



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

EFFECTO DE LA APOCININA Y EL EJERCICIO SOBRE EL ESTRÉS OXIDANTE EN EL MÚSCULO CARDÍACO DE RATAS DIABÉTICAS

T E S I S

Para obtener el título de
Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Presenta:

Q.F.B. Kenia Yesenia Peñaloza López

Directora de Tesis:

D.C. Rocío del Carmen Montoya Pérez

Codirector de Tesis:

D.C. Francisco Alfredo Saavedra Molina



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS
UMSNH**

Morelia Michoacán, febrero del 2023.

CONTENIDO	
Tema	Página
1. RESUMEN	7
ABSTRACT	8
2. ANTECEDENTES	9
2.1. Diabetes	9
2.1.1. Clasificación	9
Diabetes mellitus tipo I	10
Diabetes mellitus tipo II	10
Diabetes mellitus Gestacional	10
Diabetes tipo MODY	10
2.2. Fisiología del Corazón	11
2.2.1. Músculo Cardíaco	12
2.3. Estrés oxidante en la diabetes mellitus	16
2.4. Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)	18
2.4.1. Componentes del sistema NADPH – Oxidasa	18
2.5. Genes que intervienen en la patogénesis de la diabetes mellitus	21
2.6. Apocinina	22
2.7. La importancia del ejercicio en personas diabéticas	24
2.7.1. Tipos de protocolo de ejercicio físico	24
Ejercicio continuo de moderada intensidad	25
Ejercicio de sobrecarga	25
Ejercicio con intervalos de alta intensidad	26
Ejercicio concurrente	27
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVOS	28
6. MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1. Inducción de diabetes experimental	29
6.2. Protocolo de entrenamiento	29
6.3. Biomarcadores metabólicos	29
6.4. Prueba de resistencia a la Insulina	30

6.5.	Disección de músculos cardíacos	30
6.6.	Análisis de marcadores de estrés oxidante	30
6.6.1.	Medición de los niveles de Especies Reactivas de Oxígeno	30
6.6.2.	Medición de peroxidación de lípidos	31
6.6.3.	Medición de glutatión	31
6.7.	Ensayo de expresión de genes	31
7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
8.	RESULTADOS	33
8.1.	Efecto de la apocinina y el ejercicio sobre el peso corporal y los niveles de glucosa sanguínea basal en músculo cardíaco	33
8.2.	Efecto de la apocinina y el ejercicio sobre los niveles de glucosa sanguínea en la prueba de resistencia a la insulina en el músculo cardíaco	34
8.3.	Efecto de la apocinina y el ejercicio en los niveles de ERO en el músculo cardíaco	36
8.4.	Efecto de la apocinina y el ejercicio en los niveles de peroxidación de lípidos en el músculo cardíaco	36
8.5.	Efecto de la apocinina y el ejercicio en los niveles de glutatión en el músculo cardíaco	37
8.6.	Efecto de la apocinina y el ejercicio en los niveles de la actividad de catalasa en el músculo cardíaco.	40
8.7.	Efecto de la apocinina y el ejercicio en la expresión genética presente en el músculo cardíaco.	41
9.	DISCUSIÓN	45
10.	CONCLUSIONES	53
11.	REFERENCIAS	54

ÍNDICE DE FIGURAS	
Figura	Página
Figura 1. Localización del corazón en la cavidad torácica humana	11
Figura 2. Fisiología del corazón	12
Figura 3. Corte transversal de un corazón donde se muestran los tipos de células que lo forman	14
Figura 4. Circulación sanguínea	15
Figura 5. Consecuencias de aumento del estrés oxidante en el organismo	17
Figura 6. Estructura de la NADPH Oxidasa	19
Figura 7. Isoformas de NOX	20
Figura 8. Peso corporal de los diferentes grupos de ratas	33
Figura 9. Niveles de glucosa en ayuno de los diferentes grupos de ratas	34
Figura 10. Niveles de glucosa de los diferentes grupos de ratas en la prueba de resistencia a la insulina	35
Figura 11. Área bajo la curva de la prueba de resistencia a la insulina	35
Figura 12. Niveles de ERO en el corazón de los diferentes grupos de ratas	36
Figura 13. Niveles de peroxidación de lípidos en el corazón de los diferentes grupos de ratas	37
Figura 14. Niveles de glutatión total en el corazón de los diferentes grupos de ratas	38
Figura 15. Niveles de glutatión reducido (GSH) en el corazón de los diferentes grupos de ratas	39
Figura 16. Niveles de glutatión oxidado (GSSG) en el corazón de los diferentes grupos de ratas	39
Figura 17. Niveles de la relación glutatión reducido (GSH)/ glutatión oxidado (GSSG) en el corazón de los diferentes grupos de ratas	40
Figura 18. Niveles de la actividad de catalasa (CAT) en el corazón de los diferentes grupos de ratas	41
Figura 19. Niveles de expresión genética de NOX2 en el corazón de los diferentes grupos de ratas	42
Figura 20. Niveles de expresión genética de NOX4 en el corazón de los diferentes grupos de ratas	43
Figura 21. Niveles de expresión genética de Nrf2 en el corazón de los diferentes grupos de ratas	43

Figura 22. Niveles de expresión genética de NF-κB en el corazón de los diferentes grupos de ratas	44
Figura 23. Niveles de expresión genética de GLUT4 en el corazón de los diferentes grupos de ratas	44
Figura 24. Niveles de expresión genética de catalasa (CAT) en el corazón de los diferentes grupos de ratas	45

INDICE DE TABLAS	
Tabla	Página
Tabla 1. Grupos de animales y condiciones a las que fueron sometidos	28
Tabla 2. Intervalos de velocidad y tiempo de ejercicio de los animales a estudiar	29
Tabla 3. Secuencia de los cebadores de PCR utilizados	32

A G R A D E M I E N T O S

A lo largo de este proyecto he contado con la ayuda y el apoyo de muchas personas a las cuales les debo mi gratitud.

Iniciaré agradeciendo a mi **directora de tesis**, por haberme brindado la oportunidad y la orientación necesaria para este proyecto y a mis sinodales por cada uno de sus comentarios, los cuales me ayudaron a mejorar cada día.

A **mis abuelos Carlota y Rafael**, ellos siempre han sido el impulso necesario para poder salir adelante y ser lo que soy ahora; les dedico a ustedes este logro como una meta más conquistada.

A **mis padres** que, a pesar de la distancia, siempre han estado a mi lado en mente y corazón en momentos tan importantes como lo es este. Estoy orgullosa y agradecida de haberlos elegido como mis padres.

Para **mi Antoñito**, muchas gracias por tu apoyo y constancia, tú has sido siempre el motor que alienta mis sueños y esperanzas, estuviste conmigo en los días y noches más difíciles durante mis horas de estudio y siempre creíste en mi aun cuando yo no lo hacía. Siempre has sido mi mejor guía de vida.

Finalmente, a **mis compañeros de laboratorio y amigos**, muchas gracias por sus múltiples palabras de aliento cuando más las necesite; gracias por sus orientaciones y por estar allí cuando a veces no salían bien las cosas.

Hoy toca cerrar un capítulo maravilloso lleno de nuevos conocimientos y grandes oportunidades, las cuales espero me lleven a ser una mejor profesionista y persona.

“La ciencia es más que un simple conjunto de conocimientos: es una manera de pensar”

Carl Sagan

1. RESUMEN

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por niveles elevados de glucosa en sangre resultante del mal funcionamiento de las células β del páncreas y la disminución de la sensibilidad de la insulina. En estado hiperglucémico, existe un incremento del estrés oxidante, el cual juega un papel importante en el desarrollo de complicaciones diabéticas en el tejido cardíaco. La apocinina es un compuesto aislado de la planta *Picrorhiza kurroa* que ha sido utilizado en estudios experimentales como un agente antioxidante debido a que sus acciones incluyen inhibir la generación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) por la NADPH oxidasa. Por otro lado, la actividad física ha demostrado beneficios en la disminución del estrés oxidante en la diabetes mellitus debido a que esta mejora la capacidad de los sistemas de defensa antioxidantes para disminuir los niveles de ERO lo que mejora el estado metabólico y la sensibilidad a la insulina. En este trabajo se analizó la influencia de la apocinina y el ejercicio de moderada intensidad sobre el estrés oxidante en el músculo cardíaco de ratas diabéticas. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar a las cuales se les midió la glucosa basal, la resistencia a la insulina y el peso corporal. Además, se utilizó un homogenado de musculo cardíaco para el análisis de los marcadores de estrés oxidante y evaluación de la expresión génica. Los resultados obtenidos mostraron una disminución significativa en los niveles glucémicos de los grupos diabéticos tratados con apocinina y ejercicio así como en los niveles de ERO y peroxidación de lípidos, mejorando así, la resistencia a la insulina. Además, se pudo demostrar una mejora en la defensa antioxidante en dichos grupos, al haber un aumento en los niveles de glutatión reductasa y catalasa. De igual manera, la apocinina y el ejercicio incrementaron los niveles de ARNm de Nrf2 y GLUT4 y disminuyeron los niveles de ARNm de NOX2, NOX4 y NF κ B. En conclusión, se puede determinar que la apocinina y el ejercicio de moderada intensidad tiene efectos significativos en los niveles de glucemia y resistencia a la insulina; además, mejora la actividad de la defensa antioxidante, reduciendo los niveles de ERO presentes en el musculo cardíaco de ratas diabéticas. Asimismo, se pudo observar que hubo una disminución de los niveles de NOX2, NOX4 y NF κ B mostrando así, su efecto a través de la inhibición del estrés oxidante.

Palabras clave: diabetes, apocinina, corazón, estrés oxidante, ejercicio.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a chronic metabolic disease characterized by elevated blood glucose levels resulting from the malfunction of the β -cells of the pancreas and decreased insulin sensitivity. In a hyperglycemic state, there is an increase in oxidative stress, which plays an essential role in the development of diabetic complications in cardiac tissue. Apocynin is a compound isolated from the plant *Picrorhiza kurroa* it has been used in experimental studies as an antioxidant agent because its actions include inhibiting the generation of reactive oxygen species (ROS) by NADPH oxidase. On the other hand, physical activity has shown benefits in decreasing oxidative stress in diabetes mellitus because it improves the ability of antioxidant defense systems to decrease ROS levels, which improves metabolic status and insulin sensitivity. In this study we analyzed the influence of apocynin and moderate-intensity exercise on oxidative stress in the cardiac muscle of diabetic rats. Male Wistar rats were used, and basal glucose, insulin resistance, and body weight were measured. A cardiac muscle homogenate was used for the analysis of oxidative stress markers and evaluation of gene expression. The results obtained showed a significant decrease in the glycemic levels of the diabetic groups treated with apocynin and exercise as well as in the levels of ROS and lipid peroxidation, thus improving insulin resistance. In addition, an improvement in antioxidant defense could be demonstrated in these groups, as there was an increase in glutathione reductase and catalase levels. Similarly, apocynin and exercise increased Nrf2 and GLUT4 mRNA levels and decreased NOX2, NOX4, and NF- κ B mRNA levels. In conclusion, it can be determined that apocynin and moderate-intensity exercise have significant effects on glycemia levels and insulin resistance; in addition, it improves the activity of the antioxidant defense, reducing the levels of ROS present in the cardiac muscle of diabetic rats. Likewise, it could be observed that there was a decrease in NOX2, NOX4 and NF- κ B levels, thus showing its effect through the inhibition of oxidative stress.

2. ANTECEDENTES

2.1. Diabetes

La diabetes mellitus (DM) se define como un grupo de alteraciones metabólicas que se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a un defecto en la secreción de la insulina, a un defecto en la acción de la misma, o ambas (*Rojas et al. 2012*). La hiperglucemia inducida por diabetes está relacionada con daño en varios órganos y asociada con enfermedades vasculares y cardíacas como la hipertensión arterial, la enfermedad de las arterias coronarias y la insuficiencia cardíaca, que son responsables de una mayor morbilidad y mortalidad (*ADA, 2017*).

La incidencia de DM está aumentando sustancialmente en todo el mundo (*Gimenes et al. 2018*). La diabetes es uno de los desafíos sanitarios de mayor crecimiento del siglo XXI: el número de adultos que vive con diabetes se ha triplicado durante los últimos 20 años. En 2021, aproximadamente 537 millones de adultos (20-79 años) viven con diabetes y causando 6.7 millones de muertes (*IDF, 2021*). La IDF calcula que el número total de personas que viven con diabetes aumente a 643 millones para 2030 y 783 millones para 2045 (*IDF, 2021*).

El envejecimiento, la urbanización y un estilo de vida poco saludable, como una dieta inadecuada y el sedentarismo, son los principales responsables de su mayor incidencia y prevalencia (*Gimenes et al. 2018*).

2.1.1. Clasificación

Los principales eventos subyacentes a la DM son la deficiencia de insulina, ya sea por la falla en el funcionamiento o por la disminución de las células β -pancreáticas, junto con un incremento en la *resistencia a la insulina*, la cual es definida como la incapacidad de la insulina para estimular de manera óptima el transporte de glucosa al interior de las células del cuerpo (*Roberts et al. 2013*), manifestada por una mayor producción hepática de glucosa y por la menor captación de glucosa en tejidos insulino-sensibles, particularmente el músculo esquelético y el tejido adiposo (*DeFronzo, 2009*).

Se han clasificado diversos tipos de diabetes, de las cuales, cuatro son de mayor prevalencia, principalmente a partir de síntomas clínicos: Diabetes tipo I o DM1 (diabetes mellitus insulino-dependiente), Diabetes tipo II o DM2 (diabetes no insulino-dependiente)

(Stevens y Lowe, 2001), Diabetes gestacional y Diabetes tipo MODY (del inglés: maturity onset diabetes of the young) (IDF, 2019; *Sánchez-Malo et al. 2019*).

Diabetes mellitus tipo 1 (DM1): su característica distintiva es la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, lo que ocasiona deficiencia absoluta de insulina, y tendencia a la cetoacidosis (*Rojas et al. 2012*). En la clasificación actual, la DM1 se subdivide en dos subtipos: la DM 1A o autoinmune y DM 1B o idiopática (*Conget, 2002*).

Diabetes mellitus tipo 2 (DM2): esta forma de DM corresponde a lo que anteriormente se denominaba DM no insulino-dependiente o del adulto (por encima de los 40 años). El carácter no insulino-dependiente de la enfermedad, únicamente hacía referencia al tratamiento requerido a lo largo de la historia natural de la enfermedad (*Conget, 2002*). Es la forma más común y con frecuencia se asocia a obesidad o incremento en la grasa visceral. El defecto va desde una resistencia predominante a la insulina, acompañada con una deficiencia relativa de la hormona, hasta un progresivo defecto en su secreción (*Rojas et al. 2012*).

Diabetes mellitus gestacional (DMG): Agrupa específicamente la intolerancia a la glucosa detectada por primera vez durante el embarazo. La hiperglucemia previa a las veinticuatro semanas del embarazo, se considera diabetes preexistente no diagnosticada. (*IADPSGCP, 2010*).

Diabetes tipo MODY: La diabetes tipo MODY, acrónimo que corresponde a *Maturity Onset Diabetes of the Young*, es una forma de diabetes monogénica caracterizada por una transmisión autosómica dominante, por presentar un inicio temprano y por asociarse a defectos de las células β que limitan la secreción de insulina. Hoy en día se han descrito 5 tipos (únicamente tres incluidos en la clasificación ADA, 1997) de diabetes tipo MODY, asociadas a mutaciones en diferentes localizaciones cromosómicas: factor nuclear hepático 4 α (MODY 1), en el gen que codifica para la enzima glucocinasa (MODY 2), factor nuclear hepático 1 α (MODY 3), en el factor promotor de la insulina 1 (MODY 4) y factor nuclear hepático 1 β (MODY 5) (*Conget, 2002*).

Este aumento de glucosa en sangre, ya sea por la resistencia o insuficiencia parcial o total de insulina, provoca diversas complicaciones en el organismo, afectando múltiples áreas del cuerpo, como los riñones, ojos, sistema nervioso, pies y el corazón.

2.2. Fisiología del corazón

El corazón es un órgano muscular impar y hueco, el que alberga cuatro cavidades en su interior.

Tiene una forma piramidal, con la base proyectada posterior y superiormente, y el vértice, llamado ápex, en dirección anterior e inferior. Se localiza en el mediastino antero-inferior, relacionándose arriba con los grandes vasos y la carina de la tráquea; por detrás también con los grandes vasos y el esófago; por debajo está en contacto con el diafragma; por delante se encuentra la pared torácica; y a los lados se relaciona con los pulmones (Figura 1) (Ramírez-Ramírez, 2009).

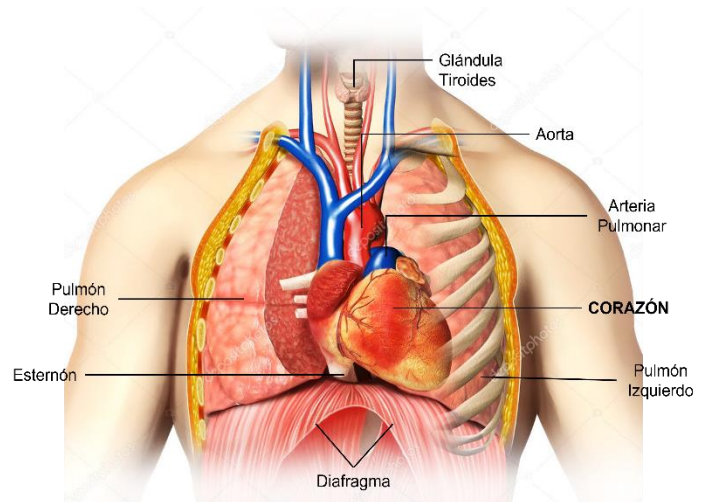
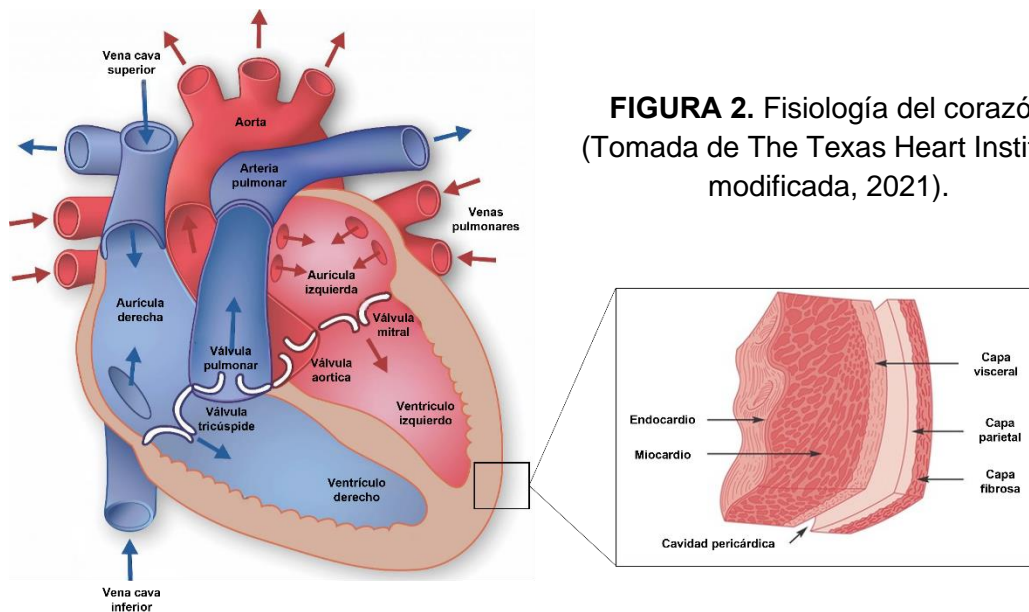


FIGURA 1. Localización del corazón en la cavidad torácica humana (Tomada de Calvetti, s.f.).

El corazón de un varón adulto pesa de 280 a 340 g y el de una mujer de 230 a 280 g. Sus cavidades se disponen en dos superiores, conocidas como aurículas o atrios, izquierdo y derecho, comunicándose con dos cavidades inferiores llamadas ventrículos a través de dos orificios que cuentan con un sistema valvular especializado. Estas cavidades están separadas entre sí, externamente por el surco interauricular e interventricular que se unen en la cruz del corazón, e internamente por el septum o tabique interauricular e interventricular que constan de una parte muscular y otra fibrosa (*De los Nietos, 2007*). La capa más interna, que recubre las cavidades, es llamada endocardio; inmediatamente después se encuentra el miocardio, formado por la mayoría de músculo cardíaco especializado en la función contráctil; la siguiente capa es el epicardio, que es una capa epitelial unicelular que recubre el miocardio; el pericardio, la capa más externa encierra y rodea el corazón con sus dos hojas, la capa parietal y la capa visceral (Figura 2) (Ramírez-Ramírez, 2009).

2.2.1. Músculo cardíaco

El músculo es el sistema de mayor tamaño del organismo. Consta de tres tipos diferentes de músculos; con base en factores como características morfológicas, vías de emisión de señales celulares, maneras de alterar la fuerza de la contracción, patrón de contracción (cíclico en contraposición con gradado), y la función del sistema nervioso en la función muscular. Los tres tipos de músculo son el **esquelético, cardíaco y liso**. El músculo cardíaco es el principal componente del corazón, y se contrae de una manera cíclica durante toda la vida del individuo (Raff y Levitzky, 2011).



Aunque el corazón está formado por músculo cardíaco, se pueden encontrar tres clases musculares diferentes:

- ✚ El músculo auricular.
- ✚ El músculo ventricular.
- ✚ Las fibras musculares excitadoras y conductoras especializadas.

El músculo cardíaco se contrae casi de la misma forma en que lo hace el músculo esquelético, la diferencia estriba en que la contracción del músculo cardíaco tiene una mayor duración. Las fibras excitadoras y conductoras especializadas se contraen débilmente, ya que no contienen demasiadas fibras contráctiles, su función es, por lo tanto, estimular y controlar el latido cardíaco. Las fibras musculares cardíacas se disponen

como un enrejado, se dividen y se vuelven a unir varias veces, poseen carácter estriado y contienen miofibrillas típicas que contienen filamentos de actina y de miosina casi idénticos a los del músculo esquelético. Las células musculares cardíacas se encuentran atravesadas por áreas oscuras, denominadas discos intercalares, membranas que separan a las células entre sí, cuya cualidad es la de ejercer 400 veces menos resistencia que el resto de la membrana muscular cardíaca, y al conjuntarse unas con otras forman uniones permeables y comunicantes conocidas como *GAP junctions* (del inglés: Uniones GAP), que permiten una difusión casi totalmente libre de los iones, hace que los potenciales de acción viajen de una célula miocárdica a la siguiente a través de los discos intercalares con escasos obstáculos. Por lo anterior, el músculo cardíaco forma un sincitio celular, al estar interconectadas de tal forma que cuando se excita una de estas células, el potencial de acción se extiende a todas ellas saltando de una célula a otra a través de las interconexiones del enrejado (*Ramírez-Ramírez, 2009*).

El corazón se compone de dos sincitios, el auricular y el ventricular, compuesto por las paredes de las aurículas y los ventrículos respectivamente, conectadas por las válvulas auriculoventriculares, el tejido que rodea estas válvulas es en realidad tejido fibroso que no permite la conducción directa de los potenciales del sincitio auricular al ventricular, así los potenciales solo pueden viajar de las aurículas a los ventrículos a través de un sistema de células especializadas, conocido como haz auriculoventricular; esta separación permite que las aurículas se contraigan un poco antes que los ventrículos, lo que representa una característica de gran importancia para el funcionamiento del corazón como bomba (*Ramírez-Ramírez, 2009*).

A nivel celular, el corazón está formado por diferentes tipos que contribuyen a sus propiedades estructurales, bioquímicas, mecánicas y eléctricas. De entre ellos destacan los cardiomiocitos, que ocupan la mayor parte del volumen tisular; y, sin embargo, contribuyen sólo al 30% del número total de células. Los cardiomiocitos se pueden clasificar en dos grupos: los auriculares y ventriculares, responsables de la contracción muscular, y los de conducción y excitación, fibras de Purkinje y células nodales que forman el haz de His y los nódulos sinoauricular y auriculoventricular, respectivamente, especializados en conducir el potencial de acción y excitar a los cardiomiocitos anteriores. El 70% de células restantes corresponde a fibroblastos cardíacos, la inmensa mayoría, así como a células endoteliales que forman el endocardio, las válvulas cardíacas y los conductos sanguíneos, y células del músculo liso que contribuyen al sistema vascular de entrada y salida del corazón, y a las arterias coronarias (Figura 3) (*Blasco, 2017*).

La principal función del corazón es la de proveer sangre a todos los tejidos. El ciclo que sigue la sangre es el siguiente: la aurícula derecha es la primera cámara cardiaca a donde llega la sangre, aquí desembocan las venas cavas superior e inferior y el seno coronario que trae el drenaje venoso del corazón, el atrio derecho se comunica con el ventrículo derecho, a través de un orificio que enmarca la válvula tricúspide, y de aquí la sangre sale por la arteria pulmonar para que sea oxigenada en los pulmones (circulación menor). La sangre una vez oxigenada regresa al atrio izquierdo por cuatro venas pulmonares y de aquí pasa hacia el ventrículo izquierdo atravesando la válvula mitral o bicúspide, el ventrículo izquierdo es el encargado de enviar la sangre hacia la circulación sistémica (circulación mayor).

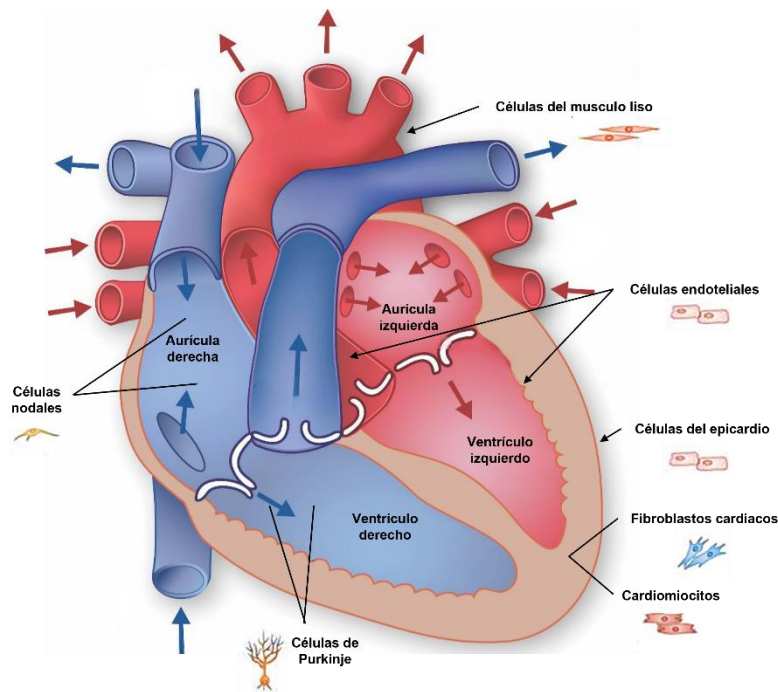


FIGURA 3. Corte transversal de un corazón. Se muestran las estructuras y los tipos de células que lo forman (Tomado de The Texas Heart Institute modificada, 2021).

Funcionalmente el corazón está formado por dos bombas, la que corresponde al corazón derecho encargada del flujo sanguíneo en la circulación menor y el corazón izquierdo que impulsa la sangre llevando a cabo la circulación mayor. Ambas bombas funcionan pulsátilmente, conformadas por una aurícula y un ventrículo, la función como bomba de las aurículas es mucho menor a la de los ventrículos, incluso se menciona que cumplen una función como “bombas cebadoras” ya que solo ayudan a mover la sangre al

interior del ventrículo. Es este quien proporciona la principal fuerza para movilizar el flujo sanguíneo ya sea pulmonar o sistémico (Ramírez-Ramírez, 2009).

La clave de esta circulación de la sangre a través de las cámaras cardiacas es la existencia de movimientos rítmicos y automáticos de contracción y relajación, llamados sístole y diástole. Durante la sístole, los ventrículos se contraen, reduciendo su tamaño y volumen por lo que la sangre contenida en ellos saldrá hacia sus respectivas arterias; la diástole, por lo contrario, consiste en una relajación del músculo cardíaco o miocardio, que provoca un aumento de volumen acompañado de una caída de la presión. Esto hace que la sangre que hay en las aurículas tienda a pasar libremente hacia los ventrículos para igualar la presión entre ambas cámaras, llenando otra vez los ventrículos y reiniciando de nuevo el ciclo (Figura 4) (Blasco, 2017).

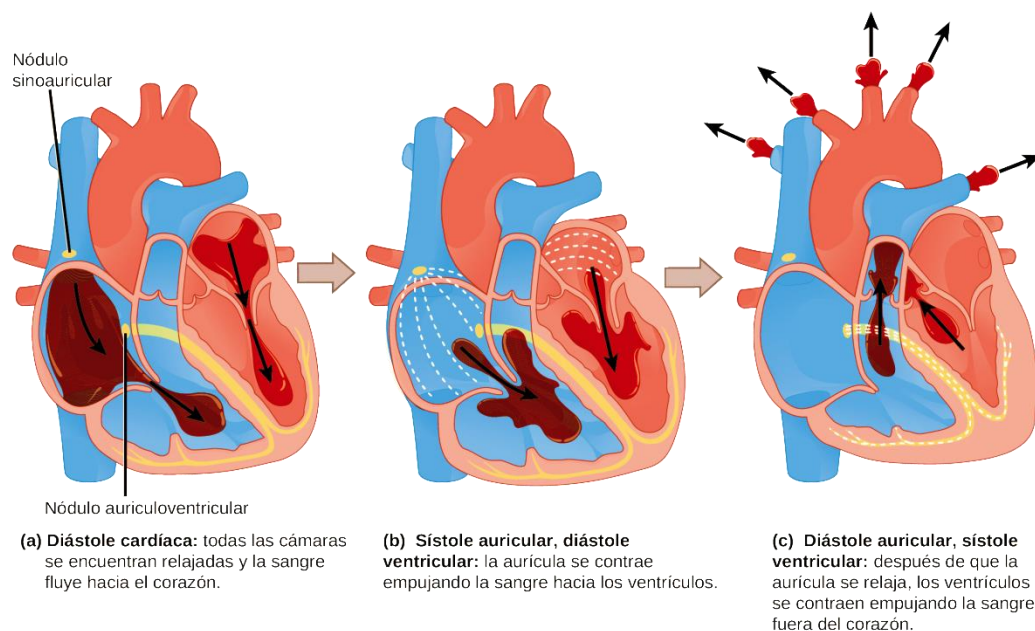


FIGURA 4. Circulación sanguínea. Se muestran los movimientos de sístole y diástole del corazón (Tomado de Blasco, 2017).

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la causa más frecuente de morbimortalidad en pacientes diabéticos. Los cambios asociados a la diabetes en la estructura y función del miocardio, que no están relacionados con la enfermedad de las arterias coronarias, la hipertensión arterial, la cardiopatía valvular o la cardiopatía congénita, se denominan *Miocardopatía Diabética*. Varios mecanismos están implicados

en la miocardiopatía diabética, incluidos cambios metabólicos, hipertrofia de miocitos, fibrosis intersticial miocárdica, apoptosis, enfermedad microvascular, disfunción autonómica, deterioro de la producción de energía, alteraciones de la homeostasis del calcio intracelular y deterioro de las proteínas contráctiles del miocardio (*Rojas et al. 2012*).

2.3. Estrés oxidante en la diabetes mellitus

El estrés oxidante (EO) es un desequilibrio entre la producción de ERO y la capacidad de los sistemas antioxidantes para contrarrestarlos (*Sies, 2015*).

En condiciones fisiológicas, existe un balance redox resultante de la interacción entre las ERO tales como el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\bullet), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (*Pisoschi y Pop, 2015; Toro y Rodrigo, 2009*) y de agentes antioxidantes enzimáticos como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), y antioxidantes no enzimáticos tales como el glutatión reducido o la vitamina C. No obstante, cuando se pierde el equilibrio del balance redox por una mayor generación de agentes oxidantes por sobre los agentes antioxidantes, se produce EO (*Toro y Rodrigo, 2009*). El EO de carácter crónico es dañino para la célula, ya que provoca oxidación de macromoléculas y genera cambios en las vías de señalización celular por modificaciones en el balance redox, alterando la función celular, además de poder inducir su muerte.

Hay dos mecanismos principales a través de los cuales el EO contribuye al desarrollo de diversas enfermedades. El primero involucra la producción de especies reactivas durante el EO, particularmente OH^\bullet , $ONOO^-$ y $HClO^\bullet$, que oxidan directamente macromoléculas, incluidos lípidos de membrana, proteínas estructurales, enzimas y ácidos nucleicos, lo que conduce a una función celular aberrante y muerte. El segundo mecanismo del EO es la señalización redox aberrante. Los oxidantes, particularmente el H_2O_2 generado por las células tras la estimulación fisiológica, pueden actuar como segundos mensajeros. En el EO, la producción no fisiológica de H_2O_2 puede hacer que la señalización redox falle. Ambos tipos de mecanismo de EO pueden ocurrir en una sola enfermedad, como en la diabetes, donde se acumulan productos de glicación avanzada y la activación aberrante de las vías de señalización del estrés conduce a complicaciones diabéticas. Además, el aumento en la producción de H_2O_2 y la liberación de hierro de las

proteínas en el EO por O_2 y $ONOO^-$ provoca una marcada elevación en la producción de productos de peroxidación lipídica que también puede causar señalización aberrante (Forman et al. 2021).

Se cree que el EO juega un papel importante en el desarrollo de complicaciones vasculares en la diabetes, particularmente en la diabetes tipo 2 (Pham-Huy, 2008). En pacientes con DM2 existe una producción aumentada de ERO y una menor actividad antioxidante. La disfunción mitocondrial y la disminución de la actividad de enzimas antioxidantes parecen ser los principales factores involucrados en la generación crónica de ERO induciendo un estado de EO crónico (Henriksen et al. 2011).

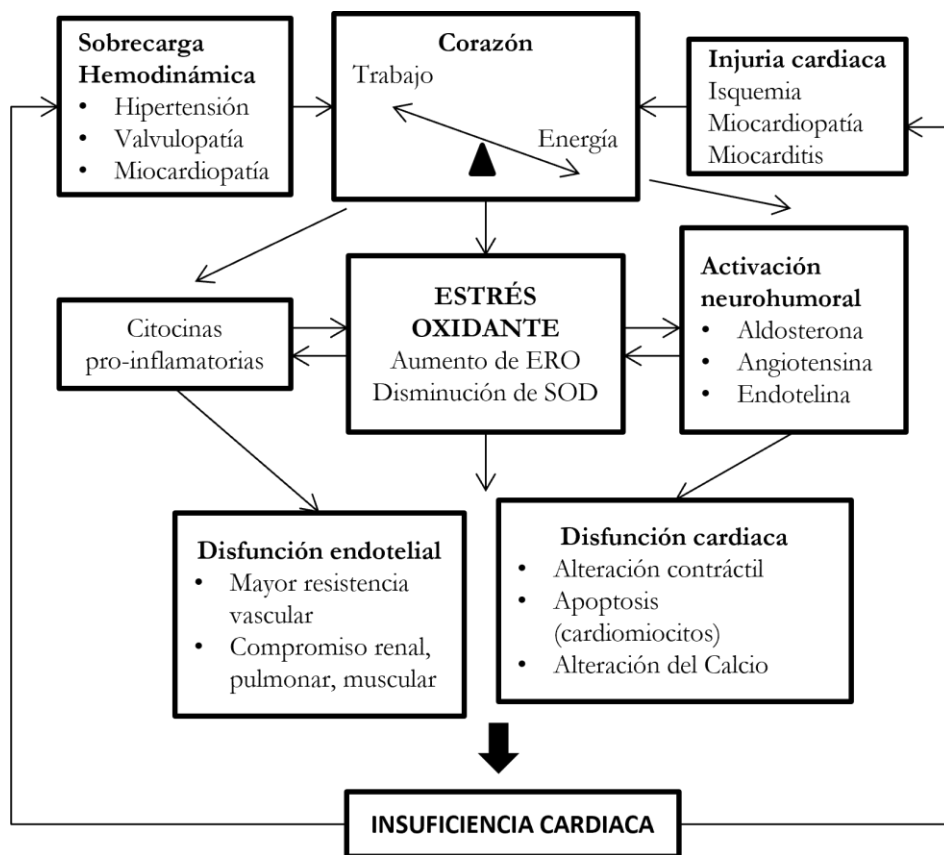


FIGURA 5. Consecuencias de aumento del estrés oxidante en el organismo. Existen diversas alteraciones que pueden afectar al corazón causando estrés oxidante, con aumento de ERO y disminución de sistemas de defensa antioxidante como SOD. (Tomada de Miranda et al. 2007).

Con relación a las enzimas pro-oxidantes, se ha observado un aumento en la actividad de NADPH oxidasa 2 (NOX2) en el músculo esquelético, y con ello, un aumento en la producción de ERO basal (Padron de Figueiredo et al. 2015). Diversas NOX que

afectan el corazón, producen disminución de la eficacia contráctil y aumento del EO con disminución de sistemas antioxidantes. Hay activación neurohumoral y aumento de citocinas inflamatorias. Estos fenómenos contribuyen en la expresión clínica y progresión de la falla cardíaca (Figura 5). Ambos procesos contribuyen en la generación de resistencia a la insulina (RI) debido a una alteración en la función del sustrato del receptor de insulina (SRI), el cual es sensible a cambios en el ambiente redox (*Tangvarasittichai, 2015*). De este modo, existe una alteración en la translocación de los transportadores de glucosa GLUT4 desde el citoplasma hacia la membrana celular (*Kaneto et al. 2010; Olivares Reyes et al. 2008*). Posteriormente se genera disfunción de las células β pancreáticas por una mayor secreción de insulina, con el fin de compensar la RI de los diferentes órganos afectados (*Olivares Reyes et al. 2008; Le Lay et al. 2014*).

La elevación del nivel de ERO en la diabetes puede deberse a una disminución en los niveles de catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GSH-Px). La variación en los niveles de estas enzimas hace que los tejidos sean susceptibles al EO, lo que lleva al desarrollo de complicaciones diabéticas (*Lipinski, 2001*).

2.4. Especies reactivas de oxígeno (ERO)

El aumento en la producción de ERO causado por cambios metabólicos inducidos por la DM se considera un factor importante para desencadenar cambios miocárdicos (*Gimenes et al. 2018*). Una de las fuentes más importantes de ERO a nivel vascular es la NADPH oxidasa o NOX2. La NADPH oxidasa es una enzima generadora de ERO que cataliza la reacción de reducción del O_2 a $O_2^{\cdot-}$ y/o H_2O_2 utilizando como donador de electrones el NADPH. Se identificó por primera vez en las células fagocíticas de la respuesta inmune innata y participa en la “explosión respiratoria”, generando grandes cantidades de $O_2^{\cdot-}$ para destruir a los patógenos invasores (*Weswler et al. 2010*).

2.4.1. Subunidades de la NADPH oxidasa

La subunidad gp91^{phox} (conocida también como NOX2) es una glicoproteína de 91 kDa responsable de unir NADPH, FAD y grupos hemo, importantes para la transferencia de electrones hacia el oxígeno molecular y la producción de anión ($O_2^{\cdot-}$) (*Vélez-Tobon et al. 2016*). La proteína p22^{phox} (22 kDa), posee una región rica en prolina (PRR) que interactúa

con un dominio de homología de las Src (SH3) que se encuentra en $p47^{phox}$; esta proteína es la que permite que $gp91^{phox}$ se acople con las subunidades citosólicas y se inicie la producción de ERO. La subunidad $p47^{phox}$ (47 kDa) interactúa con los demás componentes citosólicos del sistema oxidasa a través de dos dominios SH3, un PRR y un dominio PX, este último importante para su interacción con la membrana celular (Coyoy et al. 2012).

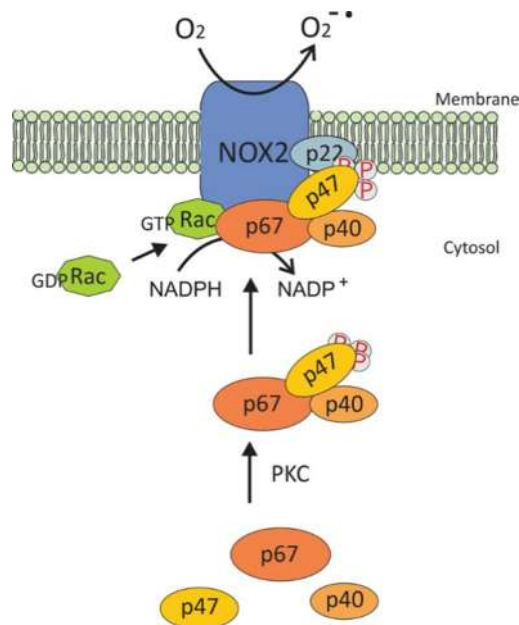


FIGURA 6. Estructura de la NADPH Oxidasa. Se muestran las subunidades de conforman la NADPH Oxidasa (Tomada de González-Perilli et al. 2019).

Otro de los componentes citosólicos, la proteína $p67^{phox}$ (67 kDa), posee un dominio de activación esencial para la transferencia de electrones a través del centro reductor del *flavohemocitocromo* b_{558} . Igualmente, $p67^{phox}$ posee dos dominios SH3 importantes para la interacción con $p47^{phox}$, un dominio de repeticiones tetratricopetídicas (TPR) que facilita la interacción con la proteína Rac y un dominio PB1 (*Px-phox* y *Bem1*) importante para la interacción entre $p67^{phox}$ y $p40^{phox}$.

Finalmente, se encuentra la proteína $p40^{phox}$ (40 kDa), en la que se han identificado tres dominios: PX, SH3 y PB1 (Figura 6). La función de esta proteína en humanos es mantener acoplado el sistema oxidasa durante la activación y la producción de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Coyoy et al. 2012).

Como componentes reguladores de este complejo enzimático se encuentran las proteínas Rac1 y Rac2, las cuales, para estimular la producción de ERO, pasan de una forma inactiva unida a GDP a la forma activa unida a GTP (Vélez-Tobon *et al.* 2016). Hasta el momento se han encontrado siete isoenzimas de la unidad catalítica NOX en mamíferos (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 Y DUOX2) (Figura 7). Un homólogo de la subunidad p47^{phox} (NOXO1) y uno de p67^{phox} (NOXA1) (Coyoy *et al.* 2012). De las siete isoformas de NOX de mamíferos, NOX2 y NOX4 se expresan en el corazón (Lassègue *et al.* 2012). Ambas isoformas existen como un flavocitocromo heterodimérico con una subunidad p22^{phox}, pero difieren en su estructura, activación, localización subcelular, , así como en las vías de señalización específicas que inducen (Anilkumar *et al.* 2008).

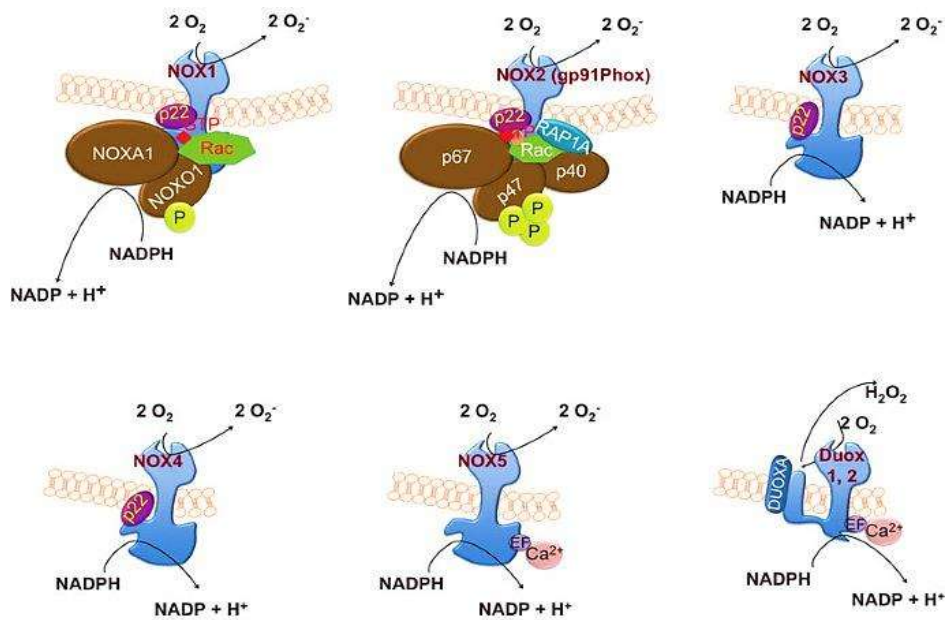


FIGURA 7. Isoformas de NOX. Se muestran las 7 isoformas de la unidad NOX presentes en mamíferos (Tomada de Panday *et al.* 2015)

En condiciones fisiológicas, las NOX regulan funciones vasculares clave como el tono vascular, el crecimiento, la diferenciación, la migración y la proliferación mediante la activación de vías de señalización sensibles al estado redox celular. Sin embargo, en presencia de factores de riesgo cardiovascular aumenta su actividad y la producción de ERO, contribuyendo a crear una situación de EO, que altera la función normal del endotelio y disminuye la producción del radical óxido nítrico (NO[•]), el cual es un

importante vasodilatador y protector vascular (*Rodríguez, 2016*). Además, el aumento del EO, el aumento de la coagulación, la disfunción endotelial y la neuropatía autonómica a menudo están presentes en pacientes con DM y pueden contribuir directamente al desarrollo de las ECV (*León y Maddox, 2015*).

2.5. Genes que intervienen en la patogénesis de la diabetes mellitus

La DM1 y la DM2 son enfermedades complejas, determinadas por múltiples factores genéticos y ambientales, cuyo resultado final es la aparición de hiperglucemia y, con ella, el riesgo de desarrollar complicaciones crónicas microvasculares y macrovasculares que condicionan el pronóstico de los pacientes. Tanto en la DM1 como en la DM2, son múltiples los genes que intervienen en la patogénesis de la enfermedad. El corazón diabético se caracteriza metabólicamente por la resistencia a la insulina, la reducción de la importación y oxidación de glucosa celular y el aumento de la importación y oxidación de ácidos grasos mitocondriales (*Stanley et al. 1997*). El aumento de la hipertrofia y la fibrosis cardíacas son cambios estructurales observados en la miocardiopatía diabética que se acompañan molecularmente de un aumento del EO, disfunción mitocondrial y apoptosis de los cardiomiocitos (*Hathaway et al. 2018*). La insuficiencia cardíaca diabética es la culminación de estas alteraciones patológicas que se caracteriza por una disfunción contráctil grave del miocardio (*Dhingra et al. 2012*).

El tejido cardíaco contiene una actividad significativamente menor de SOD, catalasa, GPx y glutatión reductasa (GR) en comparación con el hígado (*Chen et al. 1994*), lo que hace que el corazón sea vulnerable al EO y esto es más evidente ante la presencia de un padecimiento como la DM. El EO se ha asociado durante mucho tiempo con las enfermedades cardiovasculares, tanto como causa y como consecuencia. Las enfermedades cardiovasculares comunes, como la aterosclerosis, la isquemia, la reperfusión y la insuficiencia cardíaca, se han estudiado ampliamente con respecto al papel del EO. En condiciones de EO, las células remodelan el metabolismo y la expresión génica para mantener la homeostasis redox mediante la activación del factor 2 relacionado con NF-E2 (Nrf2) y otras vías de respuesta al estrés. Nrf2 es conocido como un regulador maestro que regula la activación transcripcional de genes involucrados en la expresión de sistemas antioxidantes (*Mitsuishi et al. 2012*). Los ratones mutantes en Nrf2 han ofrecido un modelo conveniente para establecer las consecuencias de la ausencia de este factor transcripcional, mientras que se ha probado el potencial farmacológico de los

inductores de Nrf2 de molécula pequeña en la protección contra diversas afecciones cardíacas. La disminución de la actividad de la vía de señalización de Nrf2 se ha reportado en estados con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular como el envejecimiento, la diabetes, la hipertensión y la inflamación crónica (*Chen y Maltagliati, 2018*).

La hiperglucemia, la resistencia a la insulina, la inflamación y el EO son las características comunes de la DM (*Bohl et al. 2017*), la cual conduce a una serie de complicaciones peligrosas que incluyen enfermedades cardiovasculares, insuficiencia renal, ceguera y neuropatías periféricas (*Van den Oever et al. 2010*). Los factores inflamatorios sistémicos del plasma y algunos mediadores proinflamatorios en las vías de transcripción y señalización, como el factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de las células B activadas (NF-kB), desempeñan un papel importante en la incidencia de estas complicaciones (*Goldberg et al. 2009*). La diabetes tipo 2 se asocia con un aumento de la actividad de NF-kB. Este es un factor de transcripción que regula muchos genes de los componentes del sistema inmunitario, incluidas las citocinas proinflamatorias, las moléculas de adhesión de células endoteliales y enzimas como la ciclooxigenasa y la NO sintasa. Además, promueve la supervivencia celular mediante la regulación de algún inhibidor celular de las proteínas de apoptosis.

Metabólicamente, la disminución en la importación y oxidación de glucosa en el cardiomiocito diabético se asocia con una menor expresión del transportador de glucosa tipo 4 estimulado por insulina 4 (GLUT4) y una menor actividad de piruvato deshidrogenasa (PDH). El GLUT4 es un transportador de glucosa regulado por insulina que normalmente se encuentra en vesículas intracelulares en células grasas y musculares en condiciones de insulina baja. Sin embargo, los niveles altos de insulina pueden inducir la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática desde las vesículas intracelulares como un medio para aumentar la captación de glucosa celular. Las alteraciones en la translocación de GLUT4 provocan trastornos en la captación de glucosa, lo que resulta en resistencia a la insulina (*Guo et al. 2019*).

2.6. Apocinina

La apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona, nombres triviales: apocinina, acetovanillona) fue descrita por primera vez por Schmiedeberg en 1883 y fue aislada de

las raíces de *Apocynum cannabinum* (cáñamo canadiense) y sus extractos se utilizaron como remedios oficiales para la hidropesía y problemas del corazón. En 1971, se identificó la apocinina durante el aislamiento guiado por actividad de constituyentes inmunomoduladores de la raíz de *Picrorhiza kurroa* (Scrophulariaceae), una planta nativa cultivada en las montañas de India, Nepal, Tíbet y Pakistán, muy conocida en la medicina tradicional india (Ayurveda). La apocinina es una acetofenona con un peso molecular de 166.17 g/mol y forma agujas tras la cristalización en agua. Posee un ligero olor a vainilla y tiene un punto de fusión de 115 °C (Luchtefeld et al. 2008; Hougee et al. 2006).

La apocinina se ha utilizado como un inhibidor eficaz de las NOX en muchos modelos experimentales que involucran células fagocíticas y no fagocíticas (Lafeber et al. 1999; Zhang et al. 2005). El mecanismo de inhibición no se conoce totalmente, pero implica la disminución de la translocación a la membrana de la subunidad p47^{phox} (Barbieri et al. 2004; Peters et al. 2001). Un hallazgo muy importante sobre este mecanismo fue el descubrimiento de que la apocinina es un profármaco que se convierte en un dímero por oxidación mediada por peroxidasa, que ha demostrado ser más eficaz que la propia apocinina (Johnson et al. 2002).

La apocinina requiere la activación por la mieloperoxidasa (Simons et al. 1990) para formar un radical apocinina, que luego oxida los tioles de la NOX que son críticos para la función de p47^{phox}. (Johnson et al. 2002; Clark et al. 1990). De acuerdo con este concepto, se observó que la suplementación de glutatión o cisteína evita el efecto inhibidor de la apocinina sobre la NAPDH oxidasa. Una explicación alternativa para el tiempo de retraso del efecto inhibitorio de la apocinina fue que a través del paso de un radical de apocinina, se forma un dímero de apocinina (Ximenes et al. 2007). Se ha sugerido que este dímero es el compuesto inhibidor activo que puede bloquear la actividad de la NOX (van den Worm et al. 2001).

La administración de apocinina ha logrado atenuar el EO asociado con la hipertrofia cardíaca, la fibrosis cardíaca y la disfunción diastólica en animales de experimentación. Recientemente, se evaluó la influencia de la apocinina como antioxidante en la remodelación cardíaca en ratas espontáneamente hipertensas con DMTI, donde redujo significativamente el EO (Gimenes et al. 2018).

2.7. La importancia del ejercicio en personas diabéticas

La práctica regular de ejercicio físico y el cumplimiento de unas pautas alimentarias saludables aportan indiscutibles beneficios para la salud de las poblaciones, incluyendo el efecto preventivo sobre diferentes patologías crónicas como el cáncer, la enfermedad cardiovascular y la diabetes (*Fernández et al. 2009*).

Las intervenciones estructuradas de la práctica de ejercicio, al menos durante 8 semanas, evidencia una disminución promedio de 0.66% de los niveles de la hemoglobina glicosilada 1c (HbA1c) en personas con DM2, aun sin cambios significativos del índice de masa corporal (IMC). Los niveles más altos de intensidad del ejercicio físico se asocian con mejoras mayores en la reducción de los niveles de HbA1c y en la adaptabilidad a este (*Hernández-Rodríguez et al. 2010*).

En la última década, diversos reportes han indicado que la realización de ejercicio físico promueve la producción de ERO debido principalmente a una elevación de la actividad excito-contráctil del músculo esquelético (*Powers et al. 2016*). Dicho fenómeno genera un desbalance redox de carácter transitorio denominado “estrés oxidante inducido por ejercicio” (*Powers et al. 2008*). La producción de ERO durante la realización de ejercicio es aguda y de corta duración, pudiendo aumentar los niveles de biomarcadores de daño por EO como malondialdehído (MDA) y proteínas carboniladas (PC) en sangre entre 24 a 48 h (*Bogdanis et al. 2016*). Las ERO generadas en el ejercicio inducen adaptaciones siguiendo el principio de “hórmesis” que es un mecanismo de autorregulación en donde una baja dosis “tóxica” de ERO desencadena una respuesta antioxidante como desintoxicación, permitiendo activar como resultado final distintas vías de señalización, las cuales a su vez confluyen en la activación de factores transcripcionales que promueven un incremento de la respuesta antioxidante del organismo y la disminución de biomarcadores de EO demostrando así un mecanismo de adaptación inducido por el ejercicio (*Gómez-Cabrera et al. 2009*).

2.7.1. Tipos de protocolos de ejercicio físico

Existen diferentes protocolos de ejercicio físico, según la metodología empleada. El ejercicio puede ser de baja, moderada y alta intensidad; es importante tomar en cuenta la intensidad ya que también existe evidencia contradictoria respecto a la efectividad del ejercicio físico en la disminución de marcadores de EO y si puede tener efectividad en la

prevención y/o tratamiento de la patología. El ejercicio de moderada intensidad puede ser fundamental para la regulación y control de la glicemia (*Poblete-Aro et al. 2018*).

Para el tratamiento de la DM, los principales protocolos de ejercicio físico recomendados son los ejercicios continuos de moderada intensidad (ECMI) (*Gómez-Cabrera, et al. 2008*) ejercicios de sobrecarga (ES) (*Gacitua et al. 2017*), ejercicios en intervalos de alta intensidad (EIAI) (*Mitranun et al. 2014*), y la combinación de ECMI y ES conocida como ejercicio concurrente (EC) (*Vinetti et al. 2015*).

Ejercicio continuo de moderada intensidad

El ejercicio continuo de moderada intensidad (ECMI) o “ejercicio aeróbico” es un tipo de ejercicio caracterizado por la predominancia de la vía metabólica oxidativa y por la ejecución de modalidades cíclicas (caminata, trote, bicicleta, etc.) que involucran grandes grupos musculares. Según la metodología empleada, la intensidad del ejercicio puede ser baja o moderada, siendo esta última fundamental en la regulación y control de la glucemia (*Quílez et al. 2015*).

Respecto a los efectos del ECMI sobre biomarcadores relacionados al EO en pacientes con DM, en la mayoría de los ensayos se han observado mejoras en relación al balance REDOX, tanto por un aumento de los niveles de biomarcadores antioxidantes en sangre (*Azizbeigi et al. 2015; Kurban et al. 2011; Moghaddam et al. 2011; Krause et al. 2014*), como por una disminución de biomarcadores de oxidación de proteínas en sangre (*Krause et al. 2014*) y ADN en orina (*Nojima et al. 2008*). Asimismo, dichas respuestas coinciden con efectos positivos sobre diversos parámetros clínicos tales como incremento de la función cardiovascular, control del perfil lipídico, mejora de la composición corporal y control glicémico (*Kurban et al. 2011; Moghaddam et al. 2011; Krause et al. 2014*).

Ejercicio de sobrecarga

El ejercicio de sobrecarga (ES), también conocido como “ejercicio de fuerza” o de “contra resistencia”, consiste en la ejecución de movimientos monoarticulares o poliarticulares en contra de una resistencia, la cual generalmente es propiciada por pesos libres o máquinas de sobrecarga (*Gacitua et al. 2017*). Aunque la evidencia muestra que la realización de ES promueve una mejora de la salud metabólica en pacientes con DMT2

(Gordon et al. 2009), no se han observado cambios significativos sobre parámetros de EO en este tipo de pacientes (Neves de Oliveira et al. 2012). Interesantemente, la respuesta del ES sobre marcadores de EO parece depender del estado de salud de los pacientes, observándose una disminución en los niveles plasmáticos de MDA (Azizbeigi et al. 2015; Cakir-Atabek et al. 2010) y un aumento en la actividad sanguínea de GPx en sujetos sanos posterior a protocolos de 3 series a 65-70% de 1 RM (Repetición Máxima: resistencia específica que permite realizar únicamente una repetición en esa serie y en un ejercicio concreto), 3 veces por semana durante 6-8 semanas (Azizbeigi et al. 2015). Asimismo, posterior a protocolos de alta intensidad (3 x 3-6 repeticiones a 85-90% de 1 RM) se ha constatado un aumento de la actividad de SOD en sangre. Sin embargo, una diferencia importante entre los trabajos con sujetos sanos (Azizbeigi et al. 2015; Cakir-Atabek et al. 2010) y el ensayo con pacientes diabéticos (Neves de Oliveira et al. 2012) es la diferencia de edades entre los participantes, siendo los primeros menores a 30 años, mientras que los segundos son mayores a 50 años.

Ejercicio con intervalos de alta intensidad

El ejercicio en intervalos de alta intensidad (EIAI), también conocido como “ejercicio intermitente”, se caracteriza por la realización reiterada de breves períodos de trabajo (de 10 s hasta 4 min) a una intensidad relativa superior al umbral anaeróbico, seguido de periodos de recuperación a baja intensidad o descanso absoluto (Buchheit et al. 2013). Respecto a los efectos del EIAI sobre marcadores de EO en pacientes con DMT2, la evidencia es escasa. Un ensayo clínico reclutó a 43 pacientes, los cuales fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos: I) EIAI, II) ECMI y III) grupo control que permaneció sin realizar ejercicio. La intervención de entrenamiento consistió en trotar sobre un tapiz rodante durante 12 semanas con tres sesiones por semana, con un aumento en la duración de la sesión desde 30 a 60 min. Si bien no se observaron cambios estadísticamente significativos en las concentraciones de SOD en ninguno de los grupos experimentales, sólo en el grupo de EIAI se observó una disminución significativa de MDA y un aumento de la actividad de la enzima GPx. Estos resultados coincidieron con una disminución de % HbA1c, glucemia en ayunas y la resistencia a la insulina, además de la mejora de otros parámetros clínicos relacionados con la función cardiovascular, perfil lipídico y composición corporal (Mitranun et al. 2014).

Ejercicio concurrente

El protocolo de ejercicio concurrente (EC) generalmente combina el ECMI con ES dentro de la misma sesión de entrenamiento. A nivel metabólico se han demostrado sus beneficios sobre el control glicémico en pacientes con DMT2 (*Oliveira et al. 2012*). Respecto a la efectividad del EC sobre parámetros de EO se ha observado que dichos efectos parecen ser evidentes a largo plazo. No se han hallado cambios significativos en la actividad antioxidante de GPx, SOD, CAT ni en los niveles de MDA en sangre posterior a un protocolo de 12 semanas de duración (*Neves de Oliveira et al. 2012*). Por otra parte, un protocolo de ejercicios de 12 meses produjo una disminución significativa en marcadores de daño de la membrana plasmática inducidos por EO una disminución de la resistencia a la insulina y una mejora significativa de la composición corporal, el perfil lipídico y la función cardiovascular en pacientes con DMT2 (*Vinetti et al. 2015*).

3. JUSTIFICACIÓN

Una de las enfermedades metabólicas que ocasiona mayor morbilidad y mortalidad en el mundo es la diabetes mellitus (DM). El estrés oxidante está relacionado con diversas complicaciones presentes en este trastorno, las cuales afectan a distintos órganos, entre ellos, el corazón. La apocinina se considera un agente antioxidante que inhibe la actividad de las NOX y disminuye los niveles de ERO. Se ha demostrado que la administración de apocinina resulta benéfico para disminuir el estrés oxidante y restablecer la actividad de los antioxidantes en el tejido cardíaco. Se ha observado que el ejercicio induce una respuesta de adaptación, caracterizada por la disminución de marcadores de daño por estrés oxidante, así como un incremento de la respuesta antioxidante del organismo.

Por lo anterior, el presente trabajo tiene como finalidad evaluar el efecto causado por la apocinina en conjunto con el ejercicio de moderada intensidad sobre el estrés oxidante ocasionado en el músculo cardíaco de ratas en condición de diabetes.

4. HIPÓTESIS

La apocinina y el ejercicio reducen el estrés oxidante causado en músculo cardíaco de ratas diabéticas.

5. OBJETIVOS

Objetivo general: Analizar el efecto de la apocinina y el ejercicio de moderada intensidad sobre el estrés oxidante presente en músculo cardíaco de ratas diabéticas.

Objetivos específicos

- ✚ Evaluar el efecto de la apocinina y el ejercicio sobre niveles de glicemia y la sensibilidad a la insulina a nivel sistémico en ratas en condición de diabetes.
- ✚ Analizar el efecto de la apocinina y el ejercicio sobre la actividad enzimática de glutatión y catalasa en ratas en condición de diabetes.
- ✚ Evaluar el efecto de la apocinina y el ejercicio sobre el estrés oxidante en ratas durante la diabetes.
- ✚ Cuantificar la expresión de los genes NOX2, NOX4, Nrf2, NF-κB, GLUT 4 y Catalasa en las ratas con diabetes y ejercitadas con moderada intensidad.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en ratas macho de la cepa Wistar de aproximadamente 250 g. Estas se alojaron en jaulas de polietileno, en una habitación con temperatura controlada (24 °C) con ciclos de 12 horas luz/oscuridad. Los animales se alimentaron con dieta estándar y agua *ad libitum*.

Los animales se dividieron en 8 grupos (Tabla 1):

Tabla 1. Grupos de Animales y condiciones a las que se fueron sometidos.

Grupo	Condiciones
1	Control
2	Apocinina
3	Diabético
4	Diabético + Apocinina
5	Ejercitado
6	Diabético + Ejercitado
7	Ejercicio + Apocinina
8	Diabético + Ejercicio + Apocinina
Nota: La dosis de Apocinina administrada fue de 3 mg/kg/día durante las 8 semanas (<i>Gimenes et al. 2018</i>).	

6.1 Inducción de diabetes experimental. Antes del procedimiento, las ratas permanecieron en ayuno por un periodo de 12 h; se les midió el peso y los niveles de glucosa basales empleando un glucómetro digital (Accu-Chek Performa, Roche, Indianapolis, IN, USA). Posteriormente, se les administró intraperitonealmente estreptozotocina (STZ) a dosis de 45 mg/kg de peso, diluido en solución buffer de fosfato salino, ajustando el pH a 4.5 con ácido cítrico 0.5 M. 24 h post-inducción se verificó si se desarrolló la condición diabética; los niveles de glucosa se midieron por muestras sanguíneas obtenidas del extremo distal de la cola de los animales.

6.2 Protocolo de entrenamiento. Las ratas se sometieron a un protocolo de ejercicio físico de moderada intensidad en una banda sin fin, la cual está seccionada en 5 áreas con una estructura fabricada con acrílico adaptada a las dimensiones de la banda y tamaño de los animales.

Antes del protocolo de ejercicio completo, todos los animales se sometieron a un régimen de pre-acondicionamiento de la función muscular durante una semana, que consistió en correr diariamente 12 min a una velocidad de 15 m/min. El programa completo de ejercicios incluyó cinco sesiones por semana durante un período de 8 semanas. Cada sesión de entrenamiento consistió en 3 intervalos de tiempo y velocidades con una duración final de 30 min (Tabla 2).

Tabla 2. Intervalos de Velocidad y Tiempo de ejercicio de los animales a estudiar, siguiendo el protocolo descrito por *Wisløff et al. 2001*, con algunas modificaciones.

Intervalo	Velocidad/Tiempo
1	Comenzó con una velocidad de 15 m/min durante 5 min
2	La velocidad se incrementó progresivamente hasta los 20 m/min durante 20 min
3	Concluyó con una velocidad 15 m/min durante 5 min.

6.3 Biomarcadores metabólicos. Todos los grupos experimentales fueron sometidos una vez por semana, durante las 8 semanas de duración del protocolo experimental, a

mediciones de glucosa basal en ayuno, utilizando un glucómetro Accu Check Performa® (descrito anteriormente).

6.4 Prueba de resistencia a la insulina. Quince horas después de la sesión de entrenamiento final, las ratas de experimentación recibieron una dosis de insulina de acción rápida regular (0.75 U/kg de peso corporal), inmediatamente después de tomar una muestra de glucosa basal. Las concentraciones de glucosa en sangre se midieron a partir de la línea base (inmediatamente antes de la administración de insulina a $t=0$ min), eventualmente los niveles de glucosa se midieron en los 30 min (0.5 h), 60 min (1 h), 90 min (1.5 h) y 120 min (2 h) post-inyección.

Una vez culminados los protocolos de entrenamiento y tratamiento, el músculo cardíaco fue aislado y sometido a análisis bioquímicos de estrés oxidante y estudios moleculares.

6.5 Disección del músculo cardíaco. Después 8 semanas de tratamiento y de actividad física, las ratas fueron eutanizadas por dislocación cervical y se procedió a la extracción del órgano cardíaco (corazón) completo, esto para poder trabajar con dicho órgano en forma de homogenado.

6.6 Análisis de marcadores de estrés oxidante

6.6.1 Medición de los niveles de las especies reactivas de oxígeno. Los niveles de ERO se determinaron a través de la oxidación del cromóforo fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA). Se colocaron en tubos de ensayo muestras de homogenados del músculo cardíaco (0.5 mg/mL). La muestra se incubó a 4 °C en agitación constante durante 15 min en el buffer (10 mM HEPES, 100 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$ y 3 mM KH_2PO_4 a un pH de 7.4) con 1.25 mM de H_2DCFDA para un volumen total de 2 ml. Esta suspensión se colocó en una celda de cuarzo y se registró una primera lectura y 60 min después, una segunda medición de los cambios en la fluorescencia (Ortiz-Avila et al. 2013) en un espectrofluorómetro Shimadzu RF-5301PC (λ excitación 485 nm; λ emisión 520 nm). La media de los datos obtenidos se expresó como delta de fluorescencia (ΔF) por minuto por miligramo de muestra (min/mg de muestra).

6.6.2 Medición de los niveles de peroxidación de lípidos. Para medir los niveles de peroxidación de lípidos, se midieron los niveles de malondialdehído (MDA) presentes en el homogenado cardíaco, utilizando el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). En tubos cónicos, se colocó la muestra del homogenado cardíaco, buffer de fosfatos (KH_2PO_4 50 mM, pH 7.6) y 2 mL solución ácida (ácido tricloroacético al 15 %, 0.375% y ácido clorhídrico 0.25 M) para un volumen total de 3 mL. Posteriormente, se realizaron 3 ciclos de agitación-hielo y se colocó a incubación a baño María durante 25 min. Pasado este tiempo, las soluciones obtenidas se centrifugaron a 7500 rpm por 5 min y con un espectrofotómetro Shimadzu UV-2550 ($\lambda = 532\text{nm}$) se realizó una lectura de la absorbancia del sobrenadante.

6.6.3 Medición de glutatión. El estado redox del glutatión se determinó con el método de Rahman et al. 2006 con algunas modificaciones. El contenido de glutatión muscular se determinó en 0,5 mg de proteína. Las muestras se suspendieron en ácido sulfosalicílico al 0.6 %, EDTA- Na_2 5 mM y Triton X-100 al 0.1 % en un tampón de fosfato de potasio (K_2HPO_4 , 0.1 M, pH 7.5). Esta mezcla se sonicó tres veces durante 5 s y se colocó en hielo durante 20 s entre cada ciclo de sonicación, seguida de dos ciclos de congelación/descongelación y se centrifugaron durante 10 min a 8000 rpm. Para el glutatión total, se mezclaron 100 μl del sobrenadante resultante y se incubaron durante 30 segundos con tampón de fosfato 0.1 M que contenía EDTA- Na_2 5 mM, ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) 0.1 mM, enzima glutatión reductasa 100 μM y 50 μM NADPH (forma reducida). La reacción se controló durante 5 min a 412 nm en un espectrofotómetro UV/vis (Shimadzu UV-2550, Kyoto, Japón). Para las determinaciones de glutatión oxidado (GSSG), las muestras se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con 0.2 % de 4-vinilpiridina para derivatizar el glutatión reducido (GSH). La concentración de GSH se calculó restando la concentración de GSSG de la concentración de GSH + GSSG.

6.7 Ensayo de expresión de genes. El aislamiento del ARN total del músculo cardíaco se llevó a cabo empleando el reactivo Trizol (TRI Reagent, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.), utilizando el método descrito por *Chomczynski y Sacchi, 2006*. La calidad y la cantidad de ARN se analizaron espectrofotométricamente a densidades ópticas en una proporción de 260/280 utilizando el BioPhotometer (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

Para la reacción de la transcripción reversa (RT), se utilizaron 2 µg de ARN total para obtener el cDNA, empleando el kit QuantiNova Reverse Transcription (QIAGEN, Hilden, Alemania; número de catálogo 205413,), según las instrucciones del fabricante. La expresión de genes se determinó mediante qRT-PCR. Las reacciones en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativas (qRT-PCR) se realizaron en un sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 3 (Applied Biosystems, ThermoFischer, CA, EE. UU.), utilizando el kit de PCR QuantiFast SYBR Green (QIAGEN, Hilden, Alemania) utilizando sets de cebadores comerciales para NOX2, NOX4, Nrf2, NF-κB, GLUT 4 y catalasa (CAT); Las secuencias de los cebadores (Tabla 3) se diseñaron utilizando la información obtenida de la base de datos pública del Banco de Genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica. La expresión de los genes se evaluó mediante el método de cuantificación relativa utilizando el método del umbral del ciclo delta-delta comparativo ($\Delta\Delta CT$). Los valores de expresión fueron normalizados con valores obtenidos del gen de mantenimiento endógeno 18s como control interno.

Tabla 3. Secuencia de los cebadores de PCR utilizados

Gen	Forward	Reverse
NOX2	5'-CAATTCACACCATTGCACATC-3'	5'-CGAGTCACAGCCACATACAG-3'
NOX4	5'-TCCATCAAGCCAAGATTCTGAG-3'	5'-GGTTTCCAGTCATCCA-TAGAG-3'
Nrf2	5'-CACATCCAGACAGACACCAGT-3'	5'-CTACAAATG-GAATGTCTCTGC-3'
NF- κB	5'-ATGGCAGACGACGATCCTTTC-3'	5'-TGTTGACAGTG-TATATCTGTTG-3'
GLUT4	5'-TCCATCAAGCCAAGATTCTGAG-3'	5'-GGTTTCCAGTCATCCA-TAGAG-3'
CAT	5'-CCTGTGAACTGTCCCTACCG-3'	5'-AGAATGTCCGCACCTGAGTG-3'
18s	5'-GCAAATTACCCACTCCCGAC-3'	5'-CCGCTCCCAAGA TCCAATA-3'

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de una n=6. Los análisis estadísticos se realizaron con análisis de varianza (ANOVA) unidireccional o bidireccional con la prueba de comparación múltiple de Tukey. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0,05$. Todos los datos se analizaron con el Programa Prism (GraphPad versión 7.0, Inc., San Diego, CA, EE. UU.).

8. RESULTADOS

8.1. Efecto de la apocinina y el ejercicio de moderada intensidad sobre el peso corporal y los niveles de glucosa sanguínea basal en el músculo cardíaco. En la fig. 8 se puede observar que hubo una disminución significativa en el peso corporal en el grupo diabético (D) en comparación con el grupo de control (C) ($p < 0.05$). Sin embargo, esta disminución de peso se reestableció en el grupo diabético administrado con apocinina (D+A) después de 8 semanas. Por el contrario, en los grupos diabético + ejercicio (D+E) y diabético + ejercicio + apocinina (D+E+A), no se observó una diferencia significativa en comparación con el grupo diabético.

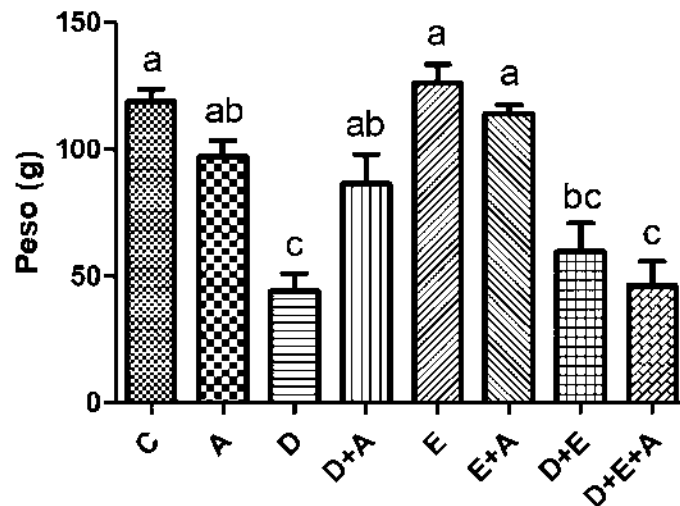


Figura 8. Peso corporal de los diferentes grupos de ratas. C= Control, A= Apocinina, D= Diabéticas, D+A= Diabéticas + Apocinina, E= Ejercitadas, E+A= Ejercitadas + Apocinina, D+E= Diabéticas + Ejercicio, D+E+A= Diabéticas + Ejercicio + Apocinina. $n=6$. Los datos se presentan como la media \pm error estándar. (ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre grupos.

En la fig. 9 se presentan los niveles de glucosa basal de los 8 grupos analizados. Se puede observar que el nivel de glucosa basal en el grupo diabético es significativamente elevado, esto en comparación con el grupo control; de igual manera, se observa que la administración de apocinina (D+A), el ejercicio (D+E) y la combinación de estos tratamientos (D+E+A) logró una disminución de la glucemia.

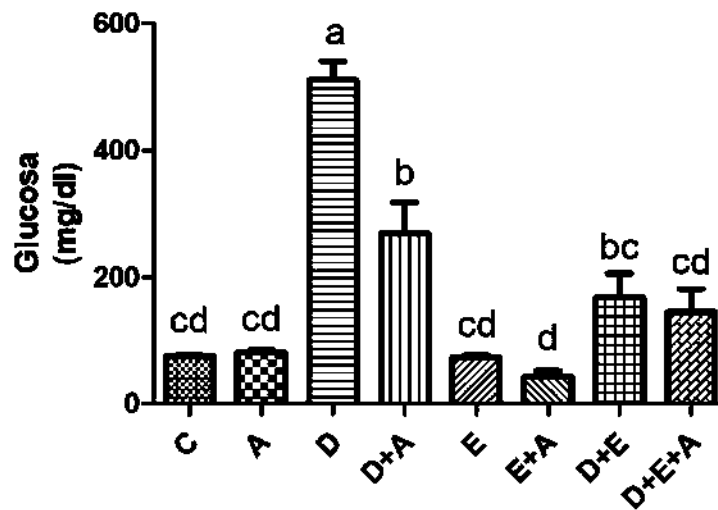


Figura 9. Niveles de glucosa en ayuno de los diferentes grupos de ratas. C= Control, A= Apocinina, D= Diabéticas, D+A= Diabéticas + Apocinina, E= Ejercitadas, E+A= Ejercitadas + Apocinina, D+E= Diabéticas + Ejercicio, D+E+A= Diabéticas + Ejercicio + Apocinina. n=6. Los datos se presentan como la media \pm error estándar. (ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre grupos.

8.2. Efecto de la apocinina y el ejercicio de moderada intensidad sobre los niveles de glucosa sanguínea en la prueba de resistencia a la insulina en músculo cardíaco.

La prueba de resistencia a la insulina se observa en la fig. 10. Se puede observar un aumento de la resistencia a la insulina en el grupo diabético, esto en comparación con el grupo control. El grupo diabético administrado con apocinina, así como los grupos ejercitados y el grupo D+E+A presentaron una mejoría de manera significativa en la resistencia de insulina, esto en comparación con el grupo diabético.

Para poder evaluar estos resultados de una mejor manera, se examinó el área bajo la curva (fig. 11), en donde se observa la elevada resistencia a la insulina presente en el grupo diabético, como se mencionó con anterioridad; de igual manera, se observa la disminución de dicha resistencia en el grupo administrado con apocinina (D+A), el grupo D+E y el grupo D+E+A, esto en comparación con el grupo diabético.

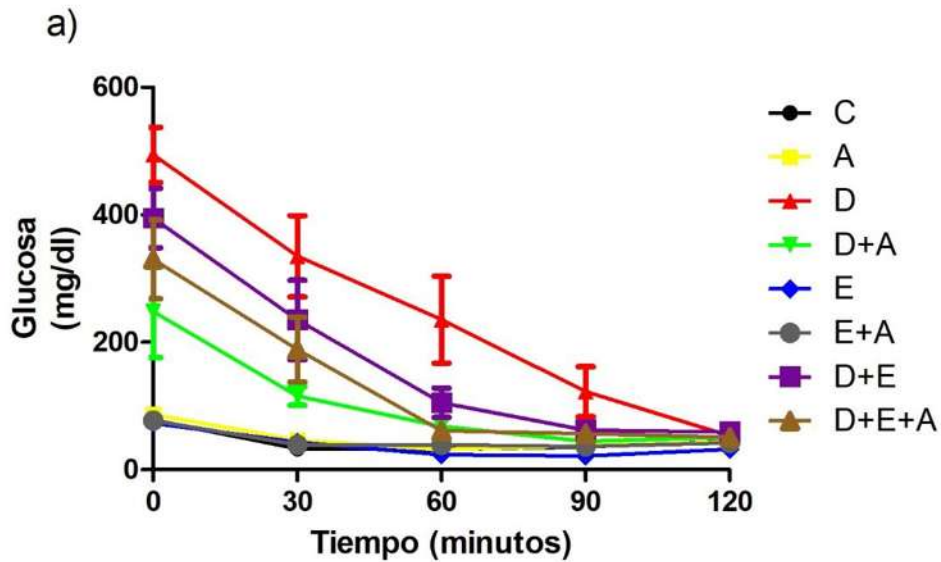


Figura 10. Niveles de glucosa de los diferentes grupos de ratas en la prueba de resistencia a la insulina. C= Control, A= Apocinina, D= Diabéticas, D+A= Diabéticas + Apocinina, E= Ejercitadas, E+A= Ejercitadas + Apocinina, D+E= Diabéticas + Ejercicio, D+E+A= Diabéticas + Ejercicio + Apocinina. n=6. Los datos se presentan como la media \pm error estándar. (ANOVA de 2 vías, prueba post- hoc de Tukey, $p < 0.05$). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre grupos.

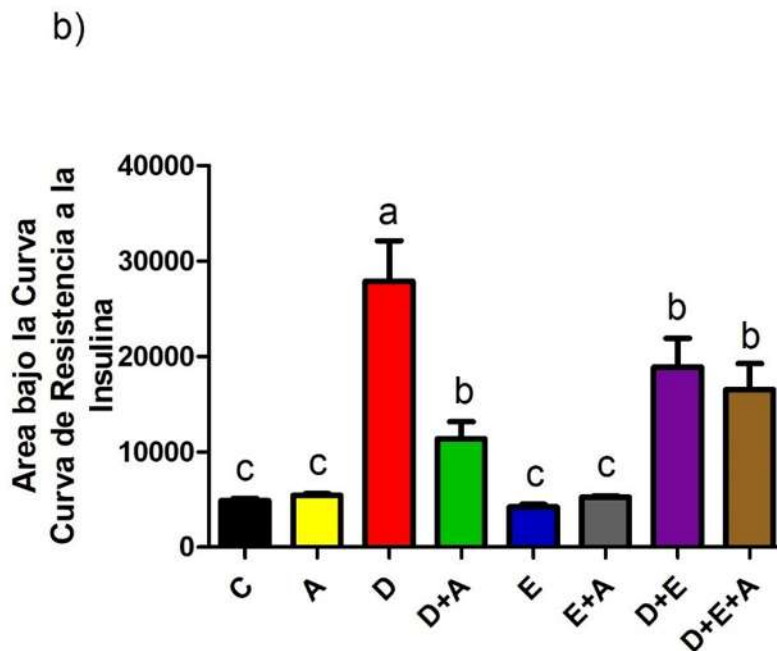


Figura 11. Área bajo la curva de la prueba de resistencia a la Insulina. C= Control, A= Apocinina, D= Diabéticas, D+A= Diabéticas + Apocinina, E= Ejercitadas, E+A= Ejercitadas + Apocinina, D+E= Diabéticas + Ejercicio, D+E+A= Diabéticas + Ejercicio + Apocinina. n=6; Los datos se presentan como la media \pm error estándar. (ANOVA de 1 vía, prueba post- hoc de Tukey, $p < 0.05$). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre grupos.

8.3. Efecto de la apocinina y el ejercicio de moderada intensidad en los niveles de ERO en el músculo cardíaco. Los resultados obtenidos para la determinación de ERO del músculo cardíaco se muestran en la fig. 12. Como se puede apreciar, el grupo diabético presenta un mayor nivel de ERO, en comparación con el grupo control. Sin embargo, estos niveles se ven disminuidos en los grupos D+A, D+E y D+E+A.

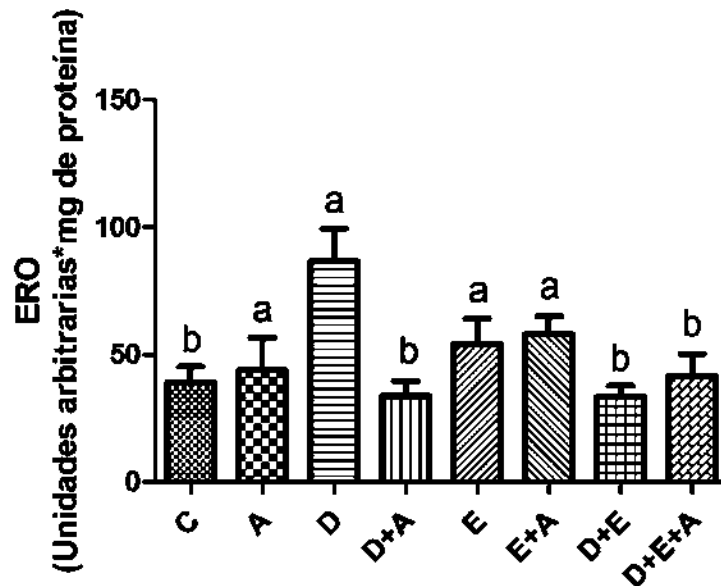


Figura 12. Niveles de ERO en el corazón de los diferentes grupos de ratas. C= Control, A= Apocinina, D= Diabéticas, D+A= Diabéticas + Apocinina, E= Ejercitadas, E+A= Ejercitadas + Apocinina, D+E= Diabéticas + Ejercicio, D+E+A= Diabéticas + Ejercicio + Apocinina. n=6. Los datos se presentan como la media \pm error estándar. (ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre grupos.

8.4. Efecto de la apocinina y el ejercicio de moderada intensidad en los niveles de Peroxidación de lípidos en el músculo cardíaco. En la fig. 13 se puede apreciar los niveles de peroxidación de lípidos. Los datos obtenidos muestran niveles altos de las concentraciones de TBARS en el grupo diabético en comparación con el grupo control. Estos niveles se ven disminuidos en los grupos que fueron tratados con los protocolos de apocinina (D+A) y de ejercicio de intensidad media (D+E), así como en la combinación de ambos protocolos (D+E+A).

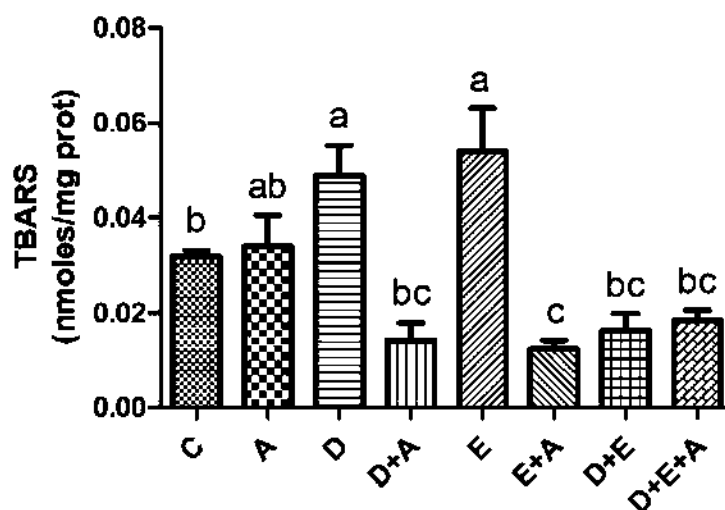


Figura 13. Niveles de peroxidación de lípidos en el corazón de los diferentes grupos de ratas. C= Control, A= Apocinina, D= Diabéticas, D+A= Diabéticas + Apocinina, E= Ejercitadas, E+A= Ejercitadas + Apocinina, D+E= Diabéticas + Ejercicio, D+E+A= Diabéticas + Ejercicio + Apocinina. n=6. Los datos se presentan como la media \pm error estándar. (ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre grupos.

8.5. Efecto de la apocinina y el ejercicio de moderada intensidad en los niveles de glutatión en el músculo cardíaco. Para poder analizar los niveles y estado redox del glutatión en el músculo cardíaco de las ratas diabéticas, se realizó el análisis del glutatión total, glutatión reducido, glutatión oxidado y se obtuvo la relación glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG). Como se muestra en la fig. 14, el análisis del glutatión total demostró que en los grupos D+A, D+E y D+E+A aumentaron los niveles de este antioxidante, en comparación con el grupo diabético.

Con relación al glutatión reducido (GSH), se puede observar en la fig. 15 que el grupo D+A presenta una concentración mayor en comparación con el grupo diabético; de igual manera se puede observar que en el grupo D+E aumentaron los niveles de GSH.

Por el contrario, la concentración de GSSG es mayor en el grupo diabético, en comparación con el grupo control (fig. 16). Estos valores disminuyeron en los grupos administrados con apocinina (D+A) y ejercitados (D+E); sin embargo, la combinación de los dos tratamientos (D+E+A) no presentó diferencias significativas, todo esto en comparación con el grupo diabético.

La relación GSH/GSSG (fig. 17) disminuyó en el grupo diabético y presentó un aumento significativo en los grupos tratados con Apocinina, el grupo D+E y en el grupo diabético que fue sometido a los dos tratamientos (D+E+A).

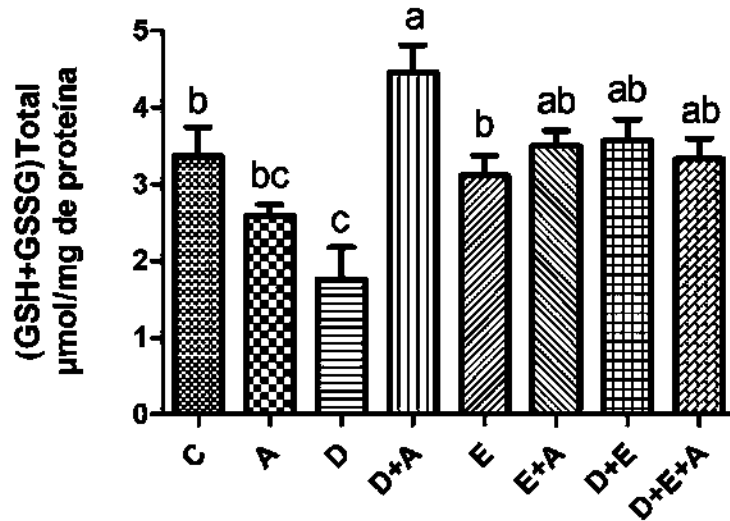


Figura 14. Niveles de glutación total en el corazón de los diferentes grupos de ratas. C= Control, A= Apocinina, D= Diabéticas, D+A= Diabéticas + Apocinina, E= Ejercitadas, E+A= Ejercitadas + Apocinina, D+E= Diabéticas + Ejercicio, D+E+A= Diabéticas + Ejercicio + Apocinina. n=6. Los datos se presentan como la media ± error estándar. (ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre grupos.

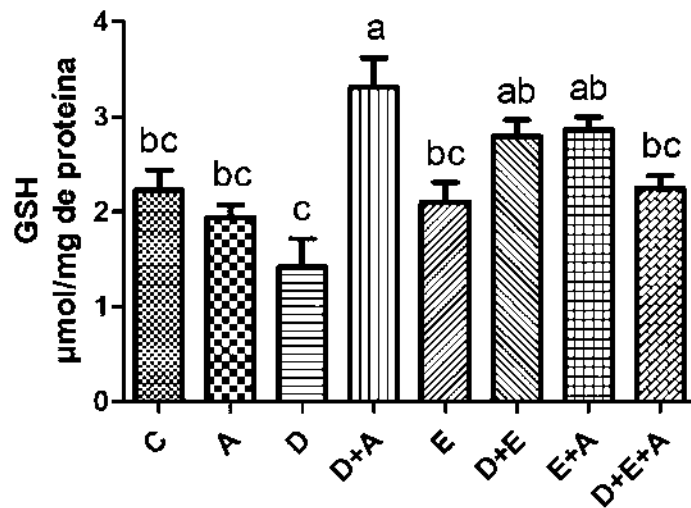


Figura 15. Niveles de glutatión reducido (GSH) en el corazón de los diferentes grupos de ratas. C= Control, A= Apocinina, D= Diabéticas, D+A= Diabéticas + Apocinina, E= Ejercitadas, E+A= Ejercitadas + Apocinina, D+E= Diabéticas + Ejercicio, D+E+A= Diabéticas + Ejercicio + Apocinina. n=6. Los datos se presentan como la media \pm error estándar. (ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre grupos.

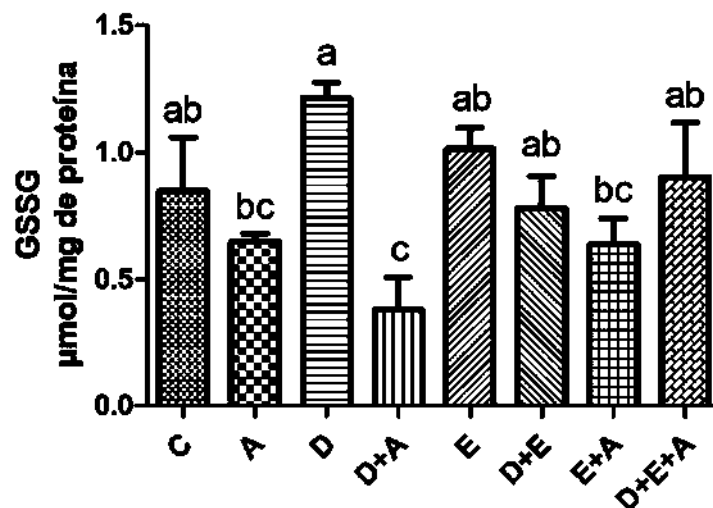


Figura 16. Niveles de glutatión oxidado (GSSG) en el corazón de los diferentes grupos de ratas. C= Control, A= Apocinina, D= Diabéticas, D+A= Diabéticas + Apocinina, E= Ejercitadas, E+A= Ejercitadas + Apocinina, D+E= Diabéticas + Ejercicio, D+E+A= Diabéticas + Ejercicio + Apocinina. n=6. Los datos se presentan como la media \pm error estándar. (ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre grupos.

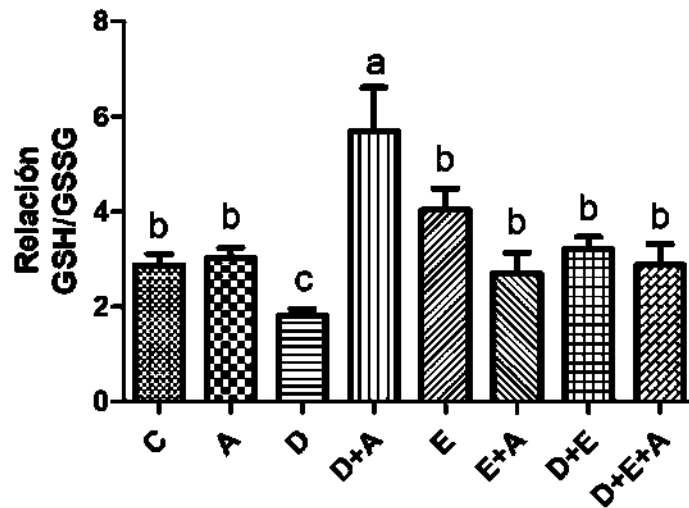


Figura 17. Niveles de la Relación de glutatión reducido (GSH) /glutatión oxidado (GSSG) en el corazón de los diferentes grupos de ratas. C= Control, A= Apocinina, D= Diabéticas, D+A= Diabéticas + Apocinina, E= Ejercitadas, E+A= Ejercitadas + Apocinina, D+E= Diabéticas + Ejercicio, D+E+A= Diabéticas + Ejercicio + Apocinina. n=6. Los datos se presentan como la media ± error estándar. (ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre grupos.

8.6 Efecto de la apocinina y el ejercicio de moderada intensidad en los niveles de la actividad de catalasa en el músculo cardíaco. Se analizó la actividad de la enzima catalasa; como se puede observar en la fig. 18, hubo una disminución de la actividad de esta enzima en el grupo diabético, en comparación con el grupo control; estos valores se vieron restaurados a valores de grupo control en el grupo D+A, el grupo D+E y la combinación de los dos protocolos de tratamientos (D+E+A), demostrando así que la apocinina el ejercicio y la combinación de estos dos procesos, ayudan a mejorar la actividad de catalasa presente en el músculo cardíaco de ratas diabéticas.

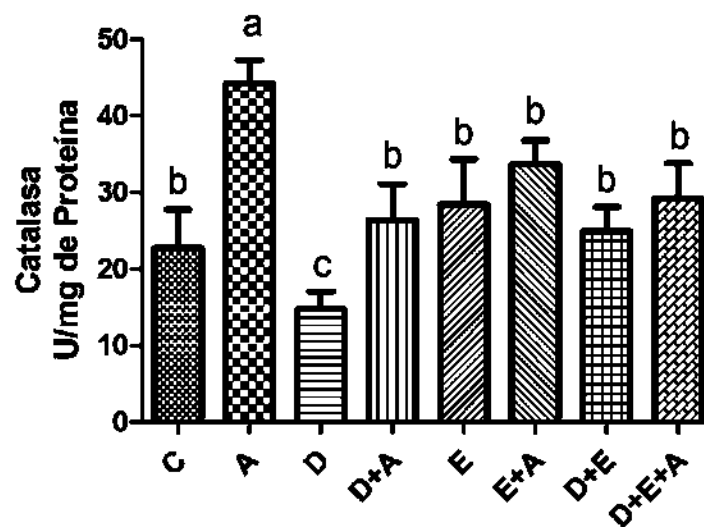


Figura 18. Niveles de la actividad de catalasa (CAT) en el corazón de los diferentes grupos de ratas C= Control, A= Apocinina, D= Diabéticas, D+A= Diabéticas + Apocinina, E= Ejercitadas, E+A= Ejercitadas + Apocinina, D+E= Diabéticas + Ejercicio, D+E+A= Diabéticas + Ejercicio + Apocinina. n=6. Los datos se presentan como la media \pm error estándar. (ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre grupos.

8.7 Efecto de la apocinina y el ejercicio de moderada intensidad en la expresión génica del músculo cardíaco. A continuación, se presentan los resultados que se obtuvieron en el análisis de la expresión génica de ARNm mediante qRT-PCR. Los genes que se analizaron en este proyecto fueron: NOX2, NOX4, Nrf2, NF- κ B, GLUT4 y Catalasa.

En las figs. 19 y 20 se representa la expresión relativa de los genes NOX2 y NOX4, tanto la NOX2 como la NOX4 están sobre expresadas, esto en comparación con los grupos control de cada gen; esta expresión se vio reducida en los grupos diabéticos que fueron administrados con apocinina, los grupos D+E y en la combinación de los dos tratamientos (D+E+A), solo el gen NOX2 presenta diferencias significativas con respecto al grupo diabético. Estos resultados muestran que la apocinina y el ejercicio ayudan a atenuar la expresión de los genes NOX2 y NOX4, importantes isoformas de NADPH que provocan el estrés oxidante presente en el músculo cardíaco de ratas diabéticas.

Otro de los genes analizados fue Nrf2, en donde se puede observar (fig. 21) que en el grupo diabético este gen está expresado de forma disminuida, en comparación con el grupo control; el ejercicio y la combinación de ejercicio + apocinina lograron aumentar la expresión genética de este factor de transcripción; por el contrario, en el grupo D+A no se encontraron diferencias significativas con el grupo diabético.

El gen del NF-κB también fue analizado. Se puede observar que la apocinina (D+A), el ejercicio (D+E) y la combinación de los dos tratamientos (D+E+A) ayudaron a mitigar la expresión de dicho gen, esto en comparación con el grupo diabético (fig. 22).

El GLUT4 es el transportador de glucosa específico en músculo esquelético y miocárdico. En la fig. 23 se puede observar que la expresión de este gen disminuyó en el grupo que presenta la enfermedad (D) y el cual aumentó en los grupos diabéticos tratados con apocinina (D+A) y ejercicio + apocinina (D+E+A).

Se realizó el análisis de la expresión génica de la catalasa (fig. 24), en donde se puede apreciar que no hay diferencias significativas entre el grupo diabético y los grupos que fueron tratados con los diversos tratamientos utilizados en este proyecto (D+A, D+E y D+E+A).

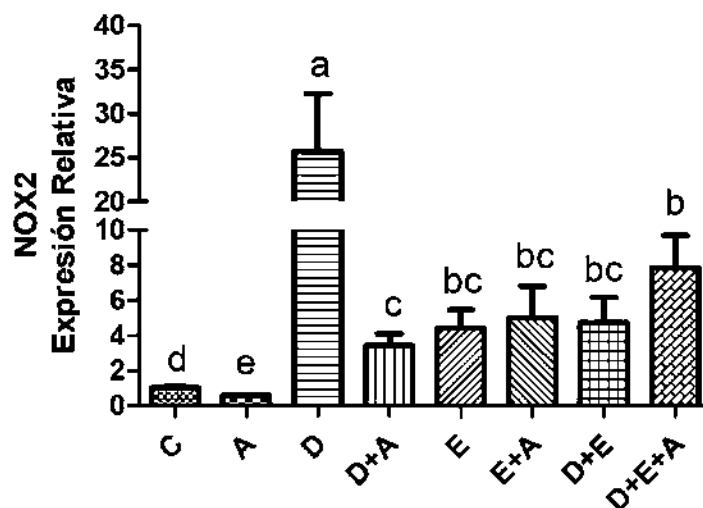


Figura 19. Niveles de expresión genética de NOX2 en el corazón de los diferentes grupos de ratas. C= Control, A= Apocinina, D= Diabéticas, D+A= Diabéticas + Apocinina, E= Ejercitadas, E+A= Ejercitadas + Apocinina, D+E= Diabéticas + Ejercicio, D+E+A= Diabéticas + Ejercicio + Apocinina. n=6. Los datos se presentan como la media ± error estándar. (prueba T de student, p<0.05). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre grupos.

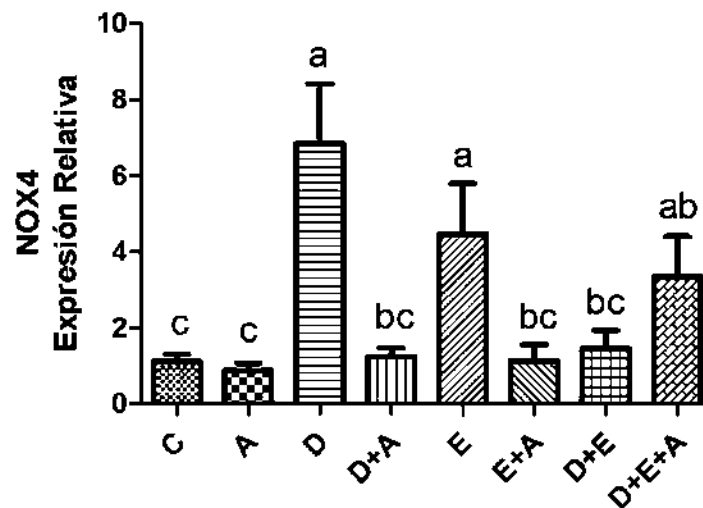


Figura 20. Niveles de expresión genética de NOX4 en el corazón de los diferentes grupos de ratas. C= Control, A= Apocinina, D= Diabéticas, D+A= Diabéticas + Apocinina, E= Ejercitadas, E+A= Ejercitadas + Apocinina, D+E= Diabéticas + Ejercicio, D+E+A= Diabéticas + Ejercicio + Apocinina. n=6. Los datos se presentan como la media ± error estándar. (prueba T de student, $p < 0.05$). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre grupos.

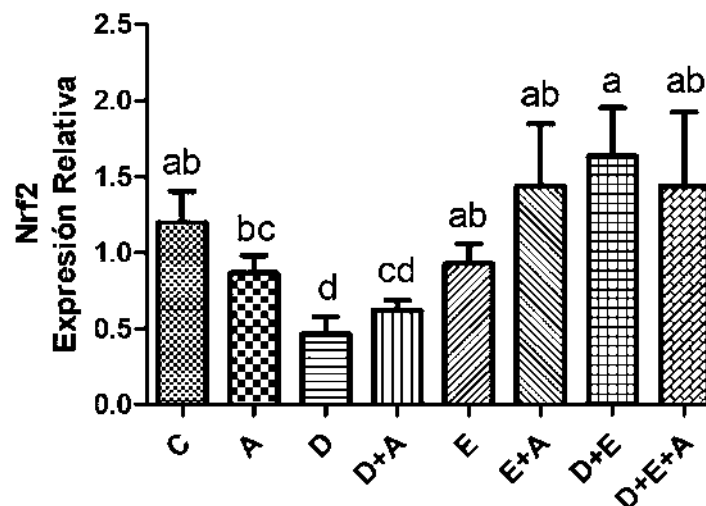


Figura 21. Niveles de expresión genética de Nrf2 en el corazón de los diferentes grupos de ratas. C= Control, A= Apocinina, D= Diabéticas, D+A= Diabéticas + Apocinina, E= Ejercitadas, E+A= Ejercitadas + Apocinina, D+E= Diabéticas + Ejercicio, D+E+A= Diabéticas + Ejercicio + Apocinina. n=6. Los datos se presentan como la media ± error estándar. (prueba T de student, $p < 0.05$). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre grupos.

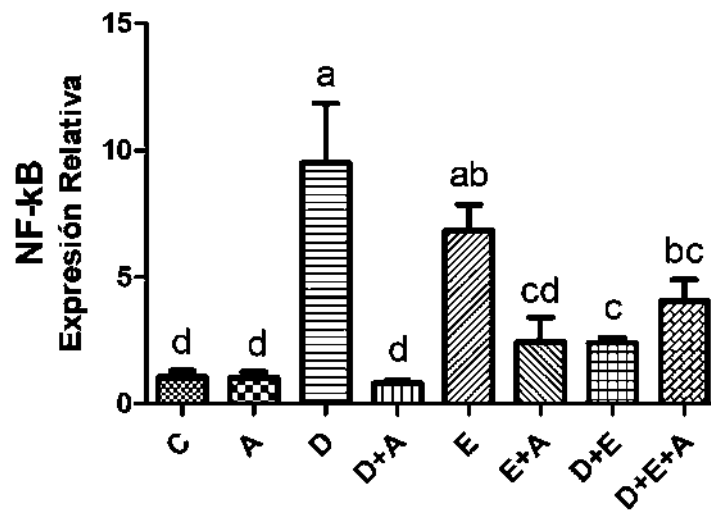


Figura 22. Niveles de expresión genética de NF-κβ en el corazón de los diferentes grupos de ratas. C= Control, A= Apocinina, D= Diabéticas, D+A= Diabéticas + Apocinina, E= Ejercitadas, E+A= Ejercitadas + Apocinina, D+E= Diabéticas + Ejercicio, D+E+A= Diabéticas + Ejercicio + Apocinina. n=6. Los datos se presentan como la media ± error estándar. (prueba T de student, p<0.05). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre grupos.

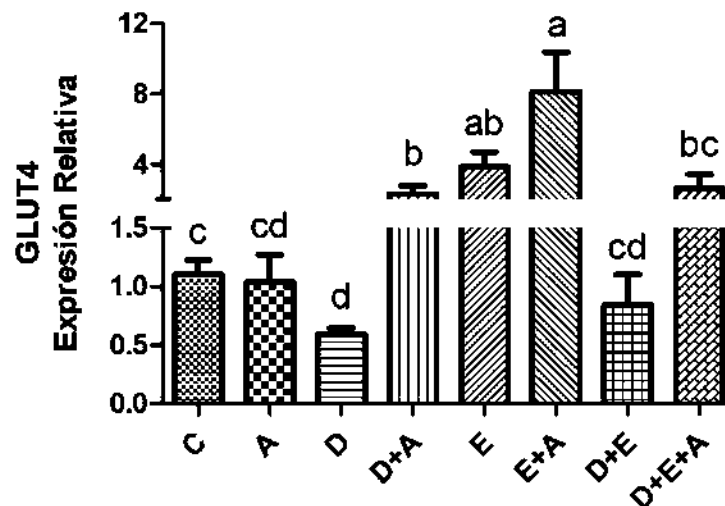


Figura 23. Niveles de expresión genética de GLUT4 en el corazón de los diferentes grupos de ratas. C= Control, A= Apocinina, D= Diabéticas, D+A= Diabéticas + Apocinina, E= Ejercitadas, E+A= Ejercitadas + Apocinina, D+E= Diabéticas + Ejercicio, D+E+A= Diabéticas + Ejercicio + Apocinina. n=6. Los datos se presentan como la media ± error estándar. (prueba T de student, p<0.05). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre grupos.

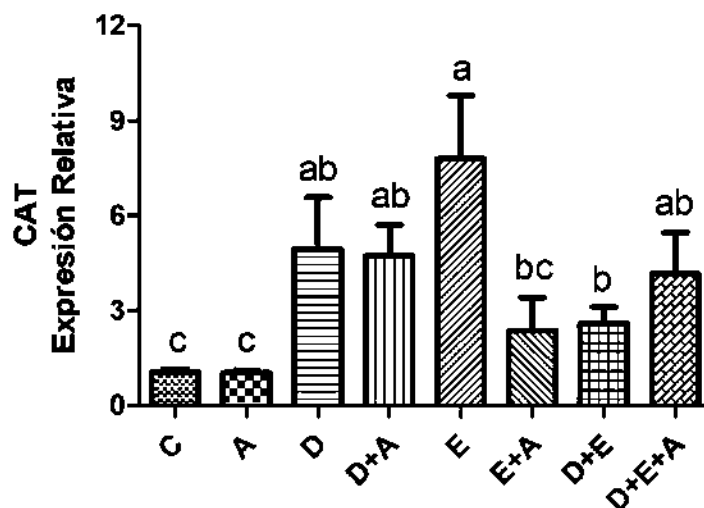


Figura 24. Niveles de expresión genética de catalasa (CAT) en el corazón de los diferentes grupos de ratas. C= Control, A= Apocinina, D= Diabéticas, D+A= Diabéticas + Apocinina, E= Ejercitadas, E+A= Ejercitadas + Apocinina, D+E= Diabéticas + Ejercicio, D+E+A= Diabéticas + Ejercicio + Apocinina. n=6. Los datos se presentan como la media \pm error estándar. (prueba T de student, $p < 0.05$). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre grupos.

9. DISCUSIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por niveles elevados de glucosa en sangre (OPS, 2021) resultante del mal funcionamiento de las células β del páncreas y la disminución de la sensibilidad de la insulina. La hiperglucemia inducida por esta enfermedad está relacionada con daños en varios órganos, entre ellos el corazón y está asociada con enfermedades vasculares y cardíacas. Se cree que el estrés oxidante juega un papel importante en el desarrollo de complicaciones vasculares en la diabetes, ya que, en estado hiperglucémico, la generación de ERO y el estrés oxidante aumentan (ADA, 2017).

Investigaciones anteriores han evidenciado que la apocinina, la cual es una acetofenona natural que se encuentra en las raíces de *Picrorhiza kurroa*, se ha utilizado en una extensa lista de procesos experimentales y ha demostrado ser útil para mejorar una gran variedad de trastornos, como complicaciones diabéticas, neurodegeneración, trastornos cardiovasculares, cáncer de pulmón, cáncer hepatocelular, cáncer de páncreas y feocromocitoma (Savla et al. 2021). Además, es bien sabido que la práctica regular de

ejercicio físico aporta indiscutibles beneficios para la salud de las poblaciones, incluyendo el efecto preventivo sobre diferentes patologías crónicas como el cáncer, la enfermedad cardiovascular, la diabetes y está asociada con una menor mortalidad y morbilidad cardiovascular (*Fernández et al. 2009*).

Este estudio demostró que el grupo diabético presentó alteraciones significativas en el peso corporal y los niveles de glucosa en sangre; de igual manera, se observó que la administración de apocinina logró una disminución de estos niveles glucémicos y un aumento del peso corporal; así mismo, los grupos diabéticos ejercitados y los que fueron tratados con la combinación de los dos tratamientos presentaron una disminución de los niveles de glucosa, esto en comparación con el grupo diabético, pero no se vieron cambios significativos en el peso corporal entre el grupo en condición de diabetes y dichos grupos mencionados con anterioridad. Estos resultados son consistentes con diversos autores, los cuales pudieron observar que el tratamiento con apocinina atenuó significativamente la concentración de glucosa sérica en conejos diabéticos y ellos concluyeron que la inhibición de la gluconeogénesis renal está implicada en la acción hipoglucémica de la apocinina, ya que esta es una fuente importante de glucosa endógena en condiciones diabéticas (*Winiarska et al. 2011*). En cuanto al ejercicio, *Hernández-Rodríguez y colaboradores en 2010* pudieron demostrar que las intervenciones estructuradas de la práctica de ejercicio, al menos durante 8 semanas, evidencia una disminución promedio de 0.66% de los niveles de la hemoglobina glicosilada 1c (HbA1c) en personas con DM, aunque no se presentaran cambios significativos del índice de masa corporal (IMC). Los resultados antes señalados se han tratado de explicar por varios mecanismos, entre los que se destacan el desplazamiento de los receptores de la insulina hacia la superficie celular. Tanto el ejercicio de resistencia como el aerobio son capaces de mejorar la sensibilidad a la insulina, así como otros aspectos de vital importancia para el individuo con diabetes (*Hernández-Rodríguez et al. 2010*).

El estrés oxidante está implicado en la patogenicidad de la resistencia a la insulina. El aumento de los niveles de ROS es un desencadenante importante de la resistencia a la insulina, que puede provocar cambios anormales en la señalización intracelular y contribuir al desarrollo de la resistencia a la insulina (*Meng et al. 2011*). El hígado juega un papel central en la regulación del metabolismo de la glucosa, los ácidos grasos y los aminoácidos en todo el cuerpo. Sin embargo, el aumento de ERO puede dañar el ADN, los lípidos y las proteínas en los hepatocitos, lo que contribuye a la alteración de la

homeostasis celular y agrava las características del síndrome de resistencia a la insulina. Para poder observar si nuestros tratamientos tienen un efecto positivo en la resistencia insulínica evaluamos este parámetro, en donde el grupo diabético presentó una alta resistencia a la insulina, la cual se ha reportado estar presente en condición de diabetes; por el contrario, los grupos diabéticos que fueron tratados con apocinina y ejercicio, así como la combinación de dichos tratamientos, presentaron una mejoría de manera significativa en la resistencia a la insulina. Esto demuestra que la ingesta de antioxidantes, es necesaria para mantener la homeostasis hepática, que es importante no sólo para mejorar la acción de la insulina en el hígado, sino que también para eliminar resistencia a la misma en otra parte del cuerpo, como el corazón (*Meng et al. 2011*); varios autores han llegado a la conclusión de que este efecto está relacionado con la promoción de la captación de glucosa en los músculos esqueléticos, pérdida de grasa corporal en la parte central del cuerpo, la reducción de los productos lipídicos y el aumento de la capacidad oxidativa de los lípidos en las células musculares, el aumento de la función de la insulina en las células de los órganos implicados en el ejercicio, como lo es el corazón, la regulación positiva de la estimulación de las vías de señalización por la insulina, disminución de la reserva de glucógeno en hígado y músculos, cambio de los marcadores inflamatorios, prevención de atrofia, formación de nuevo tejido muscular y aumento de la congestión de la red capilar en los músculos (Guyton y Hall, 2010; Ivy, 1997; Teixeira-Lemos et al. 2011; Turcotte y Fisher, 2008; Praet y van Loon, 2009; Oberbach et al. 2006). Además, estudios epidemiológicos recientes indican que las personas con vida física activa tienen menos probabilidades de desarrollar intolerancia a la glucosa y diabetes no insulino dependiente (*Katzmarzyk et al. 2003*);

En condiciones diabéticas, la producción de ERO supera los niveles “normales” de estos radicales libres presentes en el organismo, provocando estrés oxidante. Para poder determinar el estrés oxidante en el corazón durante la diabetes y si la utilización de un antioxidante como la apocinina y el ejercicio de moderada intensidad ayudan a mitigar la sobreproducción de estos compuestos tóxicos, se realizó la medición de los niveles de ERO y peroxidación lipídica en dicho musculo. Los resultados demostraron que los niveles de ERO y peroxidación lipídica aumentaron en el grupo diabético y estos son un indicativo de la presencia de estrés oxidante en el tejido analizado. Este aumento de la peroxidación lipídica puede traer como consecuencia un mayor daño celular en la función vascular de pacientes diabéticos, ya que, durante el estrés oxidante, uno de los principales blancos de daño oxidativo por ERO son las colas hidrofóbicas insaturadas que

componen a los lípidos de las membranas mitocondriales. Además, algunos autores demostraron que la peroxidación de las membranas mitocondriales afecta a los componentes proteicos de la Cadena transportadora de electrones (CTE) que se encuentran embebidos en ellas, lo cual podría inhibir algunos procesos esenciales que dependen del funcionamiento de la CTE tales como la síntesis de ATP, el transporte de metabolitos y iones o el bombeo de protones, provocando como resultado final el colapso de la célula (*Nicholls y Ferguson, 2002*). Sin embargo, se pudo observar que la administración de apocinina a una concentración de 3 mg/kg y una rutina de ejercicio de moderada intensidad en grupos diabéticos, así como la combinación de ambos procedimientos, ayudó a disminuir las concentraciones de ERO y de peroxidación lipídica, logrando mitigar la degradación oxidativa de los lípidos.

De acuerdo con investigaciones anteriores, estos niveles elevados de ERO pueden estar relacionados con la alta resistencia a la insulina presente en las ratas diabéticas, ya que hay evidencia que asocia una señalización de insulina cardíaca interrumpida con la sobreproducción de ERO, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidante. La disminución de la captación de glucosa debido a la alteración de la señalización de la insulina y la disminución de la expresión de los transportadores de glucosa se asocia con un cambio hacia una mayor dependencia de la oxidación de ácidos grasos y una reducción de la eficiencia cardíaca en los corazones diabéticos (*Varma et al. 2018*). Además, la producción de ERO inducidas por el ejercicio activa múltiples vías de señalización intracelular a través de mecanismos genómicos y no genómicos que son responsables de los efectos beneficiosos del ejercicio en el organismo. Más allá del efecto positivo del ejercicio sobre las células del músculo esquelético, otros tejidos como el tejido adiposo, el hígado, el sistema nervioso central, el endotelio, el corazón y los tejidos de los órganos endocrinos también responden al ejercicio (*Louzada et al. 2020*).

Para neutralizar las ERO, las células están dotadas de mecanismos de defensa antioxidantes, como el glutatión y la catalasa, las cuales son capaces de interactuar con los radicales libres y neutralizarlos, impidiéndoles causar daño y así combatir el estrés oxidante. El glutatión es un abundante antioxidante endógeno sintetizado en grandes cantidades en el hígado. Se transporta a través del flujo sanguíneo a los tejidos cuando existe un desequilibrio entre la producción de ERO y los mecanismos antioxidantes endógenos. Hay reportes que han demostrado que la producción de glutatión disminuye gradualmente en pacientes con diabetes con complicaciones y que esta disminución depende del grado de hiperglucemia (*Gutiérrez-Camacho et al. 2020*). En este proyecto,

se analizó la concentración de glutatión total (GSH+GSSG), glutatión oxidado (GSSG), glutatión reducido (GSH) y la relación GSH/GSSG, que a menudo se utiliza como indicador del estado redox celular; en estos resultados se pudo percibir una disminución de la concentración de glutatión total y glutatión reducido en el grupo Diabético, condición que se vio restaurada e incluso aumentada en el grupo diabético administrado con apocinina, en los grupos tratados con ejercicio y en el grupo en condición de diabetes que fue sometido a la combinación de los tratamientos. Esto puede deberse a que el aumento de la producción de radicales libres inhibe la síntesis de glutatión en el tejido cardiaco de los roedores y una disminución de la producción da como resultado un aumento de la síntesis de glutatión, aumentando así un efecto protector contra el estrés oxidante presente (*Gutiérrez-Camacho et al. 2020*).

En cuanto a la catalasa, se ha reportado que esta es una de las enzimas antioxidantes más importantes y cruciales, ya que aminora el estrés oxidante en gran medida al convertir el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Se ha postulado que la deficiencia o el mal funcionamiento de la catalasa está relacionado con la patogenia de muchas enfermedades degenerativas, como la DM (*Nandi et al. 2019*) ya que, la deficiencia de dicho antioxidante puede ser responsable del desarrollo de diabetes mellitus de manera indirecta; esto puede deberse porque las células β del páncreas son muy sensibles a los oxidantes. Por lo tanto, estas células no solo carecen de catalasa, sino que también tienen una mayor concentración de mitocondrias, que es una de las principales fuentes de superóxido y peróxido de hidrógeno en la célula a través de la vía de transporte de electrones (*Góth et al. 2008*). En el ensayo realizado en el grupo de ratas diabéticas, se observó que los niveles de actividad de la catalasa en el tejido cardiaco, se encontraban disminuidos, esto en comparación con el grupo control; sin embargo, la administración de apocinina y la aplicación de un protocolo de ejercicio de moderada intensidad en un estado diabético, ayudó a aumentar la presencia de la acción de este antioxidante, ayudando a atenuar el estrés oxidante provocado por la DM. La catalasa tiene un papel principal en la regulación del nivel celular de peróxido de hidrógeno y su catabolismo protege a las células del ataque oxidante, por ejemplo, asegurando las células β pancreáticas de una lesión por peróxido de hidrógeno (*Góth et al. 2000*). Aunque aún no está claro exactamente cómo el ejercicio mejora las actividades de SOD, GPX y CAT, se pueden presentar varios mecanismos posibles para explicar este efecto. Se ha sugerido que la Nrf-2, que es un factor de transcripción y se observó un aumento en la fosforilación de Nrf-2 por el ejercicio en la actividad física (*Toborek et al. 2013*).

La DM es una enfermedad compleja, determinada por múltiples factores genéticos y ambientales; tanto en la DM1 como en la DM2, son múltiples los genes que intervienen en la patogenia de la enfermedad; algunos de ellos están relacionados con el estrés oxidante ocasionado por la misma patología y los cuales analizamos en este proyecto (*Urner et al. 2020*). Se realizó el análisis de la expresión genética del ARNm de los genes de NOX2, NOX4, Nrf2, NF-κB, GLUT4 y Catalasa. La NADPH oxidasa (NOX) es un complejo multiprotéico el cual tiene como finalidad la producción de ERO para realizar diversas funciones que van desde la defensa del huésped hasta la señalización celular y la regulación de la expresión génica; La expresión y activación de las proteínas NOX aumenta particularmente en condiciones de estrés agudo y crónico, como la hiperglucemia, lo que conduce a un aumento crítico de las ERO derivadas de NOX, lo que provoca estrés oxidante y daño celular (*Urner et al. 2020*). De las siete isoformas de NOX de mamíferos, NOX2 y NOX4 se expresan en el corazón (*Lasségue et al. 2012*), en este proyecto, se analizaron estos dos genes, en donde pudimos observar que, de forma significativa, la expresión genética relativa del ARNm de NOX2 y NOX4 se encontró aumentada en el grupo Diabético, esto en comparación con el grupo Control. Estos resultados pueden deberse a que se ha reportado que después de diferentes tipos de estrés sostenido, la señalización dependiente de NOX2 y NOX4 promueve varios procesos perjudiciales en la patología cardíaca, incluida la hipertrofia de los cardiomiocitos, la disfunción contráctil, la arritmia, la fibrosis intersticial, la muerte celular y la ruptura cardíaca después de un infarto de miocardio, según lo revisado por Zhang y colaboradores en el año 2013. Este aumento de la expresión genética tanto de NOX2 como de NOX4 se vio regulado y disminuido en el grupo diabético que fue administrado por apocinina y en los grupos diabéticos que practicaron un protocolo de forma regular de actividad física. Por consiguiente, se puede decir que a través de la administración de apocinina y la actividad física regular como tratamientos en individuos diabéticos, se pudo disminuir la expresión de estos genes, provocando una disminución del estrés oxidante ocasionado por estas isoformas de NADPH y evitando la traslocación de las subunidades p47^{phox} a la membrana plasmática, provocando así la inhibición de la enzima NOX, dando lugar a disminuir su actividad y el estrés oxidante presente en el tejido cardíaco en condición de Diabetes.

En condiciones de estrés oxidante, las células remodelan el metabolismo y la expresión génica para mantener la homeostasis RÉDOX mediante la activación del factor 2 relacionado con NF-E2 (Nrf2) y otras vías de respuesta al estrés. El factor Nrf2 es

conocido como un regulador maestro que regula la activación transcripcional de genes involucrados en la de la síntesis de antioxidantes (*Mitsuishi et al. 2012*) contribuyendo a la protección contra varias patologías como el cáncer y la diabetes. En este proyecto pudimos realizar el análisis de este gen en donde pudimos observar que, en el grupo Diabético, este gen se encuentra expresado de forma disminuida, en comparación con el grupo control. Este resultado mostró la deficiencia de la expresión de Nrf2 en el corazón. A los grupos diabéticos que fueron administrados solo con apocinina no se les vio una mejoría significativa en la expresión genética relativa de dicho gen, sin embargo, el ejercicio y la combinación de estos dos tratamientos lograron aumentar la expresión relativa del gen Nrf2; esto es consistente con algunos datos reportados con anterioridad, uno de ellos es de *Muthusamy y cols., en 2012*, quienes demostraron que el estrés por ejercicio agudo (EEA) da como resultado la activación de la señalización de Nrf2/EEA y la posterior mejora de las vías de defensa antioxidantes en el corazón del ratón. Además, en 2018, Hancock y colodadores demostraron que la activación de Nrf2 por EEA está mediada por NOX4 y contribuye al control de calidad mitocondrial mediante la desactivación específica de NOX4 y Nrf2 en cardiomiocitos. Entonces, el ejercicio induce la expresión de NOX4 en el corazón, lo que activa Nrf2 y aumenta la capacidad de resistencia. El factor Nrf2 se inactiva en ciertas condiciones patológicas, como la diabetes, pero la regulación en la eliminación de ERO mitocondrial rescata la expresión de Nrf2 y mejora la patología, pudiendo ser esto un potencial terapéutico en las complicaciones de la diabetes.

El factor nuclear kappa B (NF- κ B) es un factor de transcripción sensible a rédox involucrado en una variedad de procesos celulares que incluyen inflamación, respuestas inmunitarias, producción de citocinas/quimiocinas, apoptosis, así como crecimiento y desarrollo celular (*Gilmore, 2006*). Después de analizar nuestros resultados, podemos decir se presentó una sobreexpresión de este gen en el grupo diabético, actividad que se vio disminuida en el grupo diabético con apocinina y en los grupos que se ejercitaron en presencia de dicha patología, lo que nos dice que la apocinina y la actividad física están atenuando la expresión genética de un factor de transcripción que está relacionada con algunos procesos celulares, que incluyen la inflamación. Estudios previos sobre entrenamiento físico se enfocaron en la reducción de los factores de riesgo asociados con la inflamación y en el papel del ejercicio aeróbico y el entrenamiento de resistencia en la regulación de la inflamación y la respuesta inmune. Los resultados relacionados con los efectos antiinflamatorios del ejercicio han sido variados, reflejando diferencias en el tipo

de ejercicio, la duración del ejercicio, la intensidad del ejercicio, la capacidad de resistencia y la morfología muscular (*Kim et al. 2014*).

La actividad genética de estos dos genes, el Nrf2 y el NF- κ B, están relacionados, ya que el efecto negativo de la regulación negativa de Nrf2 puede amplificar las respuestas inflamatorias al inducir la expresión de NF- κ B, IL-1 β y TNF- α junto con un aumento del estrés oxidante y nitrosativo. Por lo tanto, este hallazgo puede sugerir que la supresión de la expresión de Nrf2 y el aumento de la expresión de NF- κ B están involucrados en la patogenia de la miopatía diabética, y el NOX podría ser un mediador previo de estos cambios (*Sánchez-Duarte et al. 2022*).

La glucosa es transportada a los miocitos cardíacos por miembros de la familia de transportadores de glucosa (GLUT). En este sentido, los cardiomiocitos tienen muchas similitudes con el músculo esquelético, pero también existen diferencias importantes. Por ejemplo, el transportador de glucosa más abundante en el corazón es el transportador GLUT4, en el que la translocación a la membrana plasmática representa un mecanismo importante por el cual se regula el flujo neto de glucosa hacia la célula (Abel, 2004). Se analizó la actividad genética relativa del ARNm del gen GLUT4, en donde, los resultados fueron una expresión relativa disminuida en el tejido cardíaco del grupo diabético, esto en comparación con el grupo control. Investigaciones anteriores han evidenciado que los cambios observados en el corazón diabético mostraron que la diabetes mellitus tipo 1 altera la expresión y translocación de GLUT4 y GLUT8 en las aurículas (*Szablewski et al. 2016*). En las aurículas diabéticas, el contenido en la superficie celular de estos transportadores de glucosa está regulado a la baja. En enfermedades cardíacas, como la hipertrofia cardíaca, la insuficiencia cardíaca y la isquemia miocárdica, se observan diferentes perturbaciones en la expresión de los transportadores de glucosa, especialmente en GLUT1 y GLUT4, debido a cambios en el metabolismo de la glucosa cardíaca (*Szablewski et al. 2016*). Estos niveles de expresión genética de GLUT4 se vieron aumentados en los grupos administrados con apocinina y los grupos diabéticos que se trataron con los dos tratamientos analizados, demostrando el efecto protector de dicho fármaco en el metabolismo de la Glucosa.

Finalmente, el último gen que se analizó fue el de la catalasa. Se ha informado que la sobreexpresión de catalasa a través de un promotor específico del corazón (CAT-TG) reduce la acumulación de ERO inducida por la diabetes y previene aún más las anomalías patológicas inducidas por la diabetes, incluido el trastorno estructural cardíaco y la

anomalía del ventrículo izquierdo en ratones. Los resultados demostraron, de manera sorprendente que, la expresión genética relativa de ARNm de Catalasa se encontró expresada de manera aumentada en los corazones del grupo Diabético, en comparación con el grupo control; esto puede ser debido a que algunos órganos, en este caso el corazón, al estar expuesto a un estrés oxidante de manera constante envían una señal al núcleo de la célula dañada para que haya una sobreexpresión de la actividad genética del sistema antioxidante, esto para combatir la presencia de radicales libres y en algunos casos, regular la activación de rutas de señalización relacionadas al estrés oxidante. Un estudio realizado en 2015 encontró que la activación de una vía de señalización de NF- κ B dependiente de ERO estaba regulada negativamente en corazones de ratones diabéticos que sobreexpresaban catalasa. Estos hallazgos demostraron que la catalasa protege los corazones de los ratones contra la miocardiopatía diabética, en parte al suprimir las respuestas inflamatorias dependientes de NF- κ B y la nitración de proteínas asociadas, protegiendo a los ratones contra el desarrollo de daño cardíaco (*Cong et al. 2015*). Asimismo, los grupos diabéticos sometidos a los tratamientos de forma individual y en combinación, mostraron un aumento de la expresión genética relativa de ARNm de Catalasa, los cuales fueron comparados con el grupo control.

10. CONCLUSIONES

La administración de apocinina y un protocolo de ejercicio de intensidad moderada mejoran los niveles de glucosa y resistencia a la insulina; además, restauran la actividad de los antioxidantes glutatión y catalasa, logrando disminuir los niveles de ERO presentes en el músculo cardíaco de ratas diabéticas. Asimismo, los efectos de la apocinina y el ejercicio disminuyeron los niveles de NOX2, NOX4 y NF- κ B y aumentaron la expresión del ARNm de Nrf2 y GLUT4 en el tejido cardíaco, mostrando así que tanto la apocinina como el ejercicio de moderada intensidad son métodos efectivos para lograr una mayor expresión de genes relacionados con la defensa antioxidante y así poder mitigar el estrés oxidante provocado en el músculo cardíaco en situación de diabetes.

11. REFERENCIAS

- Abel ED. (2004). Glucose transport in the heart. *Front Biosci.* 9:201-15. doi: 10.2741/1216.
- Anilkumar N, Weber R, Zhang M, Brewer A, Shah AM. (2008). Nox4 and nox2 NADPH oxidases mediate distinct cellular redox signaling responses to agonist stimulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28(1):1347-1354. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.164277.
- ADA. Asociación Americana de Diabetes. (2017). Estándares de atención médica en diabetes 2017 resumidos para proveedores de atención primaria. *Clin Diabetes.* 35(1):5-26. doi: 10.2337/cd16-0067.
- Azizbeigi K, Azarbayjani MA, Atashak S, Stannard SR. (2015). Effect of moderate and high resistance training intensity on indices of inflammatory and oxidative stress. *Res Sports Med.* 23(1):73-87. doi: 10.1080/15438627.2014.975807.
- Barbieri SS, Cavalca V, Eligini S, et al. (2004). Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine.* 37 (2):156–165. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.020.
- Blasco AN. (2017). ENDOG influye en el crecimiento y la proliferación celular con impacto en el desarrollo de tejidos y la progresión tumoral. Universidad de Lleida.
- Bogdanis GC, Stavrinou P, Fatouros IG, Philippou A, Chatzinikolaou A, Draganidis D, Ermidis G, Maridaki M. (2013). Short-term high-intensity interval exercise training attenuates oxidative stress responses and improves antioxidant status in healthy humans. *Food and Chemical Toxicology.* (61):171-7. doi: 10.1016/j.fct.2013.05.046.
- Bohl M, Bjørnshave A, Larsen M, Gregersen S, Hermansen K. (2017). The effects of proteins and medium-chain fatty acids from milk on body composition, insulin sensitivity and blood pressure in abdominally obese adults. *Eur J Clin Nutr.* 71(1):76. doi: 10.1038/ejcn.2016.207.
- Buchheit M, Laursen PB. (2013). High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle: Part I: cardiopulmonary emphasis. *Sports Med.* 43(5):313-38. doi: 10.1007/s40279-013-0029-x.

Cakir-Atabek H, Demir S, Pinarbaşı RD, Gündüz N. (2010). Effects of different resistance training intensity on indices of oxidative stress. *J Strength Cond Res.* 24(9):2491-7. doi: 10.1519/JSC.0b013e3181ddb111.

Chen QM, Maltagliati AJ. (2018). Nrf2 at the heart of oxidative stress and cardiac protection. *Physiol Genomics.* 50(2):77-97. doi: 10.1152/physiolgenomics.00041.

Chen Y, Saari JT, Kang YJ. (1994). Weak antioxidant defenses make the heart a target for damage in copper-deficient rats. *Free Radic Biol Med* (17):529–536. doi: 10.1016/0891-5849(94)90092-2.

Chomczynski P, Sacchi N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nat. Protoc.* 1:581–585. doi: 10.1038/nprot.2006.83.

Clark RA, Volpp BD, Leidal KG, Nauseef WM. (1990). Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation. *Journal of Clinical Investigation.* 85(3):714–721. doi: 10.1172/JCI114496.

Cong W, Ruan D, Xuan Y, Niu C, Tao Y, Wang Y, Zhan K, Cai L, Jin L, Tan Y. (2015). Cardiac-specific overexpression of catalase prevents diabetes-induced pathological changes by inhibiting NF- κ B signaling activation in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 89(Pt B):314-25. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.10.010.

Conget I. Diagnosis, classification and pathogenesis of diabetes mellitus. (2002). *Rev Esp Cardiol.* 55(5):528-35. doi: 10.1016/s0300-8932(02)76646-3.

Coyoy SA, Morán J. (2012). Papel de las ERO producidas por la NOX en procesos fisiológicos. *Rev Educ Bioquímica.* 31(3):100-109.

DeFronzo RA. (2009). From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes.* 58(4):773-95. doi: 10.2337/db09-9028.

De los Nietos MC. (2007). Nociones básicas de Anatomía, Fisiología y Patología cardíaca: Bradiarritmias y Taquiarritmias. *Enferm Cardiol.* (40):7-20.

Dhingra R, Vasan RS. (2012). Diabetes and the risk of heart failure. *Heart Fail Clin.* 8:125-133. doi: 10.1016/j.hfc.2011.08.008

Fernández JM, Da Silva-Grigoletto ME, Túnez-Fiñana I. (2009). Estrés oxidativo inducido por el ejercicio. *Rev And Med Dep.* 2(1):19-34.

Forman HJ, Zhang H. (2021). Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov.* (9):689-709. doi: 10.1038/s41573-021-00233-1.

Gacitua T, Karachon L, Romero E, Parra P, Poblete C, Russell J, et al. (2017). Effects of resistance training on oxidative stress-related biomarkers in metabolic diseases: a review. *Sport Sci Health.* (14):1-7. doi:10.1007/s11332-017-0402-5.

Gilmore TD. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene.* 25(51):6680-4. doi: 10.1038/sj.onc.1209954.

Gimenes, R, Gimenes, C, Rosa, CM. et al. (2018). Influence of apocynin on cardiac remodeling in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol.* 17(15). doi: 10.1186/s12933-017-0657-9.

Goldberg RB. (2009). Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metabol.* 94(9):3171–3182. doi: 10.1210/jc.2008-2534.

Gómez-Cabrera M, Domenech E, Viña J. (2008). Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. 44(2):126-31. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.001.

Gómez-Cabrera MC, Viña J, Ji LL. (2009). Interplay of oxidants and antioxidants during exercise: implications for muscle health. *Phys Sportsmed.* 37(4):116-23. doi: 10.3810/psm.2009.12.1749.

González-Perilli, L, Prolo, C, Álvarez, MN. (2019). Arachidonic Acid and Nitroarachidonic: Effects on NADPH Oxidase Activity. *Adv Exp Med Biol.* 1127:85-95. doi: 10.1007/978-3-030-11488-6_6.

Gordon BA, Benson AC, Bird SR, Fraser SF. (2009). Resistance training improves metabolic health in type 2 diabetes: A systematic review. *Diabetes Res Clin Pract.* 83(2):157-75. doi: 10.1016/j.diabres.2008.11.024.

Góth L. (2008). Catalase deficiency and type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 31(12):e93. doi: 10.2337/dc08-1607.

Góth L, Eaton JW. (2000). Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes. *Lancet*. 356(9244):1820-1. doi: 10.1016/S0140-6736(00)03238-4.

Guo X, Sun W, Luo G, Wu L, Xu G, Hou D, Hou Y, Guo X, Mu X, Qin L, Liu T. (2019). Panax notoginseng saponins alleviate skeletal muscle insulin resistance by regulating the IRS1-PI3K-AKT signaling pathway and GLUT4 expression. *FEBS Open Bio*. 9(5):1008-1019. doi: 10.1002/2211-5463.12635.

Gutiérrez-Camacho LR, Kormanovski A, Del Carmen Castillo-Hernández M, Guevara-Balcázar G, Lara-Padilla E. (2020). Alterations in glutathione, nitric oxide and 3-nitrotyrosine levels following exercise and/or hyperbaric oxygen treatment in mice with diet-induced diabetes. *Biomed Rep*. 12(5):222-232. doi: 10.3892/br.2020.1291.

Guyton A. C, Hall JE. (2010). Libro de texto de fisiología médica. 12^a ed. Filadelfia: Saunders.

Hancock M, Hafstad AD, Nabeebaccus AA, Catibog N, Logan A, Smyrniak I, Hansen SS, Lanner J, Schröder K, Murphy MP, Shah AM, Zhang M. (2018). Myocardial NADPH oxidase-4 regulates the physiological response to acute exercise. *Elife*. 7:e41044. doi: 10.7554/eLife.41044.

Hathaway QA, Pinti MV, Durr AJ, Waris S, Shepherd DL, Hollander JM. (2017). Regulating microRNA expression: at the heart of diabetes mellitus and the mitochondrion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 314(2):H293-H310. doi: 10.1152/ajpheart.00520.2017.

Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. (2011). Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med*. 51(5):993-9. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.005.

Hernández-Rodríguez J, Licea-puigii, ME. (2010). Role of physical exercise in persons presenting with diabetes mellitus. *Revista Cubana de Endocrinología*. 21(2):182-201.

Hougee S, Hartog A, Sanders A, et al. (2006). Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice. *European Journal of Pharmacology*. 531(1-3):264-269.

International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel. (2010). International association of diabetes and pregnancy study groups recommendation

on the diagnosis and classifications of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care*. 33:676-682. doi: 10.2337/dc09-1848.

International Diabetes Federation (IDF). (2021). Guía de incidencia política de la décima edición del atlas de la diabetes de la IDF.

Ivy JL. (1997). Role of exercise training in the prevention and treatment of insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Sports Med*. 24(5):321-36. doi: 10.2165/00007256-199724050-00004.

Johnson DK, Schillinger KJ, Kwait DM, Hughes CV, McNamara EJ, Ishmael F, O'Donnell RW, Chang MM, Hogg MG, Dordick JS, Santhanam L, Ziegler LM, Holland JA. (2002). Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. *Endothelium*. 9(3):191–203. doi: 10.1080/10623320213638

Kaneto H, Katakami N, Matsuhisa M, Matsuoka T. (2010). Role of Reactive Oxygen Species in the Progression of Type 2 Diabetes and Atherosclerosis. *Mediators Inflamm*. 1-11. doi: 10.1155/2010/453892.

Katzmarzyk PT, Leon AS, Wilmore JH, Skinner JS, Rao DC, Rankinen T, Bouchard C. (2003). Targeting the metabolic syndrome with exercise: evidence from the HERITAGE Family Study. *Med Sci Sports Exerc*. 35(10):1703-9. doi: 10.1249/01.MSS.0000089337.73244.9B.

Kim JS, Lee YH, Kim JC, Ko YH, Yoon CS, Yi HK. (2014). Effect of exercise training of different intensities on anti-inflammatory reaction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Sport*. 31(1):73-9. doi: 10.5604/20831862.1093775.

Krause M, Rodrigues-Krause J, O'Hagan C, Medlow P, Davison G, Susta D, Boreham C, Newsholme P, O'Donnell M, Murphy C, De Vito G. (2014). The effects of aerobic exercise training at two different intensities in obesity and type 2 diabetes: Implications for oxidative stress, low-grade inflammation and nitric oxide production. *Eur J Appl Physiol*. 114(2):251-60. doi: 10.1007/s00421-013-2769-6.

Kurban S, Mehmetoglu I, Yerlikaya HF, Gonen S, Erdem S. (2011). Effect of chronic regular exercise on serum ischemia-modified albumina levels and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Endocr Res*. 36(3):116-23. doi: 10.3109/07435800.2011.566236.

Lafeber FPJG, Beukelman CJ, van den Worm E, van Roy JL, Vianen ME, van Roon JA, van Dijk H, Bijlsma JW. (1999). Apocynin, a plant-derived, cartilage-saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 38(11):1088–1093. doi: 10.1093/rheumatology/38.11.1088.

Lassègue B, San Martín A, Griendling KK. (2012). Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res*. 110(10):1364-90. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243972.

Le Lay S, Simard G, Martínez MC, Andriantsitohaina R. (2014). Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view. *Oxid Med Cell Longev*. 2014:908539. doi: 10.1155/2014/908539

León BM, Maddox TM. (2015). Diabetes and cardiovascular disease: epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. *World J Diabetes*. 6(13):1246-1258. doi:10.4239/wjd.v6. i13.1246.

Calvetti Leonello (s.f.) Anatomía del pecho masculino de Science Photo Library. Media Storehouse. Disponible en línea: <https://www.mediastorehouse.com/science-photo-library/male-chest-anatomy-artwork-9274973.html>

Lipinski B. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. (2001). *J Diabetes Complications*. 15(4):203-210. doi:10.1016/s1056-8727(01)00143-x.

Louzada RA, Bouviere J, Matta LP, Werneck-de-Castro JP, Dupuy C, Carvalho DP, Fortunato RS. (2020). Redox Signaling in Widespread Health Benefits of Exercise. *Antioxid Redox Signal*. doi: 10.1089/ars.2019.7949.

Luchtefeld R, Luo R, Stine K, Alt ML, Chernovitz PA, Smith RE. (2008). Dose formulation and analysis of diapocynin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(2):301–306. doi: 10.1021/jf072792n.

Meng R, Zhu DL, Bi Y, Yang DH, Wang YP. (2011). Anti-oxidative effect of apocynin on insulin resistance in high-fat diet mice. *Ann Clin Lab Sci*. 41(3):236-43. PMID: 22075506.

Miranda H, Rodrigo, Castro G, Pablo, Verdejo P, Hugo, Chiong, Mario, Díaz-Araya, Guillermo, Mellado, Rosemarie, Rojas, Diego, Concepción, Roberto, & Lavandera, Sergio. (2007). Estrés oxidativo e inflamación en insuficiencia cardíaca: Mecanismos de daño y

alternativas terapéuticas. *Revista médica de Chile*, 135(8):1056-1063. doi: 10.4067/S0034-98872007000800015

Mitranun W, Deerochanawong C, Tanaka H, Suksom D. (2014). Continuous vs interval training on glycemic control and macro- and microvascular reactivity in type 2 diabetic patients. *Scand J Med Sci Sport*. 24(2):69-76. doi: 10.1111/sms.12112.

Mitsuishi Y, Motohashi H, Yamamoto M. (2012) The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Front Oncol*. 2:200. doi: 10.3389/fonc.2012.00200.

Moghaddam DA, Heber A, Capin D, Kreutz T, Opitz D, Lenzen E, Bloch W, Brixius K, Brinkmann C. (2011). Training increases peroxiREDOXin 2 contents in the erythrocytes of overweight/obese men suffering from type 2 diabetes. *Wien Med Wochenschr*. 161(21-22): 511-8. doi: 10.1007/s10354-011-0037-0.

Muthusamy VR, Kannan S, Sadhaasivam K, Gounder SS, Davidson CJ, Boehme C, Hoidal JR, Wang L, Rajasekaran NS. (2011). Acute exercise stress activates Nrf2/ARE signaling and promotes antioxidant mechanisms in the myocardium. *Free Radic Biol Med*. 52(2):366-76. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.440.

Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2019:9613090. doi:10.1155/2019/9613090.

Neves de Oliveira V, Bessa A, Mendonça Pereira JML, Da Silva Oliveira RJ, de Mello MT, De Agostini GG, et al. (2012). The effect of different training programs on antioxidant status, oxidative stress, and metabolic control in type 2 diabetes. *Appl Physiol Nutr Metab*. 37(2):334-44. doi: 10.1139/h2012-004.

Nicholls DG y Ferguson SJ. (2002). *Bioenergetics 3*. London, UK Academic Press. 5, 89-156.

Nojima H, Watanabe H, Yamane K, Kitahara Y, Sekikawa K, Yamamoto H, Yokoyama A, Inamizu T, Asahara T, Kohno N; Hiroshima University Health Promotion Study Group. (2008). Effect of aerobic exercise training on oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 57(2):170-6. doi: 10.1016/j.metabol.2007.08.021.

Oberbach A, Tönjes A, Klötting N, Fasshauer M, Kratzsch J, Busse MW, Paschke R, Stumvoll M, Blüher M. (2006). Effect of a 4-week physical training program on plasma

concentrations of inflammatory markers in patients with abnormal glucose tolerance. *Eur J Endocrinol.* 154(4):577-85. doi: 10.1530/eje.1.02127.

Olivares Reyes J, Arellano Plancarte A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la Insulina. *Rev Educ Bioquímica.* 27(1):9-18.

Oliveira C, Simões M, Carvalho J, Ribeiro J. (2012). Combined exercise for people with type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *Diabetes Res Clin Pract.* 98(2):187-98. doi: 10.1016/j.diabres.2012.08.004.

Organización Panamericana de Salud (OPS). (2021). *Diabetes.*

Ortiz-Ávila O, Sámano-García CA, Calderón-Cortés E, Pérez-Hernández IH, Mejía-Zepeda R, Rodríguez-Orozco AR, Saavedra-Molina A, Cortés-Rojo C. (2013). Dietary avocado oil supplementation attenuates the alterations induced by type i diabetes and oxidative stress in electron transfer at the complex ii-complex iii segment of the electron transport chain in rat kidney mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 45(3):271-87. doi: 10.1007/s10863-013-9502-3.

Ortiz-Avila O, Esquivel-Martínez M, Olmos-Orizaba BE, Saavedra-Molina A, Rodriguez-Orozco AR, Cortés-Rojo C. (2015). Avocado oil improves mitochondrial function and decreases oxidative stress in brain of diabetic rats. *J Diabetes Res.* 2015:485759. doi:10.1155/2015/485759.

Padron de Figueiredo A, Salmon A, Bruno F, Jiménez F, Martínez H, Halade G, et al. (2015). Nox2 Mediates Skeletal Muscle Insulin Resistance Induced by a High Fat Diet. *The Journal of Biological Chemistry.* 290(21):13427-39. doi: 10.1074/jbc.M114.626077.

Panday A, Sahoo MK, Osorio D, Batra S. (2015). NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cellular & Molecular Immunology.* 12(1):5-23. doi: 10.1038/cmi.2014.89.

Peters EA, Hiltermann JTN, Stolk J. (2001). Effect of apocynin on ozone-induced airway hyperresponsiveness to methacholine in asthmatics. *Free Radical Biology and Medicine.* 31(11):1442–1447. doi: 10.1016/s0891-5849(01)00725-0.

Pham-Huy LA., He H., Pham-Huy C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 4(2):89-96.

Pisoschi AM, Pop A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 97: 55-74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040.

Poblete-Aro C, Russell-Guzmán J, Parra P, Soto-Muñoz M, Villegas-González B, Cofré-Bola-Dos C, Herrera-Valenzuela T. (2018). Efecto del ejercicio físico sobre marcadores de estrés oxidante en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Rev. Méd. Chile.* 146(3):362-372. doi: 10.4067/s0034-98872018000300362.

Powers S, Radak Z, Ji LL. (2016). Exercise-induced oxidative stress: past, present and future. *J Physiol.* 594(18):5081-92. doi: 10.1113/JP270646.

Powers SK, Jackson MJ. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 88(4):1243-76. doi: 10.1152/physrev.00031.2007.

Praet SF, van Loon LJ. (2009). Exercise therapy in type 2 diabetes. *Acta Diabetol.* 46(4):263-78. doi: 10.1007/s00592-009-0129-0.

Quílez Llopiz P, Reig García-Galbis M. (2015). Glycemic control through physical exercise in type 2 diabetes systematic review. *Nutr Hosp.* 31(4):1465-72. doi: 10.3305/nh.2015.31.4.7907.

Ramírez-Ramírez, F. J. (2009). Fisiología Cardíaca. *Revista Médica MD.* 1(3).

Raff, H., Levitzky, M. (2011). Fisiología médica: un enfoque por aparatos y sistemas. McGraw-Hill Interamericana. págs 790.

Roberts CK, Hevener AL, Barnard RJ. (2013). Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise training. *Compr Physiol.* 3(1):1-58. doi: 10.1002/cphy.c110062.

Rojas de PE, Molina R, Rodríguez C. (2012). Definición, clasificación y diagnóstico de la Diabetes Mellitus. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo.* 10(1):7-12.

Sánchez-Duarte S, Montoya-Pérez R, Márquez-Gamiño S, Vera-Delgado KS, Caudillo-Cisneros C, Sotelo-Barroso F, Sánchez-Briones LA, Sánchez-Duarte E. (2022). Apocynin Attenuates Diabetes-Induced Skeletal Muscle Dysfunction by Mitigating ROS Generation and Boosting Antioxidant Defenses in Fast-Twitch and Slow-Twitch Muscles. *Life (Basel).* 12(5):674. doi: 10.3390/life12050674.

Sánchez-Malo, MJ, Arrudi MM, Lou-francés GM. (2019). Diabetes tipo MODY-3, no todo debut es diabetes tipo 1. Elsevier. 66(4):271-272.

Savla SR, Laddha AP, Kulkarni YA. (2021). Pharmacology of apocynin: a natural acetophenone. Drug Metab Rev. 53(4):542-562. doi: 10.1080/03602532.2021.1895203.

Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in REDOX biology and medicine. REDOX Biol. (4):180–183. doi: 10.1016/j.REDOX.2015.01.002.

Simons JM, 't Hart BA, Ip Vai Ching TRAM, Van Dijk H, Labadie RP. (1990). Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. Free Radical Biology and Medicine. 8 (3):251–258. doi: 10.1016/0891-5849(90)90070-y.

Stanley WC, Lopaschuk GD, McCormack JG. (1997). Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. Cardiovasc Res. 34:25–33. doi: 10.1016/S0008-6363(97)00047-3.

Stevens A, J Lowe. (2001). Anatomía patológica. 2a Ed. S.A. Elsevier España. 672 pp.

Szablewski L. (2016). Glucose transporters in healthy heart and in cardiac disease. Int J Cardiol. 230:70-75. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.12.083.

Tangvarasittichai S. (2015). Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. World J Diabetes. 6(3):456-80. doi: 10.4239/wjd.v6.i3.456.

Teixeira-Lemos E, Nunes S, Teixeira F, Reis F. (2011). Regular physical exercise training assists in preventing type 2 diabetes development: focus on its antioxidant and anti-inflammatory properties. Cardiovasc Diabetol. 10:12. doi: 10.1186/1475-2840-10-12.

The Texas Heart Institute. (2021). Heart anatomy. Disponible en línea: <https://www.texasheart.org/heart-health/heart-information-center/topics/anatomia-del-corazon/>

Toborek M, Seelbach MJ, Rashid CS, Andrés IE, Chen L, Park M, Esser KA. (2013). Voluntary exercise protects against methamphetamine-induced oxidative stress in brain microvasculature and disruption of the blood-brain barrier. Mol Neurodegener. 8:22. doi: 10.1186/1750-1326-8-22.

Toro J, Rodrigo R. (2009). *Oxidative Stress: Basic Overview. Oxidative Stress and Antioxidants: Their Role in Human Disease*. New York, United States of America: Nova. 1-24.

Turcotte LP, Fisher JS. (2008). Skeletal muscle insulin resistance: roles of fatty acid metabolism and exercise. *Phys Ther.* 88(11):1279-96. doi: 10.2522/ptj.20080018.

Urner S, Ho F, Jha JC, Ziegler D, Jandeleit-Dahm K. (2020). NADPH Oxidase Inhibition: Preclinical and Clinical Studies in Diabetic Complications. *Antioxid Redox Signal.* 33(6):415-434. doi: 10.1089/ars.2020.8047.

Van den Oever IA, Raterman HG, Nurmohamed MT, Simsek S. (2010). Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. *Mediat Inflamm.* 2010:792393. doi: 10.1155/2010/792393.

Van den Worm E, Beukelman CJ, Van den Berg AJ, Kroes BH, Labadie RP, Van Dijk H. (2001). Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. *Eur J Pharmacol.* 433(2-3):225-230. doi: 10.1016/s0014-2999(01)01516-3.

Varma U, Koutsifeli P, Benson VL, Mellor KM, Delbridge LMD. (2018). Molecular mechanisms of cardiac pathology in diabetes - Experimental insights. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1864(5 Pt B):1949-1959. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.10.035.

Vélez-Tobon GJ, Rocha-Arrieta YC, Arias-Sierra A, Lopez-Quintero JA. (2016). Función del sistema nadph oxidasa en la formación de trampas extracelulares de los neutrófilos (NETS). *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 32(1):43-56.

Vinetti G, Mozzini C, Desenzani P, Boni E, Bulla L, Lorenzetti I, Romano C, Pasini A, Cominacini L, Assanelli D. (2015). Supervised exercise training reduces oxidative stress and cardiometabolic risk in adults with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *Sci Rep.* 5: 9238. doi: 10.1038/srep09238.

Weswler AR, Bast A. (2010). Oxidative Stress and Vascular Function: Implications for Pharmacologic Treatments. *Curr Hypertens Rep.* (12):154-161. doi: 10.1007/s11906-010-0103-9.

Winiarska K, Grabowski M, Rogacki MK. (2011). Inhibition of renal gluconeogenesis contributes to hypoglycaemic action of NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Chem Biol Interact.* 189(1-2):119-26. doi: 10.1016/j.cbi.2010.09.033

Wisløff U, Brubakk AO. (2001). Aerobic endurance training reduces bubble formation and increases survival in rats exposed to hyperbaric pressure. *J Physiol.* 537(2):607-611. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.00607.

Ximenes VF, Kanegae MPP, Rissato SR, Galhiane MS. (2007). The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition. *Arch Biochem Biophys.* 457(2):134–141. doi: 10.1016/j.abb.2006.11.010.

Zhang Y, Chan MMK, Andrews MC, Mori TA, Croft KD, McKenzie KU, Schyvens CG, Whitworth JA. (2005). Apocynin but not allopurinol prevents and reverses adrenocorticotrophic hormone-induced hypertension in the rat. *American Journal of Hypertension.* 18(7):910–916. doi: 10.1016/j.amjhyper.2005.02.017.

Zhang M, Perino A, Ghigo A, Hirsch E, Shah AM. (2013). NADPH oxidases in heart failure: poachers or gamekeepers? *Antioxid Redox Signal.* 18(9):1024-41. doi: 10.1089/ars.2012.4550.