiempo de resistencia a la fatiga en ambos músculos, siendo mayor el efecto para ambos músculos con el ejercicio, sobre todo en el músculo EDL.

Se observó, una disminución en el tiempo de resistencia a la fatiga del 50.31 % (74.28 ± 5.53 s) en el músculo sóleo y del 43.84 % (64.93 ± 2.54 g) en el músculo EDL vs el grupo control (sóleo 149.5 ± 4.59 s; EDL 115.62 ± 2.21 s) en el grupo de ratas obesas. En contraste se pudo apreciar un incremento del tiempo de resistencia a la fatiga para ambos músculos con cada uno de los tratamientos por separado y un efecto mayor con la combinación de ambos, como lo refleja el incremento del 34.25 % (99.73 ± 2.43 s) para músculo sóleo y del 31.77 % (85.57 ± 2.82 s) para músculo EDL en el grupo de ratas obesas con diazóxido vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (sóleo 74.28 ± 5.53 s; EDL 64.93 ± 2.54 g) y de 87.51 % para el músculo sóleo (139.29 ± 1.81 s) y del 93.15 % para músculo EDL (125.42 ± 1.97 s) para el grupo de ratas ejercitadas vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (sóleo 74.28 ± 5.53 s; EDL 64.93 ± 2.54 g). En el grupo de ratas obesas ejercitadas con diazóxido, se observó un

incremento del 149.64 % (185.44 ± 1.22 s) en el músculo sóleo y del 134.96 % (152.57 ± 1.77 s) para músculo EDL vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (sóleo 74.28 ± 5.53 s; EDL 64.93 ± 2.54 g).

Estos resultados indican que el diazóxido o el ejercicio aumentan el tiempo de resistencia a la fatiga en la obesidad, siendo mayor este efecto con el ejercicio vs el grupo de ratas obesas tratadas con diazóxido y este efecto mejora cuando ambos tratamientos se combinan.

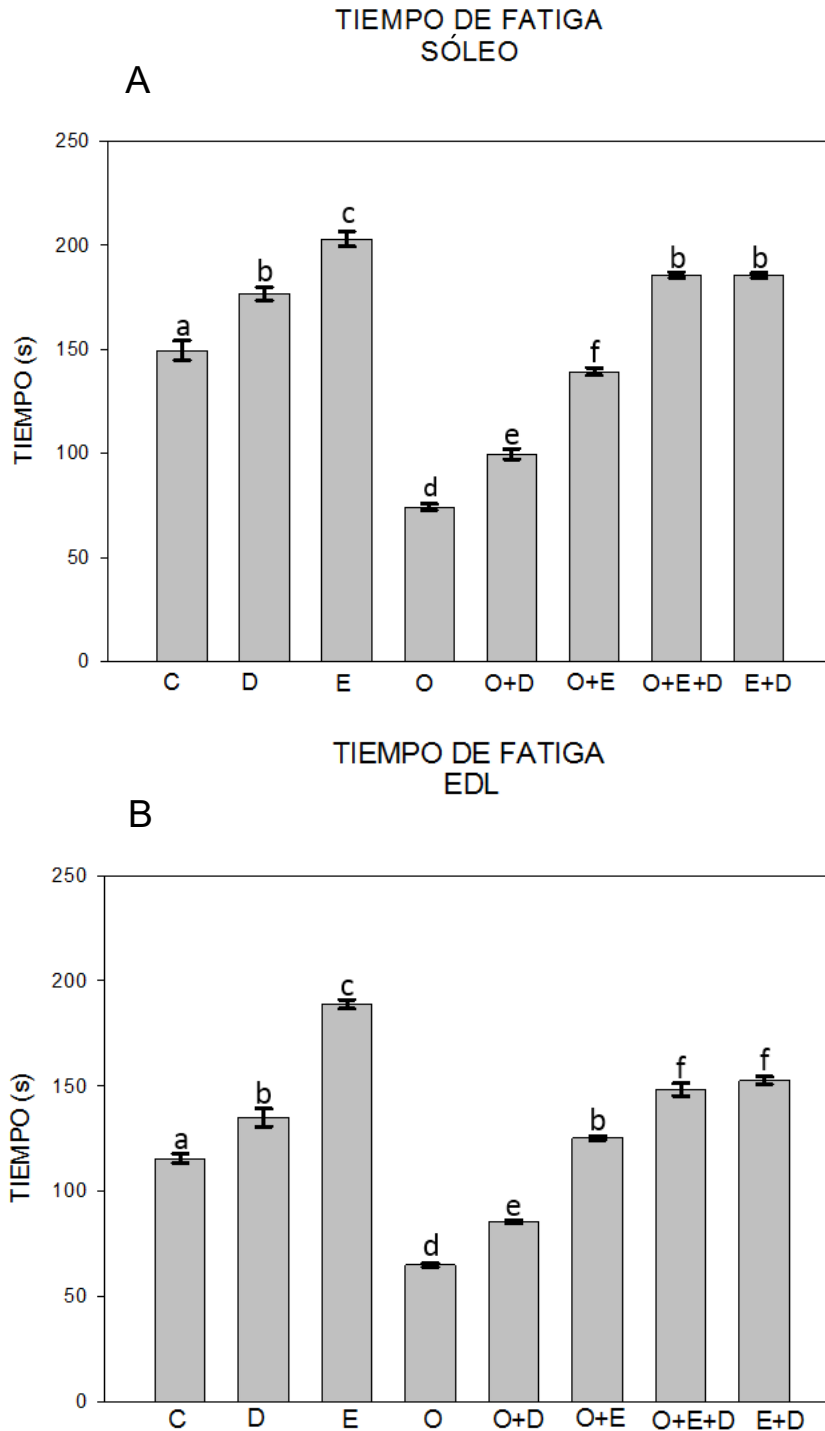


Figura 11. Tiempo de establecimiento de la fatiga muscular en los diferentes grupos. En el panel A se muestra el tiempo de aparición de fatiga en segundos (s) para músculo sóleo, mientras que en el panel B se muestra el tiempo de aparición de fatiga en segundos (s) para músculo EDL para cada grupo. C: control; D: diazóxido; E: ejercitadas; O: obesas; OD: obesas diazóxido; OE: obesas ejercitadas; OED: obesas ejercitadas con diazóxido; ED: ejercitadas diazóxido. Los datos se representan como la media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($P < 0.05$) ANOVA de 1 vía, Tukey prueba post-hoc, $n=8$.

7.4 Efecto del diazóxido y el ejercicio sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno en músculo esquelético de ratas obesas

Previamente, se ha identificado que la obesidad induce disfunción mitocondrial, lo cual provoca un incremento en los niveles de ERO, contribuyendo a la fatiga muscular y al estrés metabólico. No obstante, se ha identificado que el diazóxido (abridor de canales K_{ATP}) y el ejercicio regular, promueven disminución en dichos niveles (Moghtadaei et al., 2012). Por tal motivo en esta serie experimental se exploró el efecto del diazóxido, el ejercicio y la combinación de ambos sobre los niveles de ERO en las fibras musculares lentas (músculo sóleo) y rápidas (músculo EDL) de ratas obesas.

En el músculo sóleo (Fig. 12 panel A), se observó una disminución en los niveles de ERO del 56.36 % ($0.047 \pm 0.002 \Delta F$) antes de la fatiga y del 41.17 % ($0.13 \pm 0.012 \Delta F$) después de la fatiga, esto, en el grupo tratado de manera individual con diazóxido vs el grupo control (antes de la fatiga $0.109 \pm 0.011 \Delta F$; después de la fatiga $0.223 \pm 0.090 \Delta F$), mientras que en el grupo de ratas ejercitadas se apreció un decremento del 28.13 % ($0.078 \pm 0.002 \Delta F$) antes de la fatiga y del 55.29 % ($0.010 \pm 0.015 \Delta F$) después de la fatiga vs el grupo control (antes de la fatiga $0.109 \pm 0.011 \Delta F$; después de la fatiga $0.223 \pm 0.090 \Delta F$). Estos resultados mostraron que ambos tratamientos por separado disminuyeron los niveles de ERO en ratas control, presentando mayor efecto el grupo tratado con diazóxido con vs el grupo tratado con ejercicio antes de la fatiga, no obstante, posterior a la fatiga no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos.

Se observó un incremento en los niveles de ERO del 51.96 % ($0.165 \pm 0.0113 \Delta F$) antes de la fatiga y del 40.81 % ($0.314 \pm 0.020 \Delta F$) después de la fatiga, en el grupo de ratas obesas vs el grupo control (antes de la fatiga $0.109 \pm 0.011 \Delta F$; después de la fatiga $0.223 \pm 0.090 \Delta F$). En contraste se pudo apreciar en el grupo de ratas obesas tratados con diazóxido, disminución en los niveles del ERO del 34.80 % ($0.108 \pm 0.015 \Delta F$) antes de la fatiga y del 26.67 % ($0.230 \pm 0.017 \Delta F$) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga $0.165 \pm 0.0113 \Delta F$;

después de la fatiga $0.314 \pm 0.020 \Delta F$), el grupo de ratas obesas ejercitadas mostró un decremento del 38.69 % ($0.101 \pm 0.011 \Delta F$) antes de la fatiga y del 58.57 % ($0.114 \pm 0.019 \Delta F$) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga $0.165 \pm 0.0113 \Delta F$; después de la fatiga $0.314 \pm 0.020 \Delta F$) y finalmente en el grupo de ratas obesas ejercitadas con diazóxido, se observó una disminución del 39.95 % ($0.099 \pm 0.014 \Delta F$) antes de la fatiga y del 63.49 % ($0.115 \pm 0.012 \Delta F$) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga $0.165 \pm 0.0113 \Delta F$; después de la fatiga $0.314 \pm 0.020 \Delta F$). Estos resultados mostraron que los tres tratamientos disminuyeron los niveles de ERO en los grupos de ratas obesas, sin presentarse diferencias entre ellos antes de la fatiga, sin embargo, posterior a la fatiga, el grupo de ratas obesas ejercitadas con y sin diazóxido mostraron mayor disminución de los niveles de ERO vs grupo de ratas obesas tratadas solo con diazóxido.

En el músculo EDL (Fig. 12 panel B), se observó una disminución en los niveles de ERO del 33.28 % ($0.100 \pm 0.004 \Delta F$) antes de la fatiga y del 23.13 % ($0.214 \pm 0.014 \Delta F$) después de la fatiga, en el grupo tratado de manera individual con diazóxido vs el grupo control (antes de la fatiga $0.1511 \pm 0.010 \Delta F$; después de la fatiga $0.285 \pm 0.019 \Delta F$), mientras que en el grupo tratado con ejercicio se apreció un decremento del 24.64 % ($0.113 \pm 0.008 \Delta F$) antes de la fatiga y del 60.18 % ($0.117 \pm 0.029 \Delta F$) después de la fatiga vs el grupo control (antes de la fatiga $0.1511 \pm 0.010 \Delta F$; después de la fatiga $0.285 \pm 0.019 \Delta F$). Estos resultados mostraron que ambos tratamientos por separado disminuyeron los niveles de ERO, sin mostrar diferencias entre el grupo tratado con diazóxido con respecto al grupo tratado con ejercicio antes de la fatiga, sin embargo, posterior a la fatiga, se observó mayor decremento de los niveles de ERO en el grupo tratado con ejercicio vs el grupo tratado con diazóxido.

Por otro lado, se observó un incremento del 35.89 % ($0.205 \pm 0.015 \Delta F$) antes de la fatiga y del 81.41 % ($0.518 \pm 0.040 \Delta F$) después de la fatiga, en el grupo de ratas obesas vs el grupo control (antes de la fatiga $0.1511 \pm 0.010 \Delta F$; después de la fatiga $0.285 \pm 0.019 \Delta F$). Por el contrario, se observó una disminución en los niveles de ERO

con cada uno de los tratamientos, se pudo apreciar en el grupo de ratas obesas tratados con diazóxido, decremento en los niveles del ERO del 45.46 % ($0.111 \pm 0.013\Delta F$) antes de la fatiga y del 29.26 % ($0.366 \pm 0.022 \Delta F$) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga $0.205 \pm 0.015 \Delta F$; después de la fatiga $0.518 \pm 0.040 \Delta F$), el grupo de ratas obesas ejercitadas mostró reducción del 28.59 % ($0.146 \pm 0.018 \Delta F$) antes de la fatiga y del 71.73 % ($0.154 \pm 0.023 \Delta F$) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga $0.205 \pm 0.015 \Delta F$; después de la fatiga $0.518 \pm 0.040 \Delta F$) y finalmente en el grupo de ratas obesas ejercitadas con diazóxido, se observó una disminución del 37.25 % ($0.128 \pm 0.008 \Delta F$) antes de la fatiga y del 69.38 % ($0.158 \pm 0.020 \Delta F$) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga $0.205 \pm 0.015 \Delta F$; después de la fatiga $0.518 \pm 0.040 \Delta F$). Estos resultados mostraron que los tres tratamientos disminuyen los niveles de ERO en los grupos de ratas obesas, sin encontrarse diferencias con ninguno de los tres tratamientos en los músculos analizados antes de la fatiga, no obstante, posterior a la fatiga, tanto el grupo de obesas ejercitadas como obesas ejercitadas con diazóxido mostraron mayor disminución de los niveles de ERO vs el grupo de obesas tratadas únicamente con diazóxido.

Por último, cabe mencionar que para ambos músculos de cada grupo, los niveles de ERO se encontraron incrementados en los músculos analizados post-fatiga vs los músculos no fatigados, no obstante, se pudo apreciar que en todos los grupos sometidos al protocolo de ejercicio se mantuvieron iguales los niveles de ERO de los músculos analizados post-fatiga en relación a los músculos no fatigados.

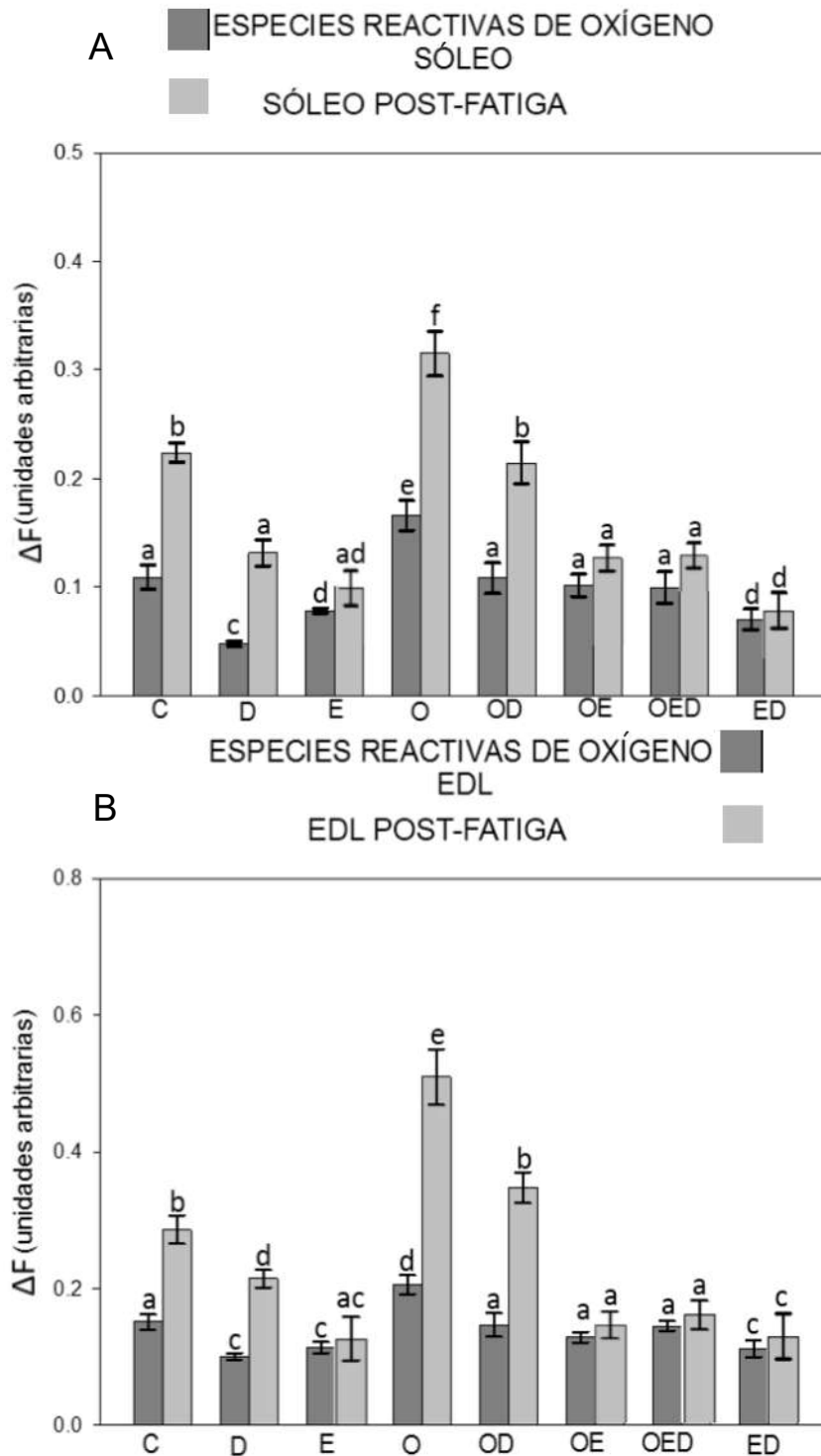


Figura 12. Efecto del diazóxido y/o ejercicio sobre los niveles de ERO en los diferentes grupos. En el panel A se muestran los niveles de especies reactivas de oxígeno para músculo sóleo, mientras que en el panel B para músculo EDL para cada grupo. C: control; D: diazóxido; E: ejercitadas; O: obesas; OD: obesas diazóxido; OE: obesas ejercitadas; OED: obesas ejercitadas con diazóxido; ED: ejercitadas diazóxido. Los datos se representan como la media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($P < 0.05$) ANOVA de 1 vía, Tukey prueba post-hoc, $n=8$.

7.5 Efecto del diazóxido y el ejercicio sobre los niveles de peroxidación lipídica en músculo esquelético de ratas obesas

Debido a que la disfunción mitocondrial causada por la obesidad incrementa los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO), y que es bien sabido que el incremento de ERO promueve la peroxidación lipídica (Moghtadaei et al., 2012; Heo et al., 2017), en esta serie experimental se exploró el efecto del diazóxido, el ejercicio y la combinación de ambos sobre los niveles de peroxidación lipídica (nmolas/mg prot) en las fibras musculares lentas (músculo sóleo) y rápidas (músculo extensor digitorio longus (EDL)) de ratas obesas.

En la Fig. 13 se muestran los resultados obtenidos para los niveles de peroxidación lipídica, antes y después de inducir fatiga, tanto para músculo sóleo (Fig. 13 panel A), como para músculo EDL (Fig. 13 panel B). Para el músculo sóleo (Fig. 13A), en el grupo tratado de manera individual con diazóxido, no se observaron diferencias significativas en los niveles de peroxidación lipídica antes (0.404 ± 0.020 nmolas/mg prot) y después de la fatiga (0.55 ± 0.023 nmolas/mg prot) vs el grupo control (antes de la fatiga 0.43 ± 0.012 nmolas/mg prot; después de la fatiga 0.51 ± 0.019 nmolas/mg prot). De igual manera, en el grupo tratado con ejercicio, no se observaron diferencias antes de la fatiga (0.38 ± 0.018 nmolas/mg prot), no obstante, después de la fatiga se observó un decremento del 42.50 % (0.29 ± 0.022 nmolas/mg prot) vs el grupo control (antes de la fatiga 0.43 ± 0.012 nmolas/mg prot; después de la fatiga 0.51 ± 0.019 nmolas/mg prot). Estos resultados mostraron que ambos tratamientos por separado no disminuyen los niveles de peroxidación lipídica antes de la fatiga en ratas control y posterior a la fatiga, el tratamiento con diazóxido tampoco mostró disminución en los niveles de peroxidación lipídica, no obstante, posterior a la fatiga el tratamiento con ejercicio si presenta reducción en dichos niveles.

A continuación, se observó un incremento en los niveles de peroxidación lipídica del 70.91 % (0.74 ± 0.022 nmolas/mg prot) antes de la fatiga y del 70.19 %

(0.87 ± 0.021 nmolas/mg prot) después de la fatiga, en el grupo de ratas obesas vs el grupo control (antes de la fatiga 0.43 ± 0.012 nmolas/mg prot; después de la fatiga 0.51 ± 0.019 nmolas/mg prot), empero, se pudo apreciar una disminución en los niveles de peroxidación lipídica con cada uno de los tratamientos por separado y una un efecto sinérgico con la combinación de ambos tratamientos. Se observó en el grupo de ratas obesas tratados con diazóxido, una disminución del 26.91 % (0.54 ± 0.024 nmolas/mg prot) antes de la fatiga y del 17.24 % (0.72 ± 0.021 nmolas/mg prot) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga 0.74 ± 0.022 nmolas/mg prot; después de la fatiga 0.87 ± 0.021 nmolas/mg prot), el grupo de ratas obesas ejercitadas mostró un decremento del 22.84 % (0.57 ± 0.019 nmolas/mg prot) antes de la fatiga y del 38.36 % (0.53 ± 0.053 nmolas/mg prot) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga 0.74 ± 0.022 nmolas/mg prot; después de la fatiga 0.87 ± 0.021 nmolas/mg prot) y por último, en el grupo de ratas obesas ejercitadas con diazóxido, se observó una disminución del 39.96 % (0.45 ± 0.023 nmolas/mg prot) antes de la fatiga y del 44.64 % (0.48 ± 0.035 nmolas/mg prot) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga 0.74 ± 0.022 nmolas/mg prot; después de la fatiga 0.87 ± 0.021 nmolas/mg prot). Estos resultados mostraron que los tres tratamientos disminuyen los niveles de peroxidación lipídica en los grupos de ratas obesas, presentando un efecto sinérgico en la combinación de ambos tratamiento.

Para el músculo EDL (Fig. 13B), en el grupo tratado de manera individual con diazóxido, no se observaron diferencias significativas en los niveles de peroxidación lipídica antes (0.62 ± 0.034 nmolas/mg prot) y después de la fatiga (0.73 ± 0.018 nmolas/mg prot) vs el grupo control (antes de la fatiga 0.64 ± 0.015 nmolas/mg prot; después de la fatiga 0.74 ± 0.02 nmolas/mg prot), mientras que en el grupo tratado con ejercicio, se encontró una disminución del 30.56 % (0.44 ± 0.014 nmolas/mg prot) antes de la fatiga y vs el grupo control (antes de la fatiga 0.64 ± 0.015 nmolas/mg prot; después de la fatiga 0.74 ± 0.02 nmolas/mg prot). Estos resultados indican que el tratamiento con diazóxido no disminuye los niveles de peroxidación lipídica antes y

después de la fatiga en ratas control, no obstante, el tratamiento con ejercicio si presenta reducción de dichos niveles antes y después de la fatiga.

Por otro parte, se observó un incremento del 43.48 % (0.91 ± 0.018 nmolas/mg prot) antes de la fatiga y del 51.19 % (1.12 ± 0.046 nmolas/mg prot) después de la fatiga en el grupo de ratas obesas vs el grupo control (antes de la fatiga 0.64 ± 0.015 nmolas/mg prot; después de la fatiga 0.74 ± 0.02 nmolas/mg prot), sin embargo, se observó disminución en los niveles de peroxidación lipídica con cada uno de los tratamientos por separado y una disminución aun mayor con la combinación de ambos tratamientos, se pudo apreciar en el grupo de ratas obesas tratados con diazóxido, una disminución del 19.70 % (0.73 ± 0.022 nmolas/mg prot) antes de la fatiga y del 23.91 % (0.85 ± 0.023 nmolas/mg prot) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga 0.91 ± 0.018 nmolas/mg prot; después de la fatiga $.12 \pm 0.046$ nmolas/mg prot), el grupo de ratas obesas ejercitadas mostró un decremento del 21.07 % (0.72 ± 0.021 nmolas/mg prot) antes de la fatiga y del 35.87 % (0.72 ± 0.022 nmolas/mg prot) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga 0.91 ± 0.018 nmolas/mg prot; después de la fatiga $.12 \pm 0.046$ nmolas/mg prot) y por último, en el grupo de ratas obesas ejercitadas con diazóxido, se observó una disminución del 31.46 % (0.63 ± 0.016 nmolas/mg prot) antes de la fatiga y del 43.77 % (0.63 ± 0.021 nmolas/mg prot) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga 0.91 ± 0.018 nmolas/mg prot; después de la fatiga $.12 \pm 0.046$ nmolas/mg prot). Estos resultados mostraron que los tres tratamientos disminuyeron los niveles de peroxidación lipídica en los grupos de ratas obesas, presentando un efecto sinérgico en la combinación de ambos tratamiento.

Finalmente, cabe mencionar que en ambos músculos de cada grupo, los niveles de peroxidación lipídica se encontraron incrementados en los músculos analizados post-fatiga en relación a los músculos no fatigados. No obstante se pudo apreciar que en todos los grupos sometidos al protocolo de ejercicio los niveles de peroxidación lipídica se mantuvieron iguales antes y después de la fatiga, o bien, en

algunos casos, posterior a la fatiga, dichos niveles se encontraron disminuidos, esto, en relación a los músculos no fatigados.

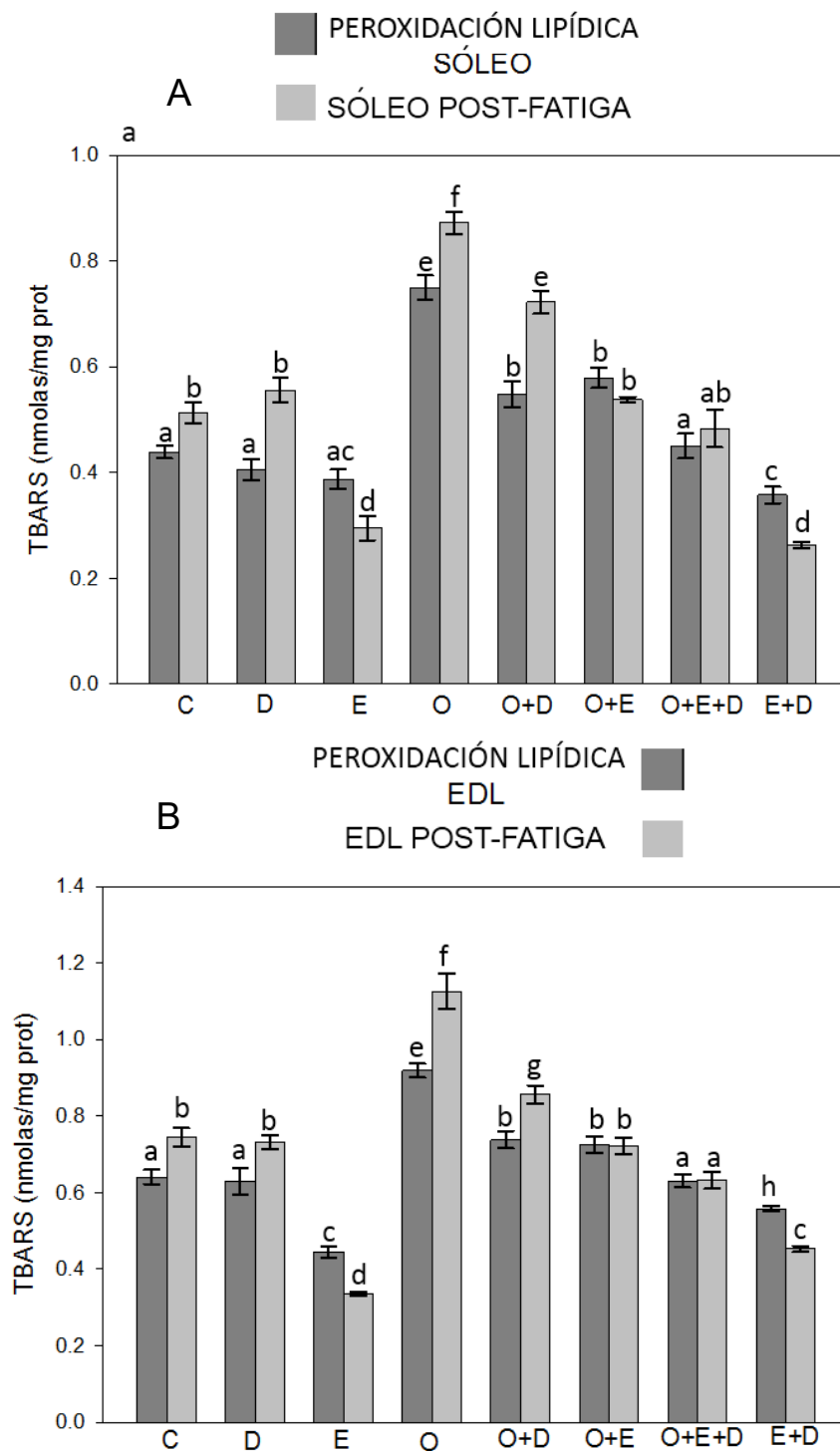


Figura 13. Nivel de peroxidación lipídica en los diferentes grupos. En el panel A se muestra los niveles de peroxidación lipídica para músculo sóleo, mientras que en el panel B se muestra para músculo EDL para cada grupo. C: control; D: diazóxido; E: ejercitadas; O: obesas; OD: obesas diazóxido; OE: obesas ejercitadas; OED: obesas ejercitadas con diazóxido; ED: ejercitadas diazóxido. Los datos se representan como la media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($P < 0.05$) ANOVA de 1 vía, Tukey prueba post-hoc, $n=8$.

7.6 Efecto del diazóxido y el ejercicio sobre los niveles de glutatión en músculo esquelético de ratas obesas

Esta serie experimental se llevó a cabo con la finalidad de evaluar el efecto del diazóxido, el ejercicio y la combinación de ambos sobre el estado redox del músculo durante la obesidad e identificar si la disminución tanto de ERO como de la peroxidación lipídica con estos tratamientos, se debe en parte, a la activación del sistema antioxidante. Dicha evaluación se realizó sobre los niveles de glutatión ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$) en las fibras musculares lentas (músculo sóleo) y rápidas (músculo extensor digitorio longus (EDL)) de ratas obesas.

7.6.1 Glutatión total (GSH+GSSG)

En la Fig. 14 se muestran los resultados obtenidos para los niveles de glutatión total, antes y después de inducir fatiga, tanto para músculo sóleo (Fig. 14 panel A) como para músculo EDL (Fig. 14 panel B). En el músculo sóleo (Fig. 14A) el grupo tratado de manera individual con diazóxido, mostró un incremento del 33 % ($40.79 \pm 1.78 \mu\text{mol}/\text{mg prot}$) en los niveles de GSH+GSSG antes de la fatiga y un incremento del 39.54% ($43.29 \pm 3.51 \mu\text{mol}/\text{mg prot}$) después de la fatiga, vs el grupo control (antes de la fatiga $30.66 \pm 2.50 \mu\text{mol}/\text{mg prot}$; después de la fatiga $31.02 \pm 3.34 \mu\text{mol}/\text{mg prot}$), de igual manera, en el grupo tratado con ejercicio, se observó un incremento del 55.70 % ($47.75 \pm 1.47 \mu\text{mol}/\text{mg prot}$) antes de la fatiga y del 78.07 % ($55.25 \pm 2.78 \mu\text{mol}/\text{mg prot}$) después de la fatiga vs el grupo control (antes de la fatiga $30.66 \pm 2.50 \mu\text{mol}/\text{mg prot}$; después de la fatiga $31.02 \pm 3.34 \mu\text{mol}/\text{mg prot}$). Estos resultados mostraron que ambos tratamientos por separado incrementan los niveles de GSH+GSSG antes y después de la fatiga en ratas control, presentándose diferencias significativas entre ambos tratamientos, mostrando mayor efecto el grupo de ratas ejercitadas.

Por otro lado, no se observaron diferencias en los niveles de GSH+GSSG entre el grupo de ratas obesas antes ($31.35 \pm 1.54 \mu\text{mol}/\text{mg prot}$) y después de la fatiga

(31.35 ± 1.54 $\mu\text{molas/mg prot}$) vs el grupo control (antes de la fatiga 30.66 ± 2.50 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 31.02 ± 3.34 $\mu\text{molas/mg prot}$), no obstante, se pudo apreciar incremento en los niveles GSH+GSSG, se observó en el grupo de ratas obesas tratados con diazóxido, un incremento del 45.31 % (45.56 ± 1.60 $\mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga y del 88.90 % (49.31 ± 2.78 $\mu\text{molas/mg prot}$) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga 31.35 ± 1.54 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 31.35 ± 1.54 $\mu\text{molas/mg prot}$), el grupo de ratas obesas ejercitadas mostró un incremento del 18.80 % (37.25 ± 1.57 $\mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga y del 71.42 % (44.75 ± 2.65 $\mu\text{molas/mg prot}$) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga 31.35 ± 1.54 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 31.35 ± 1.54 $\mu\text{molas/mg prot}$) y finalmente en el grupo de ratas obesas ejercitadas con diazóxido, se observó un incremento del 28.16 % (40.18 ± 1.95 $\mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga y del 92.23 % (50.18 ± 2.14 $\mu\text{molas/mg prot}$) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga 31.35 ± 1.54 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 31.35 ± 1.54 $\mu\text{molas/mg prot}$). Estos resultados mostraron que los tres tratamientos incrementaron los niveles de glutatión total en los grupos de ratas obesas antes y después de la fatiga en músculo sóleo, sin observarse un efecto sinérgico en la combinación de ambos tratamientos.

Para el músculo EDL (Fig. 14B), en el grupo tratado de manera individual con diazóxido, se observó un incremento en los niveles de GSH+GSSG del 22.77 % (57.51 ± 3.06 $\mu\text{molas/mg prot}$) en los niveles de glutatión total antes de la fatiga y un incremento del 18.62 % (56.14 ± 3.91 $\mu\text{molas/mg prot}$) después de la fatiga vs el grupo control (antes de la fatiga 46.84 ± 1.15 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 47.33 ± 2.59 $\mu\text{molas/mg prot}$), de igual manera en el grupo tratado con ejercicio, se observó un incremento del 23.51 % (57.85 ± 2.08 $\mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga y del 37.91 % (65.27 ± 2.15 $\mu\text{molas/mg prot}$) después de la fatiga vs el grupo control (antes de la fatiga 46.84 ± 1.15 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 47.33 ± 2.59 $\mu\text{molas/mg prot}$). Estos resultados indican que ambos tratamientos por separado incrementaron los niveles de glutatión total antes y después de la fatiga en ratas control, sin

presentarse diferencias significativas entre ambos tratamientos antes de la fatiga. Sin embargo, posterior a la fatiga mostró mayor efecto el grupo de ratas ejercitadas.

En el grupo de ratas obesas, se observó una disminución en los niveles de GSH+GSSG del 16.74 % (39 ± 3.18 $\mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga y del 20.12 % (37.80 ± 4.06 $\mu\text{molas/mg prot}$) después de la fatiga vs el grupo control (antes de la fatiga 46.84 ± 1.15 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 47.33 ± 2.59 $\mu\text{molas/mg prot}$), no obstante, se pudo apreciar incremento en los niveles de GSH+GSSG en los grupos de ratas obesas con cada uno de los tratamientos, se pudo observar en el grupo de ratas obesas tratados con diazóxido, un incremento del 49.38 % (58.26 ± 1.76 $\mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga y del 37.48 % (51.97 ± 2.21 $\mu\text{molas/mg prot}$) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga 39 ± 3.18 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 37.80 ± 4.06 $\mu\text{molas/mg prot}$), el grupo de ratas obesas ejercitadas mostró un incremento del 24.37 % (48.5 ± 2.42 $\mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga y del 51.38 % (57.23 ± 2.42 $\mu\text{molas/mg prot}$) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga 39 ± 3.18 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 37.80 ± 4.06 $\mu\text{molas/mg prot}$). Finalmente en el grupo de ratas obesas ejercitadas con diazóxido, se observó un incremento del 27.27 % (49.63 ± 1.28 $\mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga y del 83.33 % (69.31 ± 1.21 $\mu\text{molas/mg prot}$) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga 39 ± 3.18 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 37.80 ± 4.06 $\mu\text{molas/mg prot}$). Estos resultados mostraron que los tres tratamientos incrementan los niveles de GSH+GSSG en los grupos de ratas obesas antes y después de la fatiga, mostrándose mayor efecto posterior a la fatiga en el grupo de ratas obesas ejercitadas con diazóxido, indicando un efecto sinérgico entre la combinación de ambos tratamientos.

Para finalizar, cabe mencionar que en el músculo sóleo del grupo de ratas obesas analizado postfatiga, los niveles de glutatión total se encontraron disminuidos en relación al músculo no fatigado, no obstante, esta diferencia no se encontró en el músculo EDL, por otro lado, en ambos músculos para el resto de los grupos no se

encontraron diferencias entre los niveles de GSH+GSSG antes y después de la fatiga, con excepción de los grupos sometidos al protocolo de ejercicio en los que los niveles se encontraron incrementados, particularmente en los músculos fatigados en relación a los músculos no fatigados.

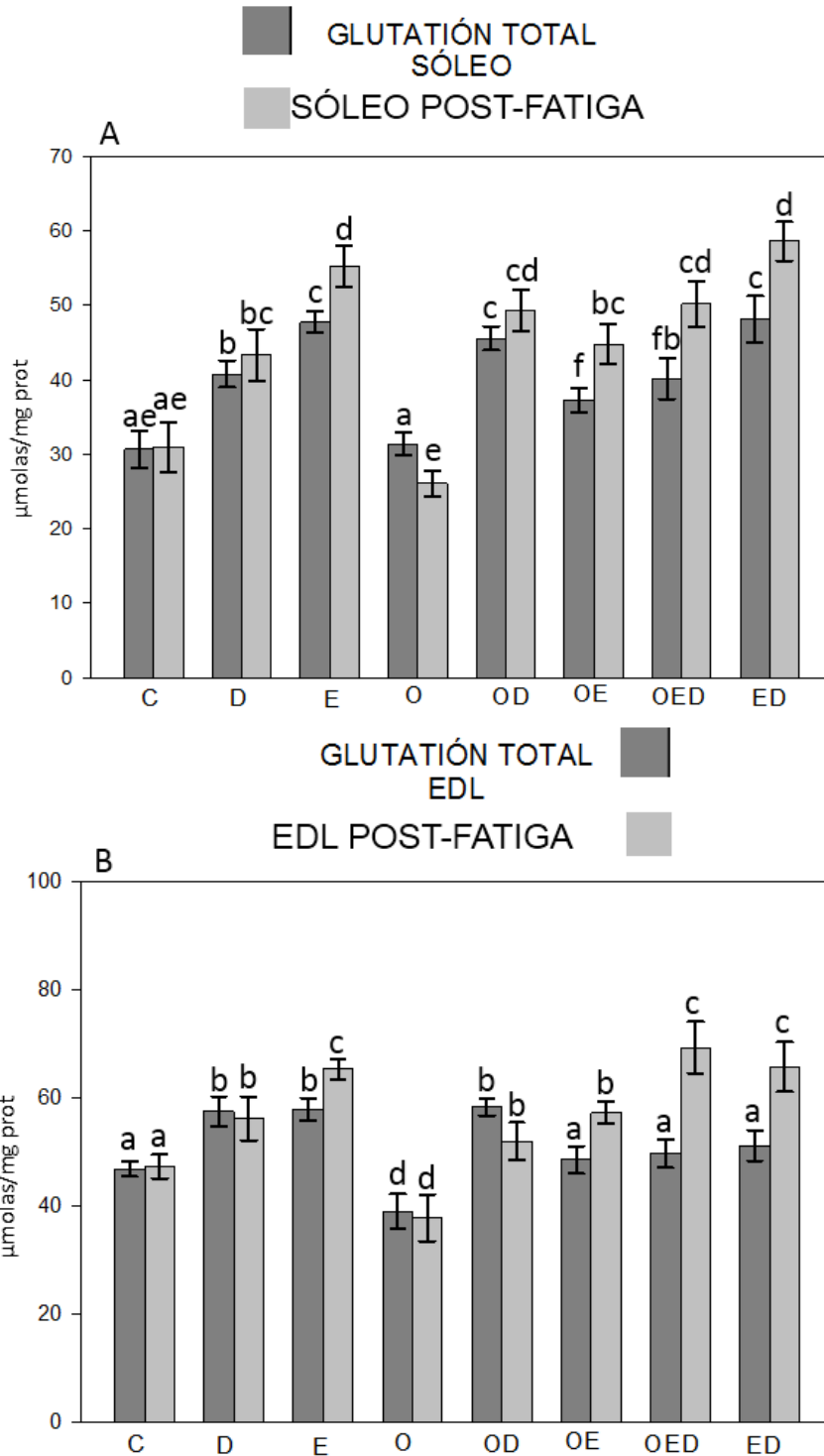


Figura 14. GSH+GSSG en los diferentes grupos. En el panel A se muestran los niveles de GSH+GSSG para músculo sóleo, mientras que en el panel B para músculo EDL para cada grupo; C: control; D: diazóxido; E: ejercitadas; O: obesas; OD: obesas diazóxido; OE: obesas ejercitadas; OED: obesas ejercitadas con diazóxido; ED: ejercitadas diazóxido. Los datos se representan como la media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($P < 0.05$) ANOVA de 1 vía, Tukey prueba post-hoc, $n=8$.

7.6.2 Glutación reducido (GSH)

En la Fig. 15 se muestran los resultados obtenidos para los niveles de GSH antes y después de inducir fatiga, esto, tanto para músculo sóleo (Fig. 15 panel A), como para músculo EDL (Fig. 15 panel B). Para el músculo sóleo (Fig.15A) en el grupo tratado de manera individual con diazóxido se observó un incremento en los niveles de GSH del 47.28 % (26.69 ± 1.70 μ molas/mg prot) en los niveles de glutación reducido antes de la fatiga y un incremento del 61.09 % (27.32 ± 3 μ molas/mg prot) después de la fatiga vs el grupo control (antes de la fatiga 18.12 ± 1.82 μ molas/mg prot; después de la fatiga 16.96 ± 1.96 μ molas/mg prot), de igual manera en el grupo tratado con ejercicio, se observó un incremento del 71.43 % (31.07 ± 2.40 μ molas/mg prot) antes de la fatiga y del 142.18 % (41.07 ± 3.72 μ molas/mg prot) después de la fatiga vs el grupo control (antes de la fatiga 18.12 ± 1.82 μ molas/mg prot; después de la fatiga 16.96 ± 1.96 μ molas/mg prot). Estos resultados mostraron que ambos tratamientos por separado incrementaron los niveles de GSH antes y después de la fatiga en ratas control, sin presentarse diferencias significativas entre ambos tratamientos antes de la fatiga, sin embargo, posterior a la fatiga mostró mayor incremento el grupo de ratas ejercitadas.

El grupo de ratas obesas presentó una disminución en los niveles de GSH del 39.76 % (10.91 ± 1.05 μ molas/mg prot) antes de la fatiga y una disminución del 58.25 % (7.08 ± 1.54 μ molas/mg prot) después de la fatiga con respecto al control (antes de la fatiga 18.12 ± 1.82 μ molas/mg prot; después de la fatiga 16.96 ± 1.96 μ molas/mg prot). Sin embargo, se pudo apreciar incremento en los niveles de GSH en los grupos de ratas obesas con cada uno de los tratamientos, en relación al grupo de ratas obesas sin tratamiento. Se pudo observar en el grupo de ratas obesas tratados con diazóxido un incremento en los niveles de GSH del 165.20 % (28.95 ± 2.07 μ molas/mg prot) antes de la fatiga y del 354.90 % (32.20 ± 3.39 μ molas/mg prot) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga 10.91 ± 1.052 μ molas/mg prot; después de la fatiga 7.08 ± 1.54 μ molas/mg prot). El grupo de ratas obesas ejercitadas mostró un incremento del 85.89 % (20.29 ± 1.57 μ molas/mg prot)

antes de la fatiga y del 280.26 % (26.92 ± 2.49 $\mu\text{molas/mg prot}$) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga 10.91 ± 1.052 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 7.08 ± 1.54 $\mu\text{molas/mg prot}$). El grupo de ratas obesas ejercitadas mostró un incremento del 85.89 % (20.29 ± 1.57 $\mu\text{molas/mg prot}$) y por último, en el grupo de ratas obesas ejercitadas con diazóxido, se observó un incremento del 143.14 % (26.54 ± 1.45 $\mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga y del 426.80 % (37.29 ± 2.59 $\mu\text{molas/mg prot}$) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga 10.91 ± 1.052 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 7.08 ± 1.54 $\mu\text{molas/mg prot}$). El grupo de ratas obesas ejercitadas mostró un incremento del 85.89 % (20.29 ± 1.57 $\mu\text{molas/mg prot}$) vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga 10.91 ± 1.052 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 7.08 ± 1.54 $\mu\text{molas/mg prot}$). Estos resultados mostraron que los tres tratamientos incrementaron los niveles de GSH en los grupos de ratas obesas antes y después de la fatiga en músculo sóleo, sin mostrarse un efecto sinérgico en la combinación de ambos tratamientos.

Para el músculo EDL (Fig. 15B), en el grupo tratado de manera individual con diazóxido se observó un incremento del 43.85 % (38.58 ± 2.59 $\mu\text{molas/mg prot}$) en los niveles de GSH antes de la fatiga y un incremento del 51.17 % (41.47 ± 3.90 $\mu\text{molas/mg prot}$) después de la fatiga vs el grupo control (antes de la fatiga 26.82 ± 1.76 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 27.43 ± 2.27 $\mu\text{molas/mg prot}$). De igual manera en el grupo tratado con ejercicio, se observó un incremento de los niveles de GSH del 22.49 % (32.85 ± 2.27 $\mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga y del 42.68 % (39.15 ± 1.73 $\mu\text{molas/mg prot}$) después de la fatiga vs el grupo control (antes de la fatiga 26.82 ± 1.76 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 27.43 ± 2.27 $\mu\text{molas/mg prot}$). Estos resultados mostraron que ambos tratamientos por separado incrementan los niveles de GSH antes y después de la fatiga en ratas control, sin presentarse diferencias significativas entre ambos tratamientos.

Se observó una disminución en los niveles de GSH del 57.84 % (11.30 ± 1.41 $\mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga y del 52.20 % (13.11 ± 3.37 $\mu\text{molas/mg prot}$)

después de la fatiga vs el grupo control (antes de la fatiga 26.82 ± 1.76 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 27.43 ± 2.27 $\mu\text{molas/mg prot}$). No obstante, se pudo apreciar incremento en los niveles de GSH en los grupos de ratas obesas con cada uno de los tratamientos. Se pudo apreciar en el grupo de ratas obesas tratados con diazóxido, un incremento del 207.50 % (34.77 ± 2.56 $\mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga y del 128.14 % (29.91 ± 3.53 $\mu\text{molas/mg prot}$) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga 11.30 ± 1.41 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 13.11 ± 3.37 $\mu\text{molas/mg prot}$). El grupo de ratas obesas ejercitadas mostró un incremento del 138.13 % (26.92 ± 2.20 $\mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga y del 168.10 % (35.15 ± 1.44 $\mu\text{molas/mg prot}$) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga 11.30 ± 1.41 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 13.11 ± 3.37 $\mu\text{molas/mg prot}$) y finalmente, en el grupo de ratas obesas ejercitadas con diazóxido, se observó un incremento del 175.39 % (31.14 ± 2.78 $\mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga y del 291.33 % (51.31 ± 2.94 $\mu\text{molas/mg prot}$) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga 11.30 ± 1.41 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 13.11 ± 3.37 $\mu\text{molas/mg prot}$). Estos resultados mostraron que los tres tratamientos incrementaron los niveles de GSH en los grupos de ratas obesas antes y después de la fatiga, mostrando únicamente mayor incremento posterior a la fatiga en el grupo de ratas obesas ejercitadas con diazóxido.

Por último, cabe mencionar que en el grupo de ratas obesas, los niveles de GSH se encontraron disminuidos en el músculo sóleo analizado postfatiga, en relación al músculo no fatigado. No obstante, dicha diferencia no se encontró en el músculo EDL. Por otro lado, para ambos músculos en el resto de los grupos no se encontraron diferencias entre los niveles de glutatión reducido antes y después de la fatiga, con excepción de los grupos sometidos al protocolo de ejercicio, en donde dichos niveles se encontraron incrementados en los músculos fatigados en relación a los músculos no fatigados.

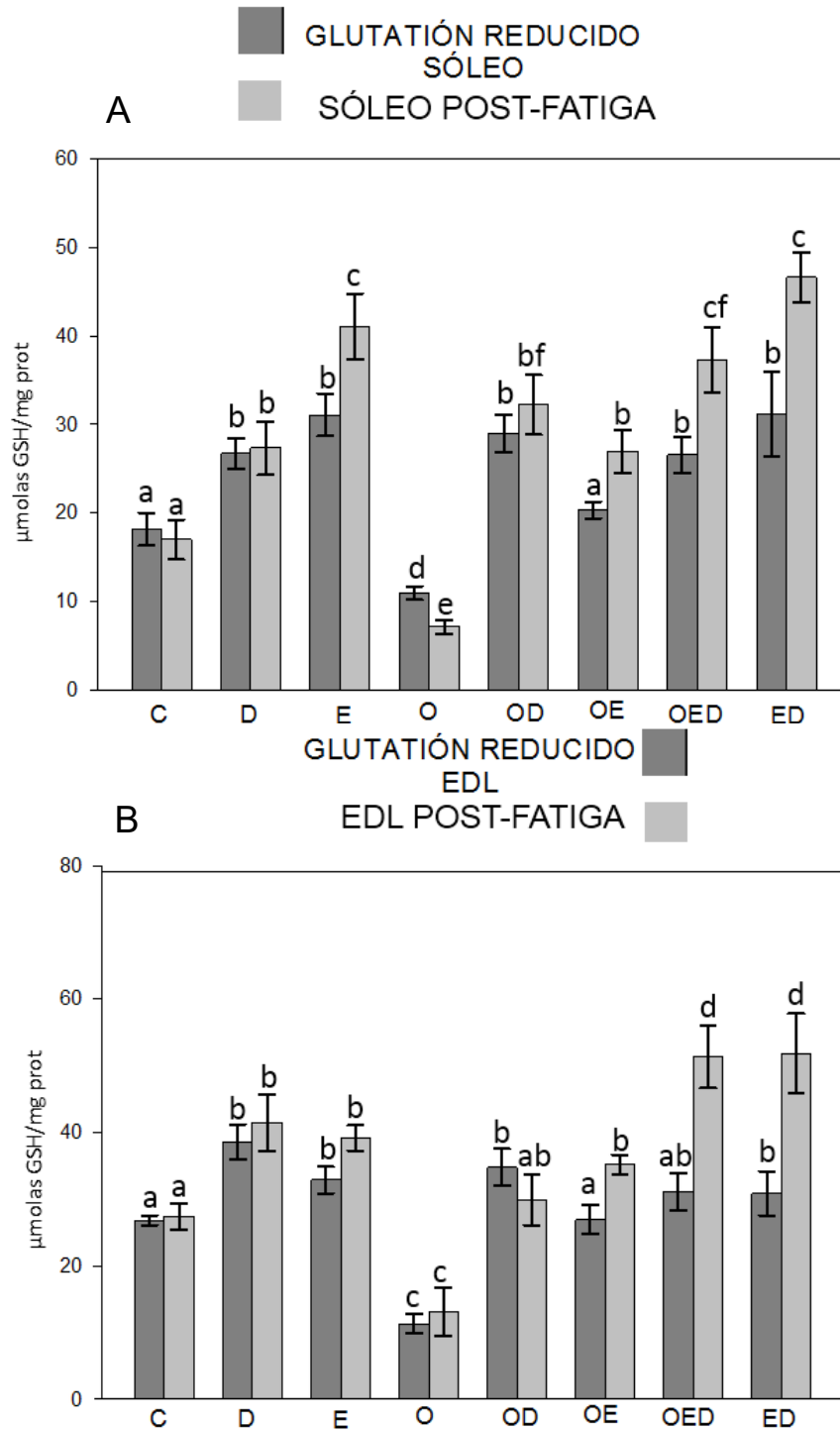


Figura 15. GSH en los diferentes grupos. En el panel A se muestran los niveles de GSH para músculo sóleo, mientras que en el panel B para músculo EDL para cada grupo; C: control; D: diazóxido; E: ejercitadas; O: obesas; OD: obesas diazóxido; OE: obesas ejercitadas; OED: obesas ejercitadas con diazóxido; ED: ejercitadas diazóxido. Los datos se representan como la media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($P < 0.05$) ANOVA de 1 vía, Tukey prueba post-hoc, $n=8$.

7.6.3 Glutación oxidado (GSSG)

En la Fig. 16 se muestran los resultados obtenidos para los niveles de GSSG, antes y después de inducir fatiga, tanto para músculo sóleo (Fig. 16 panel A), como para músculo EDL (Fig. 16 panel B). En el músculo sóleo (Fig. 16A), el grupo tratado de manera individual con diazóxido, no mostró diferencias significativas en los niveles de GSSG antes (14.09 ± 1.12 $\mu\text{molas/mg prot}$) y después de la fatiga (15.97 ± 1.62 $\mu\text{molas/mg prot}$) vs el grupo control (antes de la fatiga 12.54 ± 1.79 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 13.70 ± 1.09 $\mu\text{molas/mg prot}$), de igual manera en el grupo tratado con ejercicio, no se observan diferencias antes (14.67 ± 1.08 $\mu\text{molas/mg prot}$) y después de la fatiga (14.17 ± 1.06 $\mu\text{molas/mg prot}$) vs el grupo control (antes de la fatiga 12.54 ± 1.79 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 13.70 ± 1.09 $\mu\text{molas/mg prot}$). Estos resultados mostraron que ninguno de los dos tratamientos por separado disminuyeron los niveles de GSSG antes y después de la fatiga en ratas control, sin presentarse diferencias significativas entre ambos tratamientos antes y después de la fatiga.

El grupo de ratas obesas presentó un incremento en los niveles de GSSG del 62.96 % (20.43 ± 1.34 $\mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga y un incremento del 38.80 % (19.02 ± 1.30 $\mu\text{molas/mg prot}$) después de la fatiga vs el grupo control (antes de la fatiga 12.54 ± 1.79 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 13.70 ± 1.09 $\mu\text{molas/mg prot}$), no obstante, se pudo apreciar disminución en los niveles de GSSG en los grupos de ratas obesas con cada uno de los tratamientos antes de la fatiga, mientras que, posterior a la fatiga no se apreció una disminución significativa en los tratamientos por separado, sin embargo, en la combinación de ambos tratamientos se observó una disminución significativa, se pudo apreciar en el grupo de ratas obesas tratados con diazóxido, una disminución del 18.73 % (16.60 ± 1.09 $\mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga y sin diferencias después de la fatiga (17.10 ± 1.64 $\mu\text{molas/mg prot}$) vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga 20.43 ± 1.34 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 19.02 ± 1.30 $\mu\text{molas/mg prot}$), el grupo de ratas obesas

ejercitadas mostró una disminución del 17.03 % (16.95 ± 1.93 $\mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga y sin diferencias después de la fatiga (17.83 ± 1.95 $\mu\text{molas/mg prot}$) vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga 20.43 ± 1.34 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 19.02 ± 1.30 $\mu\text{molas/mg prot}$). Finalmente, en el grupo de ratas obesas ejercitadas con diazóxido, se observó una disminución del 32.03 % (13.89 ± 2.17 $\mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga y del 29.62 % (13.39 ± 1.07 $\mu\text{molas/mg prot}$) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga 20.43 ± 1.34 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 19.02 ± 1.30 $\mu\text{molas/mg prot}$). Estos resultados mostraron que los tres tratamientos disminuyen los niveles de GSSG en los grupos de ratas obesas antes de la fatiga, sin embargo, este efecto no se observa posterior a la fatiga con los tratamientos de diazóxido y ejercicio por separado, únicamente se observó en la combinación de ambos tratamientos.

Para el músculo EDL (Fig. 16B), en el grupo tratado de manera individual con diazóxido, se observó una disminución en los niveles GSSG del 30.44% (13.92 ± 1.12 $\mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga y del 26.26 % (14.66 ± 1.62 $\mu\text{molas/mg prot}$) después de la fatiga vs el grupo control (antes de la fatiga 20.02 ± 1.13 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 19.89 ± 1.11 $\mu\text{molas/mg prot}$), de igual manera, en el grupo tratado con ejercicio, se observó una disminución del 18.58 % (16.3 ± 1.04 $\mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga, no obstante, no se observaron diferencias significativas después de la fatiga (17.17 ± 1.29 $\mu\text{molas/mg prot}$) vs el grupo control (antes de la fatiga 20.02 ± 1.13 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 19.89 ± 1.11 $\mu\text{molas/mg prot}$). Estos resultados mostraron que ambos tratamientos por separado disminuyeron los niveles de GSSG antes de la fatiga en ratas control, de igual manera, se observa esta disminución en el grupo tratado con diazóxido después de la fatiga no así para el grupo ejercitado, donde no se observan estas diferencias.

Por otra parte, el grupo de ratas obesas presentó un incremento en los niveles de GSSG del 38.31 % (27.69 ± 2.27 $\mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga y un incremento del 33.54 % (26.56 ± 1.60 $\mu\text{molas/mg prot}$) después de la fatiga vs el grupo control (antes de la fatiga 20.02 ± 1.13 $\mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga 19.89 ± 1.11

$\mu\text{molas/mg prot}$), no obstante, se pudo apreciar disminución en los niveles de GSSG en los grupos de ratas obesas con algunos de los tratamientos antes y después de la fatiga, se pudo apreciar en el grupo de ratas obesas tratados con diazóxido, que antes de la fatiga ($23.49 \pm 1.54 \mu\text{molas/mg prot}$) no se presentó disminución significativa vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga $27.69 \pm 2.27 \mu\text{molas/mg prot}$), sin embargo, posterior a la fatiga, se apreció una disminución del 16.95 % ($22.06 \pm 1.47 \mu\text{molas/mg prot}$) vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (después de la fatiga $26.56 \pm 1.60 \mu\text{molas/mg prot}$), el grupo de ratas obesas ejercitadas mostró una disminución del 22.08 % ($21.57 \pm 1.28 \mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga y del 16.90 % ($22.07 \pm 1.90 \mu\text{molas/mg prot}$) vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga $27.69 \pm 2.27 \mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga $26.56 \pm 1.60 \mu\text{molas/mg prot}$). Finalmente en el grupo de ratas obesas ejercitadas con diazóxido, se observó una disminución del 33.20 % ($18.49 \pm 1.84 \mu\text{molas/mg prot}$) antes de la fatiga y del 32.25 % ($17.99 \pm 2.44 \mu\text{molas/mg prot}$) después de la fatiga vs el grupo de ratas obesas sin tratamiento (antes de la fatiga $27.69 \pm 2.27 \mu\text{molas/mg prot}$; después de la fatiga $26.56 \pm 1.60 \mu\text{molas/mg prot}$). Estos resultados mostraron que los niveles de GSSG disminuyeron con algunos de los tratamientos antes y después de la fatiga.

En suma, cabe mencionar que los niveles de GSSG no presentaron diferencias significativas entre los músculos analizados antes y después de la fatiga, cuando se estudiaron ambos músculos para cada grupo.

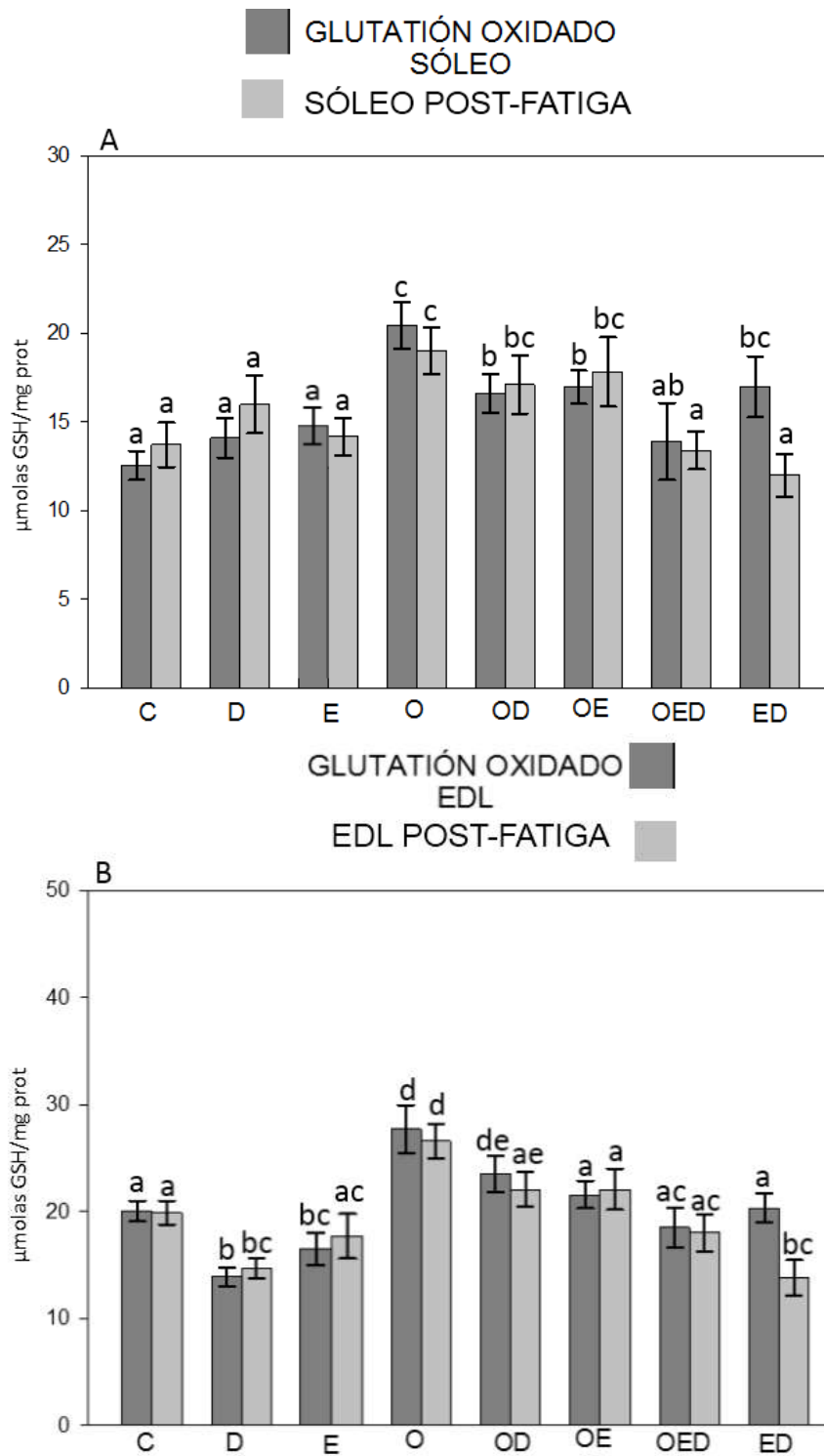


Figura 16. GSSG en los diferentes grupos. En el panel A se muestra los niveles de GSSG ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$) para músculo sóleo, mientras que en el panel B para músculo EDL para cada grupo; C: control; D: diazóxido; E: ejercitadas; O: obesas; OD: obesas diazóxido; OE: obesas ejercitadas; OED: obesas ejercitadas con diazóxido; ED: ejercitadas diazóxido. Los datos se representan como la media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($P < 0.05$) ANOVA de 1 vía, Tukey prueba post-hoc, $n=8$.

VIII. DISCUSIÓN

La obesidad es un problema mundial de salud pública que ha alcanzado proporciones epidémicas en varios países. Más de un tercio de la población adulta mundial la padece (Trewin et al., 2017), con más de 500 millones de personas en todo el mundo. La obesidad está relacionada con una gran cantidad de patologías tales como enfermedades cardiovasculares y respiratorias, diabetes tipo 2), enfermedades neurodegenerativas, osteoartritis y cáncer (Heo et al., 2017). La obesidad se ve agravada por el sedentarismo y la falta de actividad física (OMS 2017).

El músculo esquelético es el tejido más abundante en el humano y tiene diversas funciones fisiológicas (Abrigo et al., 2016): proporciona la fuerza necesaria para el mantenimiento de la postura del cuerpo y para efectuar movimientos, por lo tanto, el deterioro muscular resulta en disfunción física y deterioro metabólico (Rahemi et al., 2015). La disfunción del músculo esquelético es una complicación de la obesidad al provocar atrofia significativa, lo que da a lugar a disminución de la fuerza de contracción muscular y una reducida capacidad para soportar la fatiga, así como resistencia a la insulina e hiperinsulinemia (Pompeani et al., 2014; Bae et al., 2016; Martínez-Huenchullan et al., 2018). Esto produce un incremento en el estrés oxidativo (Choi et al., 2015) asociado con el deterioro de la función mitocondrial (Heo et al., 2017).

Con la finalidad de contrarrestar los efectos negativos de la obesidad, en este trabajo se analizaron los efectos del diazóxido, un abridor de los canales K_{ATP} , en el músculo esquelético. Esto debido a que se sabe que la activación farmacológica de los canales K_{ATP} con diazóxido mejora la contracción muscular y aumenta la resistencia a la fatiga (García et al., 2009), disminuye los niveles de ERO y la peroxidación lipídica, y aumenta las defensas antioxidantes (Moghtadaei et al., 2012). Con el mismo objetivo, se analizó el efecto del ejercicio y su combinación con el diazóxido, ya que el ejercicio es un valioso tratamiento no farmacológico para los trastornos metabólicos asociados con la obesidad (Hyatt et al., 2015).

Parámetros serológicos

Una de las principales características de la obesidad es el notorio incremento del peso corporal, debido a la acumulación excesiva de grasa en diversos tejidos. Estudios realizados por Alamzadeh et al. (2008), Pompeani et al. (2014), Bae et al. (2016) y Lu et al., (2016), muestran que la obesidad inducida con una dieta alta en grasa aumenta el peso corporal de la rata. Los resultados de la Fig. 9A muestra coincidencia con los estudios antes citados. De modo notable, se observó que tanto el tratamiento con diazóxido, el protocolo de ejercicio y la combinación de ambos tratamientos disminuyeron el peso corporal. lo cual es consistente con lo reportado por Alamzadeh et al. (2008), donde se observó que las ratas obesas tratadas con diazóxido tuvieron una ganancia de peso corporal menor que la de los animales obesos sin tratamiento, esto al reducir el consumo de alimento. Bae et al. (2016) observaron también que, aplicando protocolos de ejercicio, observaron también disminución en el peso corporal Sin embargo, no se encontró una sinergia ni efecto aditivo con la combinación de ambos tratamientos.

El músculo esquelético es uno de los tejidos que representa el mayor porcentaje de utilización de glucosa por lo que la obesidad se ha relacionado con la disminución de la captación de glucosa (Heo et al., 2017). La obesidad incrementa los niveles de glucosa en sangre (Pompeani et al., 2014; Martinez-Huenchallan et al., 2018). Este efecto se pudo observar en las ratas obesas de este trabajo (Fig. 9B). Esto puede estar relacionado a que cuando la grasa se almacena en el músculo esquelético, provoca disminución en la captación de glucosa y resistencia a la insulina (Choi et al., 2015; Bae et al., 2016), lo que es reflejado en los niveles de glucosa en sangre elevados durante la obesidad.

En la Fig. 9B, se observó que el diazóxido, el ejercicio y la combinación de ambos tratamientos redujeron los niveles de glucosa en sangre en ratas obesas, siendo más eficientes el ejercicio que el diazoxido. En las ratas sanas se observó este mismo efecto con el ejercicio pero no con diazóxido, donde incluso se observó un

incremento con respecto al control, lo cual sugiere que este tratamiento solo resulta efectivo mientras se encuentre la obesidad establecida.

Alemzadeh y Tushaus, (2004) y Alemzadeh et al., (2008), observaron que el diazóxido disminuye los niveles de glucosa en sangre durante la obesidad, esto se atribuye, en parte, al aumento de la sensibilidad a la insulina, supresión de la hiperinsulinemia, incremento del transporte de glucosa al interior de la célula y reducción de la lipogénesis. Mientras que Bae et al. (2016) y Bottezelli et al., (2016), observaron disminución de los niveles de glucosa en sangre, en grupos de ratas obesas sometidas a protocolos de ejercicio, lo cual se atribuyó al aumento de la sensibilidad a la insulina y mejora del transporte de glucosa al interior de las células del músculo esquelético (Bottezelli et al., 2016; Cartee et al., 2016). Por lo tanto, se puede sugerir que la implementación de un protocolo de ejercicio es un tratamiento más eficiente que la combinación con diazóxido.

La apertura de los canales K_{ATP} y el ejercicio regular mejoran la contracción y la resistencia a la fatiga.

La acumulación de grasa durante la obesidad altera el metabolismo de carbohidratos y lípidos, lo que perjudica la flexibilidad y la generación de energía necesaria para el mantenimiento de la función contráctil normal del músculo esquelético (Espinosa et al., 2016). Esto provoca disminución en la fuerza de contracción y favorece el desarrollo de Fatiga, lo que a su vez produce un incremento en el estrés oxidativo. Así, una mayor concentración de lípidos en el tejido produce menor fuerza muscular (Choi et al., 2015).

Consistente con lo anterior, en este trabajo se observó que la tensión máxima y la tensión total, de músculo sóleo y EDL de ratas obesas disminuyeron respecto al grupo control (Fig. 10A y 10B), de igual manera, se pudo observar que ambos músculos mostraron una menor resistencia a la fatiga que el control (Fig. 11A y 11B), estos resultados demostraron como la patología de la obesidad afecta la función contráctil normal de los músculos, al provocar disminución de la fuerza de contracción y promover el desarrollo de fatiga. Esto podría estar relacionado con el incremento de grasa intramuscular, lo que provoca deficiencia en la capacidad del músculo para contraerse (Choi et al., 2015), además, se sabe que la obesidad altera el proceso de regeneración parcial del músculo esquelético, aumenta la proteólisis, lo que desencadena una disminución en el diámetro de las fibras musculares y pérdida de tejido muscular, produciéndose atrofia significativa, que afecta el proceso de contracción (Pompeani et al., 2014; Brown et al., 2015). Esto, ocasiona que disminuyan los niveles de ATP y disminuya el volumen mitocondrial, produciéndose disfunción mitocondrial y fatiga muscular (Andrukhiv et al., 2006; Costa et al., 2006; Montoya-Pérez et al., 2010).

Estudios previos han demostrado que la apertura de los canales K_{ATP} con diazóxido mejoran la producción de ATP y reducen la fatiga muscular, esto, se ve reforzada al observar una reducción de la fatiga muscular (García et al., 2009; Sánchez-Duarte et al., 2012). En este trabajo, se pudo observar que el tratamiento con diazóxido, incrementó la tensión máxima y total, tanto del músculo sóleo y del músculo EDL (Fig. 10A y 10B), en los grupos de ratas obesas. De igual modo, el tratamiento con diazóxido, incrementó el tiempo de resistencia a la fatiga de ambos músculos (Fig. 11A y 11B). Esto concuerda con lo observado en el trabajo de García et al. (2009) donde el diazóxido incrementó la tensión post-fatiga del músculo EDL de ratón, mientras que Sánchez-Duarte et al. (2017) reportaron este mismo efecto protector de la apertura de los canales K_{ATP} utilizando nicorandil, un abridor selectivo de canales K_{ATP} mitocondriales. En dicho trabajo, se observó incremento de la tensión post-fatiga en fibras musculares esqueléticas lentas del pollo, sugiriendo que los efectos de nicorandil están relacionados con la activación de los canales mito K_{ATP} .

Lo anterior sugiere que el efecto protector del diazóxido observado en la obesidad es debido a la apertura de los canales mitoK_{ATP}, debido a que la entrada de K⁺ a la matriz está acompañada de la entrada de agua, causando un aumento del volumen mitocondrial, lo que conduce a un incremento de la respiración a través de la CTE y a un aumento de la síntesis de ATP, lo que favorecerá la contracción muscular y disminuirá la fatiga (Andrukhlyv et al., 2006; Costa et al., 2006).

Al mismo tiempo, en este trabajo se mostró el efecto protector con la implementación del protocolo de ejercicio como tratamiento durante la obesidad, la tensión máxima y la total incrementaron tanto en músculo sóleo como EDL (Fig. 10A y 10B) de ratas obesas ejercitadas. De igual forma, se observó en ambos músculos, incremento en la resistencia a la fatiga (Fig. 11A y 11B). Esto, podría deberse a que la actividad física promueve diversas adaptaciones metabólicas y funcionales en el músculo esquelético. El ejercicio aumenta la expresión e induce la participación de los canales K_{ATP} para la protección de cardiomiocitos. Estudios de Zigman et al. (2011) y Krajievic et al. (2015), demostraron que un aumento inducido por el ejercicio en la expresión de los canales K_{ATP} sarcolemales cardiacos mejora el acondicionamiento y la contracción, lo que podría ocurrir en las fibras musculares, por lo cual se mejora la contracción muscular y se presenta resistencia a la fatiga, asimismo, estos efectos positivos del ejercicio se le atribuyen a la disminución de grasa intramuscular, como consecuencia de un aumento en el metabolismo del músculo esquelético (Bae et al., 2016).

Con base en estos resultados se corroboraron las diferencias entre músculo sóleo y músculo EDL, ya que el músculo sóleo al estar formado principalmente de fibras oxidativas lentas tipo I presenta menor contracción y mayor resistencia a la fatiga, mientras que el músculo EDL al estar conformado principalmente de fibras glucolíticas rápidas tipo II presenta mayor contracción y menor resistencia a la fatiga (López-Chicharro y Fernández-Vaquero 2010), características de estos músculos que son evidentes en este trabajo.

La apertura de los canales K_{ATP} y el ejercicio disminuyen el estrés oxidativo en el músculo esquelético de ratas obesas.

Las ERO están involucradas en la modulación del apropiado funcionamiento del músculo esquelético y pueden generarse tanto en condiciones de reposo y de actividad contráctil (Reid 2008; Powers et al., 2011), exceso en las concentraciones de ERO conduce al estrés oxidativo y compromete la función muscular (Powers et al., 2011; Westerblad 2011).

El estrés oxidativo se produce en la célula cuando las ERO se incrementan y/o cuando se reducen los mecanismos de defensa antioxidantes. En condiciones patológicas, las ERO pueden dañar al ADN, lípidos y proteínas, iniciando daño tisular y la muerte celular. Sin embargo, a concentraciones fisiológicas, ERO pueden ser reguladoras críticas de vías de señalización celular (Beckendorf y Linke, 2015).

Durante la obesidad, el incremento de la grasa almacenada en el músculo esquelético, provoca disminución en la captación de glucosa y deterioro de la vía de señalización de la insulina, ocasionando resistencia a la insulina e hiperinsulinemia (Choi et al., 2015; Bae et al., 2016). Esto produce disfunción mitocondrial, reduce la biogénesis mitocondrial, se altera la mitofagia (defectuosa o excesiva) y se promueve la apoptosis, lo que incrementa los niveles de ERO, induce estrés oxidativo y ocasiona daño celular (Heo et al., 2017).

Abrigo et al. (2016) evaluaron los niveles de ERO en músculos de ratones obesos inducidos por dieta alta en grasa, observaron como en este grupo aumentaron los niveles de ERO 7,22 veces en relación con el grupo control. Esta información es consistente con los resultados de esta tesis, ya que se pudieron observar incrementados los niveles de ERO en los grupos de ratas a las cuales les fue inducida la obesidad, respecto al grupo de ratas control tanto en músculo sóleo, como en EDL analizados antes y después de inducir fatiga (Fig. 12A y 12B), observándose mayor

nivel de ERO en el músculo EDL, debido a que las fibras de contracción rápida pueden ser más susceptibles al estrés oxidativo que las fibras de contracción lenta (Bidi et al., 2015).

Del mismo modo, estos resultados se deben a que el incremento de grasa intramuscular, provoca reducción de la calidad muscular y se produce deficiencia en la capacidad del músculo para contraerse (Choi et al., 2015), lo que ocasiona que descendan los niveles de ATP y disminuya el volumen mitocondrial produciéndose disfunción mitocondrial y promoviendo la fatiga muscular (Andrukhiv et al., 2006; Costa et al., 2006; Montoya-Pérez et al., 2010). Esto lleva a que las fibras musculares experimenten incremento de ERO en el mioplasma que a su vez, conducirán a estrés oxidativo, poniendo en peligro la función muscular, lo que resulta a su vez en fatiga (Powers et al., 2011; Westerblad 2011). Se ha demostrado que existe una relación dosis dependiente entre la concentración de ERO y la reducción de la contractibilidad muscular y la ocurrencia de fatiga (Fernández et al., 2009).

Estos resultados mostraron que la apertura de los canales K_{ATP} , el ejercicio regular y la combinación de ambos redujeron los niveles de ERO en el grupo de ratas obesas tanto en músculo sóleo como en músculo EDL analizados antes y después de inducir fatiga (Fig. 12A y 12B). Se pudo observar como el diazóxido disminuyó los niveles de ERO en ratas obesas sometidas a este tratamiento, con respecto al grupo de ratas obesas sin tratamiento. Este efecto se puede observar en el trabajo de García et al. (2009) en fibras musculares de ratón, donde en presencia de diazóxido, la tasa de producción de ERO durante la recuperación de la fatiga fue claramente menor en comparación al grupo sin tratamiento. Efecto que se debe a la apertura de los canales K_{ATP} de la mitocondria, lo que mejora la contracción y disminuye la fatiga, disminuyéndose así los niveles de ERO (Ferranti et al., 2003; Garcia et al., 2009), lo que a su vez aminora la fatiga muscular. Efecto que el diazóxido puede estar ejerciendo sobre los niveles de ERO en la obesidad.

Por otra parte, el diazóxido *per se* disminuye los niveles del ERO en la obesidad al evitar la disfunción mitocondrial producida por la hiperinsulinemia debida al

incremento de la grasa intramuscular (Choi et al., 2015; Bae et al., 2016; Heo et al., 2017) Este efecto protector, como resultado de inhibir la secreción de insulina y mejorar la sensibilidad a la insulina ya presente (Alemzadeh et al., 2008), igualmente, se le atribuye la característica de incrementar las defensas antioxidantes, lo que favorece igualmente a la disminución de los niveles de ERO (Mogtadaei et al., 2012).

En este estudio, también se observó como el ejercicio disminuyó los niveles de ERO en los grupos de ratas obesas con respecto al grupo de ratas obesas a las cuales no les fue aplicado dicho protocolo. Este efecto del ejercicio se puede observar en el estudio de Ji et al. (2006), donde un grupo de ratas fueron sometidas a un régimen de ejercicio y donde encontraron disminución de los niveles de ERO en comparación al grupo no entrenado, en respuesta a una adaptación en sus sistemas antioxidantes. Este papel protector del ejercicio en la obesidad se podría atribuir a la producción y la actividad de enzimas antioxidantes, ya que tanto los animales como humanos que se someten a un protocolo de ejercicio regular son más resistentes al estrés oxidativo, principalmente, debido a la adaptación de sus sistemas de defensa antioxidante (Ji et al., 2006; Lambertucci et al., 2006; Heo et al., 2017).

De manera análoga, el ejercicio podría disminuir los niveles de ERO durante la obesidad, ya que el ejercicio aumenta la expresión e induce la participación de los canales K_{ATP} sarcolemas por lo cual se mejora la contracción muscular y se presenta resistencia a la fatiga (Brown et al., 2005; Zingman et al., 2011; Kraljevic et al., 2015), disminuyéndose los niveles de ERO (Ferranti et al., 2003), lo que a su vez aminora la fatiga muscular. De la misma forma, estos efectos positivos del ejercicio se le atribuyen a la disminución de grasa intramuscular, por efecto del aumento en el metabolismo del músculo esquelético (Bae et al., 2016), ya que al haber una disminución de la grasa intramuscular, se incrementa la sensibilidad a la insulina y disminuye la hiperinsulinemia, lo que a su vez disminuye la producción de ERO mitocondrial (Mcgarrah et al., 2016; Heo et al., 2017).

Estos tratamientos disminuyeron los niveles de ERO en los músculos esqueléticos, tanto de ratas sanas como obesas, se observó la misma eficiencia entre el tratamiento con diazóxido, el protocolo de ejercicio y la combinación de ambos, por lo que no se observó una sinergia. Cabe mencionar que en esta serie de experimentos, los músculos de los grupos sometidos al protocolo de ejercicio analizados después de la fatiga mostraron los mismos niveles de ERO que los músculos analizado antes de la fatiga, efecto que no se observó en el resto de los grupos, donde se observó que los niveles de ERO se encuentran incrementados en los músculos analizados post-fatiga en relación a los no fatigados, lo cual puede ser explicado con el concepto de hormesis, que describe la relación de respuesta a un factor de estrés benéfico en niveles moderados y perjudicial a altos niveles, se ha propuesto que el modelo de hormesis dependiente de ERO podría explicar esta respuesta del músculo al ejercicio (Espinosa et al., 2016).

Como se mencionó anteriormente, se ha observado que uno de los principales efectos del incremento de las ERO es el daño a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en la célula muscular (Beckendorf y Linke, 2015), por lo que en este estudio se cuantificaron los niveles de TBARS, un indicador de la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo. Cuando se produce un incremento en la producción de ERO, estas pueden ejercer sus efectos dañinos en los fosfolípidos de membrana y dar como resultado la formación de malondialdehído (MDA), que es tóxico para las células (Nonaka et al., 2014). La peroxidación lipídica juega un papel importante en la patogénesis y gravedad de diversas enfermedades. Los aldehídos reactivos formados por la descomposición de los peróxidos lipídicos como el malondialdehído (MDA), alteran el funcionamiento en la CTE, disminuyendo su actividad y la producción de ATP, lo que contribuye a la fatiga y al estrés de la célula muscular (Estepa et al., 2001).

En este trabajo se pudo observar que los niveles de peroxidación lipídica se encontraron incrementados en las ratas obesas, tanto en músculo sóleo como en EDL analizados antes y después de inducir fatiga (Fig. 13A y 13B), observándose mayor nivel de peroxidación lipídica en el músculo EDL, debido de manera probable a que

las fibras de contracción rápida pueden ser más susceptibles al estrés oxidativo que las fibras de contracción lenta (Bidi et al., 2015). Por el contrario, el grupo de ratas obesas tratadas con diazóxido mostró una disminución de los niveles de peroxidación lipídica en ambos músculos (Fig. 13A y 13B). Este efecto se observó en el trabajo de Sánchez-Duarte et al. (2017), donde el músculo esquelético lento de pollo fatigado mostró una disminución de los niveles de peroxidación lipídica cuando fue tratado con nicorandil, mientras que Farahini et al. (2012), observaron que el pretratamiento con diazóxido contribuyó a la resistencia del tejido muscular (gastrocnemio) contra el daño isquémico al disminuir la peroxidación lipídica. Lo mismo fue apreciado por Moghtadaei et al. (2012) donde observaron este efecto protector del diazóxido en la isquemia del músculo esquelético, al encontrarse disminuidos los niveles de peroxidación lipídica en el grupo preacondicionado con diazóxido.

De modo similar, los resultados mostraron esta disminución de los niveles de peroxidación lipídica, en el grupo de ratas obesas sometidas al protocolo de ejercicio (Fig. 13A y 13B), ya que el grupo de ratas obesas tratadas con ejercicio mostró una disminución de los niveles de peroxidación lipídica en ambos músculos con respecto al grupo de ratas obesas sin tratamiento. Este efecto con la implementación de un protocolo de ejercicio se observó previamente (Lambertucci et al., 2006), donde los niveles de peroxidación lipídica de tejido muscular de ratas entrenadas se encontraron disminuidos.

La apertura de los canales K_{ATP} y el ejercicio incrementan los niveles de glutatión en músculo esquelético de ratas obesas.

Las células poseen sistemas antioxidantes que las protegen contra el daño oxidativo causado por ERO. Esto incluye a las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y la glutatión peroxidasa, cuya síntesis puede modificarse por el ejercicio, la dieta y la edad (Fernandez et al., 2009).

En este estudio se pudo observar como el estrés oxidativo es inducido por la atrofia del músculo esquelético a consecuencia de la obesidad y como durante la obesidad, la respuesta antioxidante es insuficiente lo que promueve la sobreproducción de ERO y la oxidación de lípidos en las fibras musculares (Nanaka et al., 2014). Nuestros resultados mostraron que los niveles de GSH+GSSG (Fig. 14A y 14B) y de GSH (Fig. 15A y 15B) se encontraron disminuidos durante la obesidad, mientras que los niveles de GSSG (Fig. 16A y 16B) se encontraron incrementados. La disminución del contenido de GSH+GSSG sugiere que la obesidad afecta la síntesis de este antioxidante y se puede hipotetizar que esto se debe a que las ERO están involucradas en diversas vías de señalización. La sobreproducción de ERO durante la obesidad afecta negativamente la expresión de genes involucrados en la síntesis de enzimas antioxidantes (Marotte y Zeni, 2013), y al encontrarse disminuido el contenido de GSH, esto sugiere que la obesidad no solo afecta la síntesis de este antioxidante, sino que también afecta su capacidad antioxidante.

El tratamiento con diazóxido, con ejercicio y la combinación de ambos, incrementaron los niveles de GSH+GSSG (Fig. 14A y 14B) y GSH (Fig. 15A y 15B) y, en algunos casos, redujeron los niveles de GSSG en la obesidad (Fig. 16A y 16B), Este efecto se observó en el trabajo de Sánchez-Duarte et al. (2017), donde se apreció que en músculo esquelético lento fatigado de pollo, los niveles de GSH se encontraron incrementados con nicorandil, mientras que los niveles de GSSG se encontraron disminuidos. Un efecto similar se observó en el estudio de Moghtadaei et al. (2012), donde la actividad de enzimas antioxidantes se encuentra incrementada en el músculo esquelético tratado con diazóxido durante la isquemia-reperfusión, con relación al músculo sin tratamiento. El ejercicio presentó este mismo efecto debido a la actividad de enzimas antioxidantes incrementada en grupos de ratas entrenadas en relación a grupos no entrenados (Lambertucci et al., 2006). El efecto protector del diazóxido y del ejercicio puede deberse a que estos tratamientos activan vías de señalización para la activación de genes que regulan la síntesis de enzimas antioxidantes (Ji et al., 2006), además de que la síntesis del glutatión es ampliamente dependiente las

concentraciones de ATP, y tanto, el tratamiento con diazóxido como el ejercicio favorecen su producción (Andrukhiv et al., 2006).

En resumen, la obesidad y su efecto sobre el músculo esquelético han sido ampliamente estudiados, al igual que el efecto del ejercicio para contrarrestar sus efectos negativos, mientras que la apertura de los canales K_{ATP} ha sido estudiada como un mecanismo de protección para la célula muscular. Sin embargo, este es el primer estudio, que muestra como el diazóxido, así como el ejercicio y la combinación de ambos, mejora la contracción y el funcionamiento de las fibras musculares en la obesidad al reducir el estrés oxidativo (Fig. 17).

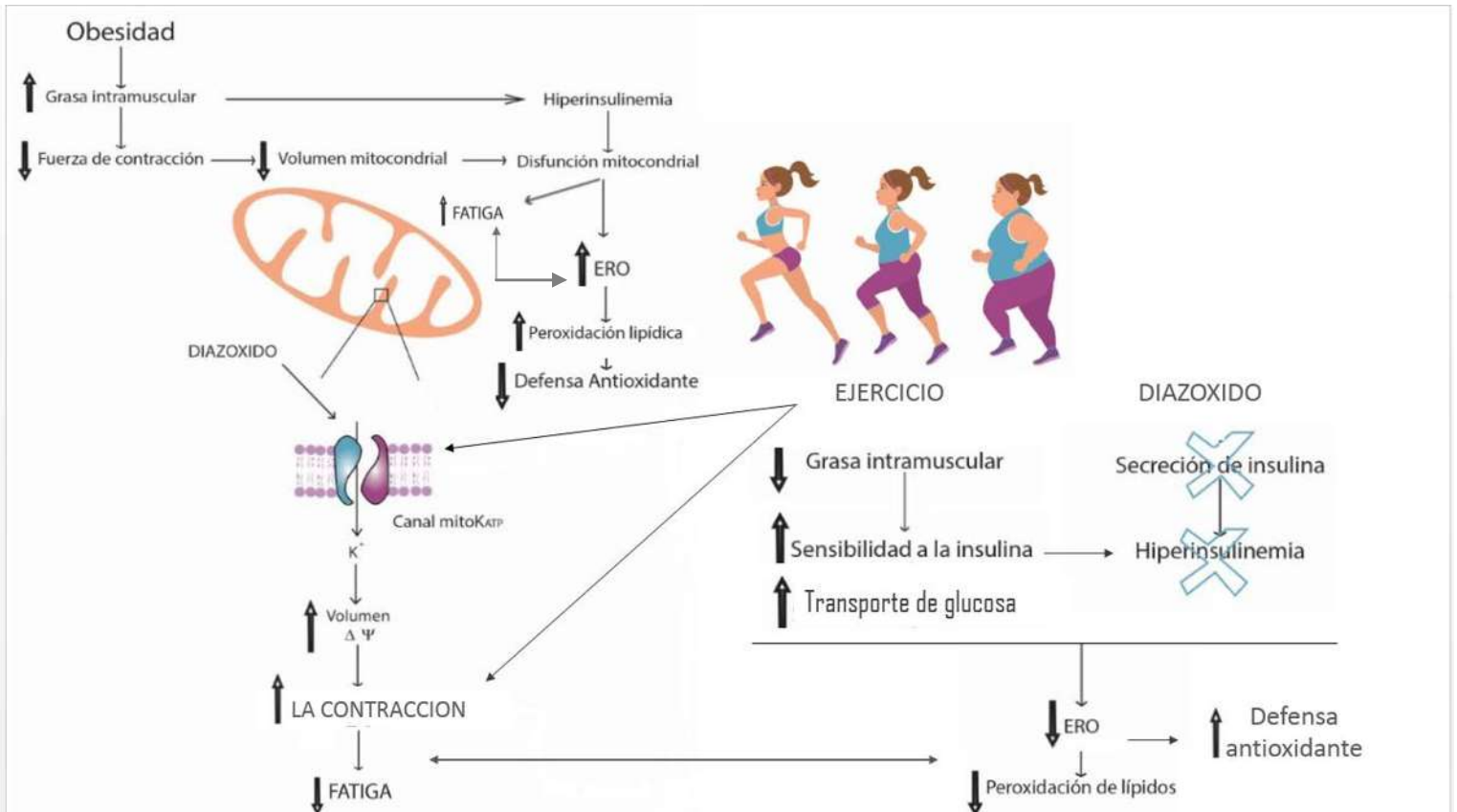


Figura 17. Modelo de estudio que muestra el efecto de la apertura de los canales K_{ATP} y el ejercicio sobre el funcionamiento muscular en la obesidad. La obesidad incrementa la grasa almacenada en el músculo, disminuye la fuerza de contracción y produce pérdida del volumen mitocondrial, generando disfunción mitocondrial, de igual modo el incremento de la grasa intramuscular favorece la hiperinsulinemia, generando también disfunción mitocondrial, la cual promueve fatiga muscular e incrementa los niveles de ERO, incrementa la peroxidación lipídica y disminuye la defensa antioxidante, no obstante, la apertura de los canales K_{ATP} , por parte del diazóxido y el ejercicio, regenera el volumen mitocondrial, lo que incrementa la contracción y disminuye la fatiga, reduciéndose los niveles de ERO, por otro lado, el ejercicio al disminuir la grasa intramuscular evita la hiperinsulinemia, mientras que el diazóxido la evita, inhibiendo la secreción de insulina, con lo que se disminuyen los niveles de ERO, se disminuye la peroxidación lipídica y se incrementa la defensa antioxidante (realizado con información de todos los artículos aquí referidos).

IX. CONCLUSIÓN

El diazóxido y el ejercicio mejoraron la contracción muscular en la obesidad al disminuir los niveles de ERO, la peroxidación lipídica y mejorar el estado redox del glutatión.

PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar cortes histológicos con la finalidad de corroborar el efecto de la grasa almacenada en músculo durante la obesidad y el efecto de la apertura del canal K_{ATP} y el ejercicio sobre esta.
- ❖ Incrementar el análisis de parámetros serológicos para determinar el efecto de la apertura de los canales K_{ATP} y el ejercicio sobre estos en la obesidad.
- ❖ Implementar diferentes protocolos de ejercicio (intensidad y duración) con la finalidad de evaluar sus efectos en el tejido muscular durante la obesidad.
- ❖ Implementar diferentes protocolos con dietas modificadas (restricción calórica) y suplementación antioxidante, con la finalidad de evaluar sus efectos en el tejido muscular durante la obesidad.
- ❖ Evaluar el efecto de los diferentes protocolos con abridor de los canales K_{ATP} , ejercicio, suplantación antioxidante y cambios en la dieta sobre la homeostasis del calcio durante la obesidad.
- ❖ Analizar el efecto de los diferentes protocolos con abridor de los canales K_{ATP} , ejercicio, suplantación antioxidante y cambios en la dieta sobre la resistencia a la insulina y el transporte de glucosa durante la obesidad.
- ❖ Determinar el efecto de los diferentes protocolos con abridor de los canales K_{ATP} , ejercicio, suplantación antioxidante y cambios en la dieta en los procesos inflamatorios inducidos en la obesidad.
- ❖ Analizar el mRNA de atrogenes para comprobar el estado de atrofia durante la obesidad.

X. REFERENCIAS

Abrigo J., Rivera Juan C., Aravena J., Cabrera D., Simon F., Ezquer F., Ezquer M., y Cabello-Verrugio. (2016). High fat diet-induced skeletal muscle wasting is decreased by mesenchymal stem cells administration: implications on oxidative stress, ubiquitin proteasome pathway activation and myonuclear apoptosis. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016:13.

Alemzadeh R., Karlstad M. D., Tushaus K. y Buchholz M. (2008). Diazoxide enhances basal metabolic rate and fat oxidation in obese Zucker rats. *Metabolism Clinical and Experimental* 57:1597–1607.

Alemzadeh R. y Tushaus K. M. (2004). Modulation of adipoinular axis in prediabetic Zucker diabetic fatty rats by diazoxide. *Endocrinology*. 145 (12):5476-84.

Allen D.G., Lamb G.D. y Westerblad H. (2008). Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol. Rev* 8:287-332.

Andrade F., Trujillo X., Sánchez-Pastor E., Montoya-Pérez R., Saavedra-Molina A. Ortiz-Mesina M., y Huerta M. (2011). Glibenclamide increases post-fatigue tension in slow skeletal muscle fibers of the chicken. *J. Comp Physiol B*. 181:403-12.

Andrukhiv A., Costa A. D., West I. C. y Garlid KD. (2006). Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Nov; 291(5):H2067-74.

Bae JY., Shin KO., Woo J., Woo SH., Jang KS., Lee YH. Y Kang S. (2016). Exercise and dietary change ameliorate high fat diet induced obesity and insulin resistance via mTOR signaling pathway. *J Exerc Nutrition Biochem*. 2016 Jun;20(2):28-33.

Bajgar R., Seetharaman S., Kowaltowski A. J., Garlid K. D. y Paucek P. (2001). Identification and Properties of a Novel Intracellular (Mitochondrial) ATP-sensitive Potassium Channel in Brain. *J Biol Chem.* 2001 Sep 7;276 (36):33369-74.

Barbieri E. y Sestili P. (2012). Reactive oxygen Species in skeletal muscle signaling. *Journal of signal transduction* 10:1155.

Baynes J. W. y Dominiczak M. H. (2011). *Bioquímica médica.* 3ra Edición. Ed. Elsevier Mosby. Capítulo 20:253-261.

Beckendorf L., Linke W. A. (2015). Emerging importance of oxidative stress in regulating striated muscle elasticity. *J Muscle Res Cell Motil.* 2015 Feb;36(1):25-36.

Bidi R. E., Rébillard A., Lefeuvre L., Gratas-Delamarche A., Davies K. J.A. y Cillard J. (2015). The calcineurin antagonist, rcan1-4 is induced by exhaustive exercise in rat skeletal muscle. *Free Radical Biology and Medicine.*

Botezelli J. D., Coope A., Ghezzi A. C., Cambri L. T., Moura L. P., Scariot P. P., Gaspar R. S., Mekary R. A., Ropelle E. R., Pauli J. R. (2016). Strength Training Prevents Hyperinsulinemia, Insulin Resistance, and Inflammation Independent of Weight Loss in Fructose-Fed Animals. *Sci Rep.* 4;6:31106

Brown D. A., Chicco A. J., Jew K. N., Johnson M. S., Lynch J. M., Watson P. A., Moore R. L. (2005). Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the KATP channel in the rat. *J Physiol.* 2005 Dec 15;569(Pt 3):913-24.

Brown L. A., Lee D. E., Patton J. F., Perry Jr. R. A., Brown J. L, Baum J. I., Smith-Blair N., Greene N. P. y Washington T. A. (2015). Diet-induced obesity alters anabolic signalling in mice at the onset of skeletal muscle regeneration. *Acta Physiol* 215, 46–57.

Cahoon N. J., Naparus A., Ashrafpour H., Hofer S. O., Huang N., Lipa J. E., Forrest C. R. y Pang Y. (2013).

Pharmacologic prophylactic treatment for perioperative protection of skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury in reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2013 Mar; 131 (3):473-85.

Cartee G. D., Arias E. B., Yu C. S., Pataky M. W. (2016). Novel single skeletal muscle fiber analysis reveals a fiber type-selective effect of acute exercise on glucose uptake. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016 Nov 1;311(5):E818-E824.

Choi S. J., Files D. C., Zhang T, Wang Z., Messi M. L., Gregory H., Stone J., Lyles M. F., Dhar S., Marsh A. P., Nicklas B. J. y Delbono O. (2015). *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, Vol. 00, No. 00, 1–8.

Constant-Urban C., Charif M., Goffin E., Van Heugen J., Elmoualij B., Chiap P., Mouithys-Mickalad A., Serteyn D., Lebrun P., Pirotte B., De Tullio P. (2013). Triphenylphosphonium salts of 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides related to diazoxide targeting mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23:5878–5881.

Costa A. D., Quinlan C. L., Andrukhiv A., West I. C., Jabůrek M. y Garlid K. D. (2006). The direct physiological effects of mitoKATP opening on heart mitochondria. *Send to Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 Jan;290(1):H406-15.

Di Meo S., Iossa S. y Venditti P. (2017). Improvement of obesity-linked skeletal muscle insulin resistance by strength and endurance training. *J Endocrinol.* 2017 Sep;234(3):R159-R181.

Drucker C. R. (2005) *Fisiología Médica.* Ed. El manual moderno. Capítulo 76:827-837.

Dutka T. L., Mollica J. P., Posterino G. S. y Lamb G. D. (2011). Modulation of contractile apparatus Ca^{2+} sensitivity and disruption of excitation-contraction coupling by S-nitrosoglutathione in rat muscle fibres. *J Physiol* 589.9 2181-2106.

Espinosa A., Henríquez-Olguín C. y Jaimovich E. (2016). Reactive Oxygen Species and Calcium Signals in skeletal muscle: A crosstalk involved in both normal signaling and disease. *Cell Calcium*. 60 (3):172-9.

Estepa V., Ródenas S., Martín M. C. (2001). Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. *Anal. Real Acad. Farm.*, 67: 1-17.

Erskine R. M., Tomlinson D. J., Morse C. I., Winwood K., Hampson P., Lord J. M., Onambélé G. L. (2016). The individual and combined effects of obesity- and ageing-induced systemic inflammation on human skeletal muscle properties. *Int J Obes (Lond)*. 41(1): 102–111.

Flagg T., Enkvetchakul D., Koster J. C. y Nichols C. G. (2010). Muscle K_{ATP} channels: recent insights to energy sensing and myoprotection. *Physiol Rev* 90: 799–829.

Farahini H., Habibey R., Ajami M., Davoodi S. H., Azad N., Soleimani M., Tavakkoli Hosseini M., Pazoki-Toroudi H. (2012) Late anti-apoptotic effect of $K(ATP)$ channel opening in skeletal muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 39 (11):909–916.

Fernandez J., Grigoletto M. y Fiñana E. (2009). Estrés oxidativo inducido por el ejercicio. *Medicina del deporte*. Elsevier 2(1):19:34.

Ferranti R., Da Silva M.M, Kowaltowski A.J., (2003). Mitochondrial ATP-sensitive K^+ channel opening decreases reactive oxygen species generation, *FEBS Lett*. 536 (2003) 51–55.

Fitts R. H. (2007). The cross-bridge cycle and skeletal muscle fatigue. *J Appl Physiol* 104: 551-558.

García M. C., Hernández A., Sánchez J. A. (2009). Role of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels on fatigue in mouse muscle fibers. *Biochem Biophys Res Commun.* **385**:28-32.

Grasa J., Sierra M., Muñoz M. J., Soteras F., Osta R., Calvo B., Miana-Mena F. J. (2014). On simulating sustained isometric muscle fatigue: a phenomenological model considering different fiber metabolisms. *Biomech Model Mechanobiol.* **13**(6):1373-85.

Halvorsen k., munkvik M., Lunde P. K. y Sejersted O. M. (2013). Multiple causes of fatigue during shortening contractions in rat slow twitch skeletal muscle. *Plos one.* **8**:8.

Hawke T. J. y Garry D. J. (2001) Myogenic satellite cell: physiology to molecular biology. *Journal of applied physiology.* **91**: 534-541.

Heo J., No M., Park D., Kang J., Seo D., Han J., Neuffer P. D. y Kwak H. (2017). Effects of exercise on obesity-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. *Korean J Physiol Pharmacol* **21**(6):567-577.

Hernández A, Cheng A, Westerblad H. (2012). Antioxidants and Skeletal Muscle Performance: "Common Knowledge" vs. Experimental Evidence. *Front Physiol.* **3**:46.

Hyatt H. W., Toedebusch R. G., Ruegsegger G., Mobley C. B., Fox C. D., McGinnis G. R., Quindry J. C., Booth F. W., Roberts M. D., Kavazis A. N. (2015). Comparative adaptations in oxidative and glycolytic muscle fibers in a low voluntary wheel running rat model performing three levels of physical activity. *Physiol Rep.* **3**(11). pii: e12619.

Hibino H., Inanobe A., Furutani K., Murakami S., Fndlay I. y Kurachi Y. (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function and physiological roles. *Physiol Rev* **90**: 291–366.

Holdsworth C. T., Copp SW., Ferguson S. K., Sims G. E., Poole D. C., Musch T. I. (2015). Acute inhibition of ATP-sensitive K_v channels impairs skeletal muscle vascular

control in rats during treadmill exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015 Jun 1;308(11):H1434-42.

Jackson M. (2009). Redox regulation of adaptive responses in skeletal muscle to contractile activity. *Free radical biology & medicine.* 47:1367-1275.

Jackson M. (2011). Control of reactive oxygen species production in contracting skeletal muscle. *Antioxidants & redox signaling.* 15(9).

Jašová M., Kancirová I., Muráriková M., Farkašová V., Waczulíková I, Ravingerová T., Ziegelhöffer A., Ferko M. (2016). Stimulation of Mitochondrial ATP Synthase Activity – a New Diazoxide-Mediated Mechanism of Cardioprotection. *Physiol Res.* 65 Suppl 1:S119-27.

Ji L. L., Gomez-Cabrera M. C., Vina J. (2006). Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci.* 1067:425-35.

Kraljevic J, Høydal MA, Ljubkovic M, Moreira JB, Jørgensen K, Ness HO, Bækkerud FH, Dujic Z, Wisløff U y Marinovic J. (2015). Role of katp channels in beneficial effects of exercise in ischemic heart failure. *Med Sci Sports Exerc.* Dec; 47(12):2504-12.

Kuwahara H., Horie T., Ishikawa S., Tsuda C., Kawakam S. Noda Y., Kaneko T., Tahara S., Tachibana T. Okab M., Melki J., Takano R., Toda T., Morikaw D., Nojiri H., Kurosawa H., Shirasawa T. y Shimizu T. (2010). Oxidative stress in skeletal muscle causes severe disturbance of exercise activity without muscle atrophy. *Free radical biology & medicine.* Elsevier. 48:1252-1262.

Lamb G. D. y Westerblad H. (2011). Acute effects of reactive oxygen and nitrogen species on the contractile function of skeletal muscle. *The journal of physiology*. 589.9: 2119–2127.

Lambertucci R.H., Levada-Pires A. C., Rossoni L. V., Curi R. y Pithon-Curi T. C. (2006). Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats. *Mechanisms of Ageing and Development* 128:267–275.

López-Chicharro J. y Fernández-Vaquero A. (2010) fisiología del ejercicio. 3ra Edición. Ed. Médica Panamericana. Capítulo 4:81-90.

Lu Y., Li H., Shen S., Shen Z., Xu M., Yang C., Li F., Feng Y., Yun J., Wang L. y Qi H. (2016). Swimming exercise increases serum irisin level and reduces body fat mass in highfat-diet fed Wistar rats. *Lipids in Health and Disease* 15:93.

Maclaren D. y Morton J. (2012) *Biochemistry for sport and exercise metabolism*. 1ra Edición. Ed. Wiley-Blackwell. Capítulo 2:11-30.

MacIntosh D. R., Gardiner P. F. y Alan J. M. (2006). *Skeletal muscle form and function*. 2da. Edición. Ed. Human Kinetics. Capítulo 15:226-230.

Martinez-Huenchullan S. F., Maharjan B. R., Williams P. F., Tam C. S., Mclennan S. V., Twigg S. M. (2018). Differential metabolic effects of constant moderate versus high intensity interval training in high-fat fed mice: possible role of muscle adiponectin. *Physiol Rep*. 2018 Feb;6(4).

Marotte C., Zeni S. N. (2013). Reactive oxygen species on bone cells activity. *Bioquimc Clin Latinoam* 47:4

McGarrah R. W., Slentz C. A., Kraus W. E. (2016). The Effect of Vigorous- Versus Moderate-Intensity Aerobic Exercise on Insulin Action. *Curr Cardiol Rep.* 2016 Dec;18(12):117.

Moghtadaei M., Habibey R., Ajami M., Soleimani M., Ebrahimi S. A. y Pazoki-Toroudi H. (2012). Skeletal muscle post-conditioning by diazoxide, anti-oxidative and anti-apoptotic mechanisms. *Mol Biol Rep* 39:11093–11103.

Montoya-Pérez R., Saavedra-Molina A., Trujillo X., Huerta M., Andrade F., Sánchez-Pastor E., Ortiz M. (2010). Inhibition of oxygen consumption in skeletal muscle-derived mitochondria by pinacidil, diazoxide, and glibenclamide, but not by 5-hydroxydecanoate. *J Bioenerg Biomembr.* **42**:21-27.

Nonaka K., Une S., Tatsuta N., Ito K., Akiyama J. (2014). Changes in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in extensor digitorum longus muscles of streptozotocin-diabetic rats may contribute to muscle atrophy. *Send to Acta Physiol Hung.* 2014 Dec;101(4):421-8.

Pattanakuhar S., Pongchaidecha A., Chattipakorn N. y Chattipakorn S. C. (2016). The effect of exercise on skeletal muscle fibre type distribution in obesity: From cellular levels to clinical application. *Obesity Research & Clinical Practice.* 11 (5):112-132.

Periasamy M. ykalyanasundaram A. (2007). SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle and Nerve.* 35: 430-44.

Pompeani N., Rybalka E., Latchman H., Murphy R. M., Croft K. y Hayes A. (2014). Skeletal muscle atrophy in sedentary Zucker obese rats is not caused by calpain-mediated muscle damage or lipid peroxidation induced by oxidative stress. *Journal of Negative Results in BioMedicine* (2014) 13:19.

Powers S. K., Ji L. L., Kavazis A. N. y Jackson M. J. (2011). reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Compr Physiol.* 1(2): 941–969.

Rahemi H., Nigam N., Wakeling J. M. (2015). The effect of intramuscular fat on skeletal muscle mechanics: implications for the elderly and obese. *J R Soc Interface*. 2015 Aug 6;12(109):20150365.

Randall D., Burggren W. y French k. (2002) *Eckert Fisiología animal mecanismos y adaptaciones*. 4ta. Edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Capítulo 11:381-411.

Reid M. B. (2008). Free radicals and muscle fatigue: Of ROS, canaries, and the IOC. *Free Radical Biology & Medicine* 44:169–179.

Sánchez-Duarte E., Trujillo X, Huerta M., Ortiz-Mesina M., Cortés-Rojo C., Manzo-Ávalos S., Saavedra-Molina A., Montoya-Pérez R. (2012). Mitochondrial KATP channels in skeletal muscle: are protein kinases C and G, and nitric oxide synthase involved in the fatigue process? *Open Access Animal Physiol* 4:21–28.

Sánchez-Duarte E., Trujillo X., Cortés-Rojo C., Saavedra-Molina A., Camargo G., Hernández L., Huerta M., Montoya-Pérez R. (2017). Nicorandil improves post-fatigue tension in slow skeletal muscle fibers by modulating glutathione redox state *J Bioenerg Biomembr*. 49(2):159-170.

Scott K., Benkhalti M., Calvert N. D., Paquette M., Zhen L., Harper M. E., Al-Dirbashi O. Y., Renaud J. M. (2016). KATP channel deficiency in mouse fdb causes an impairment of energy metabolism during fatigue. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1;311(4):C559-C571.

Szabo I, Zoratti M. (2014). Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiol Rev*. 94(2):519-608.

Tavi P., y Westerblad H. (2011). The role of *in vivo* Ca²⁺ signals acting on Ca²⁺-calmodulin-dependent proteins for skeletal muscle Plasticity. *J Physiol* 589.21: 5021–5031.

Trewin A. J., Levinger I., Parker L., Shaw C. S., Serpiello F. R., Anderson M. J., McConell G. K., Hare D. L., Stepto N. K. (2017). Acute exercise alters skeletal muscle mitochondrial respiration and H₂O₂ emission in response to hyperinsulinemic-euglycemic clamp in middle-aged obese men. *PLoS One*. 21;12(11):e0188421.

Tricarico D., Mele A., Camerino G. M., Bottinelli R., Brocca L., Frigeri A., Svelto M., George A. L. Jr, Camerino D. C. (2010). The K_{ATP} channel is a molecular sensor of atrophy in skeletal muscle. *J Physiol*. **588**:773-84.

Wang P., Li C. G., Qi Z., Cui D., Ding S. (2016). Acute exercise stress promotes Ref1/Nrf2 signalling and increases mitochondrial antioxidant activity in skeletal muscle. *Exp Physiol*. 2016 Mar;101(3):410-20.

Westerblad H., Bruton J. D. y Katz A., (2010). Skeletal muscle: Energy metabolism, Fibers types, Fatigue and Adaptability. *Experimental cell research*. 316: 3093-3099.

Wilmore J. H. y Costill D. L. (2010). Fisiología del esfuerzo y del deporte. 6ta Edición. Ed. Paldotribo. Capítulo 1:36-46.

Zingman L. V., Zhu Z., Sierra A., Stepniak E., Burnett C. M., Maksymov G., Anderson M. E., Coetzee W. A., Hodgson-Zingman D. M. (2011). Exercise-induced expression of cardiac ATP-sensitive potassium channels promotes action potential shortening and energy conservation. *J Mol Cell Cardiol*. 2011 Jul;51(1):72-81.

Zuo L., Nogueira L. yHogan M. C. (2011). Reactive oxygen species formation during tetanic contractions in single isolated *Xenopus* myofibers. *J Appl Physiol* 111: 898–904.