



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de Biotecnología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARIA DE DOCENCIA
JEFATURA DE POSGRADO**

**“Análisis de la señalización de hormonas tiroideas en el músculo
esquelético en un modelo de ejercicio aeróbico crónico”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
MEDICINA MOLECULAR**

QUE PRESENTA

L.N. MARÍA TERESA TORRES SOLIS

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. ELIZABETH LORRAINE JAIMES
HOY**

CO-DIRECTOR DE TESIS: DR. JUAN JOSÉ ACEVEDO FERNÁNDEZ

Cuernavaca, Morelos, México a mayo de 2022

Lugar y fecha de la realización de la tesis

El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular del Instituto de Biotecnología, UNAM y en el Laboratorio de Electrofisiología y Bioevaluación Farmacológica de la Facultad de Medicina, UAEM. Cuernavaca, Morelos, México del mes de agosto del año 2019 al mes de octubre del año 2021.

Miembros del comité tutorial

Co-Tutor: Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes Hoy

Co-Tutor: Dr. Juan José Acevedo Fernández

Tutor Personal: Dr. Jesús Santa Olalla Tapia

1er Vocal: Dra. Gabriela Castañeda Corral

2do. Vocal: Dra. Rosa María Uribe Villegas

Miembros del jurado de examen.

Presidente: Dra. Gabriela Castañeda Corral

Secretario: Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

1er Vocal: Dr. Diego Esquiliano Rendón

2do. Vocal: Dr. Juan José Acevedo Fernández

3er. Vocal: Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes Hoy

Fuentes de financiamiento

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de maestría (CVU: 1005140) y del donativo Ciencia de Frontera 2019-265247.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lorraine Jaimes Hoy por creer en mí, por su comprensión y paciencia en compartir sus conocimientos. Gracias por la oportunidad de seguir con mi formación académica, por sus consejos y por motivarme a seguir estudiando.

Al Dr. Juan José Acevedo por abrirme las puertas de su laboratorio, por sus enseñanzas y consejos en los experimentos de electrofisiología.

A la Dra. Patricia Joseph Bravo y al Dr. Jean-Louis Charli por sus valiosos comentarios, preguntas en los seminarios y por permitirme trabajar en el laboratorio.

Al Dr. Jesús Santa Olalla (*q.e.p.d.*), a la Dra. Rosa María Uribe y a la Dra. Gabriela Castañeda por aceptar formar parte de mi comité tutorial, por sus valiosas observaciones, comentarios y su atención prestada en cada seminario de tesis.

A la química Fidelia Romero por compartir con mucha paciencia su conocimiento y experiencia en técnicas de biología molecular, agradezco su apoyo que me permitió llevar a cabo este proyecto.

Al Q.F.B. Miguel Cisneros por su apoyo en la elaboración de radioinmunoensayos.

A mis compañeras de esta inolvidable experiencia Rocío Alvarado y Marlen Ramírez por escucharme, por darme sus sinceras opiniones y sobre todo por su amistad.

Finalmente quiero agradecer a mi familia por su apoyo y cariño de siempre. En especial a mi amada madre Roberta por su cariño incondicional, a mi querido hermano Alberto que sin su apoyo ni siquiera hubiera llegado hasta aquí. A mis hermanas Isabel y María José por apoyarme y escucharme cuando lo necesitaba, aunque no entendieran de todo lo que les hablaba. A mis abuelitos Josefa y Cornelio, el mejor abuelito que pude haber tenido, gracias por haber confiado en mí.

I. ÍNDICE

II. ÍNDICE DE FIGURAS	4
III. ÍNDICE DE TABLAS.....	5
IV. ABREVIATURAS	6
V. RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Características generales del músculo esquelético	9
1.1.1 Tipos de fibras musculares	11
1.1.2 Contracción del músculo esquelético	13
1.2 Metabolismo del músculo esquelético.....	16
1.2.1 Sistema ATP-Fosfocreatina.....	16
1.2.2 Metabolismo glucolítico.....	16
1.2.3 Metabolismo oxidativo.....	17
1.3 Regulación del eje hipotálamo-pituitaria-tiroideo	17
1.4 Señalización de las hormonas tiroideas en el músculo esquelético	18
1.5 Funciones de las hormonas tiroideas en el músculo esquelético	21
1.5.1 Miogénesis y reparación del músculo esquelético dependiente de T3.....	21
1.5.2 Plasticidad del músculo	21
1.5.3 Biogénesis mitocondrial	22
1.5.4 Regulación del gasto energético por T3 en los músculos.....	22
1.5.5 Homeostasis de la glucosa dependiente de T3	23
2. ANTECEDENTES.....	24
2.1 Señalización de HT en el músculo esquelético durante el ejercicio	24
2.2 Efectos no genómicos de las hormonas tiroideas en la contracción del músculo esquelético	26

3.	JUSTIFICACIÓN.....	28
4.	HIPÓTESIS	29
5.	OBJETIVOS.....	29
5.1	Objetivo general:.....	29
5.2	Objetivos particulares:	29
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	30
6.1	Animales	30
6.2	Protocolo de habituación al ejercicio en la banda para correr.	30
6.3	Protocolo de ejercicio aeróbico en la banda para correr	33
6.4	Sacrificio	34
6.5	Cuantificación de hormonas tiroideas (T3 y T4) por el método de ELISA:.....	34
6.6	Cuantificación de corticosterona sérica por Radioinmunoensayo (RIA)	35
6.7	Extracción de ARN total.....	36
6.8	Limpieza de ADN genómico	37
6.9	Retrotranscripción (RT).....	37
6.10	Cuantificación relativa de expresión genética obtenida por qPCR	38
6.11	Preparación neuromuscular	39
6.12	Músculo aislado.....	40
6.13	Tratamiento	40
6.14	Estimulación y registro.....	40
6.15	Análisis de datos de la contracción muscular.....	41
6.16	Análisis estadístico.....	42
7.	RESULTADOS	43
7.1	Estilo de carrera de los animales durante la habituación al ejercicio	43
7.2	Estilo de carrera de los animales durante el protocolo de ejercicio.....	44

7.3	Efecto del ejercicio en el consumo de alimento y ganancia de peso corporal.....	45
7.4	Efecto del ejercicio aeróbico en el peso de tejido adiposo blanco y pardo.....	46
7.5	Efectos del ejercicio aeróbico en los niveles séricos de las hormonas tiroideas ...	47
7.6	Efectos del ejercicio aeróbico en la concentración de corticosterona.....	47
7.7	Efecto del ejercicio aeróbico en la expresión del ARNm del transportador MCT8 en tejido muscular	48
7.8	Efecto del ejercicio aeróbico en la expresión del ARNm de las enzimas desyodasas	49
7.9	Efecto del ejercicio aeróbico en la expresión del ARNm de los receptores de HT Thr α 1 y Thr β 1	50
7.10	Efecto de la Levotiroxina en la preparación neuromuscular.....	51
7.11	Efecto de la Levotiroxina en el músculo aislado.....	52
7.12	Efecto de la Triyodotironina en la preparación neuromuscular	53
7.13	Efecto de la Triyodotironina en el músculo aislado.....	55
7.14	Efecto de la cafeína en la preparación neuromuscular.....	56
7.15	Efecto de la cafeína en el músculo aislado.....	56
8.	DISCUSIÓN.....	58
8.1	Efectos del ejercicio aeróbico en el peso corporal y en el tejido adiposo.....	58
8.2	Efectos del ejercicio aeróbico en la señalización de Hormonas Tiroideas en el músculo esquelético.....	59
8.3	Efectos de las hormonas tiroideas en la contracción muscular.....	61
9.	CONCLUSIONES.....	63
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Organización del músculo esquelético y capas de tejido conectivo que lo recubren.....	10
Figura 2.	Disposición de los filamentos dentro de un sarcómero	11
Figura 3.	Mecanismo de acoplamiento excitación-contracción.....	14
Figura 4.	Ciclo de contracción y relajación..	15
Figura 5.	Regulación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroideo (HHT) y músculo esquelético...	18
Figura 6.	Configuración esquemática de la puntuación de rendimiento de tres criterios AEY.....	32
Figura 7.	Procedimiento para el cálculo del valor promedio de cada puntaje de los tres criterios AEY basado en notas de cada período de registro..	33
Figura 8.	Imágenes de la preparación neuromuscular.....	40
Figura 9.	Registro de la contracción muscular.....	41
Figura 10.	Análisis del estilo de carrera de los animales durante la habituación al ejercicio.....	43
Figura 11.	Análisis del estilo de carrera de los animales durante el protocolo de ejercicio aeróbico.....	44
Figura 12.	Consumo de alimento y ganancia de peso corporal durante la habituación y protocolo de ejercicio aeróbico.....	45
Figura 13.	Efecto del ejercicio aeróbico en la relación del peso del tejido adiposo y el peso corporal de los animales..	46
Figura 14.	Efectos del ejercicio aeróbico en la concentración sérica de hormonas tiroideas T3 y T4 en ratas.	47
Figura 15.	Efecto del ejercicio aeróbico en la concentración sérica de corticosterona. ..	48
Figura 16.	Efecto del ejercicio aeróbico en el ARNm del transportador MCT8 en músculo esquelético.....	48

Figura 17. Efectos del ejercicio aeróbico en la expresión del ARNm de enzimas desyodasa en el músculo esquelético.	49
Figura 18. Efectos del ejercicio aeróbico en la expresión del ARNm de receptores de HT Thr α 1 y Thr β 1 en el músculo esquelético.	50
Figura 19. Efectos de la Levotiroxina en la contracción muscular en una preparación neuromuscular.	52
Figura 20. Efectos de la Levotiroxina en la contracción en una preparación de músculo aislado.....	53
Figura 21. Efectos de la triyodotironina en la contracción muscular en una preparación neuromuscular.	54
Figura 22. Efectos de la triyodotironina en la contracción de músculo aislado.....	55
Figura 23. Efectos de la cafeína en la contracción muscular en una preparación neuromuscular.	56
Figura 24. Efectos de la cafeína en la contracción de músculo aislado.	57

III.

IV. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mezcla de reacción para RT	38
Tabla 2. Secuencias de los primers de referencia y de interés.....	39

V. ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
ATP	Trifosfato de adenosina
BAT	Tejido adiposo pardo (Brown Adipose Tissue)
Dio 2	Desyodasa 2
Dio 3	Desyodasa 3
GLUT4	Transportador de glucosa 4
HPT	Eje hipotálamo-pituitaria-tiroideo
HT	Hormonas tiroideas
ME1	Enzima málica citosólica 1
MCT	Transportador de monocarboxilatos
mGPDH	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial
MHC	Cadena pesada de miosina
MyoD1	Proteína 1 de diferenciación miogénica
OATP1C1	Proteína transportadora de aniones orgánicos 1C1
PGC-1α	Receptor coactivador γ activado por el proliferador de peroxisomas-1 α
PPAR	Receptor activado por proliferadores peroxisomales
RT-qPCR	Transcripción reversa - Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
SERCA	Ca ²⁺ - ATPasa del retículo sarcoplásmico
TR	Receptores de hormonas tiroideas
TRH	Hormona liberadora de tirotropina
TSH	Hormona estimuladora de la tiroides
T3	3,5,3'-Triyodotironina
T4	Tiroxina
UCP3	Proteína desacopladora mitocondrial 3
WAT	Tejido adiposo blanco (White Adipose Tissue)

VI. RESUMEN

Introducción: El ejercicio induce adaptaciones metabólicas y cambios en la composición de fibras musculares que a su vez están reguladas por las hormonas tiroideas (HT) a través de la vía genómica. Las HT también participan en la regulación de transportadores iónicos importantes durante la contracción del músculo esquelético a través de la vía no genómica.

Objetivo: Analizar los efectos del ejercicio aeróbico crónico en la expresión de los elementos de la vía de señalización de HT (transportadores, desyodasas y receptores nucleares) en el músculo esquelético y el efecto agudo de las HT sobre la contracción muscular.

Métodos: Se utilizaron ratas macho adultas que fueron sometidas a un protocolo de ejercicio aeróbico en una banda para correr durante 14 días a las cuales posteriormente se les extrajeron los músculos soleus y plantaris. Los cambios en la expresión del ARNm del transportador MCT8, desyodasas (tipo 2 y 3) y receptores ($\text{Thr}\alpha 1$ y $\text{Thr}\beta 1$) se midieron a través de la técnica RT-qPCR. Además, se evaluó el efecto agudo de las hormonas tiroideas en la contracción del músculo esquelético utilizando una preparación neuromuscular y de músculo gastrocnemio aislado de ratones macho adultos.

Resultados: El ejercicio aeróbico crónico disminuyó la expresión del transportador de HT MCT8, de $\text{Dio}3$ y $\text{Thr}\alpha 1$ en el músculo plantaris, mientras que en el caso del músculo soleus no se encontraron cambios significativos en la expresión del ARNm de ninguno de los elementos de la señalización de HT. La aplicación aguda (5 minutos) de altas concentraciones de HT en una preparación neuromuscular y músculo aislado tuvieron efectos inotrópicos negativos, es decir provocaron una disminución en la respuesta contráctil del músculo.

Conclusiones: Los cambios encontrados en la expresión de los elementos de señalización de HT en el músculo plantaris indican que, los elementos de la señalización de HT en el músculo esquelético son específicos de acuerdo con el fenotipo de fibras musculares en respuesta al ejercicio aeróbico crónico. Por otro lado, la aplicación aguda de concentraciones elevadas de las HT a nivel tisular y con estímulos constantes tienen efectos inotrópicos negativos en el músculo esquelético de ratones adultos.

Palabras clave: Ejercicio aeróbico, hormonas tiroideas, músculo esquelético, contracción muscular.

1. INTRODUCCIÓN

Las hormonas tiroideas (tiroxina; T4 y 3,5,3'-triyodotironina; T3) son necesarias para procesos relacionados con el crecimiento, el desarrollo, la diferenciación celular, la regulación del metabolismo en el adulto y la regulación de la homeostasis energética en varios tejidos^{1,2}. Ejercen sus efectos a través de la regulación de la transcripción de varios genes catabólicos y/o anabólicos^{1,3}. Uno de los tejidos que es regulado por las hormonas tiroideas (HT) es el músculo esquelético, en el cual contribuyen en gran medida a la determinación del fenotipo de fibras musculares, es decir que participan en la regulación de las propiedades contráctiles y metabólicas del músculo^{4,5}. Además, participan en la reparación, la miogénesis, la plasticidad del músculo esquelético, el aumento de la biogénesis mitocondrial, el gasto de energía y la captación de glucosa dependiente de insulina. Todo lo anterior, a través de la regulación transcripcional de un conjunto de genes en el músculo esquelético^{6,7}.

El ejercicio es otro regulador importante del fenotipo muscular, que además puede inducir adaptaciones crónicas, mejora la capacidad al ejercicio y regula el metabolismo energético⁸. En condiciones patológicas en donde existe una alteración de la concentración de las HT, como el hipotiroidismo e hipertiroidismo, se ha observado una reducción significativa en la tolerancia al ejercicio, es decir que los pacientes son incapaces de realizar ejercicio físico a una intensidad o duración que regularmente no sería un problema. La intolerancia al ejercicio conduce a una reducción del rendimiento máximo a la actividad física y cambios en el umbral de lactato a menores cargas de trabajo. El umbral de lactato se refiere al aumento de la concentración de lactato en sangre producido por la acidosis metabólica y que se relaciona con la intensidad de ejercicio o consumo de oxígeno (VO₂)^{9,10}.

El hipotiroidismo provoca en el músculo miopatía hipotiroidea, probablemente mediante la alteración del metabolismo glucogenolítico y oxidativo y/o por la expresión alterada de proteínas contráctiles (miosina y actina)¹¹. Otro signo en pacientes con hipotiroidismo es el retardo en el ciclo de contracción y relajación del músculo¹². En contraste, el ejercicio aeróbico en pacientes con hipotiroidismo restablece a niveles normales la TSH (*por sus siglas en inglés* thyroid stimulating hormone) y las HT, además promueve la pérdida de peso corporal¹³.

En el músculo esquelético, el hipertiroidismo provoca miopatía tirotóxica. Esta última se ha propuesto que se desarrolla por atrofia muscular e interrupción del acoplamiento excitación-contracción¹⁴. En pacientes con tirotoxicosis subclínica el ejercicio aeróbico tiene efectos benéficos, aumenta la masa muscular y disminuye la percepción de fatiga durante el periodo de entrenamiento físico¹⁵.

Lo anterior se sustenta en la evidencia obtenida en modelos de hipotiroidismo en ratas, en donde se observó que el entrenamiento de resistencia o la administración de T3 mejoran notablemente su rendimiento al ejercicio y elevan el umbral de lactato⁹. Con base en lo anterior, se ha sugerido que las respuestas de adaptación del músculo esquelético al ejercicio están ampliamente reguladas por las HT. Los efectos tanto de las HT como del ejercicio en el músculo se han ido dilucidando. Sin embargo, se sabe poco sobre el papel que desempeñan las HT en la adaptación metabólica y estructurales del músculo esquelético durante el ejercicio¹⁶.

1.1 Características generales del músculo esquelético

El músculo esquelético constituye aproximadamente el 40% del peso corporal total en humanos, sus principales funciones son de sostén y movimiento que se generan a través del mecanismo de contracción-relajación del músculo en donde convierte la energía química en energía mecánica¹⁷.

Las funciones del músculo esquelético representan el 30% de la tasa metabólica basal^{6,17,18}. Desempeña un papel muy importante en el metabolismo proteico al ser un reservorio de aminoácidos, que son indispensables para la síntesis de proteínas específicas necesarias para otros órganos como la piel, el corazón y el cerebro¹⁹. Contribuye al mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre. Se encarga de la producción de calor (proceso de termogénesis) a través de contracciones involuntarias de las fibras musculares, y con esto contribuye al mantenimiento de la temperatura corporal central normal^{17,18}.

El músculo esquelético está compuesto por miles de células denominadas fibras musculares o miofibrillas, cubiertas por tres capas de tejido conectivo extendidas desde la fascia. La capa más externa es el epimisio que rodea todo el músculo. El perimisio es la capa intermedia y

rodea grupos de 10 a 100 o más fibras musculares y los separa en haces llamados fascículos. La capa interna o endomisio se encuentra rodeando cada miofibrilla (Figura 1)¹⁸.

Dentro de las miofibrillas, hay estructuras proteicas más pequeñas, denominadas filamentos o miofilamentos de los cuales los filamentos delgados están compuestos, en su mayor parte, por la proteína actina, y los filamentos gruesos compuestos por miosina. Los filamentos, tanto finos como gruesos, intervienen directamente en el proceso contráctil. Los contenidos en una miofibrilla no se extienden a lo largo de toda la fibra muscular, sino que están dispuestos en compartimentos denominados sarcómeros, que son las unidades funcionales básicas de una miofibrilla²⁰. Los sarcómeros se encuentran delimitados por discos Z²¹.

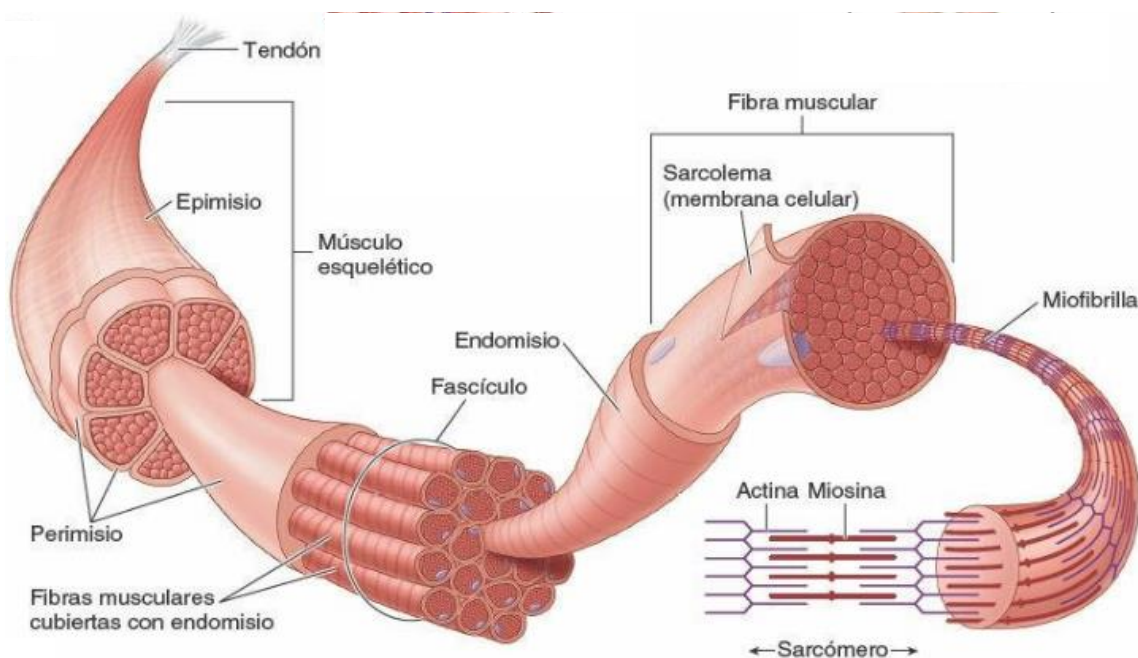


Figura 1. Organización del músculo esquelético y capas de tejido conectivo que lo recubren. Tomado de Moore et al., 2010²².

Los filamentos dentro del sarcómero se organizan en la banda A, la banda I, la zona H y la línea M (Figura 2). La parte media más oscura del sarcómero es la banda A, que se extiende a lo largo de todos los filamentos gruesos. La banda I es un área clara, menos densa, que contiene solo los filamentos finos, mientras que la zona H angosta en el centro de cada banda A contiene únicamente filamentos gruesos. Las proteínas de sostén que mantienen unidos los

filamentos gruesos en el centro de la zona H forman la línea M, denominada así porque se encuentra en medio del sarcómero^{18,23}.

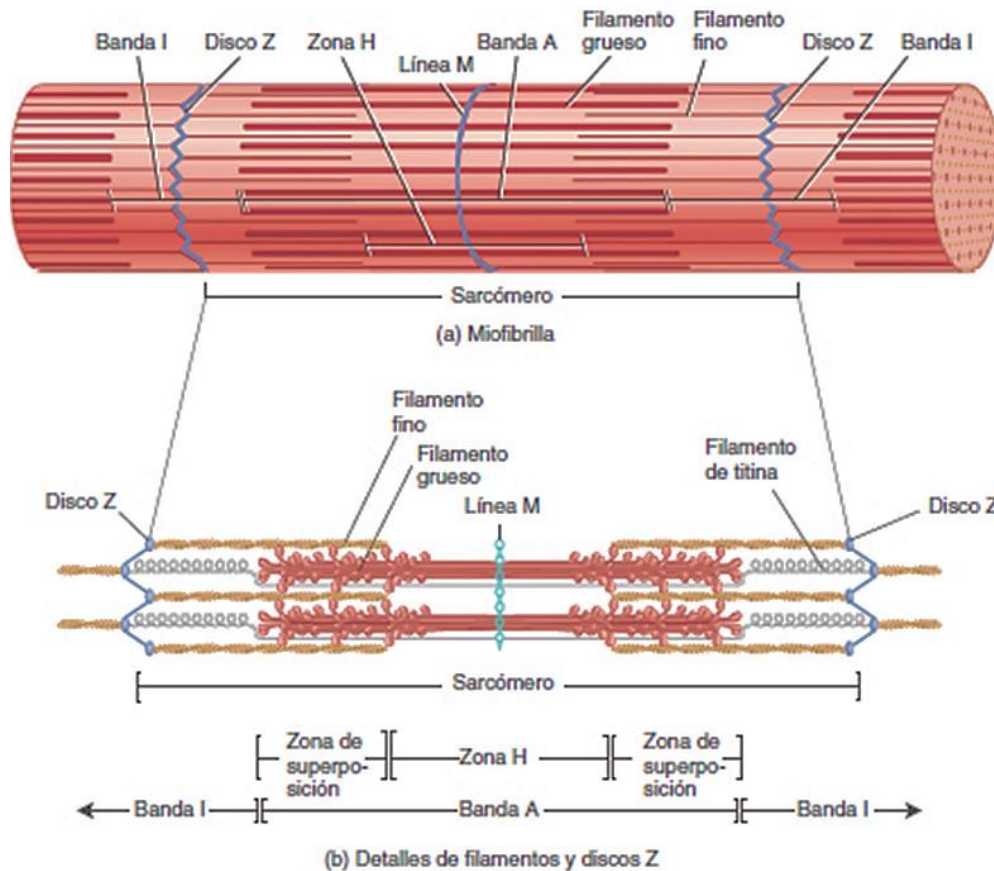


Figura 2. Disposición de los filamentos dentro de un sarcómero. Un sarcómero flanqueado por dos discos Z. Tomada de Tortora et al., 2013¹⁸.

1.1.1 Tipos de fibras musculares

De acuerdo con su velocidad de contracción y perfil metabólico las fibras del músculo esquelético se clasifican en fibras tipo I y tipo II. Las fibras tipo I son de contracción lenta y capacidad oxidativa, mientras que las fibras tipo II son de contracción rápida y predomina la capacidad glucolítica^{6,24,25}.

Las fibras tipo I son lentas en la generación de fuerza y son responsables de la contracción sostenida²⁴. La tasa de contracción-relajación está determinada por la actividad de la bomba

Ca²⁺-ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA, *por sus siglas en inglés* sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ - ATPase) y la proteína motora de la cadena pesada de miosina (MHC, *por sus siglas en inglés* myosin heavy chain)^{6,25}. Las fibras de contracción lenta expresan MHC7 y la isoforma 2a de SERCA, además presentan una gran cantidad de capilares y mioglobina encargada del transporte de oxígeno, que confiere a las fibras musculares una coloración rojiza²⁴. Estas características se encuentran estrechamente relacionadas con la alta densidad mitocondrial y el metabolismo oxidativo que desempeñan este tipo de fibras. Uno de los principales sustratos de esta vía metabólica es la glucosa por lo que estas fibras también expresan el transportador de glucosa 4 (GLUT4) dependiente de insulina, que permite la entrada de glucosa a la célula²⁶.

Las fibras tipo II se subclasifican en tres fenotipos: IIa, IIx y IIb²⁵. Las fibras tipo IIa son de contracción rápida, no obstante, tienen principalmente capacidad oxidativa. Por su contenido de mioglobina y vasos capilares presentan un color intermedio rojo y una gran cantidad de mitocondrias comparadas con otros subtipos de fibras tipo II, pero a diferencia de las fibras tipo I tienen un alto contenido de glucógeno y fosfocreatina y expresan GLUT4 y MHC2. Las fibras tipo IIx a diferencia del tipo I y tipo IIa tienen capacidad glucolítica y una baja densidad de mitocondrias, contienen poca fosfocreatina y expresan MHC1. Tienen bajo contenido de capilares y mioglobina por lo que son de coloración rojiza-blanca. Las fibras tipo IIb son de contracción más rápida que todas las anteriores, tiene alta capacidad glucolítica y expresan MHC4. Los tres fenotipos de fibras tipo II expresan SERCA1a, presentan un alto contenido de glucógeno y en general poco contenido de mitocondrias en comparación con las fibras tipo I^{6,25,27}.

Las propiedades contráctiles y metabólicas de las fibras musculares pueden cambiar durante el desarrollo del músculo, el envejecimiento, el ejercicio y por la acción de HT^{5,25}. El músculo soleus está compuesto principalmente por fibras de fenotipo lento, que generan movimientos lentos y contribuyen al mantenimiento de la postura, responden con baja frecuencia de manera prolongada y es de alta resistencia, su metabolismo es principalmente oxidativo y expresan la isoforma MHC7 y SERCA2a^{5,25}. Es altamente sensible a la acción de HT, que como se describirá más adelante, participan en la tasa de contracción-relajación muscular⁵. El músculo plantaris está compuesto principalmente por fibras de contracción rápida, se han

observado pocos efectos de las HT en la distribución de las isoformas de MHC que expresa este músculo, sin embargo, el alto grado de polimorfismo (co-expresan las isoformas MHCIIX y MHCIIB) que se encuentra en el músculo plantaris puede representar una característica que minimiza las consecuencias funcionales de grandes cambios en la composición de las isoformas de MHC²⁸.

1.1.2 Contracción del músculo esquelético

La contracción muscular es un proceso fisiológico en el que participan el sistema nervioso somático y el músculo, este proceso es conocido como acoplamiento excitación-contracción (Figura 3)^{29,30}.

El acoplamiento excitación-contracción inicia a partir de la liberación del neurotransmisor acetilcolina (ACh) de la terminal del axón en la placa motora. La ACh se une a sus receptores colinérgico-nicotínicos que son canales catiónicos activados por ligandos, estos se localizan en la zona local de la membrana (sarcolema) de la fibra muscular, cuando son activados se produce la apertura del dominio de poro del canal que permite la entrada de grandes cantidades de iones sodio hacia el interior de la membrana³¹. Esto conduce a la despolarización local que produce la activación de los canales de sodio activados por voltaje. Esto, inicia un potencial de acción en la membrana que viaja a lo largo del sarcolema hacia invaginaciones presentes en la membrana llamadas túbulos T. La activación de los receptores de dihidropiridina (DHPD) conectados estructuralmente a los receptores de rianodina (RyR) del retículo sarcoplásmico, inducen la liberación de grandes cantidades de iones de calcio del retículo sarcoplásmico^{31,32}.

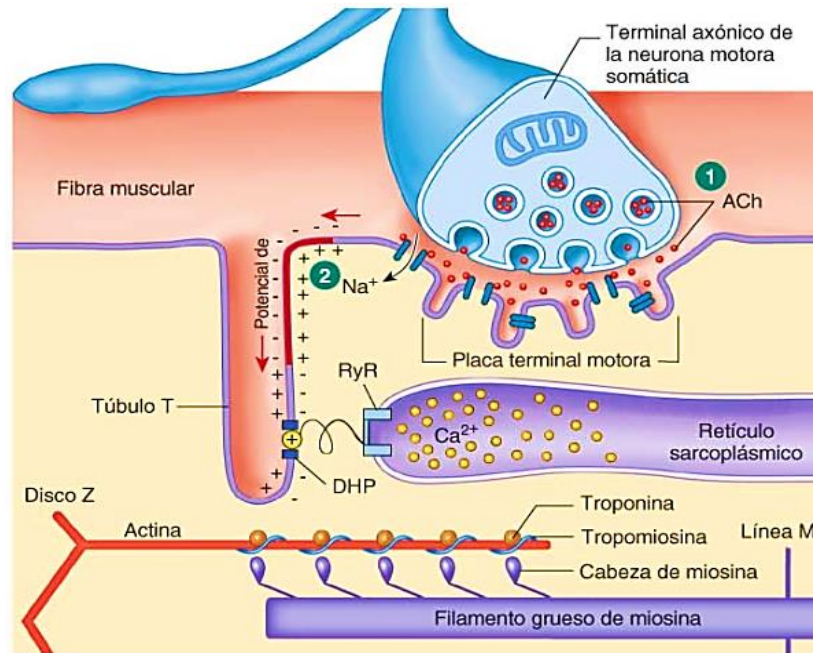


Figura 3. Mecanismo de acoplamiento excitación-contracción. 1) El neurotransmisor ACh se libera y difunde a través la hendidura sináptica y se une a sus receptores nicotínicos favoreciendo la producción del potencial de acción. 2) El potencial de acción se propaga a lo largo del sarcolema y por los túbulos T los que posteriormente favorecerá el incremento de Ca^{2+} en el sarcoplasma. Tomada de Silverthorn et al., 2019²⁹.

Una vez en el sarcoplasma, el Ca^{2+} se une a la troponina, esta desplaza a la tropomiosina de los sitios de unión actina-miosina³³. Una vez que los sitios de unión están “libres”, comienza el ciclo de contracción (Figura 4). De manera simultánea, el adenosín trifosfato (ATP) y la enzima ATPasa se unen a la cabeza de miosina en donde se produce la hidrólisis del ATP a ADP y fosfato. Esta reacción de hidrólisis reorienta y carga de energía la cabeza de miosina que se une a la actina formando puentes cruzados y favorece la liberación del grupo fosfato³². Esto conduce a la fase de deslizamiento y abertura del sitio del puente cruzado al que todavía está unido el ADP. La rotación del puente cruzado de miosina permite la liberación del ADP^{18,29}. La fuerza que se genera cuando el puente rota hacia el centro del sarcómero, desliza el filamento fino de actina sobre el filamento grueso de miosina hacia la línea M. Al final de esta fase, el puente cruzado permanece firmemente adherido a la actina hasta que se une a otra molécula de ATP. La unión del ATP a su sitio de unión en la cabeza de miosina hace que ésta se separe de la actina^{18,30}.

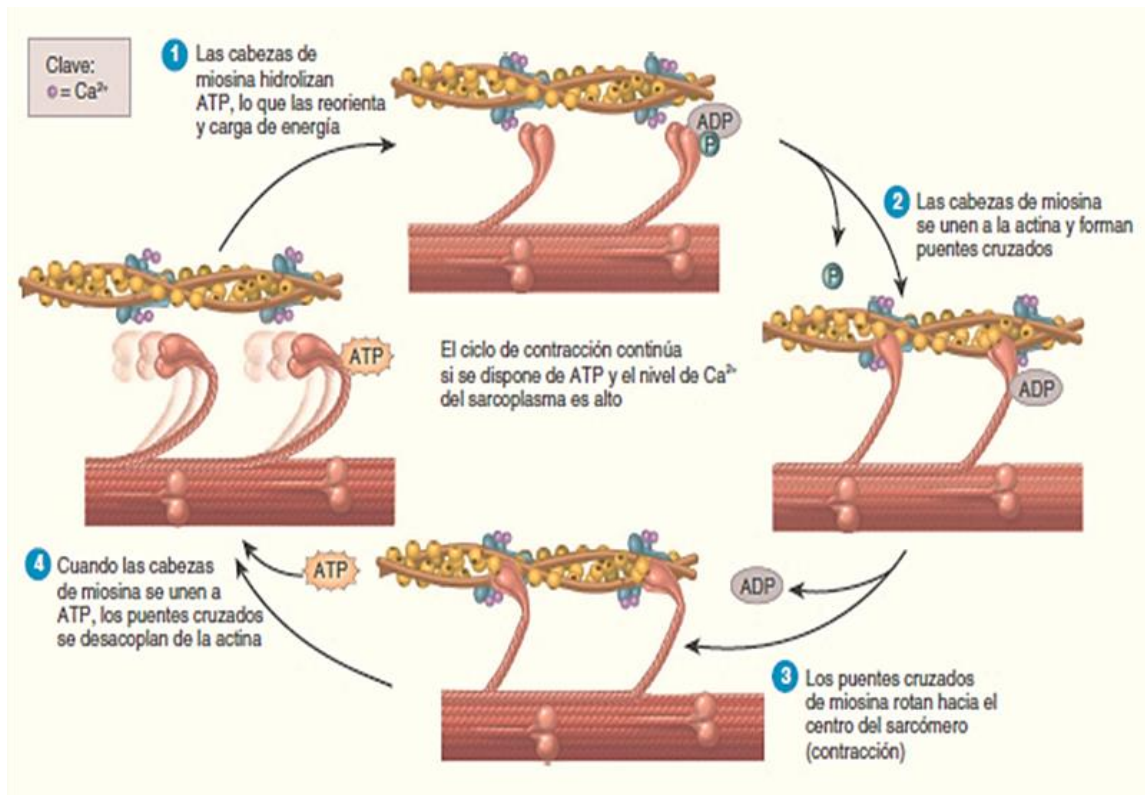


Figura 4. Ciclo de contracción y relajación. Los sarcómeros ejercen fuerza y se acortan a través de ciclos repetidos, durante los cuales las cabezas de miosina se unen a la actina (por puentes cruzados), rotan y se desacoplan. Tomada de Tortora et al., 2013¹⁸.

Después de una fracción de segundo, el Ca^{2+} es almacenado nuevamente en el retículo sarcoplásmico por la bomba SERCA en donde permanece hasta que llega un nuevo potencial de acción muscular³³.

Los efectos de las HT sobre la contracción-relajación muscular se relacionan con cambios en la expresión de proteínas contráctiles y proteínas involucradas en la regulación de la concentración de Ca^{2+} intracelular, el principal regulador de la contracción. Además, las HT potencian los efectos estimulantes de las hormonas adrenérgicas en el músculo esquelético y participan en el cambio de la capacidad de generación de ATP del músculo para que coincida con la mayor demanda de energía^{5,34}.

1.2 Metabolismo del músculo esquelético

Durante el proceso de contracción del músculo esquelético se requiere una gran cantidad de ATP. Este se obtiene en primer lugar de las reservas disponibles de las fibras musculares e impulsa la contracción durante 1 o 2 segundos^{18,31}. Después de este periodo, el músculo utiliza la fosfocreatina, la glucólisis anaeróbica y la fosforilación oxidativa para cumplir con la demanda energética durante la actividad contráctil prolongada^{18,30}.

1.2.1 Sistema ATP-Fosfocreatina

La contracción del músculo esquelético requiere de la hidrólisis del ATP a ADP y un grupo fosfato para generar energía. Para restaurar la concentración de ATP una de las reservas inmediatas en el músculo es la fosfocreatina (20 mM en una célula en reposo)^{30,35}, que es utilizada como sustrato durante las contracciones cortas de gran intensidad y es capaz de mantener la contracción muscular entre 5 y 8 segundos^{31,35,36}. En estas condiciones, la síntesis de ATP se lleva a cabo por acción de la enzima creatina cinasa quien transfiere un grupo fosfato de la fosfocreatina al ADP lo que resulta en la formación de ATP³⁶.

1.2.2 Metabolismo glucolítico

La vía glucolítica anaeróbica se emplea durante la contracción de fibras contráctiles de alta intensidad, su contribución es de 30 a 40 segundos aproximadamente¹⁸. En esta vía se utiliza el glucógeno almacenado en el músculo y posiblemente también glucosa de la circulación para formar glucosa-6-fosfato, sustrato que es utilizado para la generación de energía durante la glucólisis³⁷.

Durante la actividad intensa, especialmente en condiciones anaeróbicas, la tasa de glucólisis y producción de piruvato exceden la tasa de consumo de piruvato por el ciclo de Krebs. El exceso de piruvato se reduce a lactato por acción de la enzima lactato deshidrogenasa. Esta reacción produce la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), necesaria para la glucólisis, es decir para la formación de piruvato a partir de glucosa-6-fosfato donde también se genera ATP por fosforilación a nivel de sustrato³⁰. El lactato producido en el músculo es permeable a través del sarcolema, sin embargo, es inútil dentro del músculo por lo que es transportado a través de la sangre hasta el hígado donde se convierte nuevamente en piruvato y después

en glucosa, que se libera en la sangre para su uso por otros tejidos, como el cerebro^{18,30}. Al retornar la glucosa al músculo proveniente del hígado y de la gluconeogénesis a partir de lactato, forma un ciclo denominado ciclo de Cori. Este proceso transfiere parte de la carga metabólica del músculo al hígado, a su vez que permite que el metabolismo oxidativo esté disponible nuevamente³⁰.

1.2.3 Metabolismo oxidativo

En condiciones aeróbicas, como en el ejercicio de intensidad leve o moderada, por ejemplo, un maratón que se corre a un paso lento o durante periodos de reposo las fibras musculares utilizan el ATP generado durante la fosforilación oxidativa^{30,38}. Este proceso es energéticamente mucho más favorable que la producción de lactato. Aporta ATP para actividades prolongadas que duran desde minutos a horas^{18,31}. Solo puede ocurrir cuando hay oxígeno molecular disponible por lo cual se requiere de la mioglobina, proteína que posee un grupo hemo que contiene un átomo de hierro que facilita el transporte de oxígeno dentro de las células musculares³⁹.

En el metabolismo oxidativo se utiliza principalmente como sustrato los ácidos grasos, a partir de los cuales se genera acetyl-CoA mediante la β -oxidación³⁰. Cuando la acetyl-CoA ingresa al ciclo de Krebs, se oxida a dióxido de carbono y agua, generando NADH, guanosín trifosfato (GTP) y FADH₂^{30,38}. Los equivalentes reductores NADH y FADH₂ generados se oxidan posteriormente por la cadena de transporte de electrones, y se establece un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial, este gradiente se utiliza para catalizar la fosforilación de ADP a ATP por la ATP sintasa mitocondrial³⁰.

1.3 Regulación del eje hipotálamo-pituitaria-tiroideo

El eje Hipotálamo-Hipofisario-Tiroideo (HHT, Figura 5) se encarga principalmente de mantener los niveles normales de HT (T₄ y T₃). El eje HHT es regulado por la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), sintetizado a partir del precursor preproTRH, en las células parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo⁴⁰. Están involucradas en la regulación de diferentes funciones como, por ejemplo, la termorregulación, la conducta alimentaria y el balance energético^{41,42}.

Las neuronas hipofisiotrópicas del núcleo paraventricular proyectan sus axones hacia la eminencia media donde la TRH es liberada en la hipófisis anterior a través del sistema portahipofisiario⁴². La TRH regula la liberación y actividad biológica de la hormona estimuladora de la tiroides (TSH) al unirse con su receptor TRH-R1^{40,41}. A su vez la TSH estimula la síntesis de HT en la glándula tiroides, aumentando los niveles séricos T4 y en menor proporción T3⁴⁰.

Las HT actúan en varios tejidos blancos, entre ellos el músculo esquelético⁴⁻⁶. La actividad del eje HHT está regulada por estímulos neuronales que actúan sobre las células parvocelulares y por los efectos de retroalimentación negativa de las HT en la síntesis de las TRH y TSH en el hipotálamo y en la hipófisis anterior, respectivamente⁴⁰.

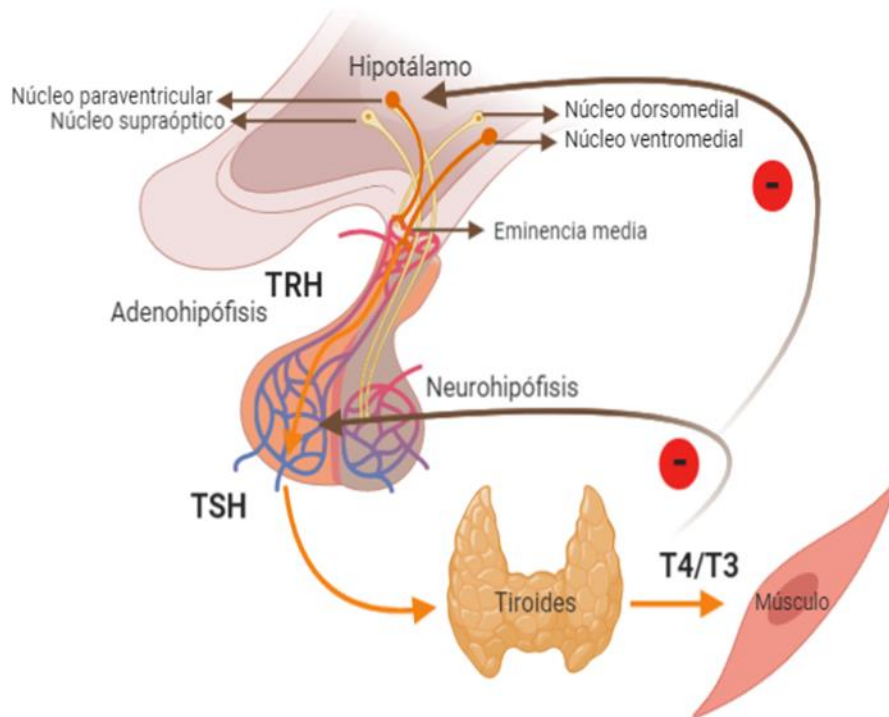


Figura 5. Regulación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroideo (HHT) y músculo esquelético. Adaptado de Joseph-Bravo et al., 2015⁴³.

1.4 Señalización de las hormonas tiroideas en el músculo esquelético

Las HT participan en la regulación de la expresión de genes relacionados con el mantenimiento de las propiedades contráctiles y metabólicas del músculo esquelético^{5,12}.

Estos efectos se producen a partir de la unión de las HT a sus respectivos receptores nucleares (TR, *por sus siglas en inglés* thyroid receptor)³. No obstante, la disponibilidad intracelular de las HT depende de la presencia y funcionamiento adecuado de transportadores y enzimas desyodasas, por lo tanto, estos elementos son importantes en la señalización celular de las HT^{3,44,45}.

El flujo celular de las HT en el músculo esquelético es facilitado por transportadores transmembranales como por ejemplo el transportador de monocarboxilatos 8 (MCT8) codificado por el gen *Slc16a2*, reconocido como un transportador específico de HT⁴⁶. Otros transportadores que también son expresados en el músculo son el transportador de monocarboxilatos 10 (MCT10) codificada por el gen *Slc16a10* y la proteína transportadora de aniones orgánicos 1C1 (OATP1C1) codificada por el gen *Slco1c1*⁴⁷⁻⁴⁹. La importancia de estos transportadores en la señalización de las HT se ha descrito en procesos como la miogénesis en músculo esquelético, durante la activación y diferenciación de células satelitales que requieren de la expresión de MCT8 y OATP1C1⁴⁸.

La regulación de la concentración intracelular de las HT depende en parte de la actividad de las enzimas desyodasas^{44,47}. En el músculo se expresan dos tipos de desyodasas, la desyodasa tipo 3 (Dio3) y tipo 2 (Dio2), esta última se localiza en el retículo endoplásmico y se encarga de la desyodación del anillo externo de T4 dando como resultado la formación de T3 (HT con mayor afinidad por los receptores nucleares de HT). Así mismo cataliza la conversión de T3 reversa (rT3) en diyodotironina (T2), mientras que la Dio3 está presente en la membrana plasmática y cataliza la desyodación del anillo interno de T4 y T3, de tal manera que Dio3 convierte a T3 en T2 y a la T4 en rT3^{45,47}.

La interacción de las HT con los TR regula su acción genómica en células blanco. Los complejos HT-TR actúan como factores de transcripción al unirse al ADN a través de la inducción o inhibición de la transcripción génica³. Los TR están codificados por los genes *Thra* y *Thrb*. El gen *Thra* genera las isoformas TR α 1, TR α 2, mientras que *Thrb* genera las isoformas TR β 1 y TR β 2. Todas las isoformas, a excepción de TR α 2, actúan como factores de transcripciones inducibles por T3, mientras que TR α 2 actúa como silenciador⁵⁰. En el músculo esquelético se expresan las isoformas, TR α 1 y TR β 1, siendo esta última la de mayor abundancia en el músculo soleus. Sin embargo, la actividad de las HT se encuentra mediada

principalmente por la isoforma TR α 1^{3,51,52}. En condiciones basales la expresión de TR α 1, TR β 1 y TR α 2 es más abundante en el músculo soleus que en el músculo plantaris, sugiriendo que el metabolismo del músculo plantaris responde débilmente a la estimulación por las HT a diferencia del músculo soleus⁴.

Los TR se unen a elementos de respuesta a hormonas tiroideas T3, generalmente formando heterodímeros con otros receptores nucleares como el receptor retinoide X expresado de forma ubicua y con el receptor activado por proliferadores peroxisomales (PPAR; *por sus siglas en inglés* peroxisome proliferator-activated). La formación posterior de un complejo proteico que incluye el co-represor NCoR2 y las enzimas modificadoras de histonas conduce a la represión activa de la transcripción^{3,53}.

En estudios realizados en roedores se encontró que en las enfermedades que se producen por alteración en los niveles de HT como el hipotiroidismo e hipertiroidismo, provocan un desbalance en la expresión de genes involucrados en las funciones de contracción y metabólicas del músculo esquelético⁴. Por ejemplo, en el músculo soleus de ratas con hipertiroidismo se observó un aumento en la expresión de la proteína desacopladora mitocondrial 3 (UCP3), de la proteína citocromo C, del receptor coactivador γ activado por el proliferador de peroxisomas-1 α (PGC-1 α , *por sus siglas en inglés* Peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator-1 α) y de fibras de contracción rápida MHCIIa y MHCIIx, mientras que la expresión de MHCI disminuyó^{4,54}.

A su vez la Dio2 parece desempeñar un papel importante en el fenotipo de fibras musculares, ya que en ratones KO de Dio2 global se observó un aumento en la tasa de contracción-relajación y en la expresión de MHCIIb, mientras que la expresión de MHCIIa disminuyó, es decir el músculo soleus considerado de metabolismo oxidativo, mostró características del metabolismo glucolítico de contracción rápida⁵⁵. También se observó que la inhibición de Dio2 conduce a cambios en la función contráctil del músculo soleus y se sugiere que los niveles reducidos de PGC-1 α pueden contribuir a cambios fenotípicos de las fibras musculares⁵⁵. Por otro lado, la expresión de Thr α 1, Thr β 1 y Thr α 2 disminuyó en el músculo soleus de ratas con hipotiroidismo⁵⁶.

1.5 Funciones de las hormonas tiroideas en el músculo esquelético

Las HT ejercen sus efectos en el músculo esquelético por medio de la vía genómica (mediada por receptores nucleares), es decir las HT regulan un conjunto de genes responsables del fenotipo de las fibras musculares^{3,5}. Entre los genes que regulan las HT y que son de especial importancia en el músculo se encuentra MHC, SERCA, GLUT4, PGC-1 α , UCP3, la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial (mGPDH, *por sus siglas en inglés* Glycerol 3-phosphate dehydrogenase) y la enzima málica citosólica 1 (ME1, *por sus siglas en inglés* malic enzyme)^{5,6,12}.

1.5.1 Miogénesis y reparación del músculo esquelético dependiente de T3

Las HT regulan múltiples eventos dentro del proceso miogénico y reparación del músculo a través de la estimulación de T3 y de genes específicos del músculo, como el factor de transcripción de la proteína 1 de diferenciación miogénica (MyoD1, *por sus siglas en inglés* myoblast determination protein 1)⁵⁷. La proteína MyoD1 regula el proceso de activación de células madre musculares inactivas o también conocidas como células satélites, que se encargan de la diferenciación y reparación muscular, cuando se activan⁵⁸. Las células satélites pueden proliferar y suministrar nuevas fibras musculares, así como reconstituir el conjunto de células satélite para rondas posteriores de regeneración⁵⁹.

En este contexto se ha observado que en la regeneración *in vivo* del músculo esquelético después de una lesión TR α juega un papel esencial en la proliferación y diferenciación de mioblastos⁷. Mientras que en ratones naïve se encontró que el aumento de T3 mediado por Dio2 fue esencial para la transcripción mejorada de MYoD, es decir que Dio2 podría ser clave en la miogénesis normal del ratón y la regeneración muscular y que a su vez Forkhead box O (FoxO3) podría ser una molécula clave que coordina la señalización de T3⁶. Dio3 se expresa en las células satélites durante la fase temprana de la miogénesis y es esencial en la diferenciación de las células musculares⁴⁷.

1.5.2 Plasticidad del músculo

El fenotipo de las fibras musculares es una propiedad dinámica y la base de la plasticidad muscular⁵. Las propiedades estructurales y funcionales de las fibras se refieren al fenotipo de

la fibra que pueden cambiar en respuesta a la actividad hormonal y neuronal, propiedad que se conoce como plasticidad muscular²⁵. La posibilidad de cambios de un tipo de fibra a otro parece estar limitado por las propiedades intrínsecas de cada fibra. Con respecto a esto las HT contribuyen en la plasticidad del fenotipo muscular^{34,60}. La señalización de las HT promueve la expresión de genes como MHC2, MHCI, MHC4 que estimulan las propiedades contráctiles rápidas del músculo⁶¹. Como consecuencia, las fibras musculares que están inervadas por terminales nerviosas motoras lentas pueden desarrollar un fenotipo de contracción rápida por acción de las HT como se ha observado en el hipertiroidismo³⁴.

1.5.3 Biogénesis mitocondrial

Las adaptaciones de las mitocondrias en respuesta al estímulo contráctil se conocen como biogénesis mitocondrial, término que se refiere al crecimiento y división de mitocondrias preexistentes, este proceso se acompaña de variaciones en el tamaño, número y masa mitocondrial⁶². La biogénesis mitocondrial se activa bajo estrés ambiental como el ejercicio, la exposición al frío, la restricción calórica, el estrés oxidativo, la división y diferenciación celular⁶³. Uno de los principales reguladores de la biogénesis mitocondrial es PGC-1 α , quien a su vez es estimulado por T3⁶⁴. PGC-1 α participa en la regulación transcripcional de genes que inducen la expresión del factor de transcripción mitocondrial A, el cual es una proteína de unión a ADN que activa la transcripción de promotores del ADN mitocondrial⁶². Regulando de esta forma proteínas mitocondriales involucradas en la regulación de vías relacionadas con el metabolismo oxidativo mitocondrial, así como el mantenimiento de la homeostasis de lípidos, glucosa y energía⁶⁵.

1.5.4 Regulación del gasto energético por T3 en los músculos

Las HT afectan el metabolismo del músculo esquelético a través de cambios en la expresión de proteínas contráctiles, tales como las proteínas involucradas en el aumento de la tasa de contracción y relajación muscular. Entre los factores regulados transcripcionalmente por HT están las proteínas determinantes de la contractilidad como MHCI, MHC2, MHC4 y MHC7^{25,61}. Así como, las proteínas involucradas en el mantenimiento de los gradientes de Na⁺ - K⁺ y Ca²⁺ por ejemplo la Na⁺, K⁺-ATPasa y SERCA, respectivamente. La regulación de estas proteínas promueve un cambio de fenotipo, de las fibras tipo 1 de contracción lenta,

a fibras tipo IIa de contracción rápida, cambio asociado con el aumento de la expresión de MHC y SERCA que conduce a una mayor renovación de energía y generación concomitante de calor durante la actividad muscular⁶⁶.

La señalización de las HT puede modular la tasa metabólica. El aumento en la concentración de T3 en ratas y humanos tratados con Levotiroxina aumenta la expresión de UCP3. Este aumento se ha correlacionado con un aumento de la tasa metabólica en reposo y el desacoplamiento mitocondrial en los músculos⁶⁷. La UCP3 es miembro de la familia de los transportadores mitocondriales, expresada en el músculo y localizada en la membrana interna de la mitocondria⁶⁸. La UCP3 aumenta la fuga de protones y estimula la oxidación para mantener la síntesis de ATP, con base en lo anterior se ha propuesto que la UCP3 genera energía que se disipa como calor en los músculos mediante este mecanismo, contribuyendo a la regulación de la termogénesis⁶⁹. No obstante, la contribución precisa de UCP3 en el gasto energético aún no se ha establecido⁶⁷.

Otra forma de regulación del metabolismo muscular por acción de las HT es a través de la regulación de la expresión de mGPDH. Esta enzima actúa como una lanzadera que contribuye a la generación de ATP mediante la transferencia de equivalentes reductores generados en el citoplasma a la membrana mitocondrial⁷⁰. Por otro lado, el tratamiento con T3 aumentó el consumo máximo de oxígeno de manera distinta de acuerdo con el tipo de músculo, en el soleus por ejemplo es dos veces mayor el consumo de oxígeno en comparación al músculo plantaris de contracción rápida⁴.

1.5.5 Homeostasis de la glucosa dependiente de T3

El músculo esquelético es un importante consumidor de glucosa en respuesta a la insulina. La insulina regula los niveles de glucosa al estimular su transporte, la fosforilación / glucólisis, la síntesis de glucógeno y la oxidación de glucosa⁷¹. El principal transportador de glucosa en el músculo esquelético es GLUT4 que a su vez es regulado transcripcionalmente por T3⁷². La translocación de GLUT4 a la membrana celular es un evento dependiente de insulina y de la contracción muscular. Además, se ha observado que la capacidad de respuesta muscular normal a la insulina requiere la conversión local de T4 a T3 mediada por Dio2⁷¹.

2. ANTECEDENTES

2.1 Señalización de HT en el músculo esquelético durante el ejercicio

Tanto el ejercicio de resistencia como el ejercicio aeróbico aumentan la demanda de contracción y el metabolismo en el músculo esquelético, lo que resulta en un cambio de tipo de fibra de contracción lenta a rápida. El entrenamiento de resistencia también afecta el metabolismo muscular al aumentar la masa muscular y mejorar la capacidad oxidativa y glucolítica de las fibras de contracción rápida⁷³.

En nuestro laboratorio se han estudiado los efectos del ejercicio voluntario sobre la actividad del eje HHT en ratas macho adultas. Se observó que el ejercicio voluntario por un periodo de 14 días induce cambios en varios aspectos que regulan el balance energético. Por ejemplo, se observó una disminución en el peso del tejido adiposo blanco y de la concentración sérica de leptina de las ratas ejercitadas en comparación con ratas sedentarias alimentadas con la misma cantidad de kilocalorías que las ratas ejercitadas. Adicionalmente, la distancia que corren las ratas correlaciona positivamente con la expresión de *Trha* en el PVN⁷⁴.

A diferentes intensidades de ejercicio se han observado cambios en la función del músculo esquelético, especialmente en la constitución y metabolismo de fibras musculares, reguladas por la señalización de HT por medio de su unión a receptores nucleares que a su vez requiere del correcto transporte y disponibilidad intracelular de T3, de lo cual se encarga los transportadores de membrana específicos para HT y las enzimas desyodasas, respectivamente^{47,75}.

En modelos de ejercicio agudo de alta intensidad en banda para correr se ha descrito un aumento en la actividad y expresión del ARNm de Dio2 en el músculo esquelético, tanto en el músculo soleus como gastrocnemios a través de un mecanismo dependiente del receptor β -adrenérgico^{65,76,77}. La enzima desyodasa 2 regula la concentración intracelular de T3, quien a su vez regula directamente a PGC-1 α , aumentando su expresión durante el ejercicio de alta intensidad⁷⁶.

El ejercicio aeróbico a una velocidad de 15 m/min, velocidad por abajo del umbral de lactato, en el músculo soleus aumenta los niveles del ARNm y de la proteína del receptor de

hormonas tiroideas TR β 1, mientras que el ejercicio anaeróbico (por arriba del umbral de lactato) disminuyó la proteína TR β 1, lo que sugiere que TR β 1 responde de manera distinta ante diferentes intensidades de ejercicio⁷⁸. También se ha visto que el ejercicio aeróbico durante 14 días aumenta la expresión de ARNm de las enzimas citrato sintasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y MyoD1 en el músculo soleus⁷⁵.

De acuerdo con lo anteriormente descrito, los efectos de las HT dependen de su unión a receptores nucleares para regular transcripcionalmente la expresión de proteínas que participan en la contracción y metabolismo del músculo^{3,5}. Por lo tanto, los cambios en la señalización de las HT durante el ejercicio físico podrían estar relacionados con las adaptaciones de contracción y metabólicas del músculo esquelético durante el ejercicio, estos cambios o adaptaciones durante diferentes entrenamientos se han descrito en proteínas blanco de HT como, por ejemplo, estudios en los que el ejercicio de alta intensidad induce la expresión de UCP3 en el músculo esquelético en las fibras glucolíticas más que en las oxidativas⁷⁹.

De forma similar en el músculo gastrocnemio de ratas que realizaron ejercicio voluntario por 14 días, se observó un aumento de la expresión de UCP3 en un 61% con respecto al grupo control sedentario, mientras que en el músculo soleus se observó una disminución de la expresión de la proteína UCP3 del 32% con respecto al grupo control⁸⁰. En contraste, el ejercicio de resistencia provocó un aumento de la expresión de UCP3 mostrando un efecto en el gasto energético corporal y un aumento de las fibras oxidativas⁸¹. Lo anterior sugiere que las variaciones en la expresión de UCP3 dependen del tipo de ejercicio al que se expone un organismo y muy posiblemente al tipo de músculo que se estudie⁷⁹.

De forma similar existen reportes que han demostrado que la expresión de GLUT4 está regulada por el ejercicio físico y el tratamiento con HT⁷¹. El ejercicio voluntario en ratones obesos también disminuye la concentración de glucosa al aumentar su absorción mediada por GLUT4. No obstante, el ejercicio no aumentó la expresión del ARNm de GLUT4, pero sí de la expresión de la proteína, indicando que el ejercicio induce un posible mecanismo de regulación positivo postranscripcional de GLUT4⁸².

2.2 Efectos no genómicos de las hormonas tiroideas en la contracción del músculo esquelético

Además de su acción directa sobre la transcripción (efectos genómicos), las HT tienen efectos no genómicos, mediados por un receptor expresado en la membrana celular, sitios de unión mitocondriales o en el citoplasma que no involucran principalmente proteínas TR, incluso se sabe que algunos mecanismos son desencadenados por catabolitos endógenos de las HT^{83,84}. Se ha considerado que los efectos no genómicos de las HT se relacionan principalmente con la homeostasis, efectos sobre los transportadores de iones de la membrana plasmática o el mantenimiento del citoesqueleto⁸⁵.

En varios trabajos de investigación se han reportado mecanismos bioquímicos en los que participan moléculas importantes en el transporte de iones que a su vez mantienen la actividad contráctil de músculo y que además son reguladas por HT a través de mecanismos no genómicos, como se mencionan a continuación⁸⁶⁻⁸⁹.

La administración de concentraciones fisiológicas (0.1 nM) de 3, 5, 3'-triyodotironina y L-levotiroxina en preparaciones de músculo esquelético *in vitro* aumentaron significativamente la actividad de SERCA, a través de un mecanismo no genómico⁸⁶. En el hipertiroidismo se han observado aumentos de la tasa de relajación del músculo que se relacionan con la presencia de sitios de unión para T4 y T3 en proteínas del retículo sarcoplásmico⁹⁰. Esto quiere decir que T3 y T4 participan en la reabsorción de Ca^{2+} a través de la regulación de SERCA y de esta forma promueven la relajación del músculo. Así mismo tanto T3 como caféina/riandina, aunque fueron bastante diferentes en términos de la forma del curso temporal, fueron capaces de movilizar el calcio intracelular⁸⁷. Aunado a esto en estudios *in vitro*, se ha demostrado que en miocitos el Ca^{2+} ejerce una acción como primer mensajero del efecto rápido de la hormona tiroidea a nivel de la membrana plasmática⁹¹. Algunos resultados indican que la exposición aguda a concentraciones elevadas de HT conduce a una regulación a la baja de canales de Ca^{2+} regulados por voltaje y un aumento en la captación del Ca^{2+} al retículo sarcoplásmico⁹². Sin embargo, en células de miocito auriculares la exposición aguda de T3 no afectó la corriente de Ca^{2+} en los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L⁹³.

En células de músculo esquelético tratadas con T4 en cultivo, se encontró que los potenciales de reposo transmembrana se encontraban significativamente más altos que en las células no tratadas, como resultado de un nivel elevado de actividad de la bomba Na^+ / K^+ electrogénica en la membrana de las células de músculo⁸⁸. El contenido reducido de la bomba de Na^+ / K^+ conduce a la pérdida de contractilidad y resistencia, posiblemente contribuyendo a la fatiga asociada con alteraciones de HT. El aumento de la entrada de Na^+ inducida reduce la resistencia contráctil. La excitabilidad y la contractilidad del músculo dependen de la relación entre las fugas pasivas de Na^+ / K^+ y la actividad de la bomba⁹⁴.

Otro transportador regulado por HT fue descrito en un estudio en células de cultivo de músculo esquelético de rata en el que se observó que los niveles fisiológicos de HT tienen un efecto estimulante en el intercambiador Na^+ / H^+ , un transportador de membrana que desempeña un papel importante en la modulación del volumen intracelular y el pH. En mioblastos L-6 los efectos no genómicos de T3 en Na^+ / H^+ fueron dependientes de Ca^{2+} ⁸⁷.

En miocitos auriculares se encontró que la exposición aguda durante 5 min de T3 (10 nM) aumentó el transporte de iones Na^+ , la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico inducida y no inducida por cafeína (10 mM). En cambio, T4 no tuvo efectos en el flujo de Na^+ , lo que indica que T3 tiene efectos inotrópicos positivos y aumenta la fuerza de contracción en el músculo cardíaco⁹³. Anteriormente se había demostrado que en miocitos de ratas recién nacidas durante la exposición aguda por 5 min de T3 (5 nM) altera en cuestión de minutos las corrientes de Na^+ , aparentemente por interacción directa con los canales de Na^+ ⁹⁵.

Los mecanismos por los cuales las HT participan en la regulación de transportadores iónicos en células musculares no está claro, no obstante, se ha propuesto que el receptor de superficie celular para HT, la integrina $\alpha\text{v}\beta3$ actúa de forma no genómica y modula a nivel local un conjunto de acciones de las HT sobre la corriente de Na^+ y transportadores membranales como por ejemplo el intercambiador de Na^+ / H^+ ^{87,96}.

3. JUSTIFICACIÓN

El estado de salud, nutricional y el envejecimiento pueden cambiar los puntos de ajuste del eje HHT, lo que conduce a cambios en la síntesis de HT por la glándula tiroides y por consiguiente cambios en los niveles periféricos de HT⁹⁷. Así mismo, enfermedades derivadas de alteraciones en los niveles de HT comunes, como el hipotiroidismo y el hipertiroidismo provocan alteraciones en la fisiología del músculo esquelético⁵. Tanto el hipotiroidismo como el hipertiroidismo reducen significativamente la tolerancia al ejercicio, cambiando el umbral de lactato a menores cargas de trabajo^{9,10}. En cambio, el entrenamiento de resistencia o la administración de T3 mejora notablemente el rendimiento de ejercicio y aumentó el umbral de lactato en animales hipotiroideos⁹. Estos hallazgos en conjunto sugieren que las respuestas de adaptación del músculo esquelético al ejercicio están ampliamente reguladas por las HT.

En este contexto es claro que el estado de las HT y el ejercicio causan cambios celulares y metabólicos importantes en la fisiología del músculo esquelético. Sin embargo, hasta donde hemos podido comprobar existen pocos estudios que vinculen la señalización de HT en las adaptaciones metabólicas y estructurales del músculo esquelético durante el ejercicio físico⁷⁸. Por lo tanto, identificar y describir los efectos del ejercicio aeróbico crónico en la expresión de los elementos de la vía de señalización de las HT como transportadores, desyodasas y receptores nucleares en el músculo esquelético contribuirá a la comprensión de su mecanismo de acción, que como indican investigaciones previas, tienen un notable papel en complicaciones clínicas asociadas a una baja tolerancia al ejercicio.

4. HIPÓTESIS

Las hormonas tiroideas participan en la regulación de las adaptaciones metabólicas y contráctiles en el músculo esquelético que son inducidas por el ejercicio aeróbico crónico, por lo tanto, aumentará la expresión de transportadores transmembranales, enzimas desyodasas y receptores nucleares que participan en la señalización celular de hormonas tiroideas.

Las hormonas tiroideas aplicadas de forma aguda provocarán cambios en la contracción-relajación del músculo esquelético.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Analizar los efectos del ejercicio aeróbico crónico en la expresión de elementos de la señalización de hormonas tiroideas (transportadores, desyodasas y receptores) en el músculo esquelético y el efecto agudo de estas hormonas sobre la contracción muscular.

5.2 Objetivos particulares:

- Evaluar los cambios en la señalización de las hormonas tiroideas inducidos por el ejercicio aeróbico crónico, a través de mediciones de la expresión del ARNm del transportador Slc16a2 (MCT8), de desyodasas tipo 2 y tipo 3 y de receptores $Thra1$ y $Thr\beta1$ en los músculos soleus y plantaris de ratas macho adultas.
- Determinar si existen diferencias en la expresión de los elementos de la señalización de las hormonas tiroideas dependiendo del perfil metabólico y capacidad de contracción del músculo esquelético inducidos por el ejercicio.
- Evaluar los efectos agudos de las hormonas tiroideas en la contracción muscular en una preparación neuromuscular y en el músculo aislado de ratones adultos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Animales

Para cumplir con los primeros objetivos del proyecto se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) machos de la cepa Wistar Han (n=20) de 70 días de edad, provenientes del bioterio del Instituto de Biotecnología, UNAM. Los animales se mantuvieron alojados en pares (2/jaula) en condiciones controladas de temperatura (22 ± 1 °C) y ciclos invertidos de luz-oscuridad de 12 h (luz encendida: 19:00 -7:00 h) a partir del destete (21 días de edad) para permitir que los animales se aclimaten⁹⁸. El consumo de agua y alimento se mantuvo *ad libitum*. De manera previa al protocolo de ejercicio, las ratas se dividieron aleatoriamente en dos grupos, un grupo control sedentario (n=10) y un grupo de ejercicio (n=10) considerando que ambos grupos debían iniciar el experimento con un peso corporal promedio similar.

Para evaluar los efectos de las hormonas tiroideas en la contracción del músculo esquelético se utilizó preparación neuromuscular y una de músculo gastrocnemio aislado. Para esto, se utilizaron ratones CD1 macho (n=33) de 180 días de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina, UAEM. Los animales se mantuvieron en cajas pequeñas (5/jaula) en condiciones controladas de temperatura (22 ± 1 °C) y ciclos de luz-oscuridad de 12 h (luz encendida: 7:00 -19:00 h). El consumo de agua y alimento fue *ad libitum*.

El uso de animales para este proyecto de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Biotecnología (id-390).

6.2 Protocolo de habituación al ejercicio en la banda para correr.

A los 70 días de edad las ratas tanto del grupo sedentario como ejercitado fueron habituados a un entrenamiento aeróbico en una máquina de correr de superficie plana (Exer 3/6 treadmill; Columbus instruments, USA) antes de iniciar el protocolo de ejercicio, con la finalidad de permitir la aclimatación paulatina de los animales a su entorno en la banda para correr y así reducir su estrés⁹⁸. La habituación consistió en colocar a las ratas en una máquina de correr durante cinco días una sola sección al día, el primer día se colocaron en la banda sin movimiento durante 10 min y para los días posteriores durante 20 min. La velocidad utilizada en el segundo día fue de 2 m/min y en los días siguientes se aumentó de manera

gradual (3 m/min por día). El orden en el que las ratas fueron expuestas al entrenamiento fue aleatorio para cada día de la habituación.

Para las ratas que fueron sometidas a ejercicio se empleó la puntuación de rendimiento de tres criterios en una banda para correr desarrollado por Ríos y colaboradores⁹⁹. Este sistema permite evaluar la eficiencia de carrera de las ratas durante el entrenamiento y se basa en asignar determinados códigos que varían en puntaje dependiendo del estilo de carrera de la rata. El código del estilo de carrera de los animales se basa en tres dominios, cada uno con su propio valor de puntaje. Estos 3 criterios son: 1) la "actitud" de carrera (A) que se refiere al posicionamiento físico y las acciones de la rata mientras corre (o trata de evitar correr); 2) "resistencia" (E) que se refiere a la posición de la cola de la rata como un indicador de cansancio basado en el esfuerzo de sostenerla y 3) el "rendimiento" bruto (Y) proporcionado por el recuento de toques que se daban con la goma de un lápiz a las ratas, para evitar estrés en los animales al usar descargas eléctricas^{98,100}. Para la evaluación de estos criterios se utilizó un esquema en el que se resume los tres criterios (Figura 6).

Las evaluaciones se realizaron del día 3-5 de la habituación, tres veces en intervalos de 5 minutos cada uno, durante los 20 minutos de sesión de entrenamiento al día (comenzando después de los primeros 5 minutos, considerados como calentamiento). Los puntajes finales se calcularon como se indica en la Figura 7. Con los puntajes finales de cada criterio se consideró incluir en el experimento de ejercicio aeróbico en banda para correr, aquellas ratas que mostraron las mejores puntuaciones con respecto al grupo y la capacidad de correr a una velocidad de 15 m/min inferior al nivel de lactato.

Puntaje de desempeño AEY; Organización esquemática					
		<p>① Una rata, avanza hacia adelante contra el movimiento de ② la cinta de correr, con ③ una rejilla en la parte posterior; en ④ un carril cerrado de la cinta de correr con ⑤ una tapa superior con bisagra, y ⑥ una abertura frontal y ⑦ trasera para permitir el flujo de aire libre.</p>			
Criterios de puntuación-A					
Marca	Diagrama	Descripción	Puntaje		
A		La rata corre continuamente sin tocar la rejilla.	0.00		
B		La rata corre, pero se apoya en la pared frontal con sus extremidades anteriores mientras solo mueve las extremidades posteriores.	-0.70		
C		La rata corre, pero toca continuamente la rejilla.	-0.30		
⊖D		La rata se aleja de la rejilla hacia la parte delantera de la cinta de correr y se detiene hasta que se ha movido hacia atrás con la cinta de correr. Movimiento: (-) D corriendo, D galopando, (+) D con un gran salto.	⊖D -0.15		
D		D -0.25			
⊕D		⊕D -0.30			
E		La rata se aferra a la abertura de aire frontal y por lo tanto evita correr.	-0.50		
F		La rata logra deslizarse en un freno contra el movimiento de la cinta de correr y evita correr.	-0.50		
G		La rata es capaz de posicionarse (generalmente sobre su espalda) deslizándose aún sobre la cinta de correr y evita correr.	-0.50		
⊖H		La rata camina hacia atrás cerca (o muy cerca) de la rejilla: (-) H, solo en las extremidades posteriores; (+) H, en las cuatro patas.	-0.80 (ambos)		
⊕H					
I		La rata se para en la rejilla, pero no se reposiciona en la cinta de correr.	-0.90		
J		La rata corre hacia adelante, pero está muy distraída al mismo tiempo.	-0.05		
K		La rata descansa todo el cuerpo sobre la cinta de correr mientras corre o camina hacia adelante.	-0.40		
L	<i>sin imagen</i>	La rata usa la parte periférica del piso que no se mueve (no cubierta por la cinta de correr) para evitar correr. Esencialmente, un lado del cuerpo se mueve.	-0.50		
M		La rata corre solo usando las extremidades posteriores para moverse y patinar con las extremidades anteriores.	-0.65		
N		La rata corre con solo usar las extremidades anteriores para moverse y arrastrar las extremidades posteriores.	-0.65		
Criterios de puntuación-E			Criterios de puntuación-Y		
Marca	Diagrama/Descripción	Puntaje	Marca	Diagrama/Descripción	Puntaje
(+)	<p>Cambios graduales en la posición de la cola desde de muy levantada (+) a nada levantada (-).</p>	1.00		El recuento de toques con la goma de un lápiz aumenta debido a que la rata:	
(+/-)		0.75	Ⓐ	Toca la rejilla por más de 3 segundos	-0.15
(-/+)		0.50	Ⓑ	Se acerca a la rejilla más de 3 veces	(each)
(-)		0.25	Ⓒ	Permanece en la rejilla aun después de los toques con la goma del lápiz.	-1.00

Figura 6. Configuración esquemática de la puntuación de rendimiento de tres criterios AEY. Tomada de Ríos et al., 2019⁹⁹

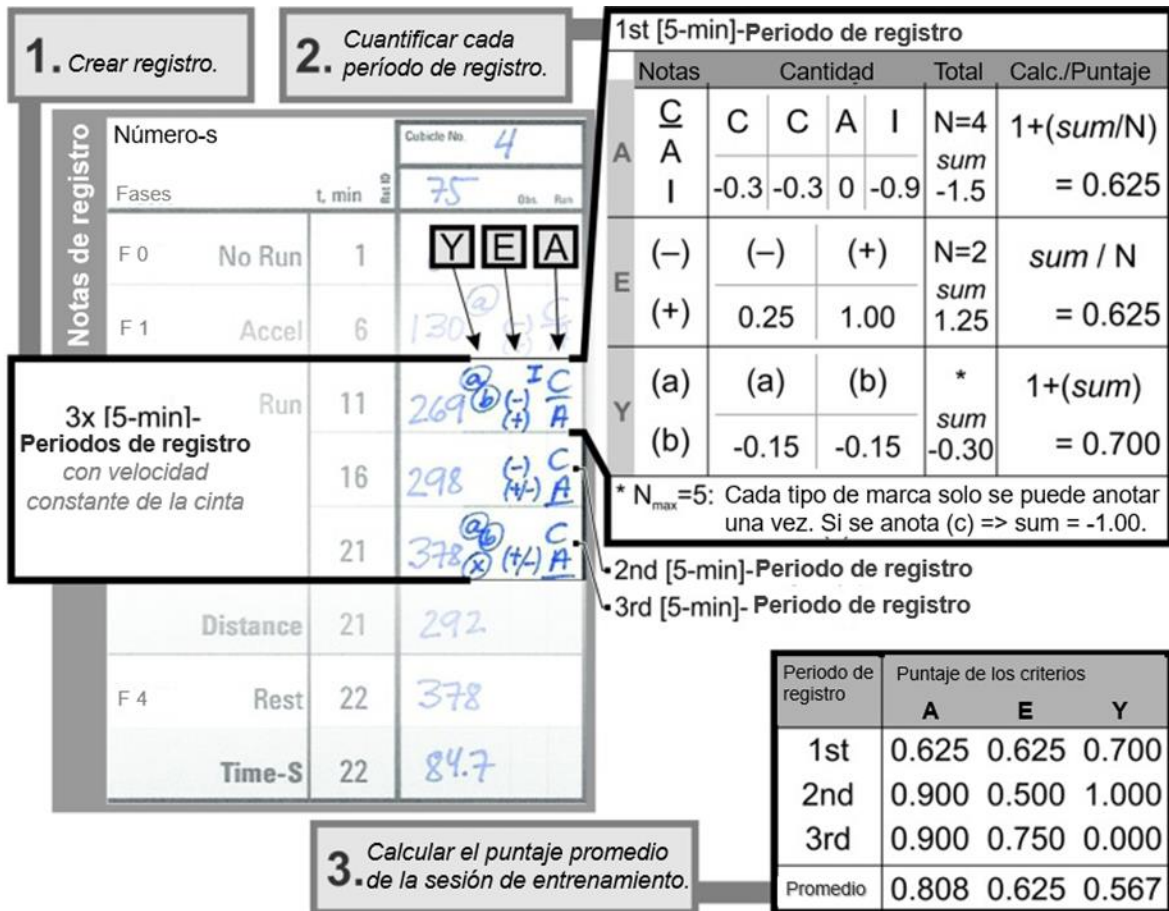


Figura 7. Procedimiento para el cálculo del valor promedio de cada puntaje de los tres criterios AEY basado en notas de cada período de registro. Tomada de Ríos et al., 2019⁹⁹.

6.3 Protocolo de ejercicio aeróbico en la banda para correr

El protocolo de ejercicio en la banda para correr consistió en colocar a las ratas del grupo sedentario en la banda sin movimiento (0 m/min) durante 20 min, mientras que el grupo de ejercicio fue colocado en la banda de la corredora a una velocidad inicial de 2 m/min, la velocidad se aumentó de manera gradual durante 5 min, que fue el tiempo en el que la banda alcanzó la velocidad de 15 m/min, velocidad con la que no se supera el umbral de lactato, por lo que el ejercicio se considera aeróbico⁷⁸. Cada sección se realizó durante 20 minutos y el orden de entrenamiento de las ratas fue aleatorizado en cada sesión, en total cada rata realizó 14 sesiones de ejercicio divididas en tres semanas (5 días de entrenamiento y dos días de descanso por semana).

En cualquier régimen de ejercicio es importante que los animales muestren adherencia al protocolo y para comprobarlo se continuó empleando la evaluación del estilo de carrera como se describió anteriormente. Además, se realizó un monitoreo del consumo de alimento. Este monitoreo se realizó colocando 100 g alimento para un día, el alimento restante encontrado en las jaulas se pesó para saber la cantidad de alimento consumida por los animales durante el periodo de habituación y del protocolo de ejercicio aeróbico. Adicionalmente se registró el peso corporal de los animales una vez por semana desde el periodo de habituación hasta el término del protocolo de ejercicio aeróbico.

6.4 Sacrificio

Después de la última sesión de entrenamiento (día 14), los animales fueron sacrificados de 9:00 am - 12:00 pm, por decapitación por un técnico experimentado. Se colectó la sangre troncal para obtener el suero por centrifugación (3000 rpm durante 20 min) y posteriormente cuantificar la concentración de hormonas tiroideas y corticosterona. Se extrajeron y pesaron el tejido adiposo blanco (WAT del inglés, White adipose tissue) epididimal, retroperitoneal e interescapular y el tejido adiposo pardo (BAT del inglés, Brown adipose tissue). Asimismo, se extrajeron los músculos soleus y plantaris. Todos los tejidos se almacenaron a -80°C para los análisis posteriores.

6.5 Cuantificación de hormonas tiroideas (T3 y T4) por el método de ELISA:

La cuantificación de hormonas tiroideas se realizó en suero por el método de ELISA (del inglés, Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) utilizando el kit de diagnóstico Internacional [Zapopan, JAL, México] para T3 y T4 respectivamente. Para adaptar el uso de este kit en ratas se utilizó suero de rata hipotiroidea¹⁰⁰. Las muestras se midieron por duplicado siguiendo las instrucciones del fabricante como a continuación se describe.

La curva estándar se preparó colocando en la primera fila de la placa 25 μl de los estándares de referencia del kit más 25 μl de suero de rata hipotiroidea e igualmente se colocaron 50 μl de suero problema en los pocillos correspondientes. Posteriormente se adicionaron 100 μl del reactivo conjugado de trabajo (0.1 ml del concentrado HT-HRPO; enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) en 2 ml del diluyente) y se dejó incubar a temperatura ambiente por 45 min para permitir la unión del antígeno específico al anticuerpo anti-HT tapizado en el

pocillo. Para eliminar el exceso de antígeno no unido se removió la mezcla de incubación y el exceso de la enzima se lavó 5 veces con el buffer de lavado 1x.

Posteriormente, se adicionó 100 µl de TMB y se dejó incubar en la obscuridad por 15 min. Para detener la reacción se adicionaron 100 µl de solución de paro. La unión del sustrato a la enzima provoca una reacción colorimétrica, en donde la intensidad del color formada (amarillo) es proporcional a la cantidad de enzima presente, y se relaciona inversamente a la cantidad de HT no marcada en la muestra.

La densidad óptica se midió con un espectrofotómetro a 450 nm, para T3 la sensibilidad de la prueba es de 0.25 ng/ml y para T4 es de 0.5 µg/dl. Finalmente, los datos de absorbancia se utilizaron para determinar la concentración de T3 y T4 por medio del software gratuito my Elisa analysis.

6.6 Cuantificación de corticosterona sérica por Radioinmunoensayo (RIA)

La cuantificación de corticosterona se realizó mediante la técnica de radioinmunoensayo, prueba en la que se hizo una dilución de los sueros 1:500 en amortiguador RIA (10 mM de fosfatos pH 7.5, 150 mM de NaCl y 0.1 % de gelatina grado RIA-Biorad) por duplicado. Las diluciones preparadas se colocaron a 98°C durante 10 min. De cada muestra se tomaron 500 µl y se colocaron en tubos de ensayo, a cada muestra se le adicionaron 100 µl del anticuerpo (Ab) anti-corticosterona diluido 1:1200 más 100 µl de corticosterona tritiada (Perki-Elmer) La curva estándar se preparó por triplicado con 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 y 5000 pg / 500 µl de amortiguador RIA.

Posteriormente se dejaron incubar todos los tubos a 4°C durante 24 h. Pasado el tiempo de incubación se adicionó 200 µl de carbón-dextrán (SigmaAldrich 4 g / 250 ml de amortiguador) y se incubaron a 4°C por 20 min. Posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm a 4°C por 15 min y se recuperó el sobrenadante en viales de centelleo a los que se les adicionó 4 ml de líquido de centelleo (Ecolite MP Biomedicals). Cada muestra se midió en el contador de emisiones beta (Beckman).

6.7 Extracción de ARN total

Las extracciones de ARN total se realizaron por el método de extracción de tiocinato de guanidina modificado de Chomczynski & Sacchi¹⁰¹, como a continuación se describe.

Se tomó una muestra de aproximadamente 15 mg del tejido muscular. El tejido congelado se pulverizó en un mortero estéril sobre hielo seco. Cada muestra del tejido pulverizado se homogenizó con 400 µl de solución desnaturalizante (solución D: constituida de tiocianato de guanidina 4 M, de citrato de sodio 25 mM y de N-lauroil sarcosinato de sodio 0.5%) y β-mercaptoetanol. Para ello se utilizó una proporción de 5 mL de Solución D + 35 µl β-mercaptoetanol. Las muestras se homogenizaron completamente con un sonicador (Ultrasonic serie 4710).

A partir del homogenizado, se separaron los componentes no nucleicos con 40 µl de acetato de sodio 2 M, un volumen de fenol frío y 0.2 volúmenes de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico 49:1. Los tubos se incubaron por 15 min y se centrifugaron a 10,000 g por 20 min a 4°C para recuperar la fase acuosa, a la cual se agregó de nuevo un volumen de fenol y 0.2 volúmenes de cloroformo-alcohol isoamílico 49:1 y se centrifugaron nuevamente bajo las mismas condiciones.

Después de recuperar la fase acuosa, se realizó una primera precipitación con un volumen de isopropanol igual al volumen recuperado y se dejó precipitar a -20°C por 2 h. Se recuperó el sobrenadante después de volver a centrifugar como se describió anteriormente. La pastilla precipitada se resuspendió en 1/3 del volumen inicial de solución D y se dejó precipitar por segunda vez con el mismo volumen de isopropanol a -20°C por 2 h. Después se centrifugó a 10,000 g por 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Para remover las sales del ARN precipitado se aplicaron dos lavados con etanol al 70%, después de cada lavado se centrifugó a 10,000 g a 4°C por 5 minutos.

El sedimento de ARN se solubilizó en agua tratada con DEPC (0.1% dietil pirocarbonatado) libre de ARNsas y se procedió a cuantificar el ARN total extraído del músculo en cada muestra, así como la pureza utilizando un Nanodrop (ThermoFisher Scientific). Además, para verificar la integridad del ARN extraído se realizó un gel de agarosa al 1%.

6.8 Limpieza de ADN genómico

Para remover el ADN genómico de las muestras de ARN total se utilizó el kit de Thermo Scientific RapidOut ADN Removal, siguiendo las instrucciones del fabricante como a continuación se describe.

Las muestras de ARN fueron tratadas con 0.5 μ l de ADNasa I recombinante libre de ARNasas en conjunto con la mezcla de reacción compuesta por 1 μ l de buffer ADNasa con $MgCl_2$ 10X, y agua libre de nucleasas. Posteriormente, las muestras se incubaron a 37 °C por 30 minutos. La DNasa I se eliminó utilizando 1 μ l del reactivo ADNasa (DRR) patentado e incubando las muestras a temperatura ambiente por 2 minutos. El DRR se une eficientemente a la DNasa I, este complejo es retenido en el fondo del tubo por centrifugación a 800 g durante 1 minuto.

Se recuperó el sobrenadante que contenía el ARN purificado, posteriormente se cuantificó el rendimiento final y pureza por medio de un Nanodrop (ThermoFisher Scientific). Así mismo se realizó un gel de agarosa al 1% para verificar la integridad del ARN después del procedimiento RapidOut.

6.9 Retrotranscripción (RT)

Para cuantificar la expresión del ARNm del transportador de HT; Slc16a2 (MCT8); el ARNm de receptores de HT $Thra1$ y $Thr\beta1$ y de enzimas desyodasas tipo 2 y 3 se utilizaron las técnicas de retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR).

Para la RT se obtuvo ADN complementario (ADNc) a partir de 1 μ g de ARN total resultante de la extracción del tejido muscular, resuspendido en 12 μ l de agua tratada con DEPC. Las alícuotas de ARN se desnaturalizaron a 65°C durante 5 min. Posteriormente a cada muestra se le agregó la mezcla de reacción mencionada en la tabla 1.

Las muestras se incubaron a 37 °C por 2 horas y se almacenaron a -20°C para su uso posterior.

Tabla 1. Mezcla de reacción para la RT

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidades por muestra</i>
<i>Agua estéril</i>	8.9 μ l
<i>Buffer para transcripción reversa</i>	6.0 μ l
<i>DTT</i>	3.0 μ l
<i>dNTPS (0.6 mM)</i>	0.6 μ l
<i>Oligo dT (0.5 μg/μl)</i>	1.0 μ l
<i>Enzima RT M-MLV (Invitrogen 200U/μl).</i>	0.5 μ l

6.10 Cuantificación relativa de expresión genética obtenida por qPCR

Para la qPCR se utilizó Gapdh citoplásmico como control interno al igual que los oligonucleótidos iniciadores o primers sentido (S) y anti-sentido (AS) (tabla 2) por cada gen de interés previamente mencionados.

A cada muestra se le agregaron 12 μ l de una mezcla de reacción constituida por 6 μ l del mix SYGreen qPCRBIO (PCRBIO SYSTEMS), 1.2 μ l de Primers S y AS (500 nM c/u), 2.4 μ l de ADNc de la muestra problema o estándares y 2.4 μ l de agua estéril libre de nucleasas. Para cada ensayo de qPCR se realizaron curvas de dilución de 5 puntos con un factor de dilución de 3, por triplicado, así como para cada muestra problema.

Se utilizó un termociclador de PCR en tiempo real (Rotor-Gene Q, QIAGEN) para la amplificación de las muestras. Para su registro y análisis se empleó el software Rotor Gene Q – Pure detection versión 2.3.5 (QIAGEN). Los niveles de expresión de cada gen se midieron mediante una cuantificación relativa o comparativa por medio del modelo matemático desarrollado por Pfaffl¹⁰². Este modelo consiste en comparar los valores de ct de las muestras con los estándares de cantidad conocida trazada en una curva estándar, tomando en cuenta cualquier diferencia de eficiencia entre el gen de interés y el gen control interno para aumentar la reproducibilidad.

Tabla 2. Secuencias de los primers de referencia y de interés

<i>Primer</i>	<i>No. de ID</i>	<i>Secuencia S / AS</i>
<i>Thra1</i>	NM_001017960.2	TGG CTT GGT AAA TGG TAC TGG/ GCG TCC TTG CTC AGC TC
<i>Thrβ1</i>	NM_001113417	GGT AGA ACT GGT GTC TGT ATG G/ GTA CCA CTA TCG CTG CAT CAC
<i>Slc16a2 (MCT8)</i>	NM_147216.2	CAG GAG GCA AAC CAG GAA TAT C / TGG CTG CAA ACA CCA CTA TC
<i>Dio2</i>	NM_010050.3	TGC TTC AGG ATT GGA CAC G/ CTC CTA GAC GCC TAC AAA CAG
<i>Dio3</i>	NM_172119.2	ATA AGT CGC CAG CAT CTC AC / GTC CCT CTT TCA CCC TGT TT
<i>Gapdh</i>	NM_017008.4	GGT CGG TGT GAA CGG ATT T / TGG AAG ATG GTG ATG GGT TTC

6.11 Preparación neuromuscular

Para determinar los efectos agudos de HT en músculo en ratones, se realizó una preparación neuromuscular. Para esto se realizó la disección del nervio ciático, bajo condiciones de anestesia con pentobarbital sódico (1 UI/ kg peso, i.p) y facilitar su exposición a estimulación constante. El nervio ciático corre caudal y paralelo al fémur, este último se identifica al palpar la rodilla y coyuntura coxofemoral (cadera), por lo tanto, el procedimiento consiste en hacer una incisión paralela al fémur empezando al nivel de la coyuntura coxofemoral a través de la banda blanca fibrosa intermuscular y con tijeras de punta afilada, se penetra la banda blanca en forma longitudinal, separando las fibras sin cortar hasta que se observe el nervio ciático (Figura 8a).

El nervio ciático se elevó con pinzas hemostáticas finas para colocar el nervio en los electrodos de estímulo (Figura 8b) y se mantuvo humedecido con solución fisiológica compuesta de 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl y 2 mM de CaCl₂.

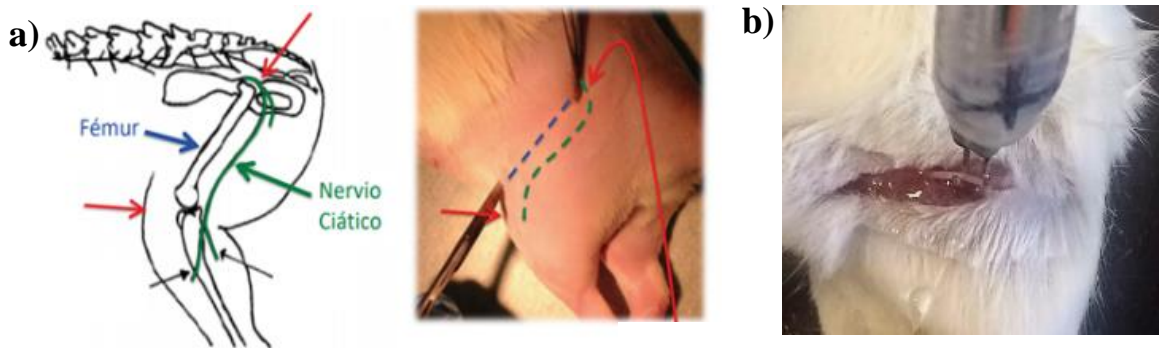


Figura 8. Imágenes de la preparación neuromuscular. a) Representación esquemática y fotografía de la ubicación del nervio ciático en ratón. b) Fotografía del nervio ciático colocado en electrodos de estímulo.

6.12 Músculo aislado

Se extrajo el músculo gastrocnemio de ratones sacrificados con una dosis letal de pentobarbital de sodio. El músculo aislado se colocó en una cámara con solución fisiológica, en contacto con dos electrodos (positivo y negativo) conectados a un estimulador (Grass S88 Dual Stimulator) y a un transductor de tensión (Grass FT03; Instruments Quincy. Mass. U.S.A.).

6.13 Tratamiento

Se evaluaron concentraciones crecientes de levotiroxina sódica (2.5, 5, 7.5, 10 y 12.5 μM), triyodotironina (1.5, 7.7, 15 y 30 nM) y cafeína (26 y 52 μM). En la preparación del nervio se aplicó directamente un volumen de 20 μl de cada concentración, mientras que en el caso del músculo se colocaron 5 mL en una cámara hasta cubrir el músculo. Entre cada concentración se realizaron lavados con la solución fisiológica para eliminar remanentes de la solución previa. Cada concentración y lavado se aplicó en ambas preparaciones durante 5 minutos.

6.14 Estimulación y registro

La estimulación del nervio ciático y músculo aislado se realizó con un estimulador (Grass S88 Dual Stimulator; Instruments Quincy. Mass. U.S.A.) que se encuentra conectado a dos electrodos paralelos que a su vez se pusieron en contacto con el nervio o músculo según el

caso. Para el registro de la contracción de cada tejido se conectaron a un transductor de tensión conectado a un amplificador de un polígrafo (Grass polygraph model 7D; Instruments Quincy, Mass. U.S.A.). La adquisición de datos se realizó a través del programa AxoScope 10.2 (Molecular Devices LLC) por medio de un digitalizador (convertidor de señal analógica a digital) de dos entradas (MiniDigi 1A) al que se conectó el estimulador y el polígrafo para el registro del estímulo y contracción muscular.

La intensidad de los estímulos aplicados para el nervio fue entre 0.16 y 0.6 volts con una duración de 3 ms, mientras que para el músculo la intensidad del estímulo osciló entre 1 y 6 volts con una duración de 30 ms, hasta superar el umbral de excitación y observar una respuesta de contracción constante. La frecuencia de estímulos se mantuvo en 0.2 pulsos por segundo (pps).

6.15 Análisis de datos de la contracción muscular

Los registros de respuesta a la estimulación se analizaron con el programa Clampfit 10.2 (Molecular Devices LLC), para determinar la amplitud, el tiempo al pico, el tiempo de relajación, la duración de la contracción y la latencia (Figura 9).

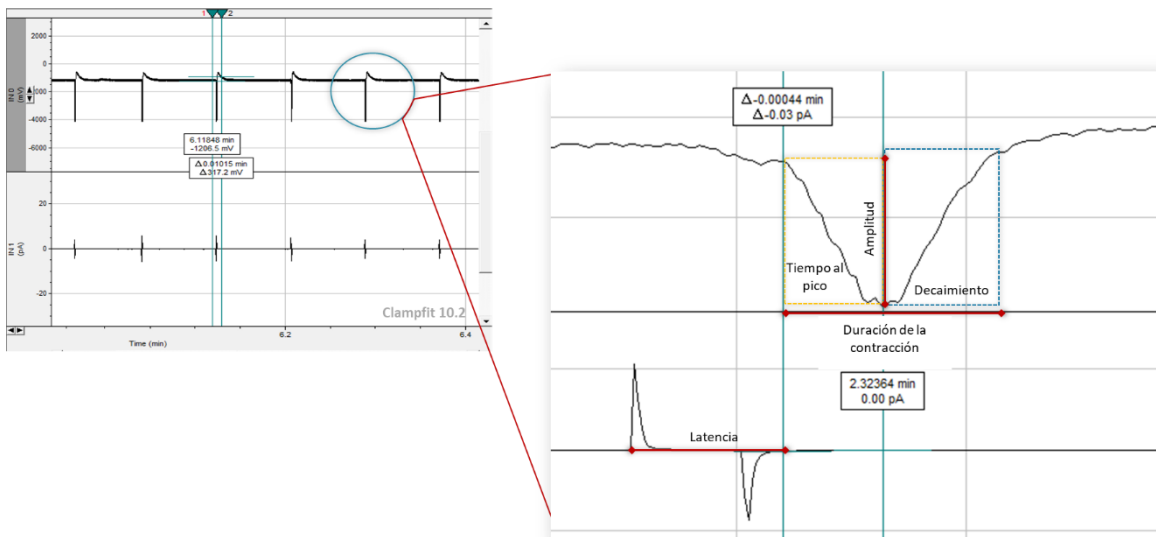


Figura 9. Registro de la contracción muscular, donde se muestran los parámetros de la contracción muscular: amplitud, tiempo al pico, tiempo de relajación, duración de la contracción y latencia.

6.16 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism versión 8.0.2. Los resultados se representan como la media \pm el error estándar de la media (E.E.M.). Para evaluar las diferencias entre el grupo ejercitado y sedentario, se utilizó la prueba *t de Student* (IC=95%). Los datos de amplitud, tiempo al pico, tiempo de relajación, duración de la contracción y latencia fueron analizados utilizando análisis de varianzas (ANOVA) de una vía, seguida de la prueba *post-hoc* de Dunnett. Las diferencias entre tratamientos se consideraron significativas cuando los valores de P fueron menores a 0.05 ($p < 0.05$) y fueron indicados con un *. En los casos en los que los valores de P fueron menores a 0.01 ($p < 0.01$) o 0.001 ($p < 0.0001$) se indicaron con ** y ***, respectivamente.

7. RESULTADOS

7.1 Estilo de carrera de los animales durante la habituación al ejercicio

El estilo de carrera de los animales se evaluó mediante el sistema de puntuación de rendimiento de tres criterios. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre el grupo sedentario y el grupo que posteriormente sería sometido al ejercicio en ninguno de los tres criterios evaluados AEY durante los tres días de la habituación (Figura 10).

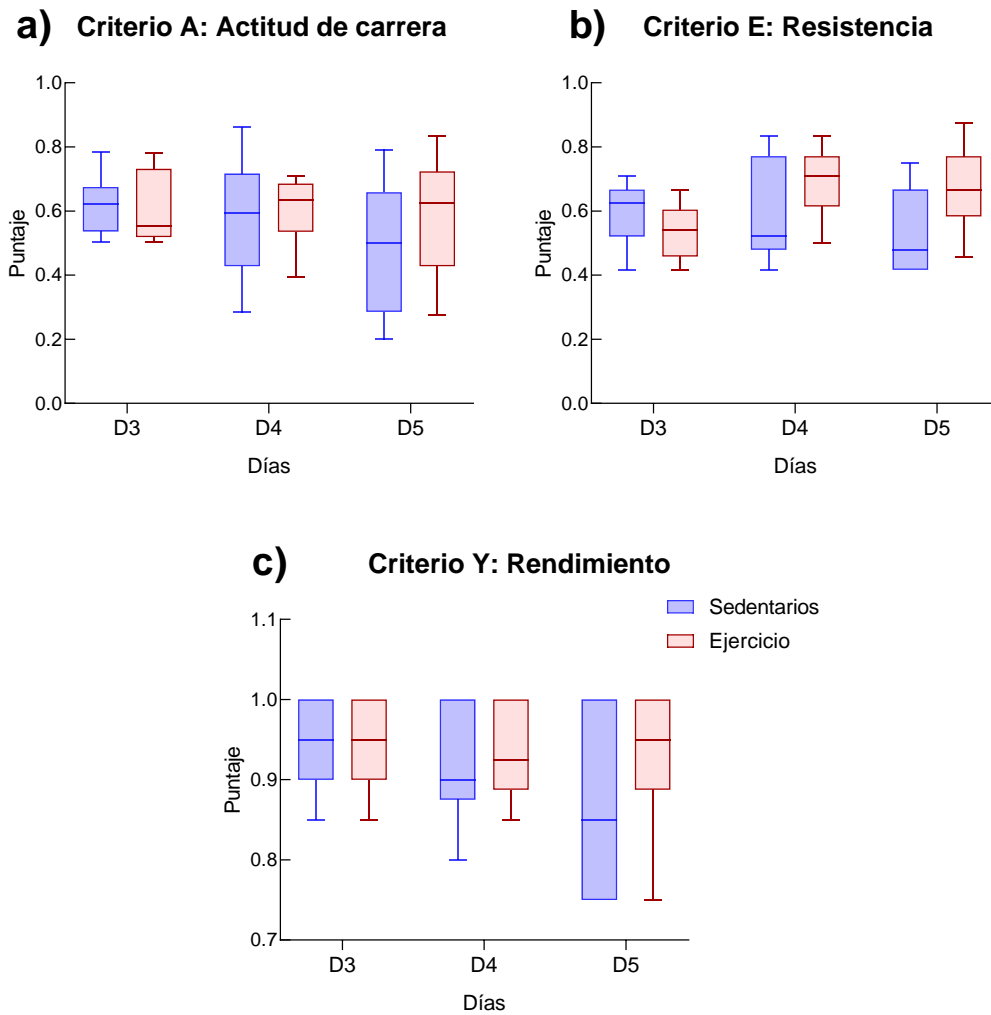


Figura 10. Análisis del estilo de carrera de los animales durante la habituación al ejercicio. Los datos se expresan como la media \pm E.E.M (n = 10).

7.2 Estilo de carrera de los animales durante el protocolo de ejercicio

Durante el protocolo de ejercicio aeróbico, no observamos diferencias significativas en los criterios A y Y, pero sí una tendencia de mejorar en el criterio A (Figura 11 a y c). En cuanto al criterio E de resistencia, encontramos una diferencia significativa en la tercera semana con respecto a la primera semana del protocolo de ejercicio (Figura 11b).

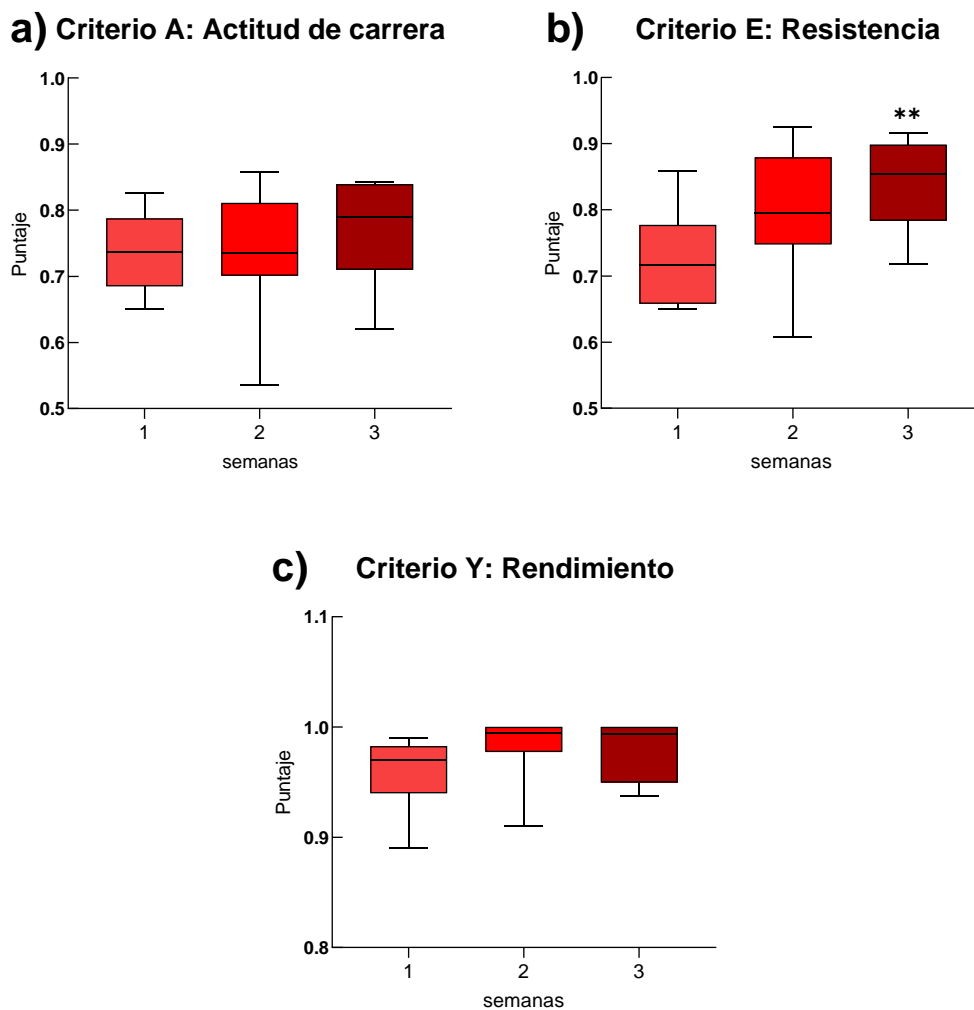


Figura 11. Análisis del estilo de carrera de los animales durante el protocolo de ejercicio aeróbico. Para determinar diferencias entre grupos se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey. * $p < 0.05$ vs Sedentarios.

7.3 Efecto del ejercicio en el consumo de alimento y ganancia de peso corporal

El consumo de alimento y peso corporal de los animales se registró desde el periodo de habituación hasta el sacrificio de los animales. En general, las ratas que se ejercitaron consumieron la misma cantidad de alimento que las ratas sedentarias a excepción de la segunda semana en donde se observó que las ratas ejercitadas consumieron significativamente menos alimento en comparación con las ratas sedentarias (Figura 12a). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la ganancia de peso entre grupos (Figura 12 b-c).

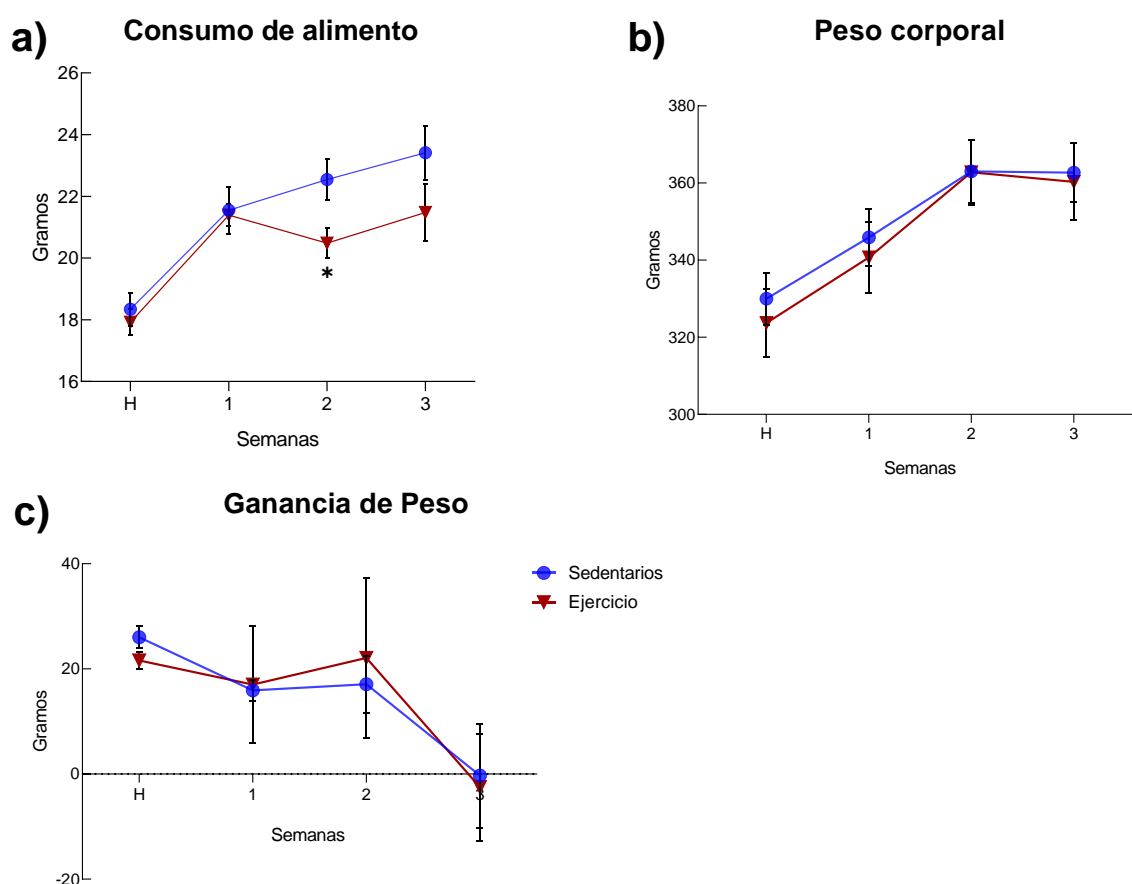


Figura 12. Consumo de alimento y ganancia de peso corporal durante la habituación y protocolo de ejercicio aeróbico. La semana de habituación al ejercicio se representa con la letra H. Los datos se expresan como media \pm E.E.M (n = 10). Para determinar diferencias entre grupos se realizó una prueba de *t de Student*. * $p < 0.05$ vs Sedentarios.

7.4 Efecto del ejercicio aeróbico en el peso de tejido adiposo blanco y pardo

El tejido adiposo blanco epididimal, retroperitoneal e interescapular y el tejido adiposo pardo fueron extraídos y pesados al momento del sacrificio. Se observó que el protocolo de ejercicio aeróbico no cambió significativamente la relación del peso del tejido adiposo blanco y pardo con respecto a el peso corporal de los animales (Figura 13).

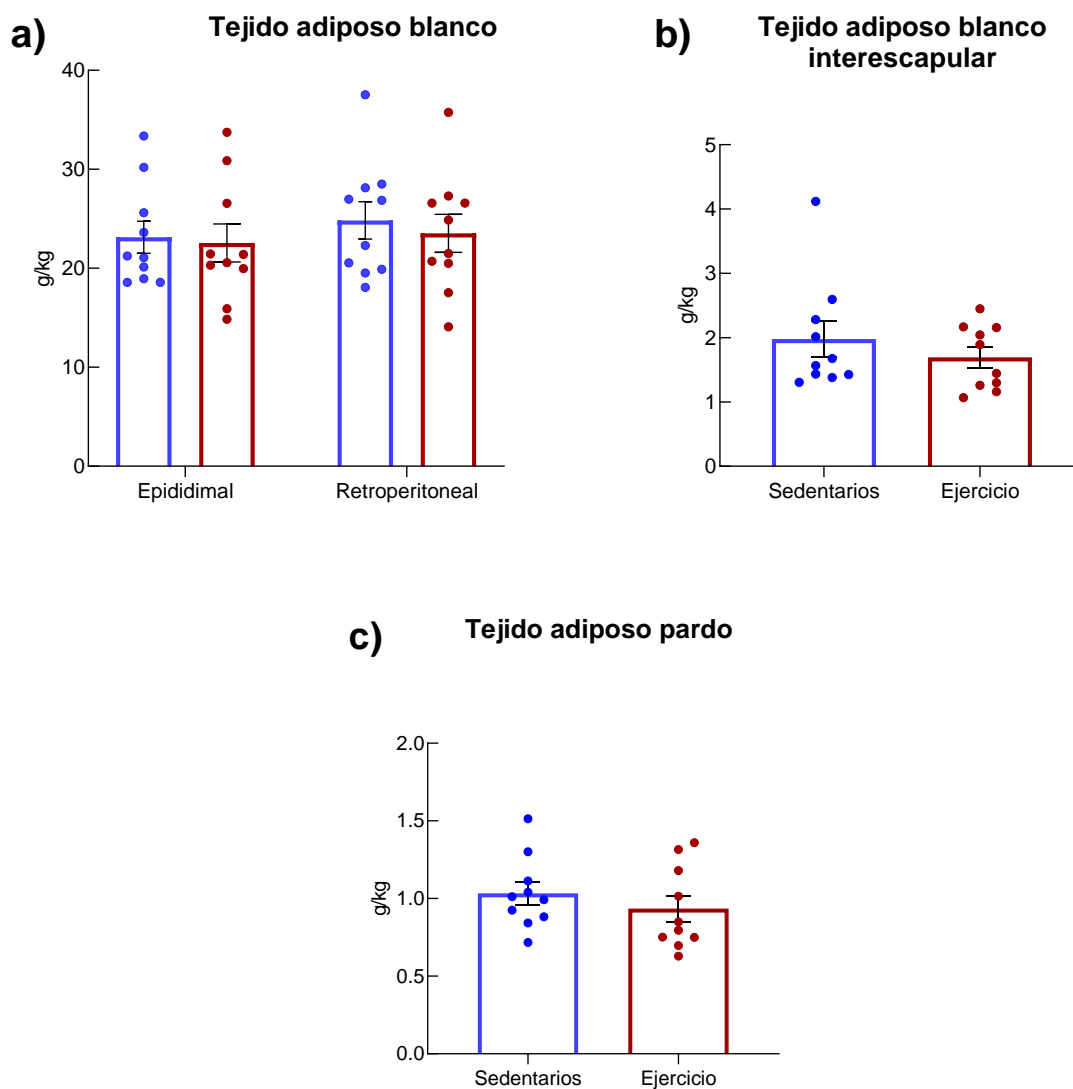


Figura 13. Efecto del ejercicio aeróbico en la relación del peso del tejido adiposo y el peso corporal de los animales. Los datos se expresan como la media \pm E.E.M (n = 10).

7.5 Efectos del ejercicio aeróbico en los niveles séricos de las hormonas tiroideas

La concentración de T3 y T4 en suero se cuantificó mediante ensayos de ELISA. Los resultados muestran que el ejercicio no produjo cambios significativos en la concentración sérica de estas hormonas con respecto al grupo sedentario (Figura 14).

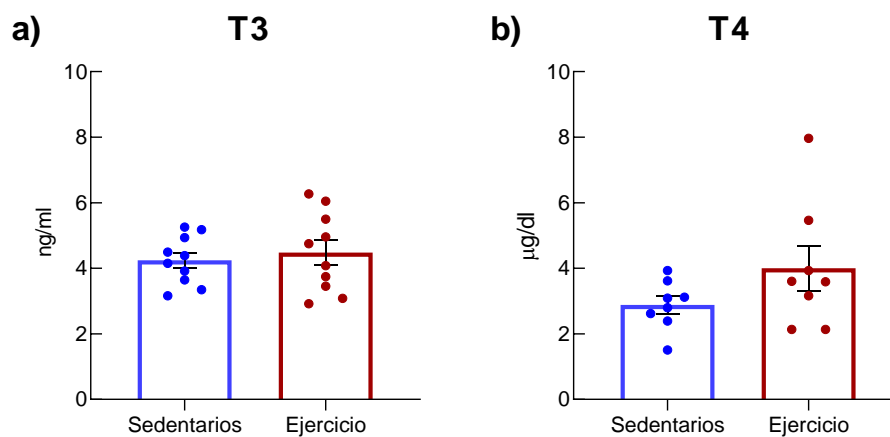


Figura 14. Efectos del ejercicio aeróbico en la concentración sérica de hormonas tiroideas T3 y T4 en ratas. Los datos se expresan como la media \pm E.E.M (n = 7-10).

7.6 Efectos del ejercicio aeróbico en la concentración de corticosterona

La corticosterona es una hormona esteroidea liberada por la glándula adrenal, utilizada como un biomarcador de estrés durante el ejercicio en la banda para correr¹⁰³. Por ello se midió la concentración sérica de corticosterona mediante RIA. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la concentración de la hormona entre los animales sedentarios y ejercitados (Figura 15).

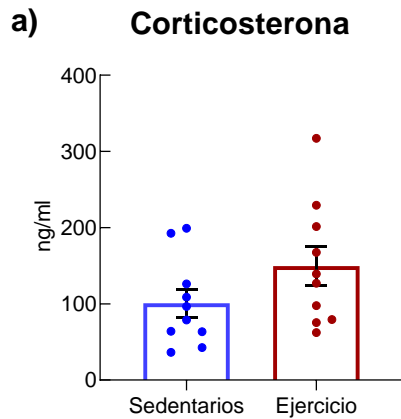


Figura 15. Efecto del ejercicio aeróbico en la concentración sérica de corticosterona. Los resultados son mostrados como la media \pm E.E.M (n=10).

7.7 Efecto del ejercicio aeróbico en la expresión del ARNm del transportador MCT8 en tejido muscular

El ejercicio aeróbico durante 14 días no indujo cambios significativos en la expresión del ARNm del transportador de hormonas tiroideas MCT8 en el músculo soleus (Figura 16a). En contraste en el músculo plantaris, la expresión del ARNm MCT8 disminuyó significativamente en comparación al grupo sedentario (Figura 16b).

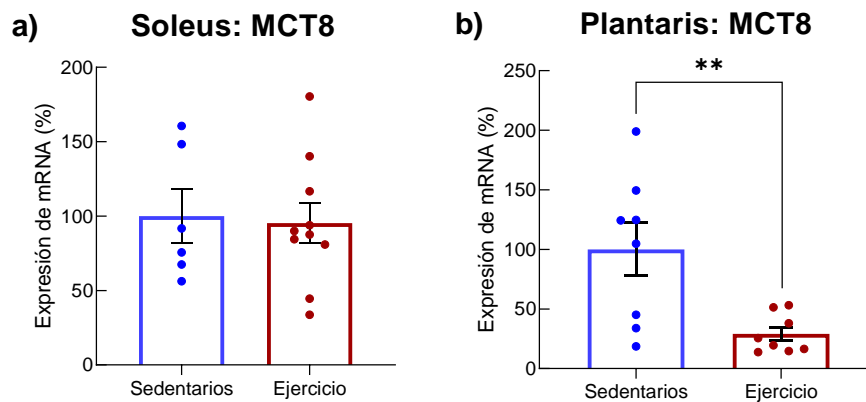


Figura 16. Efecto del ejercicio aeróbico en el ARNm del transportador MCT8 en músculo esquelético. Los resultados son mostrados como la media \pm E.E.M (n= 7-10). Para determinar diferencias entre grupos se realizó una prueba de *t de Student*. **p<0.01 vs grupo sedentario.

7.8 Efecto del ejercicio aeróbico en la expresión del ARNm de las enzimas desyodasas

El ejercicio aeróbico por 14 días no afectó significativamente la expresión de la enzima desyodasa tipo 2 con respecto al grupo sedentario tanto en músculo soleus como en el plantaris (Figura 17 a y c). En cuanto a la enzima desyodasa tipo 3 se observó una tendencia a disminuir la expresión del ARNm en el músculo soleus, sin embargo, no fue significativa. En el músculo plantaris se observó que el ejercicio aeróbico indujo una disminución significativa del ARNm de Dio3 en comparación con el grupo sedentario (Figura 17 b y d).

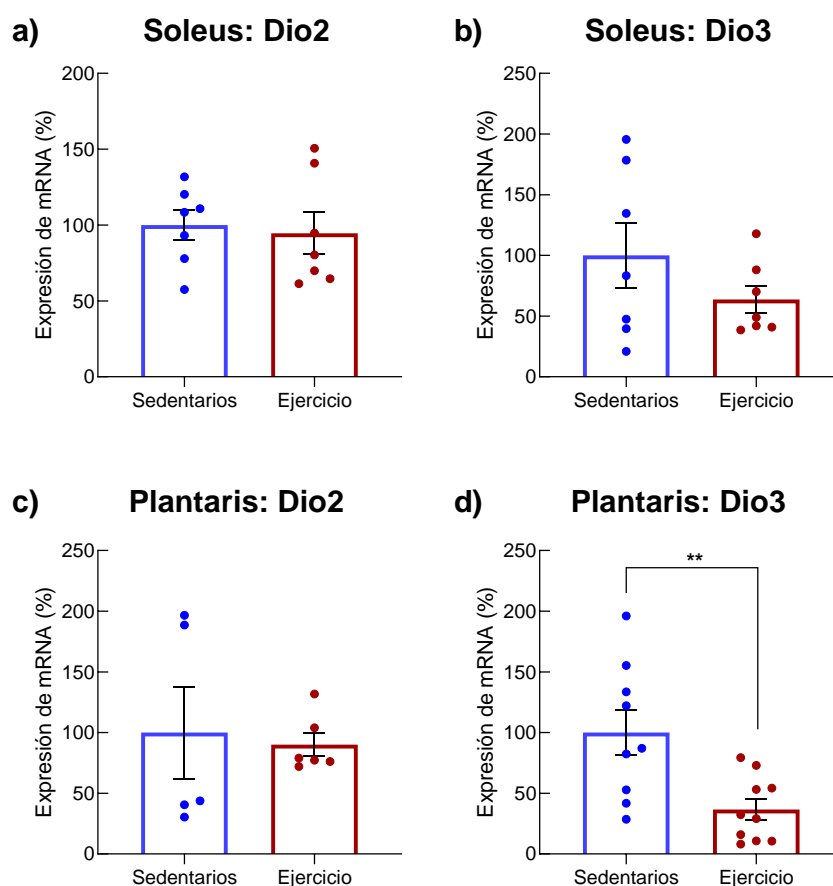


Figura 17. Efectos del ejercicio aeróbico en la expresión del ARNm de enzimas desyodasa en el músculo esquelético. Los resultados son mostrados como la media \pm E.E.M (n= 5-10). Para determinar diferencias entre grupos se realizó una prueba de *t de Student*. **p<0.01 vs grupo sedentario.

7.9 Efecto del ejercicio aeróbico en la expresión del ARNm de los receptores de HT $\text{Thr}\alpha 1$ y $\text{Thr}\beta 1$

El ejercicio aeróbico no provocó cambios significativos en la expresión ARNm de los receptores de $\text{Thr}\alpha 1$ y $\text{Thr}\beta 1$ con respecto al grupo sedentario en el músculo soleus (Figura 18 a y b). En contraste, en el músculo plantaris disminuyó significativamente ARNm del receptor $\text{Thr}\alpha 1$ con respecto al grupo sedentario (Figura 18c).

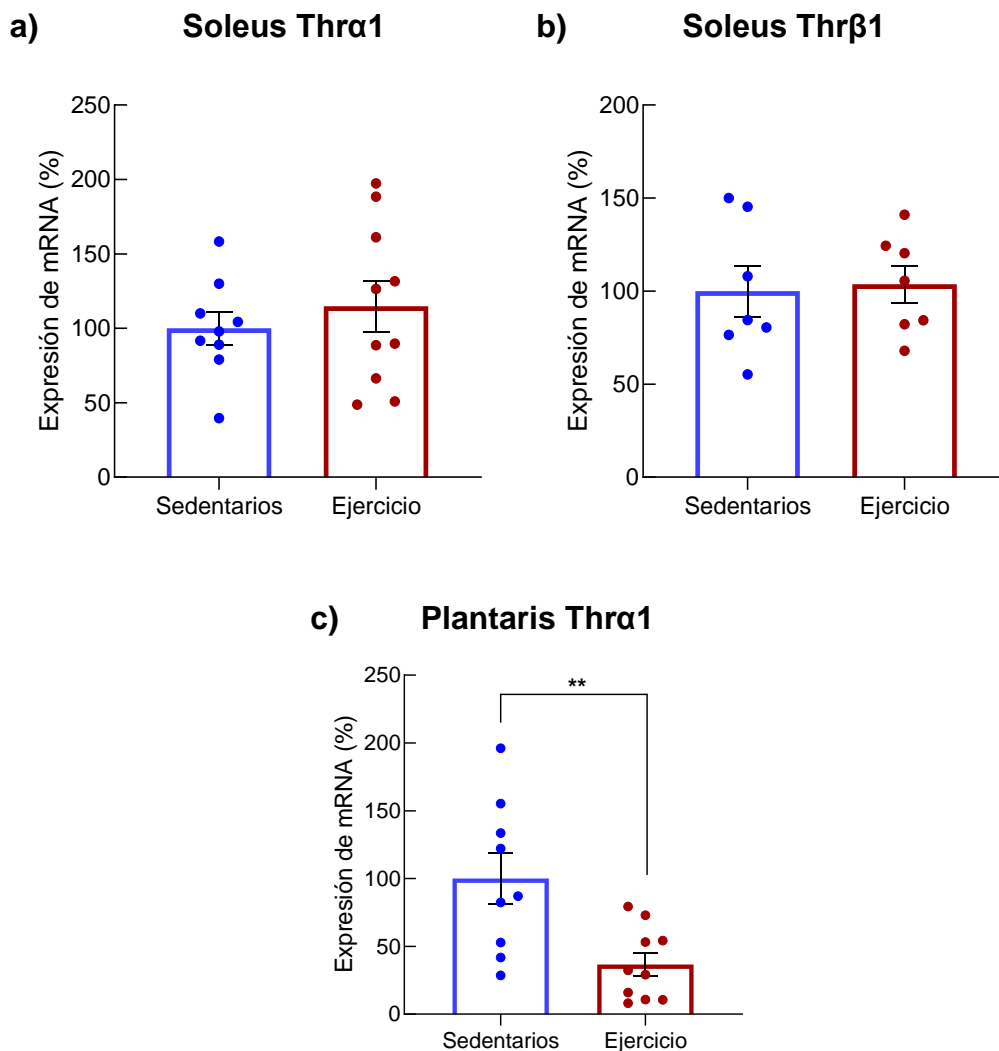


Figura 18. Efectos del ejercicio aeróbico en la expresión del ARNm de receptores de HT $\text{Thr}\alpha 1$ y $\text{Thr}\beta 1$ en el músculo esquelético. Los resultados son mostrados como la media \pm E.E.M (n=7-10). Para determinar diferencias entre grupos se realizó una prueba de *t de Student*. **p<0.01 vs grupo sedentario.

7.10 Efecto de la Levotiroxina en la preparación neuromuscular

Para determinar el efecto de la levotiroxina en la contracción muscular de ratones macho se aplicaron concentraciones crecientes de esta hormona (2.5, 5, 7.5, 10 y 12.5 μM) en una preparación neuromuscular.

Los resultados muestran que la levotiroxina no produjo cambios en la amplitud del pico de contracción con concentraciones de 2.5, 5 y 7.5 μM . Sin embargo, con las concentraciones de 10 y 12.5 μM de levotiroxina se produjo una disminución estadísticamente significativa de la amplitud de los picos de contracción en comparación con el control, es decir cuando el nervio solo se mantuvo con solución fisiológica (Figura 19a).

Así mismo, la levotiroxina a una concentración de 12.5 μM disminuyó significativamente el tiempo al pico, el tiempo de relajación, la duración de la contracción y la latencia de la contracción del músculo estimulado por el nervio ciático que lo inerva (Figura 19 b-e).

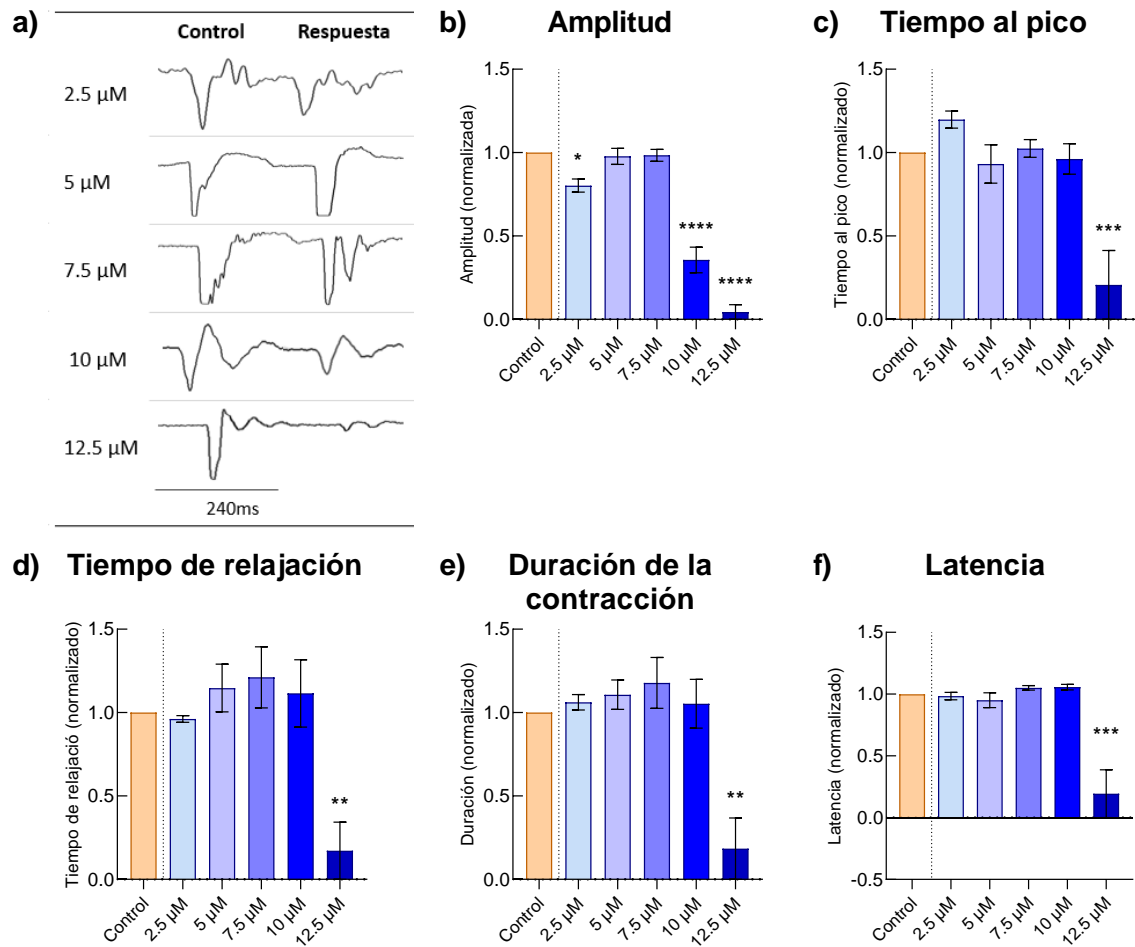


Figura 19. Efectos de la Levotiroxina en la contracción muscular en una preparación neuromuscular. Los datos están normalizados con respecto al control (n=3). Para determinar diferencias entre grupos se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$), *** $p < 0.0001$) vs control.

7.11 Efecto de la Levotiroxina en el músculo aislado

Se evaluaron los efectos de la Levotiroxina en una preparación de músculo gastrocnemio aislado, para esto se aplicaron 5 ml de concentraciones crecientes (2.5, 5, 7.5, 10 y 12.5 μM) de esta hormona. Los resultados muestran que a partir de la concentración de 2.5 μM hasta la concentración de 10 μM de Levotiroxina se observó una disminución significativa de la amplitud de los picos de contracción en comparación con el control (Figura 20a). No obstante, las concentraciones aplicadas de levotiroxina no provocaron cambios en el tiempo

al pico, el tiempo de relajación y la duración de la contracción (Figura 20 b-d). En cuanto a la latencia se observó que la levotiroxina aumentó este parámetro a las concentraciones de 5 y 10 μM con respecto al control (Figura 20e).

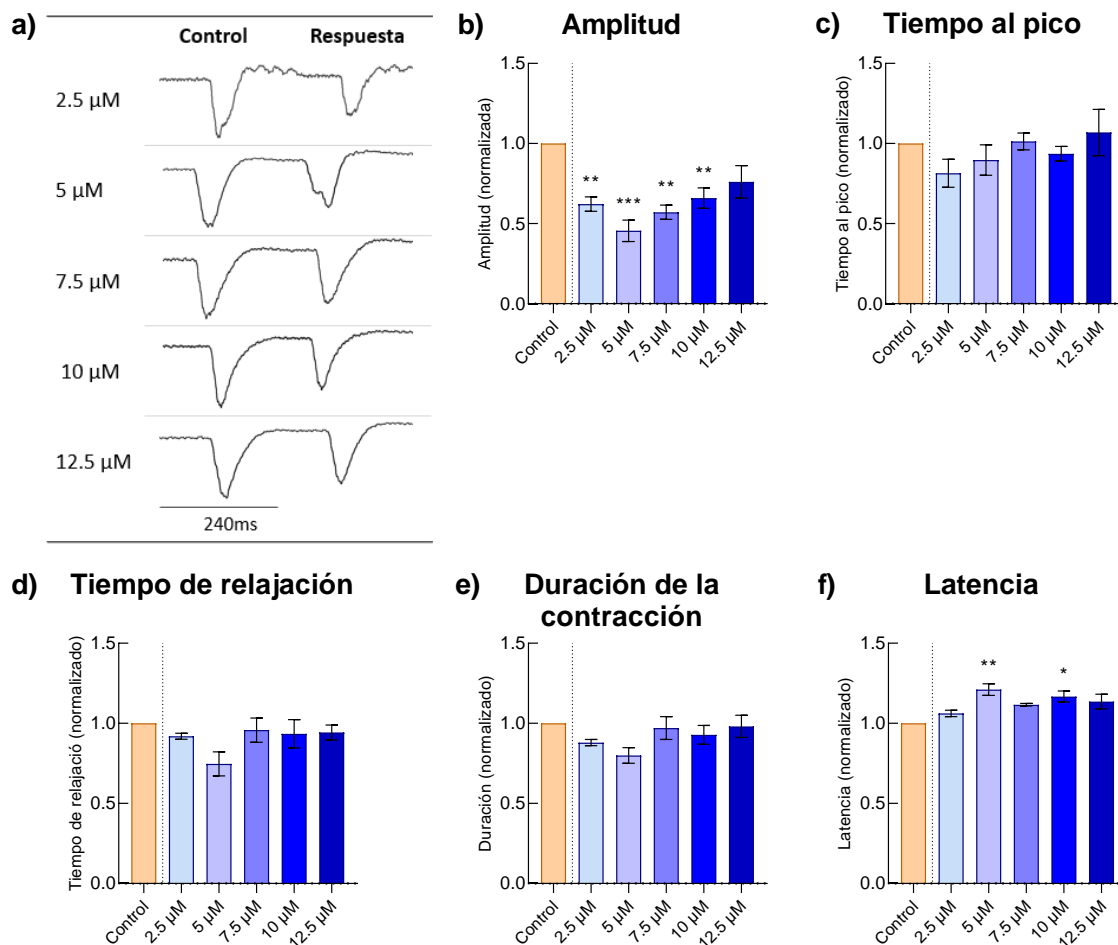


Figura 20. Efectos de la Levotiroxina en la contracción en una preparación de músculo aislado. Los datos están normalizados con respecto al control (n=3). Para determinar diferencias entre grupos se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$) vs control.

7.12 Efecto de la Triyodotironina en la preparación neuromuscular

Los resultados muestran que las concentraciones de entre 1.5 y 15 nM disminuyeron significativamente la amplitud del pico de contracción y que con una concentración mayor de 30 nM no se observan cambios (Figura 21a). Estas concentraciones tuvieron efectos

similares en cuanto el tiempo de relajación, no obstante, el tiempo de relajación muscular con una concentración 15 nM de Triyodotironina no tuvo cambios significativos con respecto al control a diferencia de la concentración de 30 nM que aumentó el tiempo de relajación muscular (Figura 21d). De igual manera cabe destacar que la concentración de 7.7 nM de Triyodotironina provocó una disminución drástica de la contracción muscular en respuesta al estímulo que se observó en todos los parámetros de la contracción muscular (Figura 21).

Por otro lado, se observó que la concentración de 1.5 aumentó la latencia significativamente, es decir que aumentó el tiempo que se tarda en aparecer la contracción muscular después del estímulo (Figura 21f).

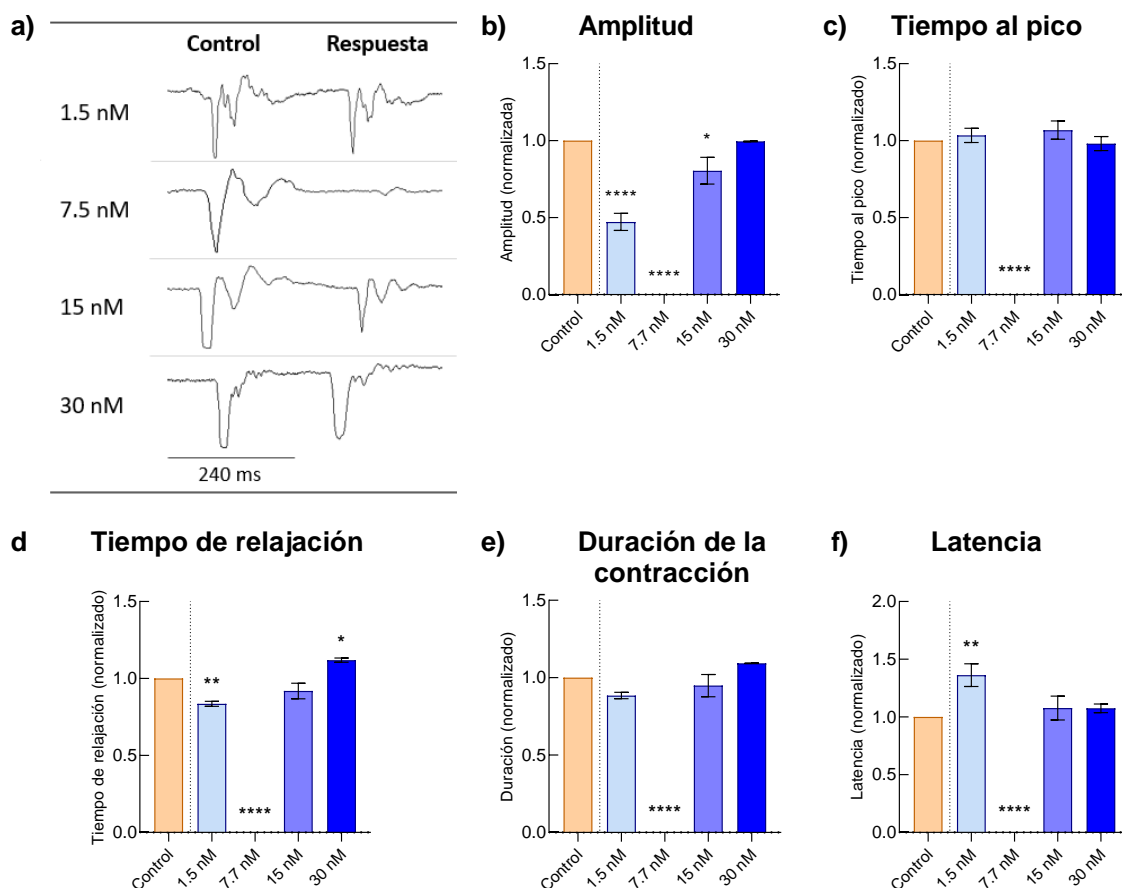


Figura 21. Efectos de la triyodotironina en la contracción muscular en una preparación neuromuscular. Los datos están normalizados con respecto al control (n=3). Para determinar diferencias entre grupos se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett. *p<0.05, **p<0.01), ***p<0.0001) vs control.

7.13 Efecto de la Triyodotironina en el músculo aislado

Los músculos aislados de ratones macho fueron tratados con concentraciones crecientes de Triyodotironina (1.5, 7.7, 15 y 30 nM). A partir de la concentración de 1.5 nM de Triyodotironina se observó una disminución en la amplitud del pico de contracción del músculo con respecto al control (Figura 22a). Mientras que la latencia solo aumentó significativamente con la concentración de 1.5 nM y 30 nM de Triyodotironina (Figura 22e).

De igual manera la concentración de 30 nM de Triyodotironina provocó un aumento del tiempo al pico y duración de la contracción muscular, además de una disminución del tiempo de relajación muscular. (Figura 22 b-d).

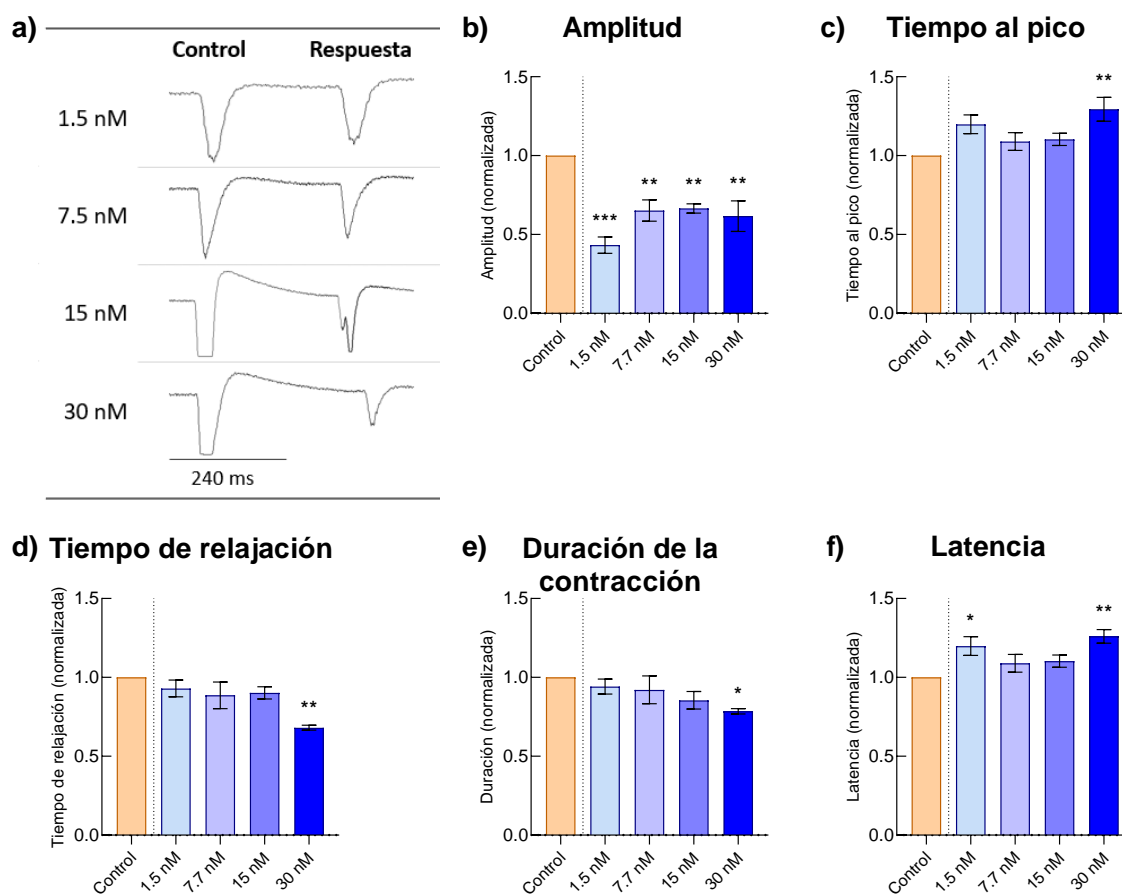


Figura 22. Efectos de la triyodotironina en la contracción de músculo aislado. Los datos están normalizados con respecto al control (n=3). Para determinar diferencias entre grupos se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$) vs control

7.14 Efecto de la cafeína en la preparación neuromuscular

Como control positivo se utilizaron las concentraciones de 26 y 52 μM de cafeína, sin embargo, no observamos cambios significativos en los parámetros analizados de la contracción muscular, a excepción del aumento observado en la duración de la contracción con 52 μM de cafeína (Figura 23 a y d).

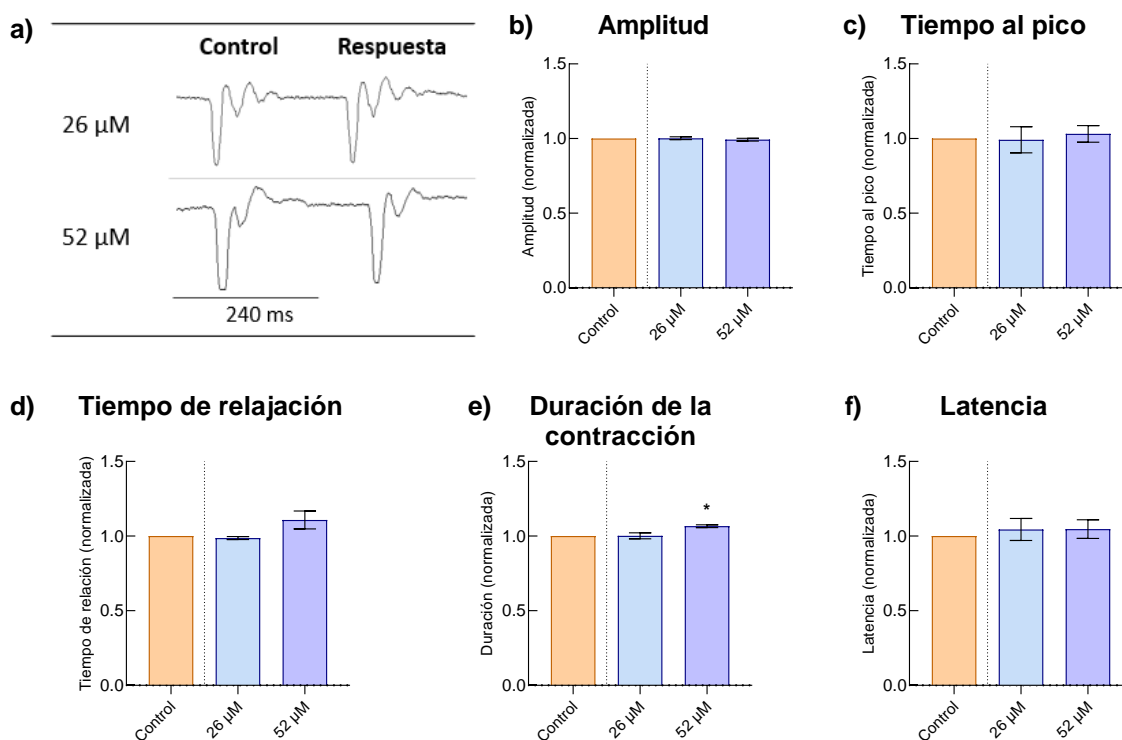


Figura 23. Efectos de la cafeína en la contracción muscular en una preparación neuromuscular. Los datos están normalizados con respecto al control (n=3). Para determinar diferencias entre grupos se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett. * $p < 0.05$ vs control

7.15 Efecto de la cafeína en el músculo aislado

En el músculo aislado la concentración de 26 μM de cafeína disminuyó la amplitud del pico de contracción (Figura 24b). Mientras que con la concentración de 52 μM provocó un aumento del tiempo al pico y la latencia con respecto al control (Figura 24e).

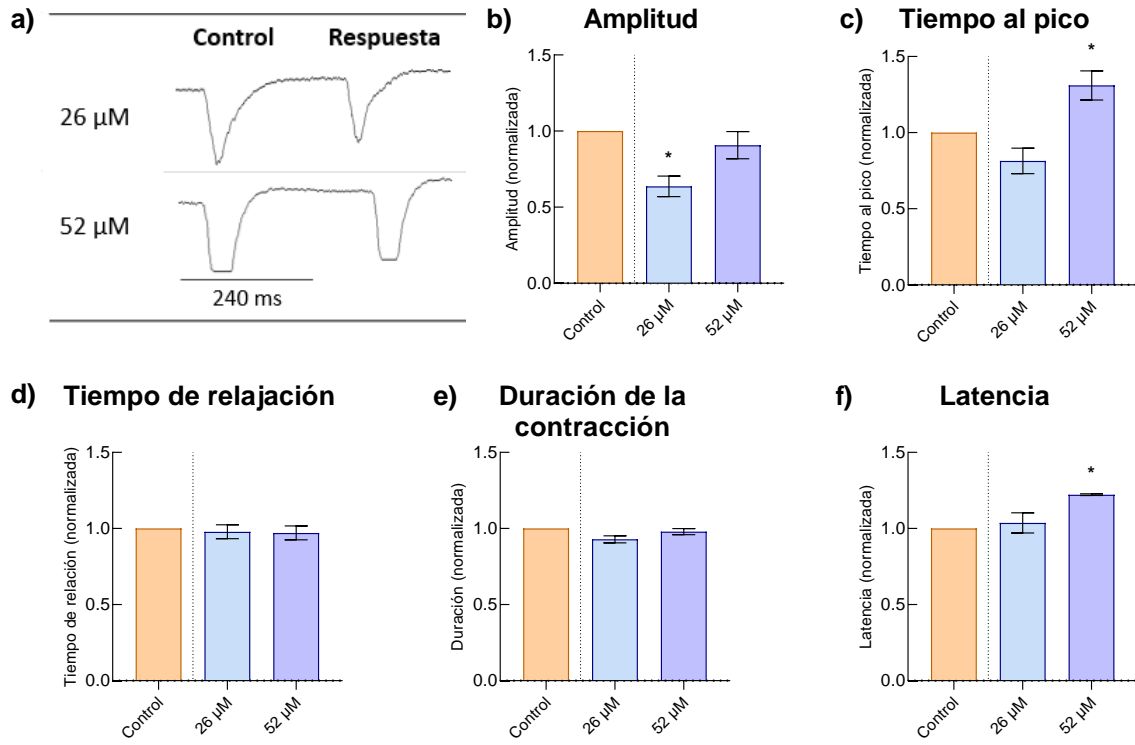


Figura 24. Efectos de la cafeína en la contracción de músculo aislado. Los datos están normalizados con respecto al control (n=3). Para determinar diferencias entre grupos se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett. *p<0.05 vs control

8. DISCUSIÓN

El ejercicio induce una serie de repuestas fisiológicas, entre estas se encuentran las adaptaciones metabólicas y cambios en la composición de fibras musculares²⁷. A su vez las moléculas que participan en las propiedades fenotípicas y metabólicas del músculo esquelético se encuentran reguladas por las hormonas tiroideas a través de la vía genómica^{5,6,12}. Por lo tanto, en este proyecto se propuso estudiar las adaptaciones en los elementos de la vía de señalización de HT en el músculo esquelético en respuesta al ejercicio aeróbico crónico. Para esto se utilizó un modelo de ejercicio aeróbico en una banda para correr, durante 14 días. Anteriormente en el laboratorio en un modelo de ejercicio voluntario durante 14 días se observó la activación del eje tiroideo⁷⁴. Además, en modelos de ejercicio aeróbico (15 m/min) se encontró que la mioglobina, la enzima citrato sintasa y MyoD aumentaban en repuesta al ejercicio, algunas de estas proteínas son reguladas por HT^{12,75}.

Debido a la importancia de tener un grupo de animales que mostrara adherencia al protocolo de ejercicio, se empleó un sistema de puntuación de rendimiento de tres criterios para ratas que hacen ejercicio en una banda para correr⁹⁹. Durante la habituación al ejercicio utilizando el sistema de puntuación de rendimiento de tres criterios no observamos una variabilidad considerable entre los grupos (Figura 10), sin embargo, el análisis por individuo permitió identificar lo que se denominó como “malos corredores”, los cuales fueron cambiados al grupo que sería sedentario. Este sistema se continuó utilizando durante el protocolo de ejercicio aeróbico, durante este periodo las ratas que hacían ejercicio mejoraron su resistencia en la tercera semana de ejercicio. (Figura 11b). Indicativo de que los animales demostraban menor fatiga durante las secciones de ejercicio y por lo tanto una adaptación al protocolo de ejercicio⁹⁹.

8.1 Efectos del ejercicio aeróbico en el peso corporal y en el tejido adiposo

El ejercicio en la máquina de correr no afectó el peso de los animales (Figura 12 b y c), lo cual coincide con lo reportado en ratas Wistar que realizaron ejercicio en una banda para correr, en las que a los 14 días de ejercicio no se encontraron cambios en el peso y consumo de alimento¹⁰⁴. No obstante, en nuestro caso, en la segunda semana del protocolo de ejercicio las ratas disminuyeron su consumo de alimento (Figura 12a). La disminución del consumo

de alimento puede ser debido a condiciones de estrés¹⁰⁵. Sin embargo, en nuestro caso no encontramos cambios en los niveles séricos de corticosterona, biomarcador de estrés en animales que hacen ejercicio en una banda para correr (Figura 15), aunque cabe mencionar que esta medición fue realizada en el suero obtenido al término del protocolo de ejercicio¹⁰³. Por lo que no se descarta la posibilidad de que la disminución del consumo de alimento se deba a una situación de estrés durante el experimento.

El ejercicio en la banda para correr a una velocidad 20 m/min (aeróbico) durante 60 min por 9 semanas estimuló la pérdida de tejido adiposo¹⁰⁶. En cambio, el ejercicio durante 4 semanas a velocidades entre 10-12 m/min durante 45 min no provocaron cambios significativos en el peso del tejido adiposo, así como tampoco el ejercicio a velocidades de 18 m/min durante 30 min por 12 semanas^{107,108}. De igual manera nuestro modelo de ejercicio en que los animales corrieron a 15 m/min durante 20 min por 2 semanas no cambió el peso del WAT ni BAT (Figura 13), posiblemente porque el tiempo de exposición al ejercicio no fue suficiente para generar cambios importantes en la utilización de tejido adiposo.

8.2 Efectos del ejercicio aeróbico en la señalización de Hormonas Tiroideas en el músculo esquelético

Al medir los niveles séricos de hormonas tiroideas no encontramos cambios significativos en la concentración de HT en respuesta al ejercicio (Figura 14), coincidiendo con lo reportado en algunos estudios previos en los que se utilizaron modelos de ejercicio crónico en una máquina de correr tanto aeróbicos como anaeróbicos^{76,109,110}. Por el contrario, el ejercicio agudo de alta intensidad aumenta los niveles séricos de HT, sugiriendo que el ejercicio agudo y crónico puede tener efectos distintos sobre los niveles de HT¹¹¹.

El mecanismo de acción principal conocido como la vía genómica, por el cual las HT pueden regular la expresión de sus genes diana es a través de la unión a sus receptores nucleares^{3,5}. Para lo cual las HT son transportadas a través de la membrana plasmática por medio de transportadores dependientes de energía, siendo identificado MCT8 como un transportador específico de HT⁴⁶. En nuestros resultados encontramos que en el músculo soleus el ejercicio aeróbico no provocó cambios en el ARNm de MCT8, en cambio en el músculo plantaris MCT8 disminuyó significativamente (Figura 16). En contraste con lo reportado, el ejercicio

en una máquina de correr no estimuló cambios en el ARNm de MCT8 en el músculo gastrocnemio¹¹⁰. Estos músculos están compuestos por diferentes fenotipos de fibras musculares, por ejemplo, el músculo soleus se compone de fibras tipo I a diferencia del músculo plantaris que se compone de fibras de contracción rápida tipo IIX y IIB^{5,28}. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el ejercicio aeróbico en una banda para correr tiene efectos diferentes en la expresión de MCT8 de acuerdo con el fenotipo muscular. No obstante, en el músculo esquelético además de MCT8 se expresa MCT10 que igualmente participa en la homeostasis de los niveles de hormona tiroidea, pero que no fue medido en este proyecto⁴⁷.

Curiosamente en un estudio en pacientes en estado crítico prolongado en unidad de cuidados intensivos, en el músculo esquelético se encontraron niveles aumentados de expresión del gen MCT8, pero no de MCT10, indicando una posible respuesta adaptativa para aumentar la disponibilidad local de HT en el músculo en condiciones de desequilibrio en los niveles séricos de HT debido a alteraciones del eje HHT¹¹². En el caso de nuestro modelo de ejercicio los niveles séricos de HT no presentaron cambios.

Las enzimas desyodasas tipo 2 y 3 participan en la regulación de la concentración intracelular de las HT en el músculo esquelético^{44,47}. El ejercicio agudo de alta intensidad aumenta la expresión y actividad de la enzima desyodasa tipo 2, la cual parece tener un papel importante en la regulación de PGC-1 α por T3 puesto que, la inhibición de Dio2 disminuye la expresión de PGC-1 α responsable de promover la biogénesis mitocondrial, la oxidación de ácidos grasos mitocondriales y la conversión de las fibras musculares⁷⁶. La disminución de Dio2 provoca cambios en la función contráctil del músculo, así mismo los niveles reducidos de PGC-1 α contribuye a cambios fenotípicos de las fibras musculares⁵⁵. Por el contrario, en el ejercicio aeróbico crónico que utilizamos, no provocó cambios en la expresión de Dio2 en músculo soleus y plantaris (Figura 17 a y c). En el caso de la desyodasa tipo 3 no encontramos estudios que evaluaran a esta enzima en respuesta al ejercicio en el músculo esquelético, pero en el tejido cardíaco de ratas se encontró que el ejercicio aeróbico disminuye la actividad de Dio3¹¹³. Además, se sabe que la desyodasa tipo 3 es responsable de inactivar la T3 intracelular^{45,47}. En el músculo plantaris de acuerdo con nuestros resultados la expresión de Dio3 disminuyó significativamente con el ejercicio en cambio en el músculo soleus no se

encontraron cambios en la expresión de Dio3 (Figura 17 b y d). Lo cual podría sugerir que el ejercicio aeróbico crónico no tiene efectos en la regulación de Dio2, sin embargo, los efectos en la expresión de Dio3 podrían estar relacionados con el fenotipo muscular.

En condiciones basales la expresión de Thr α 1 y Thr β 1 es más abundante en el músculo soleus que en el músculo plantaris⁴. Durante el ejercicio aeróbico en ratas macho aumenta la expresión y los niveles de Thr β 1 en el músculo soleus que se relaciona con la intensidad del ejercicio⁷⁵. Mientras tanto en los resultados obtenidos en este estudio no encontramos cambios en Thr α 1 y Thr β 1 del músculo soleus, mientras que en el músculo plantaris observamos una disminución significativa de Thr α 1 (Figura 18c).

Estos datos sugieren que los cambios observados en los elementos de la señalización de HT en respuesta al ejercicio aeróbico crónico podrían estar relacionados con el fenotipo de las fibras musculares de contracción rápida. Es decir que la señalización de las HT mediada por transportadores de HT, desyodasas y receptores de HT, fue específico de acuerdo con el tipo de fibras musculares en respuesta al ejercicio como sucede en otros tejidos⁴⁴.

8.3 Efectos de las hormonas tiroideas en la contracción muscular

Las hormonas tiroideas además de actuar por la vía genómica actúan a través de mecanismos no genómicos al unirse a sitios de la membrana plasmática, entre los cuales se encuentran los transportadores de iones que a su vez están relacionados con la contracción del músculo^{84,89}. Por lo tanto, en este trabajo se propuso analizar el efecto de las HT en la contracción del músculo, para esto se evaluó la administración de diferentes concentraciones de T4 y T3, además de utilizar la cafeína como control positivo.

En nuestros experimentos observamos que con una concentración de 12.5 μ M de levotiroxina sódica en el nervio ciático disminuyó la respuesta contráctil del músculo, mientras que las concentraciones de 2.5 y 10 μ M disminuyeron solo la amplitud del pico de contracción (Figura 19), en el caso del músculo gastrocnemius aislado las concentraciones de 2.5, 5, 7.5 y 10 μ M de levotiroxina sódica disminuyeron la amplitud del pico de contracción (Figura 20a). Lo cual sugiere que las concentraciones empleadas en estos experimentos indujeron efectos inotrópicos negativos, es decir provocaron una disminución en la respuesta contráctil muscular. Durante el hipotiroidismo los niveles elevados de las HT aumentan la tasa de

relajación del músculo, esto se ha relacionado con la presencia de sitios de unión a T3 y T4 en proteínas de retículo sarcoplásmico⁸⁶. La administración de concentraciones fisiológicas de 0.1 nM de T3 y T4 aumentan la actividad de SERCA en el músculo esquelético en estudios *in vitro*^{86,114}. Aunado a que concentraciones elevadas de HT regulan a la baja canales de Ca^{2+} regulados por voltaje y provocan un aumento en la absorción de Ca^{2+} mediado por la actividad de SERCA limitando el Ca^{2+} disponible en el citoplasma fundamental para que se lleve a cabo la respuesta contráctil del músculo esquelético⁹².

De manera similar los resultados de administración de concentraciones elevadas de T3 provocaron efectos inotrópicos negativos tanto en la preparación neuromuscular como en el músculo aislado (Figura 21 y 22). Por el contrario, otros estudios indican que la exposición aguda (5 min) de 10 nM de T3 estimula el aumento del flujo de Na^+ y la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico, lo cual sugiere que T3 tiene efectos inotrópicos positivos en miocitos auriculares del corazón⁹³. De igual manera la concentración 5 nM aumenta el flujo de Na^+ aparentemente por interacciones directas de T3 con los canales sodio⁹⁵.

Por otro lado, la administración de cafeína provocó cambios significativos en la preparación neuromuscular, no obstante, en el músculo aislado una concentración de 26 μM de cafeína disminuyó la amplitud del pico de contracción (Figura 23 y 24). En otros estudios se encontró que la cafeína es uno de los activadores exógenos de los canales de RyR encargados de la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico¹¹⁵. Además, una concentración de 10 mM estimula la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico, lo cual indica que la cafeína estimula la contracción muscular⁹⁵.

9. CONCLUSIONES

Con base en los resultados se demostró que las ratas mejoraron su resistencia durante el protocolo de ejercicio aeróbico crónico, sin embargo, dos semanas de ejercicio no fueron suficientes para inducir cambios en la composición corporal de las ratas, así como tampoco en los niveles séricos de HT. A pesar de que la concentración sérica de HT no cambió en los animales que realizaron ejercicio, demostramos que el ejercicio aeróbico regula la expresión de genes que participan en la vía de señalización de las HT, y que estos cambios son específicos de acuerdo con el fenotipo de fibras musculares.

Adicionalmente, la administración aguda (5 minutos de exposición) de concentraciones elevadas de T3 y T4 tienen efectos inotrópicos negativos en el músculo esquelético de ratones adultos.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mullur R, Liu YY, Brent GA. Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. *Physiological Reviews*. 2014;94(2):355-382. doi:10.1152/physrev.00030.2013
2. Mcaninch EA, Bianco AC. Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014;1311(1):77-87. doi:10.1111/nyas.12374
3. Brent GA. medicine Mechanisms of thyroid hormone action. *Journal of Clinical Investigation*. 2012;122(9):3035-3043. doi: 10.1172/JCI60047.three
4. Bahi L, Garnier A, Fortin D, et al. Differential effects of thyroid hormones on energy metabolism of rat slow- and fast-twitch muscles. *Journal of Cellular Physiology*. 2005;203(3):589-598. doi:10.1002/jcp.20273
5. Simonides WS, van Hardeveld C. Thyroid hormone as a determinant of metabolic and contractile phenotype of skeletal muscle. *Thyroid*. 2008;18(2):205-216. doi:10.1089/thy.2007.0256
6. Bloise FF, Cordeiro A, Ortiga-Carvalho TM. Role of thyroid hormone in skeletal muscle physiology. *Journal of Endocrinology*. 2018;236(1): R57-R68. doi:10.1530/JOE-16-0611
7. Milanesi A, Lee JW, Kim NH, et al. Thyroid hormone receptor α plays an essential role in male skeletal muscle myoblast proliferation, differentiation, and response to injury. *Endocrinology*. 2016;157(1):4-15. doi:10.1210/en.2015-1443
8. Moghetti P, Bacchi E, Brangani C, Donà S, Negri C. Metabolic Effects of Exercise. In: *Frontiers of Hormone Research*. Vol 47. S. Karger AG; 2016:44-57. doi:10.1159/000445156
9. Zarzeczny R, Pilis W, Langfort J, Kaciuba-Uściłko H, Nazar K. Influence of thyroid hormones on exercise tolerance and lactate threshold in rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*. Published online 1996.
10. Gonçalves A, Tolentino CC, de Souza FR, et al. The thyroid hormone receptor β -selective agonist gc-1 does not affect tolerance to exercise in hypothyroid rats. *Archives of Endocrinology and Metabolism*. 2015;59(2):141-147. doi:10.1590/2359-3997000000027
11. Sindoni A, Rodolico C, Pappalardo MA, Portaro S, Benvenega S. Hypothyroid myopathy: A peculiar clinical presentation of thyroid failure. Review of the literature. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2016;17(4):499-519. doi:10.1007/s11154-016-9357-0

12. Salvatore D, Pansini V, Simonides WS, et al. Potential Implications. 2014;10(4):206-214. doi: 10.1038/nrendo.2013.238.Thyroid
13. Bansal A, Kaushik A, Singh C, Sharma V, Singh H. The effect of regular physical exercise on the thyroid function of treated hypothyroid patients: An interventional study at a tertiary care center in Bastar region of India. *Archives of Medicine and Health Sciences*. 2015;3(2):244. doi:10.4103/2321-4848.171913
14. Brennan MD, Powell C, Kaufman KR, Sun PC, Bahn RS, Nair KS. The impact of overt and subclinical hyperthyroidism on skeletal muscle. *Thyroid*. 2006;16(4):375-380. doi:10.1089/thy.2006.16.375
15. Vigário PDS, de Oliveira Chachamovitz DS, Cordeiro MFN, et al. Effects of physical activity on body composition and fatigue perception in patients on thyrotropin-suppressive therapy for differentiated thyroid carcinoma. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*. 2011;21(7):695-700. doi:10.1089/THY.2010.0052
16. Zhou J, Parker DC, White JP, et al. Thyroid hormone status regulates skeletal muscle response to chronic motor nerve stimulation. *Frontiers in Physiology*. 2019;10(OCT):1363. doi:10.3389/fphys.2019.01363
17. Frontera WR, Ochala J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Behavior Genetics*. 2015;45(2):183-195. doi:10.1007/s00223-014-9915-y
18. Tortora, Gerard J. Derrickson B. Tejido Muscular. In: *Principios de Anatomía y Fisiología*. Vol 13a. 13a ed. Panamericana; 2013:1340.
19. Wolfe RR. The underappreciated role of muscle in health and disease. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2006;84(3):475-482.
20. Gregorio CC, Antin PB. To the heart of myofibril assembly. In: *Trends in Cell Biology*. Vol 10; 2000:355-362. doi:10.1016/S0962-8924(00)01793-1
21. Luther PK. Three-dimensional structure of a vertebrate muscle Z-band: Implications for titin and α -actinin binding. *Journal of Structural Biology*. Published online 2000. doi:10.1006/jsbi.1999.4207
22. Moore KL, Dalley AF, Argur A. Muscle Tissue and Muscular System. In: Aruna S, Sivakumar M, eds. *Clinically Oriented Anatomy*. 6th ed.; 2010:28-30. Accessed November 13, 2021.
23. Lange S, Ehler E, Gautel M. From A to Z and back? Multicompartment proteins in the sarcomere. *Trends in Cell Biology*. 2006;16(1):11-18. doi: 10.1016/j.tcb.2005.11.007
24. Scott W, Stevens J, Binder-Macleod SA. Human skeletal muscle fiber type classifications. *Physical Therapy*. 2001;81(11):1810-1816. doi:10.1093/ptj/81.11.1810

25. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in Mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews*. 2011;91(4):1447-1531. doi:10.1152/physrev.00031.2010
26. Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metabolism*. 2013;17(2):162-184. doi: 10.1016/j.cmet.2012.12.012
27. Yan Z, Okutsu M, Akhtar YN, Lira VA. Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*. 2011;110(1):264-274. doi:10.1152/jappphysiol.00993.2010
28. Caiozzo VJ, Haddad F, Baker M, Mccue S, Baldwin KM. MHC polymorphism in rodent plantaris muscle: Effects of mechanical overload and hypothyroidism. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2000;278(4 47-4):709-717. doi:10.1152/ajpccell.2000.278.4.c709
29. Silverthorn DU. *Anatomía Y Fisiología Fisiología Humana. Un Enfoque Integrado*. 8va ed. (Panamericana M, ed.); 2019.
30. Miller MS, Palmer BM, Toth MJ, Warshaw DM. Muscle: Anatomy, physiology, and biochemistry. In: *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology*. 10a ed. Elsevier Inc.; 2017:66-77. doi:10.1016/b978-0-323-31696-5.00005-x
31. Guyton C, Hall J. Contracción del músculo esquelético. In: *Tratado De Fisiología Médica*. Vol 13a. 13a ed. Elsevier; 2016:2924. doi:10.1007/s12369-009-0019-1
32. Rebbeck RT, Karunasekara Y, Board PG, Beard NA, Casarotto MG, Dulhunty AF. Skeletal muscle excitation-contraction coupling: who are the dancing partners? *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2014;48(1):28-38. doi: 10.1016/J.BIOCEL.2013.12.001
33. Berchtold MW, Brinkmeier H, Müntener M. Calcium ion in skeletal muscle: Its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiological Reviews*. Published online 2000. doi:10.1152/physrev.2000.80.3.1215
34. Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy Research and Technique*. 2000;50(6):500-509. doi:10.1002/1097-0029(20000915)50:6<500: AID-JEMT7>3.0.CO;2-7
35. McMahon S, Jenkins D. Factors affecting the rate of phosphocreatine resynthesis following intense exercise. *Sports Medicine*. Published online 2002. doi:10.2165/00007256-200232120-00002
36. Guimarães-Ferreira L. Role of the phosphocreatine system on energetic homeostasis in skeletal and cardiac muscles. *Einstein (São Paulo, Brazil)*. 2014;12(1):126-131. doi:10.1590/S1679-45082014RB2741

37. Ohlendieck K. Proteomics of skeletal muscle glycolysis. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*. 2010;1804(11):2089-2101. doi: 10.1016/j.bbapap.2010.08.001
38. Gnaiger E. Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle. New perspectives of mitochondrial physiology. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2009;41(10):1837-1845. doi: 10.1016/j.biocel.2009.03.013
39. Miller MS, Palmer BM, Toth MJ, Warshaw DM. Muscle: Anatomy, physiology, and biochemistry. In: *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology*. 10a ed. Elsevier Inc.; 2017:66-77. doi:10.1016/b978-0-323-31696-5.00005-x
40. Fekete C, Lechan RM. Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocrine Reviews*. 2014;35(2):159-194. doi:10.1210/er.2013-1087
41. de Gortari P, Joseph-Bravo P. Las neuronas TRHérgicas como reguladores de la homeostasis energética. *Medicina Universitaria*. 2009;11(42):36-43.
42. Joseph-Bravo P, Jaimes-Hoy L, Uribe RM, Charli JL. TRH, the first hypophysiotropic releasing hormone isolated: control of the pituitary–thyroid axis. *Journal of Endocrinology*. 2015;226(2): T85-T100. doi:10.1530/JOE-15-0124
43. Joseph-Bravo P, Jaimes-Hoy L, Charli JL. Erratum to Regulation of TRH neurons and energy homeostasis-related signals under stress [Journal of Endocrinology, 224, part 3, (2015), R139-R159]. *Journal of Endocrinology*. 2015;227(3):X1. doi:10.1530/JOE-14-0593e
44. Bianco AC, Dumitrescu A, Gereben B, et al. Paradigms of Dynamic Control of Thyroid Hormone Signaling. *Endocrine Reviews*. 2019;40(4):1000-1047. doi:10.1210/er.2018-00275
45. van der Spek AH, Fliers E, Boelen A. The classic pathways of thyroid hormone metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2017; 458:29-38. doi: 10.1016/J.MCE.2017.01.025
46. Friesema ECH, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(41):40128-40135. doi:10.1074/jbc.M300909200
47. Ambrosio R, de Stefano MA, di Girolamo D, Salvatore D. Thyroid hormone signaling and deiodinase actions in muscle stem/progenitor cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2017; 459:79-83. doi: 10.1016/j.mce.2017.06.014

48. Mayerl S, Schmidt M, Doycheva D, et al. Thyroid Hormone Transporters MCT8 and OATP1C1 Control Skeletal Muscle Regeneration. *Stem Cell Reports*. 2018;10(6):1959-1974. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.03.021
49. Groeneweg S, van Geest FS, Peeters RP, Heuer H, Visser WE. Thyroid Hormone Transporters. *Endocrine Reviews*. 2019;41(2). doi:10.1210/edrev/bnz008
50. Anyetel-Anum CS, Roggero VR, Allison LA. Thyroid hormone receptor localization in target tissues. *Journal of Endocrinology*. 2018;237(1): R19-R34. doi:10.1530/JOE-17-0708
51. Schuler MJ, Pette D. Quantification of thyroid hormone receptor isoforms, 9-cis retinoic acid receptor gamma, and nuclear receptor co-repressor by reverse-transcriptase PCR in maturing and adult skeletal muscles of rat. *European Journal of Biochemistry*. 1998;257(3):607-614. doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2570607.x
52. Haddad F, Qin AX, McCue SA, Baldwin KM. Thyroid receptor plasticity in striated muscle types: Effects of altered thyroid state. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 1998;274(6 37-6).
53. Yen PM. Physiological and molecular basis of Thyroid hormone action. *Physiological Reviews*. 2001;81(3):1097-1142. doi:10.1152/physrev.2001.81.3.1097
54. Branvold DJ, Allred DR, Beckstead DJ, et al. Thyroid hormone effects on LKB1, MO25, phospho-AMPK, phospho-CREB, and PGC-1 α in rat muscle. *Journal of Applied Physiology*. 2008;105(4):1218-1227. doi:10.1152/jappphysiol.00997.2007
55. Carmody C, Ogawa-Wong AN, Martin C, et al. A Global Loss of Dio2 Leads to Unexpected Changes in Function and Fiber Types of Slow Skeletal Muscle in Male Mice. *Endocrinology*. 2019;160(5):1205-1222. doi:10.1210/en.2019-00088
56. Schuler MJ, Buhler S, Pette D. Effects of contractile activity and hypothyroidism on nuclear hormone receptor mRNA isoforms in rat skeletal muscle. *European Journal of Biochemistry*. 1999;264(3):982-988. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00706.x
57. Muscat GEO, Downes M, Dowhan DH. Regulation of vertebrate muscle differentiation by thyroid hormone: The role of the myoD gene family. *BioEssays*. Published online 1995. doi:10.1002/bies.950170307
58. Bentzinger C, Wang YX, Rudnicki M. Building Muscle: Molecular Regulation of myogenesis. *ZEF Working Paper Series*. 2012;94(July):32.
59. Schultz E, McCormick KM. Skeletal muscle satellite cells. *Reviews of physiology, biochemistry, and pharmacology*. 1994; 123:213-257. doi:10.1007/BFB0030904
60. Blaauw B, Schiaffino S, Reggiani C. Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. *Comprehensive Physiology*. 2013;3(4):1645-1687. doi:10.1002/cphy.c130009

61. Larsson L, Li X, Teresi A, Salviati G. Effects of thyroid hormone on fast- and slow-twitch skeletal muscles in young and old rats. *The Journal of Physiology*. 1994;481(Pt 1):149. doi:10.1113/JPHYSIOL.1994.SP020426
62. Hood DA, Irrcher I, Ljubicic V, Joseph AM. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *Journal of Experimental Biology*. Published online 2006. doi:10.1242/jeb.02182
63. Bishop DJ, Botella J, Genders AJ, et al. High-intensity exercise, and mitochondrial biogenesis: Current controversies and future research directions. *Physiology*. 2019;34(1):56-70. doi:10.1152/physiol.00038.2018
64. Wulf A, Harneit A, Kröger M, Kebenko M, Wetzel MG, Weitzel JM. T3-mediated expression of PGC-1 α via a far upstream located thyroid hormone response element. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2008;287(1-2):90-95. doi:10.1016/j.mce.2008.01.017
65. Pilegaard H, Saltin B, Neufer DP. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. *Journal of Physiology*. Published online 2003. doi:10.1113/jphysiol.2002.034850
66. de Meis L. Role of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase on heat production and thermogenesis. *Bioscience Reports*. 2001;21(2):113-137. doi:10.1023/A:1013640006611
67. de Lange P, Feola A, Ragni M, et al. Differential 3,5,3'-triiodothyronine-mediated regulation of uncoupling protein 3 transcription: Role of fatty acids. *Endocrinology*. 2007;148(8):4064-4072. doi:10.1210/en.2007-0206
68. Girousse A, Tavernier G, Tiraby C, et al. Transcription of the human uncoupling protein 3 gene is governed by a complex interplay between the promoter and intronic sequences. *Diabetologia*. 2009;52(8):1638-1646. doi:10.1007/s00125-009-1385-9
69. Flandin P, Lehr L, Asensio C, et al. Uncoupling protein-3 as a molecular determinant of the action of 3,5,3'-triiodothyronine on energy metabolism. *Endocrine*. 2009;36(2):246-254. doi:10.1007/s12020-009-9217-8
70. Dümmler K, Müller S, Seitz HJ. Regulation of adenine nucleotide translocase and glycerol 3-phosphate dehydrogenase expression by thyroid hormones in different rat tissues. *The Biochemical journal*. 1996;317(Pt3):913-918. doi:10.1042/BJ3170913
71. Ezaki O. Regulatory elements in the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997;241(1):1-6. doi:10.1006/bbrc.1997.7587

72. Weinstein SP, O'Boyle E, Haber RS. Thyroid hormone increases basal and insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle: The role of GLUT4 glucose transporter expression. *Diabetes*. 1994;43(10):1185-1189. doi:10.2337/diab.43.10.1185
73. Baskin KK, Winders BR, Olson EN. Muscle as a " mediator" of systemic metabolism. *Cell metabolism*. 2015;21(2):237-248. doi: 10.1016/j.cmet.2014.12.021
74. Uribe RM, Jaimes-Hoy L, Ramírez-Martínez C, et al. Voluntary exercise adapts the hypothalamus- Pituitary-Thyroid axis in male rats. *Endocrinology*. 2014;155(5):2020-2030. doi:10.1210/en.2013-1724
75. Farenia R, Lesmana R, Uchida K, Iwasaki T, Koibuchi N, Shimokawa N. Changes in biomarker levels and myofiber constitution in rat soleus muscle at different exercise intensities. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2019;458(1-2):79-87. doi:10.1007/s11010-019-03532-9
76. Bocco BMLC, Louzada RAN, Silvestre DHS, et al. Thyroid hormone activation by type 2 deiodinase mediates exercise-induced peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α expression in skeletal muscle. *Journal of Physiology*. 2016;594(18):5255-5269. doi:10.1113/JP272440
77. Little JP, Safdar A, Cermak N, Tarnopolsky MA, Gibala MJ. Acute endurance exercise increases the nuclear abundance of PGC-1 α in trained human skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. Published online 2010. doi:10.1152/ajpregu.00409.2009
78. Lesmana R, Iwasaki T, Iizuka Y, Amano I, Shimokawa N, Koibuchi N. The change in thyroid hormone signaling by altered training intensity in male rat skeletal muscle. *Endocrine Journal*. 2016;63(8):727-738. doi:10.1507/endocrj. EJ16-0126
79. Kim K, Kim YH, Lee SH, Jeon MJ, Park SY, Doh KO. Effect of exercise intensity on unfolded protein response in skeletal muscle of rat. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*. 2014;18(3):211-216. doi:10.4196/kjpp.2014.18.3.211
80. de la Cruz Natalia. *Efecto Del Ejercicio Crónico En Ratas Adultas Con Estrés Neonatal Sobre La Regulación Del AMPK, PGC-1 α y UCP-3 En Tejido Músculo Esquelético*. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos; 2015.
81. Aguer C, Fiehn O, Seifert EL, et al. Muscle uncoupling protein 3 overexpression mimics endurance training and reduces circulating biomarkers of incomplete β -oxidation. *FASEB Journal*. 2013;27(10):4213-4225. doi:10.1096/fj.13-234302
82. Gurley JM, Griesel BA, Olson AL. Increased skeletal muscle GLUT4 expression in obese mice after voluntary wheel running exercise is posttranscriptional. *Diabetes*. 2016;65(10):2911-2919. doi:10.2337/db16-0305

83. Giammanco M, di Liegro CM, Schiera G, di Liegro I. Genomic and non-genomic mechanisms of action of thyroid hormones and their catabolite 3,5-diiodo-l-thyronine in Mammals. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(11):1-40. doi:10.3390/ijms21114140
84. Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2008;29(2):211-218. doi: 10.1016/j.yfrne.2007.09.003
85. Incerpi S, Davis PJ, Pedersen JZ, Lanni A. Nongenomic Actions of Thyroid Hormones. In: Springer, Cham; 2016:1-26. doi:10.1007/978-3-319-27318-1_32-1
86. Warnick PR, Davis PJ, Davis FB, Cody V, Jose G, Blas SD. Rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity: stimulation in vitro by thyroid hormone analogues and bipyridines. *BBA - Biomembranes*. 1993;1153(2):184-190. doi:10.1016/0005-2736(93)90404-N
87. Incerpi S, de Vito P, Z. Pedersen J, Luly P. Extranuclear Effects of Thyroid Hormones in Skeletal Muscle. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry*. 2012;11(3):188-198. doi:10.2174/187152211796642819
88. Brodie C, Sampson SR. Characterization of thyroid hormone effects on na-k pump and membrane potential of cultured rat skeletal myotubes. *Endocrinology*. 1988;123(2):891-897. doi:10.1210/endo-123-2-891
89. Davis PJ, Davis FB. Nongenomic actions of thyroid hormone. In: *Thyroid*. Vol 6. Mary Ann Liebert Inc.; 1996:497-504. doi:10.1089/thy.1996.6.497
90. Sayen MR, Rohrer DK, Dillmann WH. Thyroid hormone response of slow and fast sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase mRNA in striated muscle. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1992;87(1-3):87-93. doi:10.1016/0303-7207(92)90236-Y
91. Segal J. In vivo effect of 3, 5, 3'-triiodothyronine on calcium uptake in several tissues in the rat: Evidence for a physiological role for calcium as the first messenger for the prompt action of thyroid hormone at the level of the plasma membrane. *Endocrinology*. 1990;127(1):17-24. doi:10.1210/endo-127-1-17
92. Gotzsche L. L-Triiodothyronine acutely increases Ca²⁺ uptake in the isolated perfused heart. *European Journal of Endocrinology*. 1994;130(9):171-179.
93. Wang YG, Dedkova EN, Fiening JP, Ojamaa K, Blatter LA, Lipsius SL. Acute exposure to thyroid hormone increases Na⁺ current and intracellular Ca²⁺ in cat atrial myocytes. *Journal of Physiology*. 2003;546(2):491-499. doi:10.1113/jphysiol.2002.032847
94. Clausen T. Na⁺-K⁺ pump regulation and skeletal muscle contractility. *Physiological Reviews*. 2003;83(4):1269-1324. doi:10.1152/physrev.00011.2003

95. Craelius W, Green W, Harris Dr. Acute effects of thyroid hormone on sodium currents in neonatal myocytes. *Bioscience Reports*. 1990;10(3):309-315. doi:10.1006/jmcc.1998.0930
96. Lin HY, Tang HY, Davis FB, et al. Nongenomic regulation by thyroid hormone of plasma membrane ion and small molecule pumps - PubMed. *Discovery medicine*. 2012;14(76):199-206. Accessed September 19, 2021.
97. Bloise FF, Oliveira TS, Cordeiro A, Ortiga-Carvalho TM. Thyroid hormones play role in sarcopenia and myopathies. *Frontiers in Physiology*. 2018;9(MAY):1-7. doi:10.3389/fphys.2018.00560
98. Arnold JC, Salvatore MF. Getting to Compliance in Forced Exercise in Rodents: A Critical Standard to Evaluate Exercise Impact in Aging-related Disorders and Disease. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. 2014;90(90):51827. doi:10.3791/51827
99. Ríos-Kristjánsson JG, Rizo-Roca D, Kristjánsdóttir KM, et al. A three-criteria performance score for rats exercising on a running treadmill. *Plos One*. 2019;14(7): e0219167. doi: 10.1371/journal.pone.0219167
100. Bianco AC, Anderson G, Forrest D, et al. American thyroid association guide to investigating thyroid hormone economy and action in rodent and cell models. *Thyroid*. 2014;24(1):88-168. doi:10.1089/thy.2013.0109
101. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nature Protocols*. 2006;1(2):581-585. doi:10.1038/nprot.2006.83
102. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001;29(9): e45. doi:10.1093/nar/29.9. e45
103. Contarteze RVL, Machado FDB, Gobatto CA, de Mello MAR. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*. 2008;151(3):415-422. doi: 10.1016/j.cbpa.2007.03.005
104. Yan-Yan Chan C, Kendig M, Boakes RA, Rooney K. Low-volume exercise can prevent sucrose-induced weight gain but has limited impact on metabolic measures in rats. *European Journal of Nutrition*. 2013;52(7):1721-1732. doi:10.1007/s00394-012-0475-5
105. Ortolani D, Oyama LM, Ferrari EM, Melo LL, Spadari-Bratfisch RC. Effects of comfort food on food intake, anxiety-like behavior and the stress response in rats. *Physiology and Behavior*. 2011;103(5):487-492. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.03.028

106. Dantas EM, Pimentel EB, Gonçalves CP, Lunz W, Rodrigues SL, Mill JG. Effects of chronic treadmill training on body mass gain and visceral fat accumulation in overfed rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2010;43(5):515-521. doi:10.1590/S0100-879X2010000500014
107. Leigh SJ, Kaakoush NO, Escorihuela RM, Westbrook RF, Morris MJ. Treadmill exercise has minimal impact on obesogenic diet-related gut microbiome changes but alters adipose and hypothalamic gene expression in rats. *Nutrition & Metabolism*. 2020;17(1). doi:10.1186/S12986-020-00492-6
108. Gopalan V, Yaligar J, Michael N, et al. A 12-week aerobic exercise intervention results in improved metabolic function and lower adipose tissue and ectopic fat in high-fat diet fed rats. *Bioscience Reports*. 2021;41(1). doi:10.1042/BSR20201707
109. Park SH, Song M. Effects of aerobic and anaerobic exercise on spatial learning ability in hypothyroid rats: a pilot study. *Journal of Physical Therapy Science*. 2016;28(12):3489-3492. doi:10.1589/jpts.28.3489
110. Giacco A, Delli Paoli G, Simiele R, et al. Exercise with food withdrawal at thermoneutrality impacts fuel use, the microbiome, AMPK phosphorylation, muscle fibers, and thyroid hormone levels in rats. *Physiological Reports*. 2020;8(3):1-17. doi:10.14814/phy2.14354
111. Fortunato RS, Ignácio DL, Padron AS, et al. The effect of acute exercise session on thyroid hormone economy in rats. *Journal of Endocrinology*. 2008;198(2):347-353. doi:10.1677/JOE-08-0174
112. Mebis L, Paletta D, Debaveye Y, et al. Expression of thyroid hormone transporters during critical illness. *European Journal of Endocrinology*. 2009;161(2):243-250. doi:10.1530/EJE-09-0290
113. Marschner RA, Banda P, Wajner SM, Markoski MM, Schaun M, Lehnen AMH. Short-term exercise training improves cardiac function associated to a better antioxidant response and lower type 3 iodothyronine deiodinase activity after myocardial infarction. *PLOS ONE*. 2019;14(9): e0222334. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0222334
114. Everts ME. Effects of thyroid hormones on contractility and cation transport in skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1996;156(3):325-333. doi:10.1046/j.1365-201X.1996.203000.x
115. Bhat MB, Zhao J, Zang W, et al. Caffeine-induced release of intracellular Ca²⁺ from chinese hamster ovary cells expressing skeletal muscle ryanodine receptor: Effects on full-length and carboxyl-terminal portion of Ca²⁺ release channels. *Journal of General Physiology*. 1997;110(6):749-762. doi:10.1085/jgp.110.6.749

Cuernavaca, Mor., 03 de marzo de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Análisis de la señalización de hormonas tiroideas en el músculo esquelético en un modelo de ejercicio aeróbico crónico**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna María Teresa Torres Solís. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. Gabriela Castañeda Corral



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GABRIELA CASTAÑEDA CORRAL | Fecha:2022-03-15 16:42:36 | Firmante

MI9/0rzEUy+27HtELtEUDFij5CQxeTIVsoBt2CxKTwMISvrowVtXS0+5BIKovRII3VpLJdE/YBsWtxaZg0Clzp52FB9rRGkdkAaUjlrTMUZE4RrHX5cLwDEQg2sYjfKeyeuSatULpkoqc02524UQYDXp5DuwGD4nuoth+SiLGIaOF5LZbR4FeTldy6/Sil+HqXN54QDgJX2GPKqsMqipDfqtUkLPPW/bhWj9VcWMEkK+eYbGUwVjJ0dq/dokM6dbwKU81rqqWQjyHAuu+2BEVsf0rEc/YaMdCHUzZW37yri9c6WZPFVDuOWLjcG77eIDjQzNsQ0gOO5L62HX0mg36Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



J0nY9WCHT

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/8VZcajAIErRI0Ofzq6gHjblpcRfCCJRU>



Cuernavaca, Mor., 03 de marzo de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Análisis de la señalización de hormonas tiroideas en el músculo esquelético en un modelo de ejercicio aeróbico crónico**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna María Teresa Torres Solís. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ | Fecha:2022-03-28 18:23:56 | Firmante

AvIHhVHIREWuaCrwxQdPlitbZCu6ZpRi8/UqQhw/cw4OfFaQbSyZIXkn+v2uCyRLy4y470D8m5d9qH7p0DxxTzULOE9l/HQ8llWKb2VmaGBT/ZUWIS8ldlistsAZF0h3G2uuf0lz5Gq
KU9luCJU15Mp8R3ImEYjhoK18JICg+/XSOPeOmFrp7H+67Lhm2tBAFeLWRTfH0ubqbPJH+6l2vynHjY6CmA6jwYUqo9kR6Lrucu6usu0SQkCLw11GUJ8w7Kj1XeVIs1tYaQedJw1
qqIY4EhqeEQ0qqoE9lgb+dMLTr/Y8opta0sRPG7K36lwH5LLMi9GyCfYIDsWSgsRobA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[rt2QuKifW](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/yvmQX1UBhleFfuWuh1G0f0S5jkvyMDOo>



Cuernavaca, Mor., 03 de marzo de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Análisis de la señalización de hormonas tiroideas en el músculo esquelético en un modelo de ejercicio aeróbico crónico**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna María Teresa Torres Solís. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Juan José Acevedo Fernández



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUAN JOSE ACEVEDO FERNANDEZ | Fecha:2022-03-15 15:38:38 | Firmante

bboquhjAu8p99wyHp5ltuh6nTANL5clEI0n/+sDgnHomCgZJ2tqpd3yZmZPHP8aPM2HdJZY5cJ3UI/27qT0eUzhJ9MqNTToUFR8zKaHzmJMPNPDCxfidAjcHqbZdtpVCqLVjR8C4apUKIUweQct2DTkHs/fHekKWSNVm1W3R59Wf8StnLaJlymQr2bPupimzT8HdsC8Xw2lGfUgTmpiruWs7QY6C2ghkfc4dkFypQtLUFUH6q42QP4G9NtsmXW0QahExz5Gh3WWzq/ZxitbgZ86xLhtsDUvb132L9qfv+YlxVeTJ2KgA8RUa3/8pnHsy2Nz3Hj4mkONOUkj+mvHA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



bQGvDrku3

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/cp9r2LznjbPosW4ZN7hPqq0DKLdc0CjH>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 03 de marzo de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Análisis de la señalización de hormonas tiroideas en el músculo esquelético en un modelo de ejercicio aeróbico crónico**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna María Teresa Torres Solís. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes Hoy



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ELIZABETH LORRAINE JAIMES HOY | Fecha:2022-03-15 15:51:06 | Firmante

CNMz7jK8YJkzWUqVp6elNijWMjLHJ7IP6Q4xG2uMw3WXVWQcXUY9j1DcFUBkrVhNHZcvEuFif0Nj8veaDR30luOdEcuBI38Wtb5NzmCbF2Qn4/cjobMa2OU/dLPb5EksUfrdQNCx7FXR2pa/HUVX9VmCdkkoPAvCVP7Mwi6Ugtn/bqp2DzP0pS11vHZtepzUDLhf9/ptAiXnT7RqKbP4Ij/9bwlI79Zhr3EhTU44CFimWmFmtgQd9Fsop9v1XnE3WZY9Vr0ey11mJzqlf5UrJXDj9T1ABCoLGEyZeJlfy2bwID4SAzPhqPTCSTf/HF9/69C6uZhM6xY1150UPZHQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



95vXLJIFS

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ULmjSDjGIONxes6DoyntFtS7ZhICcJN0A>

