



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

**“Rol de la NOX2 en el músculo esquelético de ratas
diabéticas ejercitadas”**

TESIS

Que presenta:

Q.F.B. SARAI SÁNCHEZ DUARTE

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS EN
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

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

CO-DIRECTORA DE TESIS: D. en C. Elizabeth Sánchez Duarte

Morelia, Michoacán, noviembre de 2021.

ÍNDICE

Resumen	4
Abstract	5
Introducción	7
Músculo esquelético.....	7
Estructura del músculo esquelético.....	7
Filamentos finos y gruesos.....	9
Actividad de los músculos esqueléticos.....	11
Mecanismo molecular de contracción: La teoría del filamento deslizante.....	11
Acoplamiento de excitación-contracción.....	13
Tipos de contracción muscular.....	14
Tipos de fibra muscular.....	15
Fibras oxidativas lentas.....	16
Fibras glucolíticas rápidas.....	17
Fibras rápidas glogolíticas oxidativas.....	17
Diabetes Mellitus.....	18
Diabetes y músculo esquelético.....	19
Estrés oxidante y Diabetes.....	20
NADPH oxidasas en el músculo esquelético.....	22
El Ejercicio.....	26
Apocinina.....	28
Justificación	29
Hipótesis	30
Objetivo	30
Material y Métodos	31

Protocolo de entrenamiento.....	31
Biomarcadores metabólicos.....	32
Prueba de resistencia a la insulina.....	32
Disección de los músculos.....	33
Registro de tensión.....	33
Análisis de marcadores de estrés oxidativo.....	33
Ensayo de expresión de genes.....	35
Resultados.....	36
Efecto de la inhibición de la NOX2 sobre la glucemia en ayuno y el peso corporal.....	36
Efecto de la inhibición de la NOX2 sobre la sensibilidad a la insulina.....	37
Participación de la NOX2 en la función muscular durante la diabetes.....	39
Efecto de la Inhibición de la NOX2 sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno en músculo esquelético rápido y lento de ratas diabéticas ejercitadas.....	41
Implicación de la NOX2 sobre la expresión de genes que participan en la respuesta antioxidante y metabólica: Nrf2, NF- κ β , NOX4 y de GLUT4 en los músculos rápido y lento de ratas con diabetes y ejercitadas.....	45
Discusión.....	51
Perspectivas.....	63
Bibliografía.....	64

Resumen

En el presente trabajo se implementó la inhibición de la NADPH Oxidasa 2 (NOX2) en ratas diabéticas ejercitadas con el fin de preservar la estructura y función de las fibras en el tejido músculo esquelético y frenar el daño ocasionado por la hiperglucemia y el subsecuente estrés oxidante. En condiciones fisiológicas y en el ejercicio las NOX actúan como importantes moduladores de la homeostasis rédox, participando en las adaptaciones al ejercicio en el tejido. Sin embargo, en condiciones patológicas, como en la diabetes mellitus (DM), se ha observado que a medida que la hiperglucemia aumenta, la actividad y expresión de las NOX también son incrementadas, lo cual se ha vinculado con un incremento del estrés oxidante y con complicaciones diabéticas, como lo es la miopatía diabética.

El inhibidor específico de la NOX2, la apocinina fue administrada durante ocho semanas (3 mg/kg/día), en ratas diabéticas inducidas con STZ, mientras eran sometidas a la par a un protocolo de ejercicio de moderada intensidad en una banda sin fin. Al finalizar las ocho semanas del protocolo experimental se observó una mejora en los niveles de glucemia en ayuno y en la sensibilidad a la insulina, indicando un posible efecto sinérgico de ambos tratamientos. En cuanto a la función muscular, la inhibición de la NOX2 en combinación con el ejercicio, contribuyó a aumentar el tiempo de resistencia a la fatiga, así como en el aumento de la generación de fuerza máxima y total en el músculo rápido de manera más significativa que en el músculo lento en la diabetes. Para el análisis de marcadores de daño por estrés oxidante, en este grupo se redujeron los niveles de ERO en el músculo EDL y en el sóleo, mientras que el estado rédox del glutatión y el

contenido total incrementaron. Finalmente a nivel transcripcional la inhibición de la NOX2 logró modular positivamente y de manera diferencial según el tipo de músculo la expresión de los genes: Nrf2 y NF- κ B y GLUT4, que participan en la respuesta antioxidante y metabólica, siendo mayor en el músculo rápido (EDL) de ratas diabéticas ejercitadas. Adicionalmente, el ejercicio de moderada intensidad mejoró la función muscular y el sistema antioxidante de glutatión en ratas sanas, además de una regulación positiva observada a nivel transcripcional de la respuesta antioxidante y metabólica, evidenciando el importante papel de la NOX2 bajo estas condiciones.

Palabras clave: Diabetes, estrés oxidante, músculo esquelético, apocinina, hiperglucemia.

Abstract

In the present work, the inhibition of NADPH Oxidase 2 (NOX2) was implemented in exercised diabetic rats in order to preserve the structure and function of the fibers in the skeletal muscle tissue and to stop the damage caused by hyperglycemia and the subsequent oxidative stress. . Under physiological conditions and during exercise, NOX acts as essential modulators of redox homeostasis, participating in the adaptations to exercise in the tissue. In pathological conditions, such as diabetes mellitus (DM), it has been observed that as hyperglycemia increases, the activity and expression of NOX are also increased, which has been linked to an increase in oxidative stress and with diabetic complications like diabetic myopathy.

The specific NOX2 inhibitor, apocynin, was administered for eight weeks (3 mg/kg/day) in STZ-induced diabetic rats while they were subjected to a protocol of moderate-intensity exercise in an endless band. At the end of the eight weeks of the experimental protocol, an improvement was observed in fasting blood glucose levels and insulin sensitivity, indicating a possible synergistic effect of both treatments. Regarding muscle function, the inhibition of NOX2 in combination with exercise contributed to increasing the time of resistance to fatigue and the increase in the generation of maximum and total force in fast muscle in a more significant way than in slow muscle in diabetes. For the analysis of markers of oxidative stress damage, ROS levels in EDL muscle and soleus were reduced in this group, while glutathione redox status and total content increased. Finally, at the transcriptional level, the inhibition of NOX2 was able to modulate positively and differentially according to the type of muscle the expression of the genes: Nrf2 and NF- κ B and GLUT4, which participate in the antioxidant and metabolic response, being higher in fast muscle (EDL) from exercised diabetic rats. Additionally, moderate-intensity exercise improved muscle function and the glutathione antioxidant system in healthy rats, in addition to a positive regulation observed at the transcriptional level of the antioxidant and metabolic response, evidencing the critical role of NOX2 under these conditions.

Keywords: diabetes, oxidative stress, skeletal muscle, apocynin, hyperglycemia.

Introducción

Músculo esquelético

El músculo esquelético es considerado un órgano, debido a que está compuesto por células de múltiples tejidos, como: el tejido nervioso, tejido conectivo y por supuesto, células del propio tejido muscular. Es uno de los tejidos más dinámicos y plásticos del cuerpo humano (MacLaren y Morton, 2012). Es considerado el órgano más largo en el cuerpo humano, ya que comprende entre el 40-50 % del peso total del cuerpo, el cual contiene entre el 50-75 % de todas las proteínas del cuerpo, por lo que representa el 30-50 % de todo el recambio proteico del cuerpo (Frontera y Ochala, 2014).

El músculo esquelético es de vital importancia para el organismo debido su importante participación en la retención de la postura, así como en la locomoción para poder llevar a cabo actividades físicas de la vida humana. Además, tiene un segundo papel, un elaborado sistema de producción y consumo de energía que influye en el metabolismo energético de todo el cuerpo (Lizuka et al., 2014). Es un órgano específico que engendra una fuerza física, y el entrenamiento físico ha sido reconocido por generar múltiples beneficios para el mantenimiento y/o la mejora de la salud humana (Lizuka et al., 2014).

Estructura del músculo esquelético

La estructura jerárquica del músculo esquelético consiste en haces (fascículos) de células fibrosas multinucleadas alargadas (miofibras). Las células musculares (fibras) contienen haces de miofibrillas que son los elementos contráctiles del músculo esquelético que, a su vez, están compuestas de proteínas miofilamentosas, principalmente actina y miosina, que forman el sarcómero que es la unidad funcional de la miofibrilla y en el ocurren todos los cambios que acontecen en el ciclo de relajación-contracción. En las miofibrillas se encuentran regiones blandas y oscuras, estas regiones se conocen como bandas I (isotrópicas) y A (anisotrópicas), respectivamente. En el centro de la banda I se

observa una línea Z más oscura, mientras que en el centro de la banda A existe una zona H de tinción más clara con línea M central. La unidad contráctil, el sarcómero, está centrado en la línea M, que se extiende de una línea Z a la siguiente (Baynes y Dominiczak, 2011).

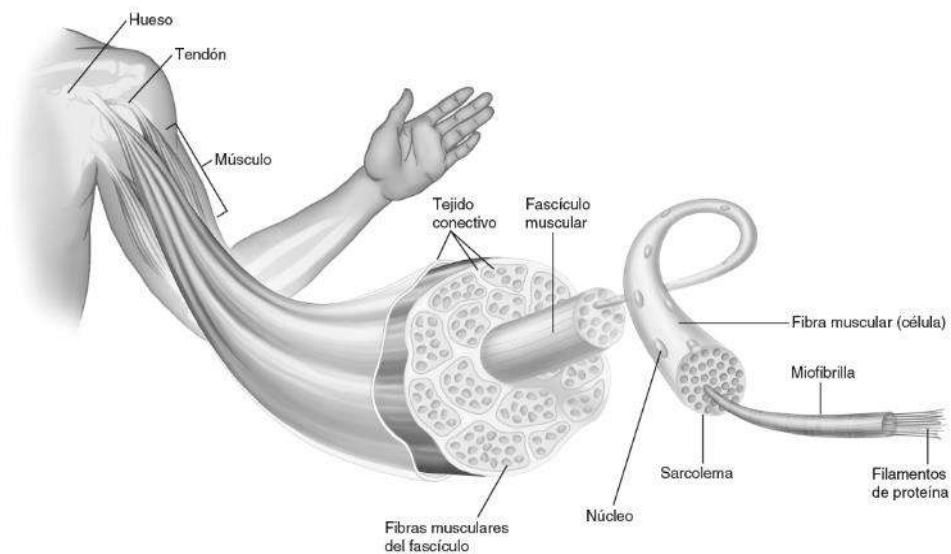


Figura 1. Estructura de un músculo esquelético (Tomada de Zao et al., 2012).

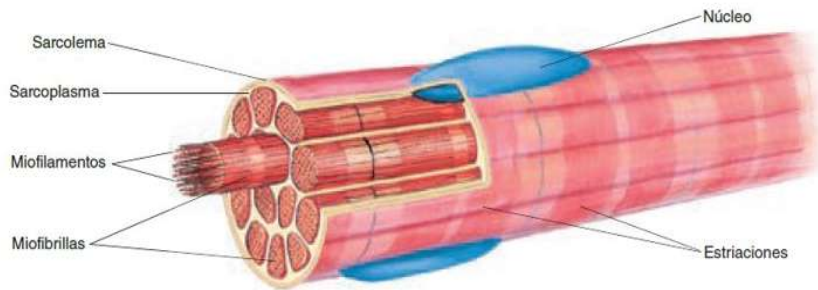


Figura 2. Componentes de una fibra de músculo esquelético. Una fibra de músculo esquelético está compuesta de numerosas miofibrillas que contienen miofilamentos y la superposición de los miofilamentos es lo que produce un aspecto estriado (Tomada de Ira-Fox, 2011).

Filamentos finos y gruesos

El sarcómero es una estructura que participa en la contracción muscular, el cual está compuesto por los filamentos gruesos y finos. El filamento fino se compone de la proteína actina y el filamento grueso se compone principalmente de miosina, con proteínas asociadas, tropomiosina y troponinas. Los filamentos gruesos y finos se extienden en direcciones opuestas desde ambos lados de las líneas M y Z, respectivamente, y se deslizan uno sobre otro durante el proceso contráctil (figura 3). Las líneas M y Z funcionan como placas base para el anclaje de filamentos (Baynes y Carson, 2011).

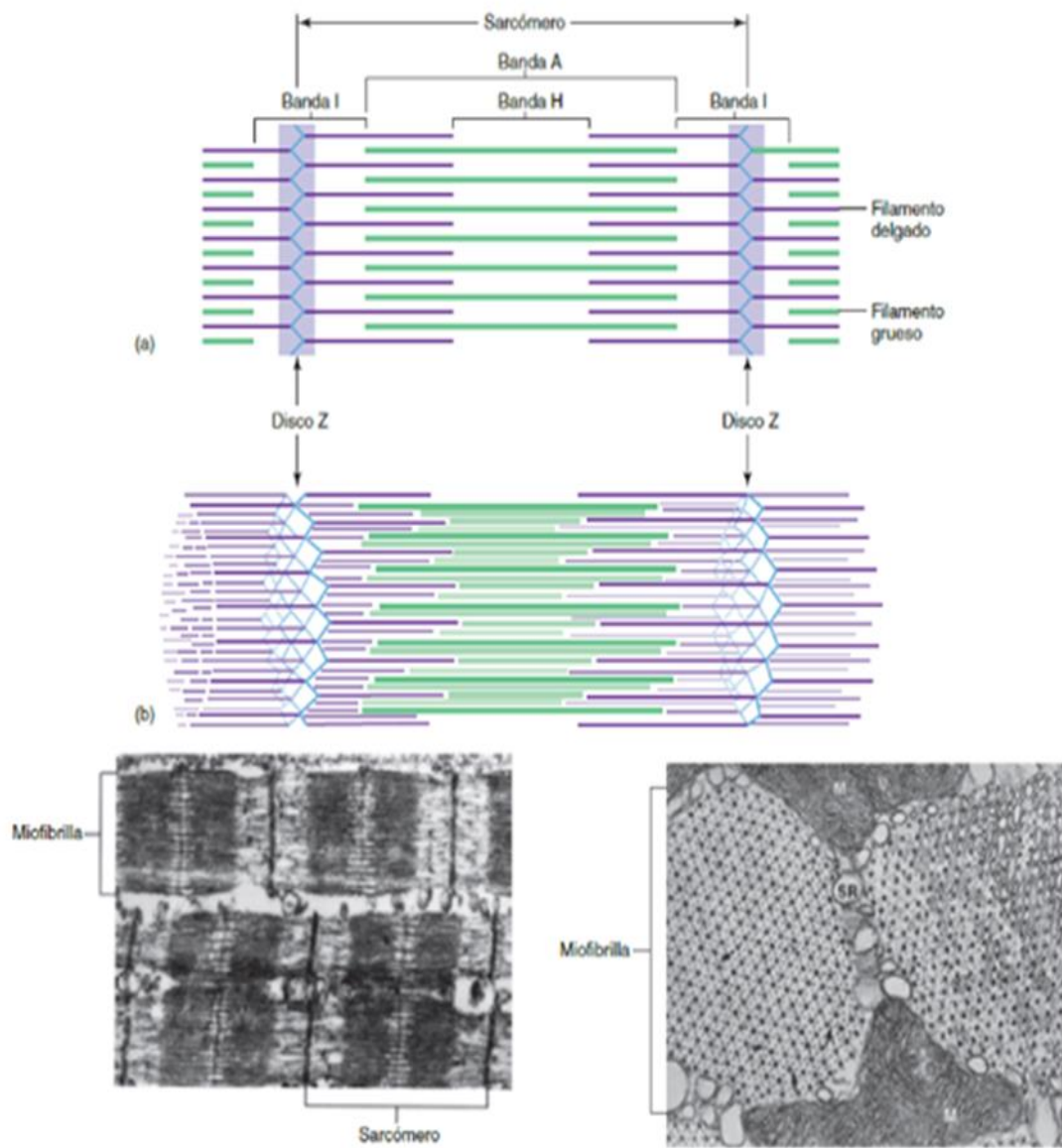


Figura 3. Disposición de filamentos gruesos y delgados en una fibra de músculo estriado. a) En un corte longitudinal se observa que los filamentos gruesos y delgados forman unidades repetitivas llamadas sarcómeros. Los patrones de bandas de los sarcómeros están marcados como I, A y H, como se muestra. b) Estructura tridimensional de los sarcómeros, que puede observarse en un corte transversal de una miofibrilla tomada a través de una región de filamentos gruesos y delgados que se superponen (parte inferior derecha). En la parte inferior izquierda se muestra una micrografía electrónica correspondiente a (53 000 \times), las flechas apuntan hacia puentes entre los filamentos gruesos (puntos oscuros) y los filamentos delgados (puntos claros). SR, retículo sarcoplasmático; M, mitocondrias (Tomada de Ira-Fox, 2011).

Actividad de los músculos esqueléticos

Las células musculares presentan algunas propiedades funcionales especiales que les permiten cumplir con sus tareas. La primera de éstas es la excitabilidad, también denominada receptividad o irritabilidad, que es la capacidad de recibir y responder a estímulos. La segunda, la contractilidad, es la capacidad de encogerse (por la fuerza) cuando se estimula a los músculos de forma adecuada. La extensibilidad es la capacidad de las células musculares de estirarse, mientras que la elasticidad es la capacidad de retraerse y recuperar su longitud original después de ser estiradas (Maireb, 2008).

Para contraerse, las células de los músculos esqueléticos deben ser estimuladas por impulsos nerviosos. Una neurona motora (célula nerviosa) puede estimular unas pocas células musculares o cientos de ellas, en función del músculo del que se trate y del trabajo que realice. Una neurona y todas las células de los músculos esqueléticos que estimula constituyen una unidad motora, estas uniones se denominan uniones neuromusculares. Cuando un impulso nervioso llega a las terminales del axón, se libera una sustancia química denominada neurotransmisor Ach (acetilcolina) que al unirse a los receptores nicotínicos de membrana presentes en el sarcolema genera una corriente eléctrica denominada potencial de acción. Una vez que comienza, el potencial de acción resulta imparable; se desplaza por toda la superficie del sarcolema y conduce el impulso eléctrico de un extremo de la célula a otro. El resultado es la contracción de la célula muscular (Maireb, 2008; Fox, 2011).

Mecanismo molecular de contracción: La teoría del filamento deslizante

En la célula muscular relajada las proteínas reguladoras que forman parte de los miofilamentos de actina impiden la unión con la miosina. Cuando un potencial de acción se extiende por su sarcolema y se excita una célula muscular, se liberan

los iones de calcio (Ca^{2+}) de las zonas de almacenamiento intracelular (los sacos del retículo sarcoplásmico) (Marieb, 2008).

Las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico (RS) están separadas por sólo una brecha muy estrecha de los túbulos transversos (túbulos T), que son “túneles” membranosos estrechos que se forman a partir del sarcolema y que son continuos con él. Así, los túbulos transversos se abren hacia el ambiente extracelular por medio de poros en la superficie celular, y tienen la capacidad para conducir los potenciales de acción que estimulan la abertura de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje. Estos canales en los túbulos T están acoplados mecánicamente a canales de liberación de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico, lo que hace que se abran. A continuación, el Ca^{2+} se difunde hacia fuera del retículo sarcoplásmico, de modo que puede unirse a la troponina y estimular la contracción muscular. (Marieb, 2008).

El flujo de calcio actúa como el desencadenante final de la contracción, dado que el calcio se une a las proteínas reguladoras (troponina C y tropomiosina) en los filamentos de actina y cambian tanto la forma como la posición en los filamentos finos. Esta acción expone las zonas de unión en la actina, a la que se pueden adherir las cabezas de miosina, y las cabezas de miosina comienzan a buscar zonas de unión a ATP de forma inmediata (Marieb, 2008).

Las cabezas de miosina libres están “montadas” como una trampa para ratones. La adhesión física de la miosina a la actina “hace saltar la trampa”, lo que provoca que las cabezas de miosina pivoten hacia el centro del sarcómero. Debido a que la actina y la miosina se encuentran todavía unidas con firmeza entre sí cuando esto ocurre, los filamentos finos se ven ligeramente desplazados hacia el centro del sarcómero. La rotura del ATP en $\text{ADP} + \text{Pi}$ (adenosin-difosfato y fosfato inorgánico) por la enzima “ATPasa” proporciona la energía necesaria para liberar y recolocar cada cabeza de miosina, de forma que se encuentren preparadas para dar otro “paso” y adherirse a una zona de unión más allá del filamento fino.

Cuando el potencial de acción finaliza y los iones de calcio se reabsorben en las zonas de almacenamiento del retículo sarcoplásmico, las proteínas reguladoras vuelven a su forma y posición originales y de nuevo obstaculizan la unión de la miosina con los filamentos finos. Dado que ahora la miosina no tiene nada a lo que adherirse, la célula muscular se relaja y vuelve a su longitud original (Marieb, 2008).

Acoplamiento de excitación-contracción

El fenómeno de acoplamiento excitación-contracción se define como la secuencia de eventos que ocurren desde la generación del potencial de acción en la fibra muscular hasta que se inicia la generación de tensión (Calderún-Vélez y Figueroa-Gordon, 2009).

El músculo esquelético como ya se ha descrito es un tejido excitable, cada fibra recibe una señal química por parte de la motoneurona que la inerva; esta señal es la acetilcolina liberada desde las numerosas vesículas en la terminal axónica, y debido a su difusión a través de la hendidura o espacio sináptico llega a unirse a los receptores nicotínicos, abre canales sensibles a aligando (químicamente) en el sarcolema. El Na^+ se difunde hacia dentro de la fibra muscular, lo que produce un estímulo despolarizante (esto hace que el interior de la célula tenga un exceso de iones positivos, lo que revierte el signo eléctrico del sarcolema y abre más canales que permiten sólo la entrada de Na^+). El potencial de acción producido se propaga disminuyendo gradualmente; la amplitud de la despolarización de la membrana es proporcional al número de receptores activados por Ach. Esta misma despolarización permitirá la apertura de canales dependientes de voltaje tipo L con el objetivo de llevar el potencial de membrana a un valor umbral y que la fibra muscular experimente un potencial de acción que se autopropague a lo largo del sarcolema y hacia los túbulos T, donde genera un cambio conformacional en los canales de dihidropiridina (canales de calcio sensibles a voltaje), también llamados receptores de dihidropiridina; a

continuación, y debido a un acople mecánico, se abrirán otros canales de Ca^{2+} (canales sensibles a rianodina) presentes en el retículo sarcoplásmico cercanos; esto aumenta la concentración intracelular de Ca^{2+} , seguido de la activación de la troponina C y de la tropomiosina, permitiendo que queden expuestos los sitios de unión de la miosina en la actina para que pueda empezar el ciclo de puentes cruzados, lo que finalmente promoverá la contracción muscular (Marieb, 2008; Ira-Fox, 2011).

En tanto se sigan produciendo potenciales de acción, mantenidos por la estimulación neural del músculo, los canales de liberación de calcio en el retículo sarcoplasmático permanecerán abiertos, el Ca^{2+} se difundirá de manera pasiva hacia fuera del retículo sarcoplasmático y la concentración de Ca^{2+} del sarcoplasma permanecerá alta. De este modo, el Ca^{2+} permanecerá fijo a la troponina y el ciclo de puente seguirá manteniendo la contracción. Para suspender esta acción, la producción de potenciales de acción debe cesar, lo que hace que los canales de liberación de calcio se cierren. Cuando ocurre esto, predominan los efectos de proteínas de transporte en el retículo sarcoplasmático; son bombas de transporte activo para Ca^{2+} que se denominan bombas de Ca^{2+} -ATPasa que mueven Ca^{2+} desde el sarcoplasma hacia el retículo sarcoplasmático. Dado que estas bombas de transporte activo reciben energía que proviene de la hidrólisis de ATP, se necesita ATP para la relajación muscular así como para la contracción muscular (Ira-Fox, 2011).

Tipos de contracción muscular

Las contracciones musculares pueden ser isométricas o isotónicas. Cuando un músculo intenta soportar una carga que es igual a la fuerza que él genera, el músculo se contrae isométricamente. Durante la contracción isométrica el músculo se mantiene con una longitud fija (isométrico significa “misma longitud”) (Ira-Fox, 2011).

Las contracciones isométricas se consiguen experimentalmente, manteniendo ambos extremos del músculo en una posición fija mientras se estimula eléctricamente. La longitud del músculo en reposo (la longitud del músculo antes de la estimulación) es un factor importante para determinar la cantidad de fuerza que puede desarrollar un músculo cuando es estimulado. La fuerza pasiva se genera por estiramiento del músculo y se debe al retroceso elástico del propio tejido muscular. Esta fuerza pasiva es causada, en gran medida, por la proteína titina, que actúa como una cuerda elástica molecular. La fuerza activa se genera cuando los filamentos gruesos de miosina se unen a los filamentos delgados de actina, en el ciclo de puentes cruzados con hidrólisis de ATP. El músculo esquelético posee dos propiedades: desarrolla fuerza pasiva cuando se estira (como una goma elástica) y fuerza activa cuando es estimulado. La fuerza total es la suma de fuerzas pasivas y activas (Ira-Fox, 2011).

Durante una contracción isotónica, la longitud del músculo esquelético cambia, y por lo tanto, la carga se mueve una distancia medible. Si la longitud del músculo se acorta cuando mueve una carga, la contracción se llama contracción isotónica *concéntrica*. Una contracción isotónica concéntrica ocurre cuando un músculo genera una fuerza mayor que la carga conectada a su extremo (Ira-Fox, 2011).

Tipos de fibra muscular

Los músculos están compuestos por células musculares (fibras) que se diferencian entre ellas por el tipo de metabolismo, su velocidad de contracción y su capacidad de almacenamiento del Ca^{+2} , por lo que se pueden clasificar con base en: a) la velocidad contráctil, b) la expresión de la cadena pesada de miosina y c) su capacidad metabólica (Allen et al., 2008; Westerblad et al., 2010). Las fibras musculares son largas y cilíndricas y generalmente se extienden por toda la longitud del músculo. El número de fibras musculares varía considerablemente en

cada músculo, dependiendo del tamaño y la función de este (Maclaren y Morton, 2012; Wilmore y Costill, 2010).

Aunque algunos grupos musculares estén formados por un tipo de fibras musculares (como el sóleo, que es un músculo de la postura, esencialmente, formado por fibras lentas), la mayoría de los músculos son mixtos. El porcentaje de los diferentes tipos de fibras musculares viene determinado genéticamente y puede resultar esencial en el éxito de ciertas disciplinas deportivas en los extremos de la relación intensidad-duración (Robert et al., 1990).

Las fibras musculares que componen al músculo esquelético, se clasifican principalmente en tres tipos: Tipo I, tipo IIa y tipo IIb. Las fibras tipo I son de contracción lenta o también llamadas fibras oxidativas; las fibras tipo IIb son de contracción rápida o también llamadas fibras glucolíticas, mientras que las fibras tipo IIa se caracterizan por ser de contracción intermedia y/o fibras glucolíticas oxidativas (Pette y Staront, 1997).

Fibras oxidativas lentas

Las fibras tipo I se denominan de "contracción lenta", por oposición a las "fibras rápidas". Las fibras tipo I o fibras de contracción lenta contienen un gran número de mitocondrias y se encuentran rodeadas por más capilares (ramificación de las arterias y las venas) que otros tipos de fibras. Además, este tipo de fibras se caracterizan por contener un pigmento rojo "la mioglobina" proteína muscular sobre la que se fija el oxígeno (Billat, 2002). Este tipo de fibras se denominan de contracción lenta debido a que la isoforma de la miosina ATPasa presente en ellas hidroliza ATP a una velocidad relativamente lenta y como resultado las contracciones ocurren a un ritmo lento, su fuerza máxima producida es menor comparada con las fibras tipo II y su producción de ATP se apoya principalmente por el metabolismo oxidativo de carbohidratos y lípidos (López y Fernández 2010; Maclaren y Morton, 2012). También, a diferencia de las fibras rápidas, las fibras tipo I poseen una menor capacidad de almacenamiento de Ca^{+2} debido a que su retículo sarcoplásmico es menos abundante. Por su alta concentración de

mitocondrias, mioglobina y capilares favorece el aporte de oxígeno (por la mioglobina y los capilares) y su utilización (por las mitocondrias, en las que se desarrolla el ciclo de Krebs, la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa). Esta gran capacidad para metabolizar ATP por medio del oxígeno (aeróbicamente) durante periodos prolongados, confiere, a la fibra muscular de tipo lento, resistencia a la fatiga (Billat, 2002).

Fibras glucolíticas rápidas

Las fibras tipo IIb o fibras de contracción rápida, este tipo de fibras tienen un número relativamente escaso de mitocondrias, un metabolismo aeróbico bajo y una menor resistencia a la fatiga que las fibras de contracción lenta (Green, 1986). La isoforma de la miosina ATPasa presente en estas fibras puede hidrolizar ATP a un ritmo rápido (Maclaren y Morton, 2012). Las fibras rápidas son ricas en glucógeno y en enzimas glucolíticas, lo que les confiere una gran capacidad anaeróbica láctica. Las fibras rápidas contienen más miofibrillas con enzimas ATPasa que las fibras lentas. La actividad ATPasa de las fibras rápidas procurará una contracción muscular mayor gracias a una velocidad de formación y de rotura de los puentes de unión más rápida. El mayor número de miofibrillas implica que la célula contiene muchos puentes de unión de actina-miosina y, por lo tanto, que puede desarrollar más fuerza que las fibras lentas. De hecho, la cantidad de fuerza generada por una fibra muscular se debe al número de puentes de unión de actina-miosina que entran en contacto en cada instante (Billat, 2002).

Fibras rápidas glucolíticas oxidativas

Las fibras tipo IIa son también llamadas fibras intermedias o "rápidas glucolíticas y oxidativas". Las fibras intermedias suelen considerarse una "mezcla" de las características de las fibras lentas y de las rápidas. Sin embargo, parece que la fibra intermedia es un estado transitorio entre las fibras lentas y las rápidas en respuesta a una fase llamada de adaptación (como el ejercicio), cuentan con la

capacidad de producir ATP por el metabolismo aerobio y anaerobio. La isoforma de la miosina ATPasa presente en estas fibras es capaz de hidrolizar ATP a un ritmo más rápido que las fibras de tipo I, también contienen una cantidad moderada de mioglobina y mitocondrias, lo que las hace un tanto resistentes a la fatiga (intermediamente resistentes). Por lo cual este tipo de fibras suelen ser muy activas durante las actividades de alta intensidad como actividades de capacidad aeróbica máxima o carreras de velocidad (Maclaren y Morton, 2012; Billat, 2002).

Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus (DM) se define como un conjunto de enfermedades metabólicas, caracterizada por un estado de hiperglucemia resultante de defectos en la secreción de la insulina, en la acción de la insulina o de ambas (American Diabetes Association, 2012). La mayoría de los casos de diabetes caen en dos amplias categorías que son DM1 y DM2; la tipo 1 se caracteriza por la destrucción autoinmune de la células β del páncreas y suele aparecer antes de los 35 años de edad mientras que la tipo 2 generalmente se desarrolla en personas mayores de 40, en algunos casos con obesidad, siendo esta resultante de una resistencia a la insulina y fallo de las células β (Alam et al., 2014). También existen otros tipos de diabetes como lo son: la diabetes juvenil de inicio en la madurez (MODY), la diabetes gestacional que se presenta durante el embarazo y la diabetes mellitus experimental (Petersmann et al.2018; Kottaisamy et al.2021).

Se estima que la prevalencia mundial de diabetes es de 425 millones de personas de entre 20 y 79 años (8,8%). Se prevé que la prevalencia mundial de la diabetes habrá aumentado hasta el 9,9% en 2045, con 629 millones de afectados en todo el mundo. Según proyecciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la diabetes será la séptima causa de mortalidad para el año 2035. Los datos de la FID estiman que el 10,7% de la mortalidad por cualquier causa entre los 20 y los 79 años en 2017 se ha debido a la diabetes (Federación Internacional de Diabetes, 2019).

La DM se ha asociado con el desarrollo de complicaciones secundarias en diversos órganos como los ojos, los riñones, el corazón, el cerebro y el músculo esquelético (Fujimaki y kuwabara, 2017).

Diabetes y músculo esquelético

El músculo esquelético es un órgano que se ve notablemente afectado por la DM. Se ha reportado que durante la diabetes, la salud del musculo esquelético se ve negativamente afectada, lo que se denomina como miopatía diabética, la cual se caracteriza por la disminución de la capacidad física, la fuerza y la masa muscular (Andersen et al., 2006; Poblete-Aro et al., 2018). Se cree que esta importante complicación, relativamente poco estudiada de la diabetes mellitus, contribuye a la progresión de complicaciones diabéticas adicionales debido a la importancia vital del músculo esquelético al bienestar físico y metabólico (D'Souza et al. 2007; Marin et al. 2018). Esto debido a que el músculo funciona como uno de los más grandes sitios para la captación de glucosa, por lo que también es un órgano muy importante para la acción de la insulina; por lo tanto, el deterioro de la acción de la insulina puede inducir varios cambios en los músculos tanto estructurales como funcionales (Fujimaki et al., 2014).

Se ha demostrado que la DM induce atrofia del músculo esquelético y una transición en el tipo de fibra, de oxidativa a glucolítica (de lenta a rápida), lo cual puede indicar que la capacidad oxidativa se reduce en los músculos esqueléticos diabéticos (Kamei et al., 2004; Sexton et al., 1994), estas alteraciones dan como resultado una disfunción en el órgano, como debilidad muscular y una intolerancia al ejercicio (Fujimaki y Kuwabara, 2017).

También se ha reportado que hay una mayor degradación de proteínas junto con disminución de la síntesis de estas en los músculos esqueléticos en ratas diabéticas inducida con STZ (Rodríguez et al., 1997), que pueden ser

responsables de la pérdida de masa muscular en la diabetes y la atrofia muscular que se han observado también en los pacientes con DM (Huang et al., 2010).

Además, en relación a la disminución de la fuerza en el tejido músculo esquelético, se ha reportado que individuos con diabetes presentan fatiga muscular. La fatiga se define como un deterioro fisiológico del músculo, esto evidenciado en una disminución en la fuerza máxima después de un periodo de estimulación repetitiva o actividad contráctil. Diversos factores bioquímicos están involucrados en este proceso, por mencionar algunos: disminución en la producción de energía, modificación del desequilibrio redox intracelular, provocado por un aumento elevado de especies reactivas de oxígeno (ERO), acumulados durante la intensa actividad contráctil (Fujimaki et al.2015).

Estrés oxidante y Diabetes

Cuando se pierde el equilibrio del balance redox por una mayor generación de agentes oxidantes (especies reactivas de oxígeno; ERO) por sobre los agentes antioxidantes, se produce estrés oxidante. El estrés oxidante de carácter crónico es dañino para las células, 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 (Call et al., 2015).

Se ha encontrado una relación entre los biomarcadores de estrés oxidante (EO) y la diabetes, dicho estrés en el músculo esquelético juega un importante papel en el desarrollo y la progresión de las complicaciones diabéticas. Estudios realizados tanto en pacientes con diabetes y modelos animales de diabetes mellitus muestran signos de daño oxidativo en el tejido músculo esquelético, como la peroxidación de lípidos, nitrosilación de proteínas y alteración en los niveles enzimáticos antioxidantes endógenos (D'Souza et al., 2013). Asimismo, la diabetes y la hiperglucemia asociada afectan el estado redox de la célula, lo cual

se ha reflejado en niveles reducidos de glutatión reducido (GSH) y un aumento del GSH oxidado (Farinha et al., 2017; Pouvreau et al., 2018).

Se ha sugerido que los principales factores involucrados en la generación crónica de ERO, es la disfunción mitocondrial y la desregulación de enzimas pro-oxidantes induciendo un estado de estrés oxidante crónico. En relación a las enzimas pro-oxidantes, se ha observado un aumento en la actividad de la enzima NADPH oxidasa 2 (NOX2) en el músculo esquelético, y con ello un aumento en la producción de ERO basal (Figueiredo et al., 2015). A este proceso se le ha atribuido la generación de resistencia a la insulina (RI) debido a una alteración en la función de sustratos del receptor de insulina (SRI), los cuales son sensibles a cambios en el balance rédox (Tangrarasittichai et al., 2015). De este modo, existe una alteración en la translocación del transportador de glucosa GLUT4 desde el citoplasma hacia la membrana celular. Posteriormente, ante las altas concentraciones de glucosa, el páncreas aumenta la secreción de insulina, con el fin de compensar la RI de los diferentes órganos afectados lo que progresivamente genera una disfunción de las células β -pancreáticas (Kaneto et al., 2010; Olivares et al., 2008). Teniendo en cuenta el papel que desempeña el EO en la patogénesis de la diabetes mellitus así como en el desarrollo de complicaciones asociadas se ha sugerido a través de diferentes estudios que la disminución de factores pro-oxidantes o el aumento de factores antioxidantes deben de ser considerados para prevenir o tratar las complicaciones diabéticas (González-Montero et al., 2017; Mañon et al., 2016).

NADPH oxidasas en el músculo esquelético

Las NADPH oxidasas (NOX) tienen como única función la producción de ERO. En los músculos esqueléticos se expresan dos isoformas de NADPH oxidasa (NOX2 y NOX4) enzimas que se han identificado como importantes moduladores de la homeostasis redox (Ferreira y Laitano, 2016; Henríquez-Olguín et al. 2019; Cully et al. 2020; Laddha y Kulkarni 2020).

Debido a la importancia de las ERO como un componente crítico dentro de la señalización celular del músculo esquelético tanto en la salud como en la enfermedad; diversos estudios se han enfocado en estudiar la participación de las NADPH oxidasas en estas vías de señalización, ya que la homeostasis redox se sugiere como un modulador clave de la plasticidad/disfunción del músculo esquelético en respuesta al ejercicio o a las enfermedades metabólicas. Se ha demostrado que la NOX2 actúa como la principal fuente de ERO en el músculo esquelético durante las contracciones, participando en la señalización de la insulina y en el transporte de glucosa, así como mediando la respuesta de los miocitos al estrés osmótico (Ferreira y Laitano, 2016). Sin embargo, también se ha reportado que la NOX2 y NOX4 contribuyen a las anomalías que pueden presentarse en músculo esquelético provocadas por la angiotensina II, en la distrofia muscular, la insuficiencia cardíaca y en una dieta alta en grasas (Ferreira y Laitano, 2016; Powers et al., 2020).

La biología de la señalización redox en el músculo esquelético se relaciona fuertemente con las NADPH oxidasas. La relevancia de la participación de esta enzima surgió a partir de que diversos estudios que identificaron la liberación extracelular de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) del músculo esquelético aislado tanto en reposo como durante la actividad contráctil. En retrospectiva, estos hallazgos fueron consistentes con la presencia y activación de la NADPH oxidasas, que no fueron completamente exploradas porque las mitocondrias eran consideradas la fuente de ERO más relevante en el músculo según lo reportado en los trabajos de

Powers y Jackson, 2008. Años después del descubrimiento de la liberación de superóxido extracelular por el músculo, Javesghani et al. (2002) informaron de la presencia y caracterización molecular de la NADPH oxidasa en el músculo esquelético (Ferreira y Laitano, 2016; Choi et al., 2015). En los recientes años la NADPH oxidasa ha surgido como la principal fuente (o inicial) de ERO en las células del músculo esquelético; que a diferencia de las mitocondrias, las NOX generan $O_2^{\cdot-}$, no solo como un subproducto del metabolismo sino también como producto principal.

También se reportó que la mayor parte del H_2O_2 producido en el músculo esquelético proviene aparentemente de la NOX2; se había asumido durante muchos años que las mitocondrias eran la fuente más importante de H_2O_2 , pero se demostró que la producción de superóxido por las mitocondrias es aproximadamente el 0,15 % del total del O_2 consumido (St-Pierre et al., 2002). Es importante destacar que entre las ERO, el H_2O_2 tiene propiedades de señalización, porque es una molécula derivada de la dismutación del anión superóxido, producido por la superóxido dismutasa (SOD). El H_2O_2 tiene una gran influencia sobre una variedad de eventos celulares a través de sus propiedades cinéticas, vida útil, generación intracelular específica y su papel crucial en la transducción de señales de las vías IRS-1 / PI3K / Akt, y de otros elementos de señalización (AMPK y p38 MAPK) en el músculo esquelético (Forman et al., 2014). Entre sus características como segundo mensajero, está involucrado en la expresión génica y en la captación de glucosa entre otros procesos celulares (St-Pierre et al., 2002).

La NOX2 funcionalmente activa es una enzima multimérica que cataliza la conversión de O_2 en superóxido utilizando Nicotiamida-Adenina Dinucleotido Fosfato (NADPH) como donante de electrones. La enzima está formada por 2 subunidades localizadas en la membrana: gp91phox (NOX2) y p22 phox que forman el centro rédox llamado flavocitocromo b558 responsable de la transferencia de electrones y la producción de superóxido; mientras que los

componentes reguladores: p47 phox, p67 phox, p40 phox y Rac1 están presentes en el citoplasma (Hidalgo et al., 2006). Tras la estimulación, las subunidades citosólicas se trasladan a la membrana y tiene lugar el ensamble completo de la enzima, acompañado de la activación de la enzima y la generación de ERO (Lambeth, 2004). En relación a p47 phox, es considerada como la reguladora del complejo, debido a que la fosforilación en residuos de serina en esta subunidad es el principal paso necesario para la producción de ERO dependientes de NOX2; por lo que se ha utilizado como indicador de la activación enzimática.

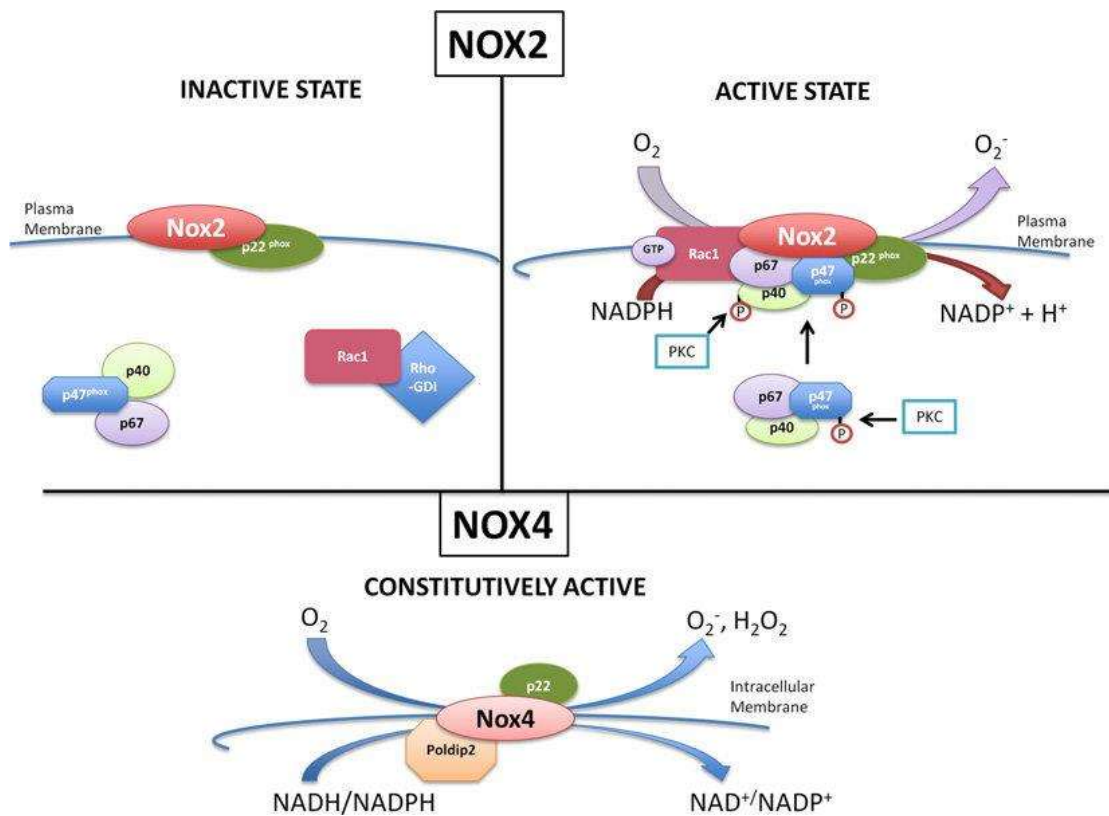


Figura 4. Estructura de la NADPH oxidasa (NOX). Representación esquemática de los mecanismos básicos de acción y activación de la NOX en el músculo (Tomada de Sciarretta et al.2015).

Las localizaciones altamente específicas y la activación de NOX2 en el músculo esquelético representan un alto potencial para la regulación espacial y

temporal de la señalización redox en la fisiología del músculo esquelético. La NOX2 se localiza principalmente en el sarcolema y en los túbulos transversales, mientras que la NOX4 se localiza en el retículo sarcoplásmico del músculo esquelético. Sin embargo, se reportó que la NOX4 también se encuentra en las mitocondrias, más específicamente en las membranas internas mitocondriales. (Sakellariou et al., 2013). La NOX4 es constitutivamente activa y no requiere asociación con subunidades reguladoras, siendo regulada principalmente por sus niveles de expresión (Hutchinson et al., 2007; Sakellariou et al., 2013). La NOX2 puede ser activada por agonistas específicos, como angiotensina II, factores de crecimiento y citocinas, así como por estrés/contracción mecánica, que inducen la asociación de subunidades reguladoras (p47phox, p67phox, p40phox y Rac1) y la activación de esta enzima (Lassègue et al., 2012).

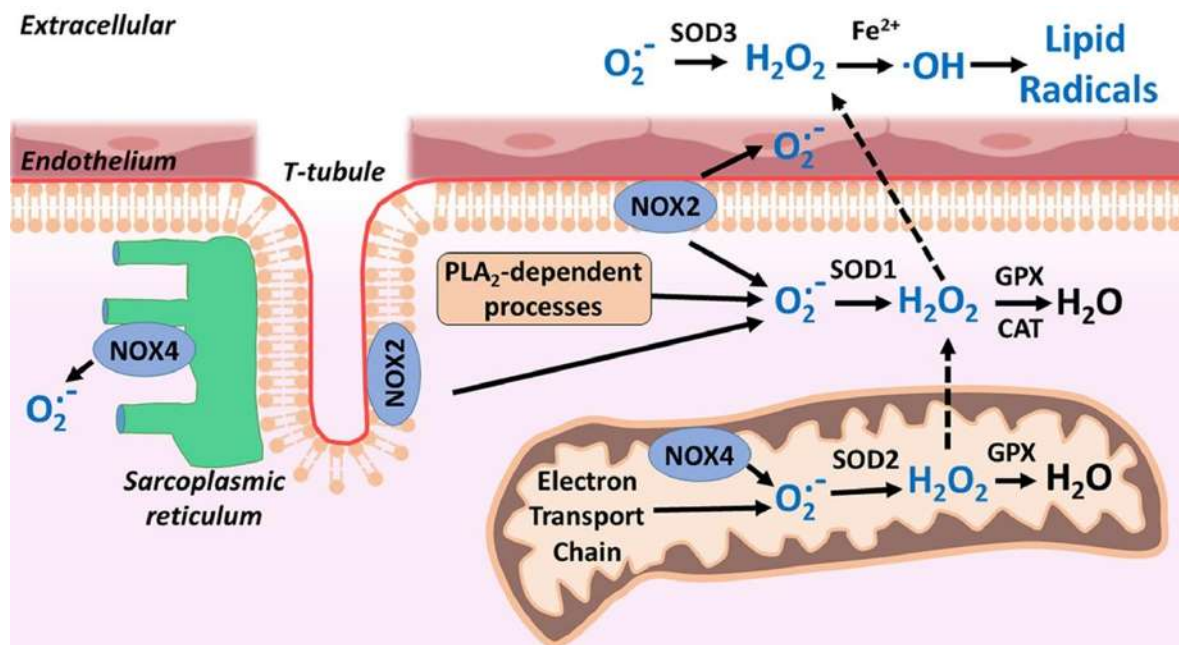


Figura 5. Sitios potenciales de producción o especies reactivas de oxígeno en la contracción de los músculos esqueléticos. Las posibles fuentes de producción de ERO inducidas por el ejercicio en las fibras musculares incluyen las siguientes: (1) mitocondrias, (2) fosfolipasa A 2 (PLA₂) y (3) NADPH oxidasas (NOX2 y NOX4) localizadas en 4 sitios dentro de las fibras: mitocondrias, sarcolema, retículo sarcoplásmico y túbulos en T. CAT = catalasa; GPX = glutatión peroxidasa; H₂O₂ peróxido de hidrógeno; NOX = NADPH oxidasa; O₂^{•-} = superóxido; •OH = radical hidroxilo; PLA₂ = fosfolipasa A 2; SOD = superóxido dismutasa. Modificado de Powers y Jackson (Tomada de Powers et al., 2020).

La contracción del músculo esquelético aumenta la producción de ERO que modulan la homeostasis y adaptaciones celulares. La hipótesis original era que las mitocondrias eran la principal fuente de ERO inducidos por la contracción. Sin embargo, estudios recientes sugieren que las NOX son la principal fuente de ERO inducidos por las contracciones del músculo esquelético. Durante las contracciones repetitivas, el aumento de ERO citosólico precede y es mayor que el aumento de ERO mitocondrial (Sakellariou et al., 2013; Parson et al., 2014; Michaelson et al. 2010). En diversos estudios, demostraron que el aumento de ERO inducido por la contracción fue bloqueado o atenuado por agentes farmacológicos como la apocinina y el Nox2ds-tat (Pal et al., 2013, Loehr et al., 2014, Espinosa et al., 2006; Díaz-Vegas et al., 2015). Estos datos sugieren que la NOX2 es la principal fuente de ERO durante las contracciones musculares. Además, también se reportó que las ERO modulan el acoplamiento de excitación-contracción en el músculo esquelético y que en estas condiciones fisiológicas la NOX2 y la NOX4 parecen estar involucradas (Loureiro et al., 2016; Cully et al., 2020).

El Ejercicio

La práctica regular de ejercicio físico ha sido ampliamente promovida debido a sus múltiples efectos para la salud, entre los cuales destacan el aumento de la función cardiovascular y respiratoria, mejora de la composición corporal, mayor control glucémico, entre otros (Pedersen y Salti, 2015). Incluso se demostró que en pacientes con DMT2, intervenciones de ejercicio físico reducen tanto estadística como clínicamente los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c) (Umpierre et al., 2011; Thomas et al., 2006). Por otro lado, se ha reportado que durante la realización de ejercicio físico se promueve la producción de ERO debido a la actividad contráctil del músculo esquelético, dicho fenómeno genera un desbalance redox de carácter transitorio denominado “estrés oxidativo inducido por ejercicio”. Siendo una de las principales fuentes el complejo enzimático NOX2

y en menor medida desde la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Powers y Jackson, 2008; Powers et al., 2016). Durante la despolarización de la fibra muscular existe liberación de ATP vía pannexina, proceso que permite la activación de receptores purinérgicos asociados a la vía de señalización de IP3 generando liberación de Ca²⁺ desde el retículo sarcoplasmático (RS) y activación de la proteínas kinasas dependientes de Ca²⁺ (PKC). La PKC (α , β , δ y ζ) fosforila la subunidad citoplasmática de NOX2 (p47/Phox), generando un cambio conformacional que favorece el acoplamiento de esta a las subunidades de la membrana plasmática de NOX2, volviendo al complejo NOX2 funcional (Poblete-Aro et al., 2018). Las ERO generadas en el ejercicio inducen adaptaciones siguiendo el principio de “hormesis” 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 como Nrf2, NF- κ B y el cofactor transcripcional PGC-1 α 2 que promueven un incremento de la respuesta antioxidante del organismo y la disminución de biomarcadores de estrés oxidante demostrando así un mecanismo de adaptación inducido por el ejercicio (Ji et al., 2015; Gómez-Cabrera et al., 2009).

Existen diferentes protocolos de ejercicio físico, según la metodología empleada, el ejercicio puede ser de baja o moderada 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 estrés oxidativo 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 glucemia (Poblete-Aro et al., 2018). Con base en lo anterior, en la búsqueda de estrategias para controlar y/o reducir el daño oxidativo, la implementación de un programa de entrenamiento con ejercicio de moderada intensidad podría ser una efectiva estrategia terapéutica para mejorar la salud muscular y retrasar la aparición y progresión de las complicaciones diabéticas.

Apocinina

La apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona) también conocida como acetovanillona, es un fármaco aislado de la raíz de la planta medicinal *Picrorhiza kurroa*; hierba perenne originaria del Himalaya. La apocinina ha ganado importancia siendo utilizada en estudios experimentales como un agente antioxidante, debido a que sus acciones incluyen inhibir la generación de ERO por las NOX así como también la eliminación de ERO (Von de Worm et al., 2001; Viridiset al., 2016).

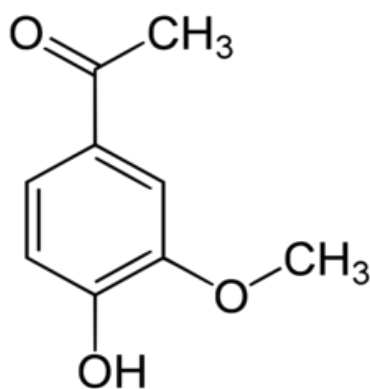


Imagen 6. Apocinina. La apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona) es un catecol sustituido con metoxi derivado de la hierba medicinal *P. kurroa*. OH: hidroxilo; -O-CH₃: metoxilo; CH₃-CO-CH₃: acetona.

La apocinina es el inhibidor de la NOX más utilizado, aplicado tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo* (Winiarska et al., 2014) Entre los mecanismos propuestos mediante el cual la apocinina actúa en las células musculares, el más aceptado es su conversión en su forma radical; uniéndose a la subunidad p47phox y bloqueando su migración a la membrana, que participa de manera crítica en el ensamble del complejo funcional de NADPH oxidasa, inhibiendo así la liberación de anión superóxido por la NOX. También se ha reportado que la apocinina lleva a cabo la oxidación del núcleo del flavocitocromo b558 resultando en la prevención de la interacción con las subunidades citosólicas de la NOX (Ferreire y Laintano, 2016).

Como ya se ha descrito, la función primaria de la NADPH es la producción de ERO, lo cual se ha relacionado con la fisiopatología de complicaciones diabéticas, debido a que a medida que la hiperglucemia aumenta, la actividad de la NADPH también se ve incrementada (Heymes et al., 2003; Touyz et al., 2008).

Los efectos de la apocinina por medio de la inhibición de la NADPH ya han sido demostrados, por lo que se ha reportado que la administración de apocinina ha logrado atenuar el estrés oxidante asociado con la hipertrofia cardíaca, la fibrosis cardíaca y la disfunción diastólica en animales de experimentación. También, recientemente se evaluó la influencia de la apocinina como antioxidante en la remodelación cardíaca en ratas espontáneamente hipertensas con DMTI, donde redujo significativamente el estrés oxidante (Gimenes et al., 2018; Rosa et al., 2016). Respecto al músculo esquelético, se ha reportado relativamente poco en relación a los efectos de la apocinina, a reserva de lo que fue observado en ratones con obesidad y diabetes, en donde de manera interesante la administración de la apocinina mejoró la tolerancia al ejercicio y la disfunción mitocondrial, ejerciendo un efecto protector al músculo (Yokota et al., 2009). Sin embargo, aún no se ha reportado el efecto de la inhibición de la NOX2 por la apocinina y el ejercicio durante una condición de diabetes en músculo esquelético de ratas inducidas con estreptozotocina, por lo cual, es de nuestro interés la realización del presente trabajo.

Justificación

El estado hiperglucémico crónico característico de la diabetes mellitus ha sido relacionado con daño por estrés oxidante, afectando significativamente la integridad y las funciones de las fibras musculares, esto reflejado en la disminución de la capacidad física, la fuerza y la masa muscular. Esto es relevante puesto que el músculo esquelético es el principal captador de glucosa en el cuerpo (dependiente de insulina).

Por lo tanto, a fin de preservar la estructura y función del músculo esquelético y debido a la importancia vital que este representa para nuestro bienestar físico y metabólico, en el presente trabajo se evalúa la posible participación de la NOX2 en el proceso de adaptación del músculo esquelético al ejercicio en condiciones de diabetes.

Hipótesis

La NOX2 participa en las adaptaciones del músculo esquelético inducidas por el ejercicio *durante la diabetes*.

Objetivo

Objetivo general

Determinar la participación de la NOX2 bajo condiciones de ejercicio durante la diabetes en músculo esquelético.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la inhibición de la NOX2 y el ejercicio regular sobre niveles de glucemia y la sensibilidad a la insulina.
- Determinar la participación de la NOX2 en la función muscular durante la diabetes.
- Evaluar la participación de la NOX2 sobre el estrés oxidante en el músculo esquelético de ratas diabéticas ejercitadas.
- Analizar la implicación de la NOX2 sobre la expresión de genes que participan en la respuesta antioxidante: Nf- κ β , NOX2, NOX4, SOD, GPx y de GLUT4 en las ratas con diabetes ejercitadas.

Material y Métodos

El presente estudio se llevó a cabo en ratas macho Wistar de aproximadamente 230-250 g. Los cuáles fueron alojados en jaulas de polietileno en una habitación ambientalmente controlada (25 °C) con un ciclo de 12 h luz/oscuridad, donde permanecieron en un ambiente libre de patógenos. Los animales fueron alimentados con dieta estándar: Nutricubos, alimento para roedores y agua *Ad libitum*.

Los animales fueron divididos en 8 grupos. Grupo 1: control (C); Grupo 2: apocinina (A); Grupo 3: diabético (D); Grupo 4: ejercicio (E); Grupo 5: diabético con apocinina (DA); Grupo 6: diabético con ejercicio (DE); Grupo 7: ejercicio con apocinina (EA); Grupo 8: diabético con ejercicio + apocinina (DEA). La dosis administrada de apocinina fue de 3 mg/kg/día durante las 8 semanas (Meng et al., 2011).

Inducción de diabetes experimental

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

Protocolo de entrenamiento

Las ratas se sometieron a un protocolo de ejercicio físico en una banda sin fin, la cual esta seccionada en 8 áreas con una estructura fabricada con acrílico adaptada a las dimensiones de la banda y tamaño de los animales, al seguir el protocolo descrito por Wisloff et al. (2001), con algunas modificaciones. Antes del protocolo de ejercicio completo, todos los animales fueron sometidos a un régimen

de preacondicionamiento 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 consistió en 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; Intervalo 1, comenzó con una velocidad de 15 m/min durante 5 min; Intervalo 2, la velocidad se incrementó progresivamente hasta los 20 m/min durante 20 min; intervalo 3, 5 min a 15 m/min, dicho protocolo es considerado de intensidad moderada. El protocolo completo de ejercicio se realizó durante 8 semanas.

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 (ayuno), glucosa postprandial, glucosa pre-ejercicio y glucosa post-ejercicio utilizando un glucómetro Accu Check Performa®.

Prueba de resistencia a la insulina

Después de 15 h de la sesión de entrenamiento final, las ratas de experimentación recibieron una dosis de insulina de acción rápida regular de la marca PHARMAlife (0.75 U/kg de peso corporal), inmediatamente después de recoger una muestra de glucosa basal. Las concentraciones de glucosa en sangre se midieron a partir de la línea de base (inmediatamente antes de la administración de insulina a t=0 min), eventualmente los niveles de glucosa fueron medidos a 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, los músculos de interés fueron aislados y sometidos a análisis bioquímicos de estrés oxidativo y estudios moleculares.

Disección de los músculos

Después 8 semanas de tratamiento y de actividad física, las ratas fueron eutanizadas por dislocación cervical y se procedió a la disección de los músculos sóleo (músculo lento) y *Extensor digitorum longus* (músculo rápido). Los músculos de una extremidad se utilizaron para hacer registros de tensión isométrica y los de la otra extremidad fueron almacenados en tubos Eppendorf de 1.5mL mantenidos a -80 °C hasta la realización de posteriores análisis bioquímicos.

Registro de tensión

Se aislaron los músculos sóleo y extensor *digitorium lungus* (EDL) de las extremidades traseras de las ratas y fueron utilizados para los registros de tensión (análisis de función muscular). Una vez aislados los músculos fueron colocados en una caja Petri, donde se fijaron con ayuda de alfileres entomológicos inmersos en solución Krebs-Ringer suministrado con gas carbógeno (95% de O₂ y 5% CO₂) a fin de retirar el exceso de tejido conectivo. Posteriormente, el músculo se montó en una cámara para el registro de la tensión isométrica, con su extremo proximal sujeto al fondo de la cámara y el extremo distal al gancho de un transductor óptico, el cual se conecta a un amplificador, y éste a su vez, a una interface analógico-digital, que permite adquirir la tensión generada por el músculo, mediante el software MDAC (Word Precision Instruments, USA) en una computadora. Dentro de la cámara de registro, se colocaron dos electrodos de platino, los cuales se conectarán a una unidad aisladora de estímulos y un estimulador eléctrico (Grass Ints. USA), esto con la finalidad de aplicar el protocolo para inducir la contractilidad del músculo y evaluar la resistencia a la fatiga, el cual consta de pulsos de 100 V, 300 ms de duración y frecuencia de 45 Hz para el sóleo y 50 Hz para el EDL.

Análisis de marcadores de estrés oxidativo

1. Evaluación del estado rédox del glutati6n. La concentraci6n de glutati6n muscular se determin6 empleando el m6todo reportado por Ortiz-Ávila et al.,

(2015) con algunas modificaciones. Las muestras de homogenados de los músculos sóleo y del EDL fueron tratados inicialmente con 200 μ l de solución liberadora de glutatión 5 % (v/v) de ácido sulfosalicílico, Tritón 100X 0.01 %. Posteriormente, se sonicó en intervalos de 3 s (3 s en hielo y 3 s en el sonicador) y se centrifugó a 10 000 rpm por 5 min, el sobrenadante se utilizó para las mediciones.

El glutatión total (GSH + GSSG) y el glutatión oxidado (GSSG) se determinaron por un método enzimático (Akerboom y Sies, 1981). El contenido de glutatión total se determinó colocando en una celda 90 μ L del sobrenadante, al cual se le adicionó buffer de fosfatos (K_2HPO_4 , 0.1 M pH 7.5), 3 mM de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzónico) - DTNB y 0.115 μ l/ml de glutatión reductasa en un volumen final de 1 mL. Después de 30 s de incubación a temperatura ambiente, se le añadió NADPH 2 mM y la cinética de la reacción se determinó durante 5 min. El incremento de la absorbancia a 412 nm fue convertida a concentración de GSH usando una curva estándar con valores conocidos de GSH (Akerboom y Sies, 1981).

Para la determinación del GSSG, el mismo ensayo de reciclaje de DNTB fue aplicado después de incubar 1 h a temperatura ambiente con 4-vinilpiridina al 3% (v/v) para determinar GSH reducido. El glutatión reducido (GSH) se determinó restando el glutatión oxidado del glutatión total. Los datos se expresaron como μ M/mg de proteína.

2. Medición de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO). Los niveles de ERO fueron determinados a través de la oxidación del crómóforo fluorescente 2',7'-diclorohidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA). Se colocaron en tubos de ensayo muestras de homogenados de cada uno de los músculos (0.5 mg/dL). La muestra se incubó a 4 °C en agitación constante durante 15 min en el buffer correspondiente (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 H₂DCFDA para un volumen total de 2 ml. Esta suspensión se distribuyó 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 ex 485 nm; λ em 520 nm). La media de los datos obtenidos se expresó como delta fluorescencia (ΔF) en unidades arbitrarias.

Ensayo de expresión de genes

El aislamiento del ARN total de los músculos de interés se llevó a cabo empleando el reactivo Trizol (Invitrogen) (isotiocianato de guanidina y fenol), de acuerdo al protocolo de Henríquez-Olguín et al. (2016). Para la reacción de la transcripción reversa (RT), se utilizaron 2 μ g de ARN total para obtener el cDNA, empleando el kit QuantiNova Reverse Transcription (QIAGEN; número de catálogo 205413). La expresión de genes se determinó mediante qRT-PCR, utilizando sets de *primers* comerciales para NOX2 , 5'- CAA TTC ACA CCA TTG CAC ATC -3 ' directo y 5'- CGA GTC ACA GCC ACA TAC AG -3 ' inversa , NOX4 5'- TCC ATC AAG CCA AGA TTC TGA G -3 ' directo y 5'- GGT TTC CAG TCA TCC AGT AGA G -3 ' inversa, Nf- κ β 5'-ATGGCAGACGACGATCCTTTC-3' directo y 5'- TGTTGACAGTGGTATATCTGTTG-3 ' inversa, y GLUT4 5'- TCC ATC AAG CCA AGA TTC TGA G -3 'directo y 5'- GGT TTC CAG TCA TCC AGT AGA G -3 ' inversa. La eficiencia de amplificación para cada muestra y los niveles relativos de expresión de ARNm se calcularon utilizando curvas estándar experimentales de acuerdo con el método $\Delta\Delta CT$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Resultados

1. Efecto de la inhibición de la NOX2 sobre la glucemia en ayuno y el peso corporal

Se evaluó el efecto de la inhibición de la NOX2 por la apocinina sobre los niveles de glucosa basal (ayuno) y el peso corporal de los ocho diferentes grupos, los cuales fueron medidos al inicio y al término de las ocho semanas del protocolo experimental.

En la figura 7A se muestran los niveles de glucosa, en donde se observa que el grupo diabético mostró niveles sumamente elevados (510.6 ± 29.98 mg/dL) de manera significativa con respecto al grupo control (75.30 ± 2.07 mg/dL), lo cual demuestra el establecimiento de la DM experimental. Sin embargo, interesantemente el grupo diabético con apocinina mostró una mejora significativa al verse disminuidos los niveles de glucosa (269.2 ± 48.76 mg/dL) respecto al grupo diabético. En cuanto a los grupos ejercitados, en el grupo diabético con ejercicio (376.6 ± 61.98 mg/dL) se observó una ligera disminución, pero no fue estadísticamente significativa, mientras que en el grupo diabético ejercitado con la apocinina (335.9 ± 60.76 mg/dL) se observó una disminución significativa con respecto al grupo diabético, destacando el efecto benéfico del ejercicio en la patología, y la importancia de la inhibición de la NOX2 bajo esta condición. Por otro lado, los grupos apocinina, ejercitado y ejercitado con apocinina permanecieron con niveles glucémicos normales hasta el final del protocolo.

En la figura 7B, se muestra el efecto de la inhibición de la NOX2 sobre el peso corporal, se observó una disminución notable del peso al finalizar el protocolo experimental en el grupo diabético (42.50 ± 7.07 g) de manera significativa con respecto al grupo control (112.4 ± 2.92 g), el cual es un rasgo muy característico de la patología. Con el tratamiento con la apocinina se revirtió este efecto, observándose una mejora significativa en la ganancia de peso en el grupo diabético con la apocinina (91.00 ± 11.59 g) con respecto al grupo diabético,

mientras que en los grupos diabético ejercitado (65.25 ± 16.08 g) y en el grupo diabético ejercitado con apocinina (35.50 ± 13.09 g) no se observaron diferencias significativas respecto al grupo diabético. Por otro lado, entre los grupos: ejercitado, ejercitado con apocinina no se encontraron diferencias entre ellos.

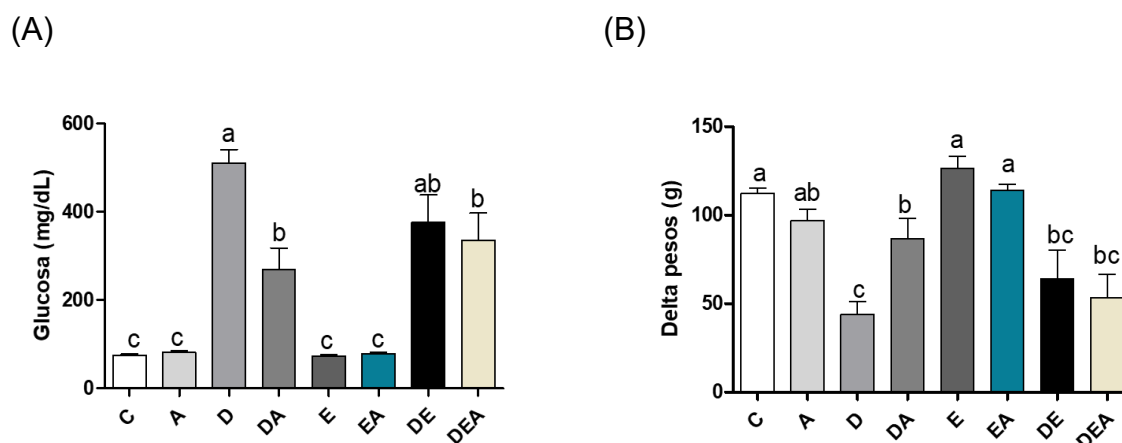


Figura 7. Efecto de la inhibición de la NOX2 sobre la glucemia en ayuno y el peso corporal.

(A). Niveles de glucosa en ayuno en todos los grupos experimentales al final de las 8 semanas del protocolo (mg/dl). (B) La ganancia de peso corporal al final del protocolo experimental (g). C: control; A: Apocinina; D: diabético; DA: diabético Apocinina; E: ejercicio; EA: ejercicio Apocinina; DE: diabético ejercitado DEA: diabético ejercitado Apocinina. Los datos se presentan como la media \pm error estándar. (ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Tukey). Las diferentes letras (minúsculas) indican las diferencias significativas entre grupos con $p < 0,05$.

2. Efecto de la inhibición de la NOX2 sobre la sensibilidad a la insulina

Con la finalidad de analizar si la mejora de la glucemia en ayuno se relaciona con una mayor sensibilidad a la insulina, se realizó una prueba de resistencia a la insulina en los diferentes grupos experimentales (figura 8A). La prueba se llevó a cabo 24 h después de finalizar el protocolo de 8 semanas y los niveles de glucosa en ayuno ($t=0$ min) fueron comparados entre los diferentes grupos experimentales. En todos los grupos, la insulina indujo una disminución en los niveles de glucosa;

sin embargo, a partir del minuto 60 se hicieron más evidentes en los grupos diabético con apocinina (68.25 ± 68.25 mg/dL), diabético ejercitado (97.83 ± 17.74 mg/dL) y diabético ejercitado con apocinina (69.17 ± 8.27 mg/dL), indicando que existe una menor resistencia a la insulina en estas ratas, mostrándose una disminución significativa comparándolos con el grupo diabético (235.7 ± 68.25 mg/dL). La inhibición de la NOX2 por la apocinina no modificó la resistencia a la insulina en condiciones control, no se mostraron diferencias respecto al control y al ejercitado. Para estimar de mejor manera la prueba de resistencia a la insulina, se calculó el área bajo la curva (AUC) de los cambios en la glucosa en respuesta a la insulina durante los 120 min (figura 8B). Estos resultados indican que el modelo de diabetes inducido con STZ presenta una elevada resistencia a la insulina en comparación al grupo control, lo cual fue mejorado a través de la inhibición de la NOX2 al incrementar significativamente la sensibilidad a la insulina. Por otro lado, también se demostró que el ejercicio como una terapia no farmacológica tiene un efecto benéfico sobre este parámetro; y de manera interesante el ejercicio en combinación con el inhibidor de la NOX2 (Apocinina) mostró un efecto sinérgico al mejorar la sensibilidad a la insulina.

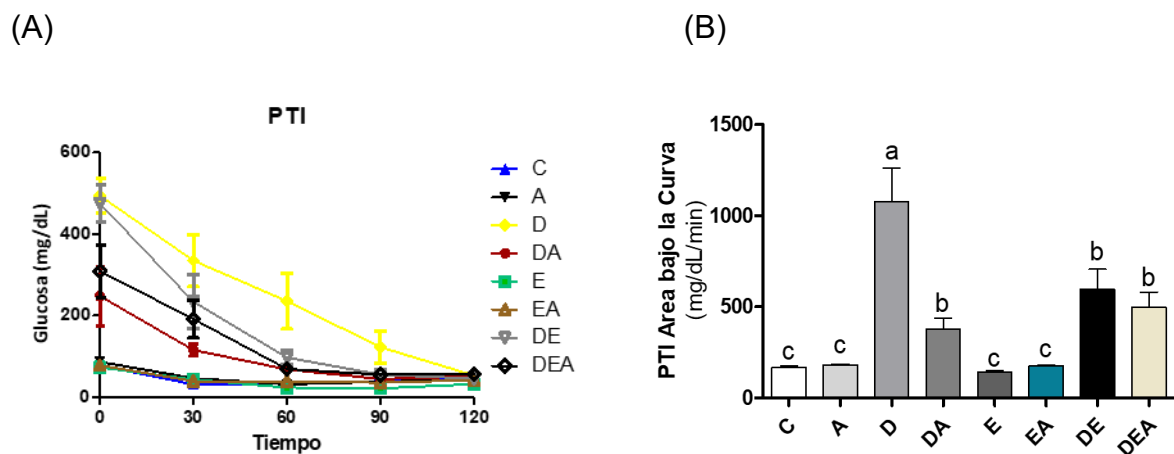


Figura 8. Prueba de Tolerancia a la Insulina (PTI) en todos los grupos experimentales. En A), se muestran los niveles de glucosa (mg/dl) medidos en los diferentes tratamientos en función del

tiempo (0, 30, 60, 90 y 120 min) ($p \leq 0.05$). Todas las ratas recibieron una inyección de 0.75 U insulina/kg de peso corporal en el tiempo 0. En B), se muestran los valores del área bajo la curva (ABC) en mg/dl durante un periodo de 120 min. C: control; A: Apocinina; D: diabético; DA: diabético Apocinina; E: ejercicio; EA: ejercicio Apocinina; DE: diabético ejercitado DEA: diabético ejercitado Apocinina. Los valores son mostrados como promedio \pm error estándar (ES), $n = 6$. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de una prueba de comparación múltiple post-hoc de Tukey.

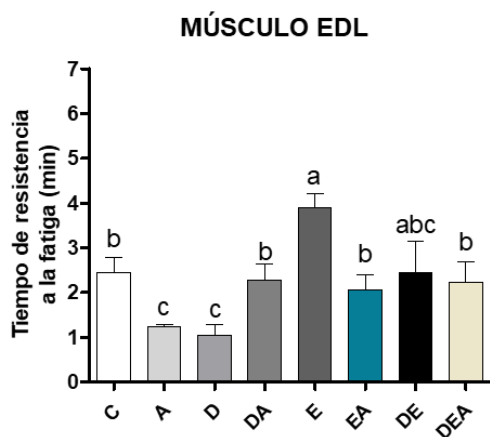
3. Participación de la NOX2 en la función muscular durante la diabetes

Para analizar el efecto de la inhibición de la NOX2 sobre la función muscular se midió el tiempo de resistencia a la fatiga, así como la tensión máxima y total generada por los músculos EDL y sóleo de los diferentes grupos experimentales. En el grupo diabético, en ambos músculos se observó una notable disminución en el tiempo de resistencia a la fatiga, así como en la generación de fuerza con respecto al grupo control. El tratamiento con la apocinina en el músculo EDL contribuyó a un aumento significativo en el tiempo de resistencia a la fatiga (54.48 %) y mejoró la tensión muscular máxima (70.64 %) y total (56.93 %) comparado al grupo diabético, sin embargo, en el músculo sóleo no se observó este mismo efecto.

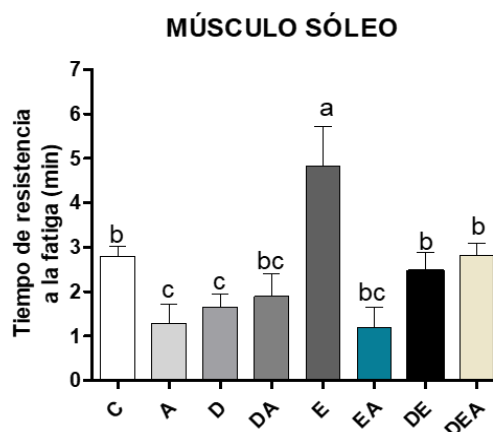
En el grupo diabético ejercitado se observó un incremento en el tiempo de resistencia a la fatiga (32.50 %) así como en la fuerza total (69.79 %) y máxima (69.45 %) en el músculo sóleo, mientras que en el EDL hubo un ligero incremento; este no fue estadísticamente significativo. Por otro lado, en la combinación del tratamiento (apocinina + ejercicio) en la diabetes, se observó una mejora en el músculo EDL al incrementar el tiempo de resistencia a la fatiga (53.40 %) así como la fuerza total (56.01 %) y máxima (76.89 %) con respecto al grupo diabético, mientras que en el sóleo también se observó un incremento en el tiempo de resistencia a la fatiga (41.20 %) y en la fuerza total y máxima se hizo notar un ligero incremento, pero este no fue estadísticamente significativo. Estos resultados muestran la implicación de la inhibición de la NOX2 en la mejora de la función

muscular, que se hizo notar aún más en el músculo rápido de ratas con diabetes y en ratas diabéticas ejercitadas.

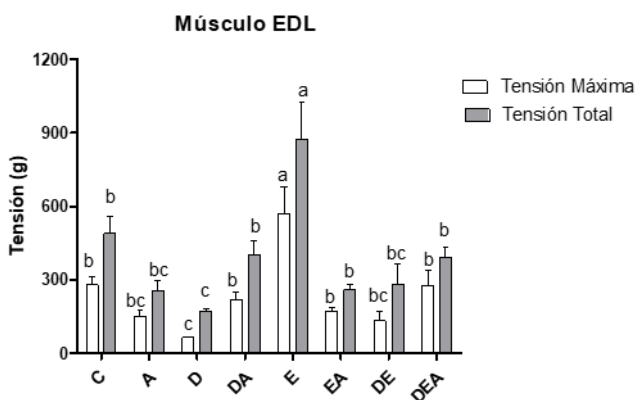
A)



B)



C)



D)

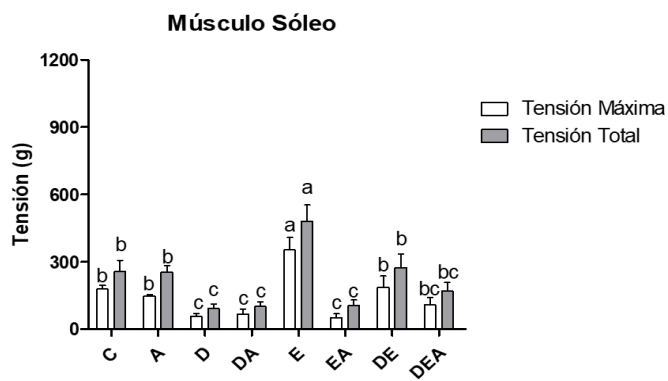


Figura 9. Efecto de la inhibición de la NOX2 y el ejercicio sobre la tensión máxima, total y el tiempo de resistencia a la fatiga del músculo esquelético rápido y lento de ratas diabéticas.

(A) Tiempo de resistencia a la fatiga para el músculo EDL y (B) tiempo de resistencia a la fatiga para el músculo Sóleo. (C) Tensión máxima y tensión total del músculo EDL, (D) tensión máxima y total del músculo Sóleo. C: control; A: Apocinina; D: diabético; DA: diabético Apocinina; E: ejercicio; EA: ejercicio Apocinina; DE: diabético ejercitado DEA: diabético ejercitado Apocinina. Los datos se

representan como la media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos, ($p \leq 0.05$) ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Tukey, $n = 6$.

4. Efecto de la Inhibición de la NOX2 sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno en músculo esquelético rápido y lento de ratas diabéticas ejercitadas

Para evaluar la participación de la NOX2 sobre el estrés oxidante, se midieron los niveles de ERO de los músculos EDL (figura 10A) y sóleo (figura 10B) de los diferentes grupos experimentales. En el grupo diabético se observó un notable incremento de las ERO del 70.03 % y 69.75 % en los músculos EDL y sóleo respectivamente, en comparación al grupo control. A través de la inhibición de la NOX2 con la apocinina en la diabetes se observó una disminución significativa del 65.01 % en el EDL (figura 10A) y un 53.01 % en el sóleo (figura 10B) con respecto al grupo diabético. Por otro lado, el ejercicio como tratamiento no farmacológico también logró disminuir los niveles de ERO en la diabetes para ambos músculos; observándose una reducción del 52.31 % y 79.20 % en el EDL y sóleo, respectivamente. Interesantemente, la combinación de ambos tratamientos tuvo un efecto importante y aun mayor al observarse una disminución del 87.56 % para el EDL (figura 10A) y 79.41 % para el sóleo (figura 10B). En condiciones control el inhibidor de la NOX2 (apocinina) mostró una disminución mayor en los niveles de ERO en el músculo EDL, mientras que en el sóleo permaneció sin cambios con respecto al control.

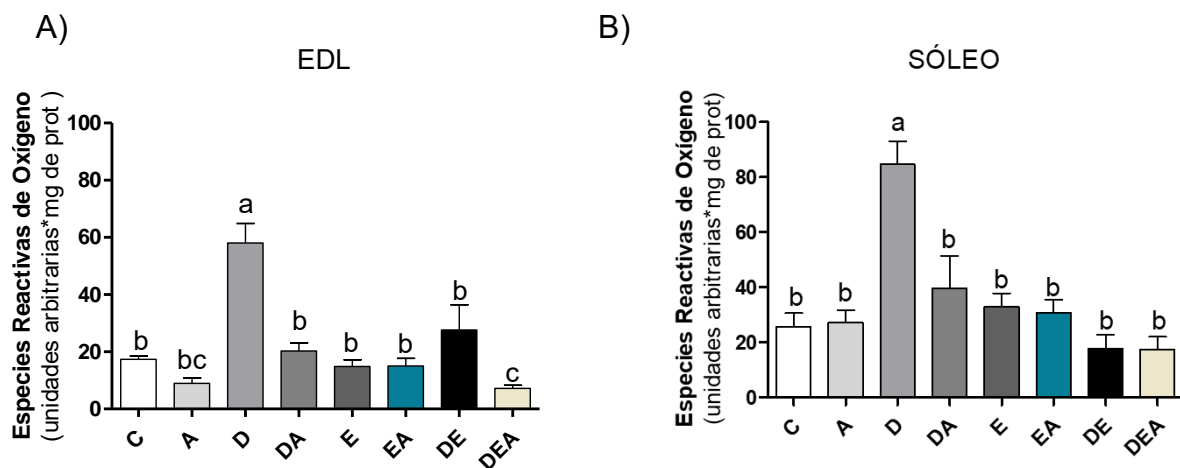


Figura 10. Efecto de la inhibición de la NOX2 y el ejercicio sobre los niveles de ERO en el músculo esquelético rápido y lento de ratas diabéticas. (A) Niveles de ERO en el músculo EDL. (B) Niveles de ERO en el músculo sóleo. C: control; A: Apocinina; D: diabético; DA: diabético Apocinina; E: ejercicio; EA: ejercicio Apocinina; DE: diabético ejercitado DEA: diabético ejercitado Apocinina; ERO: Especies Reactivas de Oxígeno. Los datos se representan como la media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos, ($p \leq 0.05$) ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Tukey, $n = 6$.

5. Efecto de la inhibición de la NOX2 sobre el estatus redox del glutatión en músculo esquelético rápido y lento en ratas diabéticas ejercitadas

El glutatión, es el antioxidante no enzimático más abundante en las fibras musculares actuando contra el estrés oxidante. Se almacena en su forma oxidada o reducida y su balance redox se ha utilizado como un marcador del estado antioxidante (Ferreira y Reid, 2008; Aoi et al., 2015) En las figuras 11.1 y 11.2 se muestran el efecto de la inhibición de la NOX2 sobre el estatus redox del glutatión; en su estado reducido (GSH), oxidado (GSSG) y los niveles de glutatión total en los músculos EDL y sóleo, respectivamente. La relación GSH/GSSG en la figura 11.1.C y 11.2.C nos indican el estatus redox de glutatión, donde observamos en la condición de diabetes que hubo una disminución significativa de un 85.15 % en el EDL y un 93.70 % en sóleo, comparado con respecto al grupo control. En cambio, en condiciones de diabetes con el inhibidor de la NOX2 se observó un aumento significativo en ambos músculos respecto al grupo diabético sin inhibidor ($P > 0.05$; $n=6$). En el grupo diabético ejercitado a pesar de que se observó un ligero incremento en ambos músculos este no fue estadísticamente significativo. En cambio, en el grupo diabético ejercitado más apocinina; en ambos músculos se observó un incremento significativo del 49.78 % y del 92.46 % en el EDL y sóleo, respectivamente (véase figura 11.1.C y 11.2.C).

En cuanto a los niveles de glutatión total, estos fueron disminuidos en el grupo con diabetes, con una diferencia de 60.83 % en el EDL y 49.94 % en sóleo con respecto al grupo control. Los niveles de glutatión total disminuyeron en ambos músculos en los grupos control, tanto ejercitado como no ejercitado con el inhibidor de la NOX2. Por otro lado, en el grupo con diabetes más apocinina el

incremento fue de 59.87 % en el EDL y de 44.55 % en el sóleo con respecto al grupo diabético sin tratamiento ($P < 0.05$; $n = 6$). Bajo la condición de diabetes más ejercicio también se observó un incremento del contenido de glutatión total del 64.54 % en el EDL y 35.36 % en el sóleo. De manera interesante, bajo la combinación de los dos tratamientos (apocinina + ejercicio), también se observó un incremento del contenido total del glutatión del 41.77 % y 50.72 % en EDL y sóleo, respectivamente. En conjunto los resultados indican que el tratamiento con el inhibidor de la NOX2 modifica el estatus rédox del glutatión, pero que sus efectos benéficos se hacen notar por mejorar la síntesis del glutatión en músculo esquelético rápido y lento tanto en condición de diabetes como en los grupos con la patología y ejercitados. Sin embargo, en condiciones control no se observó este mismo efecto (Véase figura 11.1.D y 11.2.D).

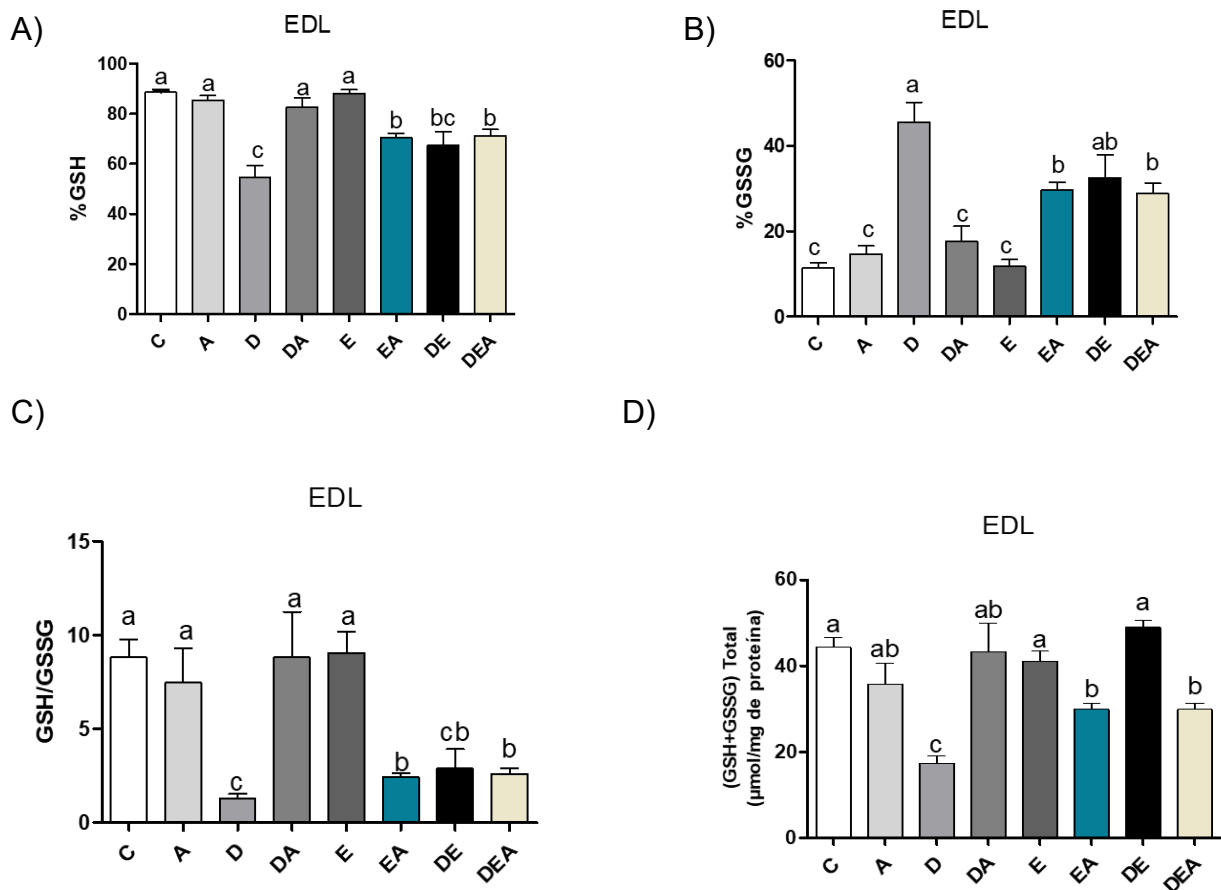


Figura 11.1. Efecto de la inhibición de la NOX2 en el estatus rédox del glutatión en músculo rápido de ratas diabéticas ejercitadas. En A) los niveles de GSH; B) los niveles de GSSG; C) la relación rédox (GSH / GSSG); y en D) los niveles de glutatión totales (GSH + GSSG) GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión disulfuro u oxidado. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos, ($p \leq 0.05$) ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Tukey, $n = 6$.

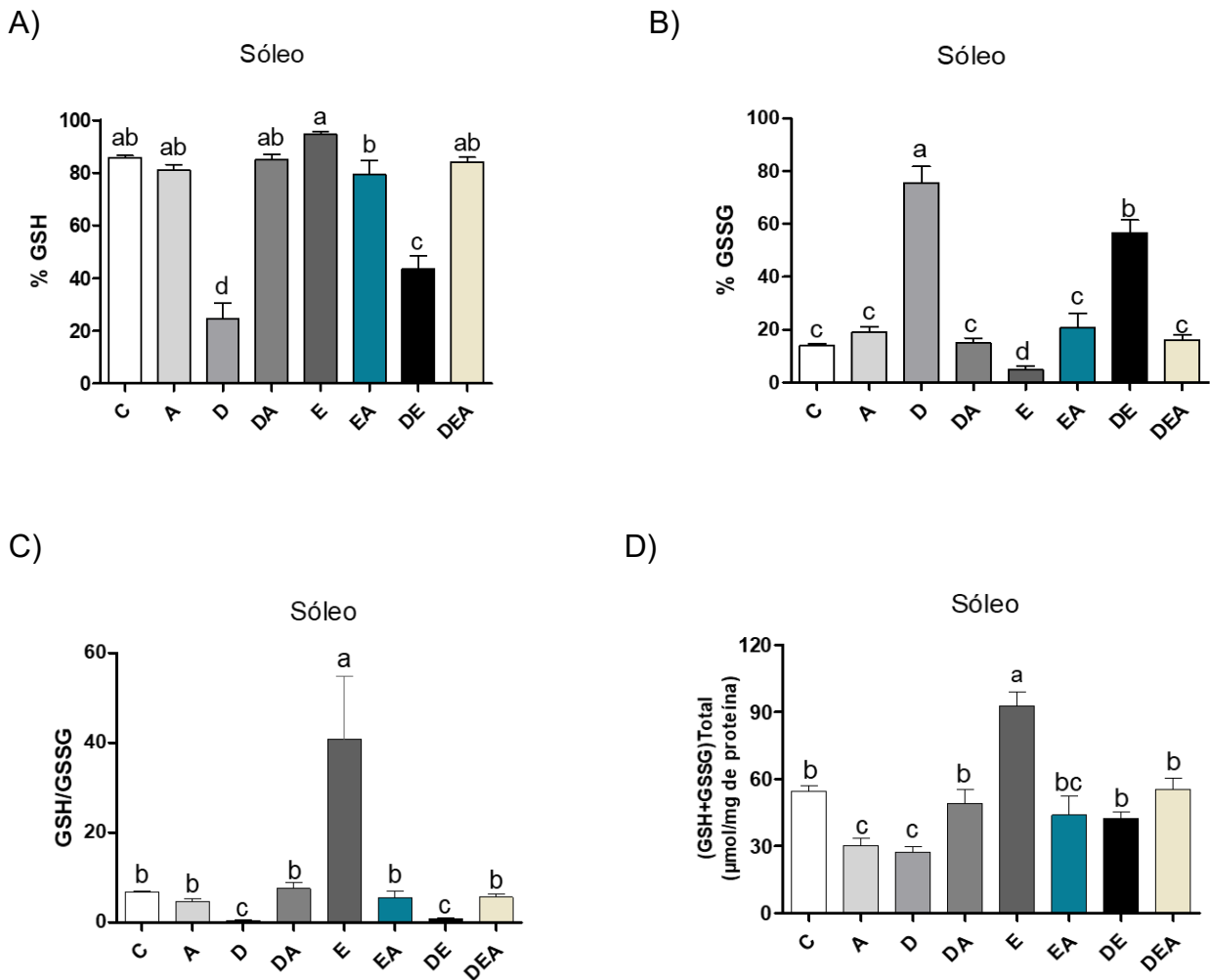


Figura 11.2. Efecto de la inhibición de la NOX2 en el estatus rédox del glutatión en músculo lento de ratas diabéticas ejercitadas. . En A) los niveles de GSH; B) los niveles de GSSG; C) la relación rédox (GSH / GSSG); y en D) los niveles de glutatión totales (GSH + GSSG) GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión disulfuro u oxidado. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos, ($p \leq 0.05$) ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Tukey, $n = 6$.

6. Implicación de la NOX2 sobre la expresión de genes que participan en la respuesta antioxidante y metabólica: Nrf2, NF- κ B, NOX4 y de GLUT4 en los músculos rápido y lento de ratas con diabetes y ejercitadas

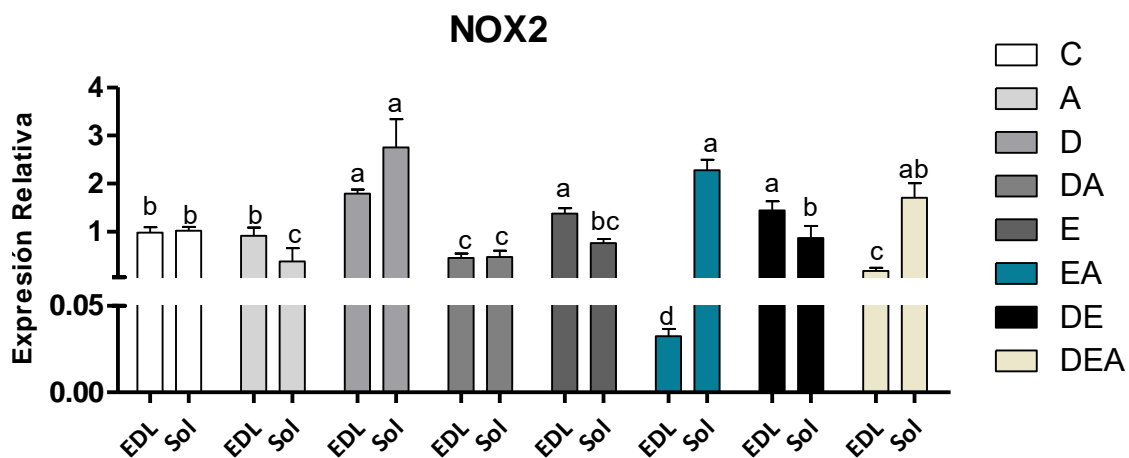
Finalmente, se analizó la implicación de la NOX sobre la expresión de genes que participan en la respuesta antioxidante: Nrf2 y Nf- κ B y en el metabolismo como GLUT4 de forma comparativa entre los músculos EDL y sóleo en los diferentes grupos experimentales.

Primero, se midieron los niveles de RNAm para la NOX2 y la NOX4; para analizar una posible diferencia en la expresión de estas isoformas dependiente del tipo de fibra predominante en el músculo. En la figura 12 se muestran los niveles de expresión para la NOX2 (figura 12A) y NOX4 (figura 12B) en los músculos EDL y sóleo en los diferentes grupos experimentales. En ambos músculos de los animales diabéticos se observó un notable incremento en los niveles de expresión de NOX2 y NOX4 de manera significativa con respecto al grupo control. La expresión de la isoforma NOX2 aumento en el EDL un 45.33% y sóleo un 62.84%. En cuanto a la isoforma NOX4 aumentaron un 69.83% y 28.20 % en el EDL y sóleo, respectivamente. En este trabajo, la apocinina logró disminuir la expresión de la NOX2 en ambos músculos en la diabetes (74.61 % y 82.84 %, respectivamente). Sin embargo, en cuanto los niveles de expresión de la NOX4 se observó una disminución significativa del 78.67 % en el EDL con respecto al grupo diabético y en el sóleo a pesar de que se observó una ligera disminución esta no fue estadísticamente significativa.

El ejercicio es otro estimulante importante que puede modular los niveles de expresión de la NOX2. En el grupo diabético ejercitado en el músculo EDL se observó una ligera disminución en los niveles de expresión de esta enzima, pero no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo diabético, sin embargo, en el músculo sóleo si se observaron notablemente disminuidos en un 68.37 % con respecto al grupo diabético. En cuanto a los niveles de NOX4 estos se observaron disminuidos en el EDL y sóleo (56.12 % y 74.53 %, respectivamente). Sorprendentemente, el ejercicio en combinación con la apocinina en la diabetes

logró reducir significativamente los niveles de expresión de la NOX2 y la NOX4 en el músculo EDL (89.76 % y 95.24 %, respectivamente), en comparación al grupo diabético. En cambio, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de RNAm de la NOX2 y la NOX4 en el músculo sóleo en comparación con el grupo diabético. Por otro lado, en condiciones control la apocinina también tuvo efecto sobre la expresión de la NOX2 y la NOX4. En el músculo EDL se observó una disminución en los niveles de NOX4 del 46.30 % en el grupo apocinina con respecto al control, y en el sóleo la disminución no fue estadísticamente significativa; mientras que los niveles de la NOX2 permanecieron sin cambios en el EDL, en el sóleo disminuyeron un 62.32 % con respecto al control. En el grupo ejercitado, la apocinina logró disminuir los niveles de expresión tanto de la NOX2 como la NOX4 en el músculo EDL, pero en el músculo sóleo sólo los niveles de la NOX4 se observaron disminuidos con respecto al control y al ejercitado.

A)



B)

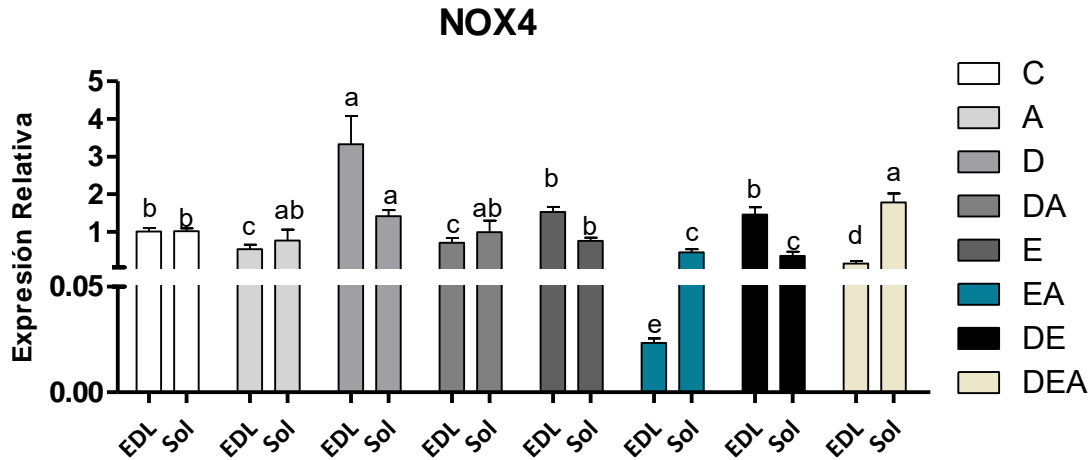


Figura 12. Efecto de Apocinina sobre la expresión de NOX2 y NOX4 en los músculos rápido y lento de ratas diabéticas ejercitadas. (A) niveles de expresión de NOX2 en el músculo EDL y sóleo. (B) niveles de expresión de NOX4 en el EDL y sóleo. Los datos se presentan como media \pm SEM (n= 6 por grupo), las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos, ($p \leq 0.05$) ANOVA de dos vías, prueba post-hoc de Tukey.

Las ERO generadas por NADPH oxidasa durante la actividad contráctil parecen mediar tanto directa como indirectamente la activación de varios factores de transcripción regulados por la homeostasis rédox, algunos de ellos son: el factor nuclear kappa B (NF- κ B), y el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) (Bouviere et al., 2021). En la figura 13, se muestra el efecto de la inhibición de la NOX2 sobre los niveles de expresión para el gen Nrf2 de los diferentes grupos experimentales en los músculos EDL y sóleo. En las ratas diabéticas los niveles de expresión de Nrf2 se mostraron notablemente disminuidos en ambos músculos en un 73.09 % en el EDL y un 57.26 % en el sóleo con respecto al grupo control. A través de la inhibición de la NOX2 por la apocinina en la diabetes se observó un incremento significativo del 75.66 % en el EDL, mientras que en el sóleo a pesar de que se

observó un ligero incremento este no fue estadísticamente significativo. Por otro lado, se sabe que el ejercicio puede incrementar los niveles de expresión de Nrf2, y en el grupo diabético ejercitado tanto en el EDL, como en el sóleo se observó un incremento significativo (88.76 % y 86.79 %, respectivamente) en comparación al grupo diabético. En este análisis, el ejercicio en combinación con la apocinina en la diabetes incrementó aún más los niveles de expresión de Nrf2 en ambos músculos (91.10 %) en el EDL y (86.79 %) en sóleo de manera significativa con respecto al grupo diabético. En las ratas sanas con apocinina los niveles de expresión de Nrf2 se observaron similares al grupo control ya que en ambos músculos el ligero cambio no fue estadísticamente significativo. En cambio, en el grupo ejercitado apocinina se observó un incremento en la expresión de Nrf2 en el músculo EDL de un 74.86% de manera significativa respecto al grupo control mientras que en el músculo sóleo no se observaron cambios respecto al grupo control.

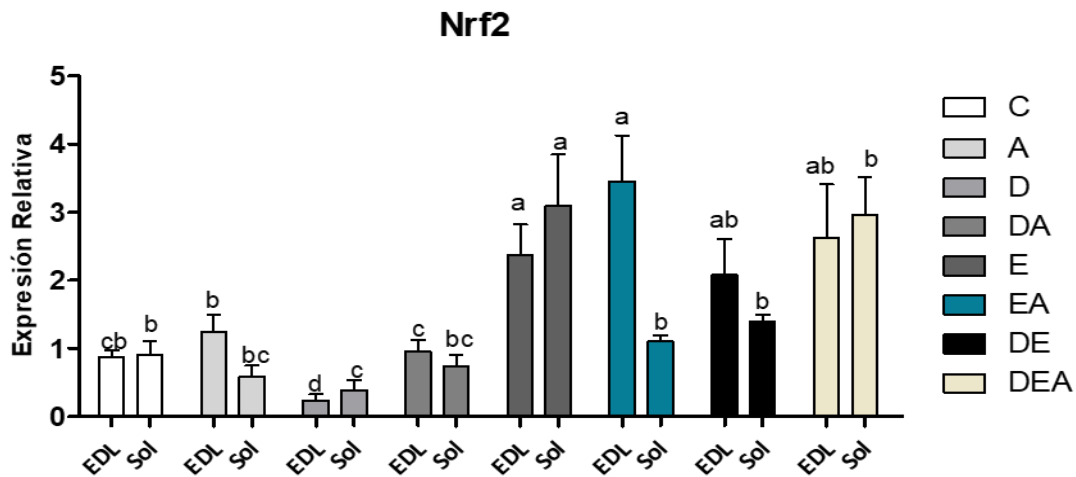


Figura 13. Efecto de la inhibición de NOX2 sobre la expresión de Nrf2 en los músculos rápido y lento de ratas diabéticas ejercitadas. Los datos se presentan como media \pm SEM (n= 6 por grupo), las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos, ($p \leq 0.05$) ANOVA de dos vías, prueba post-hoc de Tukey.

En la figura 14 se muestran de forma comparativa los niveles de expresión para el gen NF- κ B en el músculo EDL y sóleo de los diferentes grupos experimentales. En las ratas diabéticas, los niveles de expresión de NF- κ B solo se mostraron elevados en el músculo sóleo en un 67.30 % en comparación con el grupo control, pero bajo esta misma condición de diabetes más apocinina se observó una notable disminución del 91.82 % de manera significativa respecto al grupo diabético, mientras que en el EDL estos grupos permanecieron sin cambios. Interesantemente, en el grupo ejercitado, en ambos músculos los valores de expresión se mostraron sumamente elevados en comparación con el grupo control. El ejercicio en las ratas diabéticas logro disminuir los niveles de expresión para este gen en el sóleo (53.90 %) y de igual manera el ejercicio en combinación con Apocinina en las ratas diabéticas disminuyo en un 91.82 % los niveles de expresión significativamente respecto al grupo diabético.

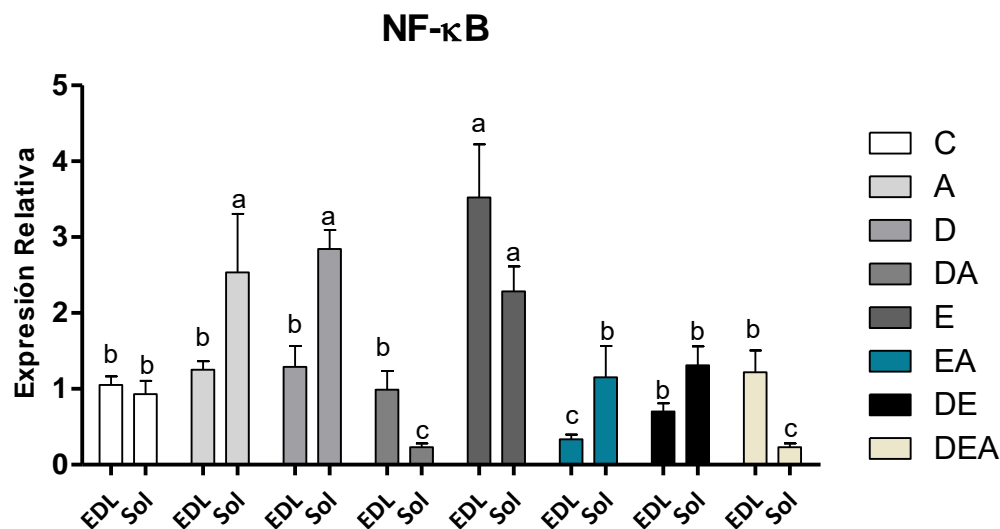


Figura 14. Efecto de la inhibición de NOX2 sobre la expresión de NF- κ B en los músculos rápido y lento de ratas diabéticas ejercitadas. Los datos se presentan como media \pm SEM (n= 6 por grupo), las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos, ($p \leq 0.05$) ANOVA de dos vías, prueba post-hoc de Tukey.

En la figura 15, se muestran los resultados en relación al análisis de los niveles de expresión para el gen GLUT4. En el grupo diabético los niveles de ARNm de GLUT4 se mostraron notablemente disminuidos en ambos músculos, un 83.39 % en el EDL y 70.51 % en el sóleo con respecto al grupo control; correlacionándose estos resultados a lo que se observó en los altos niveles de glucosa basal y en la prueba de resistencia a la insulina en este mismo grupo. Interesantemente tras la inhibición de la NOX2, en el grupo diabético más apocinina se observó un aumento estadísticamente significativo en los niveles de expresión del GLUT4 del 62.83 % en el EDL y 74.01 % en el sóleo con respecto al diabético. Este mismo efecto también se observó en los grupos diabético ejercitado (68.94 %) y diabético ejercitado más apocinina (88.13 %), siendo aún mayor en este último; solo en el músculo EDL, sin embargo, a pesar de que en el sóleo se observó un ligero incremento, este no fue estadísticamente significativo con respecto al diabético. Estos resultados indican que el incremento en los niveles de expresión del transportador de glucosa (GLUT4) fue aún más marcados en el músculo EDL. Y por otro lado, el ejercicio como terapia no farmacológica en combinación con el inhibidor de la NOX2 logró regular positivamente y estadísticamente significativa los niveles de expresión del GLUT4 en la patología. Sin embargo, los niveles de expresión del GLUT4 fueron aún mayores en el músculo EDL del grupo ejercitado en comparación con todos los demás grupos, observándose un notable incremento de manera significativa con respecto al control, apocinina, ejercitado apocinina y los grupos diabéticos (figura15).

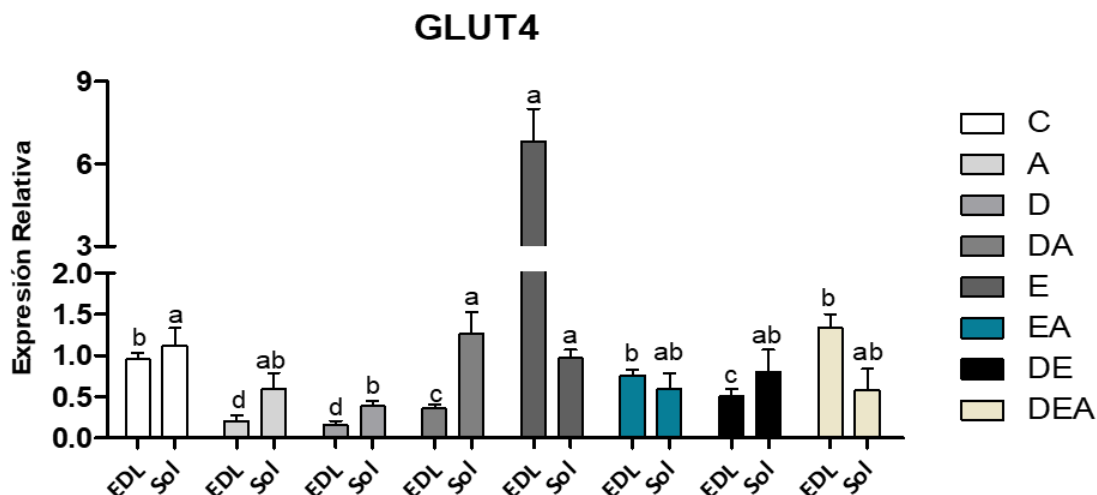


Figura 15. Efecto de la inhibición de NOX2 sobre la expresión del transportador de glucosa (GLUT4) en los músculos rápido y lento de ratas diabéticas ejercitadas. Los datos se presentan como media \pm SEM (n= 6 por grupo), las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos, ($p \leq 0.05$) ANOVA de dos vías, prueba post-hoc de Tukey.

Discusión

La miopatía diabética es una de las diversas complicaciones que se presentan durante la diabetes mellitus (DM), que se caracteriza por la disminución de la capacidad física, la fuerza y la masa muscular. La DM es una enfermedad que se clasifica dentro de las crónicas degenerativas, por lo que a medida que avanza la enfermedad se pueden presentar cambios en los músculos esqueléticos, como lo son: disminución de la capacidad metabólica, disminución del crecimiento/atrofia, un cambio en el tipo de fibra así como una disminución en la capilarización; alteraciones que se han relacionado con un estado de estrés oxidante durante la patología inducido por los altos niveles de glucemia (D' Souza et al. 2013). En consecuencia, esta condición compromete la capacidad de los individuos para realizar actividad física de manera adecuada. Por lo que, en el presente proyecto fue de principal interés buscar una estrategia terapéutica que combinara un efecto hipoglucemiante con uno antioxidante.

Los resultados muestran que en el grupo diabético se presentó una alteración de todos los biomarcadores metabólicos, comenzando por la presencia de altos niveles de glucemia en ayuno, una baja sensibilidad a la insulina así como una notable disminución del peso corporal al término de las ocho semanas del protocolo, siendo esto consistente con lo que se ha observado anteriormente en ratas tratadas con STZ para establecer un modelo de diabetes experimental (Gil-Ortega y Kaski, 2006; Saeedi et al. 2019). Inclusive estos resultados se correlacionaron con lo que se observó en este mismo grupo, en cuanto a los niveles de expresión del RNAm del transportador de glucosa (GLUT4); ya que se mostraron significativamente disminuidos en ambos músculos (EDL y sóleo), al igual que los altos niveles de expresión de las isoformas NOX; principales generadoras de ERO en el músculo (NOX2 y NOX4) en comparación al grupo control. Resultados que apoyan lo que se ha observado anteriormente en modelos de resistencia a la insulina (RI), en donde se le atribuye que las alteraciones o la disminución de la translocación del GLUT4 en las células musculares, se debe al incremento de la actividad y expresión de la enzima NOX2, estudiado en ratones Nox2-KO y líneas celulares (C2C12) (Souto et al. 2015). Se propone que la desregularización de la actividad de esta enzima promueve una mayor generación de ERO las cuales participan en el deterioro de la señalización a la insulina, ya que las proteínas sustratos del receptor a la insulina (IRS) son sensibles a los cambios redox en la célula. En condiciones de diabetes, la hiperglucemia propicia una mayor generación de ERO, lo que se ha reportado que conduce a la activación de la vía JNK (quinasas c-Jun N-terminal) y una sobreexpresión que propicia una mayor fosforilación en serina 370 del sustrato del receptor a la insulina 1 (IRS-1) e inhibe la fosforilación en tirosina del IRS-1 estimulada por la insulina, lo que conduce a un aumento de la resistencia a la insulina, hecho que también altera la translocación del transportador GLUT4 y disminuye así el transporte de glucosa (Kaneto et al. 2010). Bajo esta misma condición de diabetes, más la administración de la apocinina (3 mg/kg/día), el cual es inhibidor específico de la NADPH oxidasa, contribuyó a una reducción significativa en los niveles de glucosa basal (Figura 7A), así como una mejora en la ganancia de peso al término

de las 8 semanas (Figura B). Lo que se observó en este grupo es consistente con el trabajo de Winiarseka et al. (2010), quienes reportan que la acción hipoglucémica de la apocinina está implicada en la inhibición de la gluconeogénesis renal en conejos diabéticos, lo que también podría explicar el aumento en la ganancia de peso, ya que al disminuirse el mecanismo de gluconeogénesis, también se reducen los de proteólisis; es decir, menos degradación de proteínas por el requerimiento de sustratos de origen no glúcidos, mientras que en los grupos DE y DEA este efecto no mejoró la ganancia de peso. Además, también se observó una mejora en la sensibilidad a la insulina significativamente después del tratamiento con la apocinina en las ratas diabéticas (Figura 8B), siendo similar a los resultados de otros autores donde después del tratamiento con la apocinina durante cinco semanas, hubo una mejora notable en la sensibilidad a la insulina en ratones obesos inducidos con una dieta alta en grasas (HFD) (Meng et al. 2010; Bravo-Sánchez et al. 2021). Posteriormente, en otro trabajo similar demostraron que la apocinina redujo significativamente la hiperglucemia, la hiperinsulinemia y la dislipidemia al mejorar también la sensibilidad a la insulina en ratones alimentados con HFD (Men et al. 2011).

Por otro lado, se ha reportado que el ejercicio físico de moderada intensidad, es fundamental para el control y la regulación de la glucemia en personas con DM, además también se ha observado en modelos animales de experimentación (Poblete-Aro et al. 2018), lo cual explica la ligera disminución en los niveles de glucosa en el grupo diabético ejercitado, así como un aumento en la sensibilidad a la insulina. En condiciones saludables, el ejercicio es un estímulo que propicia adaptaciones en el tejido músculo esquelético como: el aumento de la sensibilidad a la insulina, biogénesis mitocondrial y una mejora en la defensa antioxidante, las cuales suceden a través de la activación de distintas vías de señalización como lo es la vía AMPK en el ejercicio de resistencia, donde se ha demostrado una participación de la NOX2 (Henríquez –Olgún et al. 2016; Perry et al. 2010). Por este antecedente, se combinó el ejercicio como tratamiento no farmacológico más la inhibición de la NOX2 por la apocinina en la diabetes, los cuales demostraron un efecto sinérgico al disminuir los niveles de glucosa (Figura

7A) y mejorar la sensibilidad a la insulina significativamente respecto al diabético (Figura 8A).

El músculo esquelético es un tejido heterogéneo, formado por diferentes tipos de fibras musculares con características metabólicas y velocidad de contracción distintas, que responden de manera específica según el estímulo (Schiaffino, 2018). En el presente trabajo se analizaron por esta razón a los dos tipos de músculos: EDL y sóleo. Debido a que la diabetes puede afectar a los músculos esqueléticos de manera diferencial, los integrados principalmente por fibras de contracción rápida exhiben una pérdida de función y atrofia más severa que los compuestos predominantemente por fibras de contracción lenta, sin embargo, estas son más resistentes a la fatiga debido a su alta capacidad oxidativa (Krause et al. 2014). La distribución del tipo de fibra podría desempeñar un papel importante en la susceptibilidad al daño inducido por el estrés oxidante inducido por la DM (Nonaka et al. 2014).

Como se mencionó anteriormente la DM afecta negativamente la función muscular ya reportado por D'Souza et al. (2013), lo cual es consistente con nuestros resultados evidenciado por la disminución en el tiempo de resistencia a la fatiga, en la generación de fuerza máxima y total observada en ambos músculos en el grupo diabético (Figura 9). Caneiro-Louerio et al. (2016), quienes afirman que las enzimas NOX están implicadas en acoplamiento excitación-contracción, mecanismo importante para el óptimo funcionamiento muscular. También, Sun et al. (2011) demostraron que la actividad de NOX4 está modulada positivamente por la tensión de oxígeno muscular, lo que aumenta la disponibilidad de H₂O₂, que oxida múltiples residuos de cisteína del receptor de rianodina (RyR1). Luego, este proceso promueve la liberación de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico, que es crucial para la contracción muscular. Por otro lado, la NOX2 parece ser activada por la contracción muscular, cuando el estiramiento mecánico activa la proteína Rac1, promoviendo la activación del complejo NOX2. Las ERO derivadas de NOX2

sensibilizan los canales del potencial receptor transitorio (TRP) que se encuentra en el sarcolema del músculo esquelético, aumentando la entrada de Ca^{2+} , que es esencial para mantener las cargas del RS durante las contracciones repetitivas. Otro estudio muestra que el RyR1 puede ser modificado por S-glutatinación a través de NOX2, ubicado en las membranas de los túbulos T, promoviendo la liberación de Ca^{2+} del RS. Por otro lado, aunque las NOX son esenciales para la fisiología del músculo esquelético, el exceso de ERO generadas cuando incrementa su expresión y actividad puede alterar drásticamente la función muscular, involucrándose en una amplia gama de patologías; en este trabajo demostramos por primera vez que a través de la inhibición de la NOX2 mejoró la función muscular en la diabetes: incrementando el tiempo de resistencia a la fatiga y la fuerza muscular tanto máxima como total del músculo EDL. De igual forma en combinación del ejercicio más la apocinina también se incrementó el tiempo de resistencia a la fatiga y se observó un incremento en la generación de la fuerza en el músculo EDL (Figura 9A, 9C). Mientras que en condiciones control, la inhibición de NOX2 contribuyó a la aparición de la fatiga muscular en menos tiempo. En apoyo a nuestros resultados, Henríquez-Holguin et al. (2018), demostraron que la actividad de la NOX2 es importante para el buen funcionamiento muscular en el ejercicio y condiciones saludables. Lo cual podría explicar la disminución en el tiempo a la resistencia a la fatiga y la generación de fuerza en el grupo A y EA.

La fatiga muscular característica de la diabetes, es acompañada de una marcada disminución de la capacidad antioxidante (Karla y Sahay, 2018). Por este motivo, en este estudio, se evaluó el glutatión (GSH), uno de los principales sistemas antioxidantes en las células musculares (Lamb y Westerblad, 2011). Anteriormente se reportó que en enfermedades metabólicas como la diabetes, el equilibrio redox, en particular la síntesis y el estado de GSH, se ven negativamente afectados (Pouvreau, 2018) hecho que también se observó en nuestros resultados. En las ratas diabéticas se observó una disminución significativa de la relación GSH/GSSG, y una disminución marcada en los niveles

del contenido de glutatión total, tanto en los músculos EDL como en el sóleo, indicativo un estado oxidativo, evidenciado por los altos niveles de GSSG (Figura 11.1 y 11.2). A través de la inhibición de la NOX2 en la diabetes, se restableció este sistema en ambos músculos evidenciado por la mejora en la relación del GSH/GSSG y aumento del contenido total. Anteriormente, Meng et al. (2011) reportaron un notable aumento en el contenido de GSH después de la Inhibición de la NOX2 por la apocinina en el tejido hepático en un modelo de resistencia a la insulina (RI), atribuyéndole una propiedad antioxidante a este fármaco. Sin embargo, en este trabajo por primera vez se demuestra en el tejido músculo-esquelético en un modelo de diabetes experimental. Cabe mencionar, que la reducción de la relación GSH/GSSG es un biomarcador importante del estrés oxidante y se cree que se relaciona con la disfunción de las proteínas involucradas en la contracción muscular, ya que son sensibles a la alteración redox en la células (Sánchez-Gómez et al. 2013), consistente con la disfunción muscular observada en la diabetes. Por otro lado, se ha reportado que el ejercicio por si sólo actúa como un antioxidante al regular la defensa antioxidante endógena (Merry y Ristow, 2016). En el grupo DE se observó un incremento de los niveles de glutatión total en ambos grupos y un ligero incremento en la relación GSH/GSSG. Pero la mejora en ambos parámetros, fue más marcada a través de la inhibición de la NOX2 en las ratas diabéticas ejercitadas de manera significativa en ambos músculos respecto al diabético. En trabajos recientes, se ha descrito la importancia de la enzima NOX2, como un componente clave en las adaptaciones al ejercicio físico de moderada intensidad, destacando entre ellas una mejora en la respuesta antioxidante, enzimática y no enzimática (Henriquez-Holguin et al. 2016; 2019). Sin embargo, en condiciones patológicas la incrementada actividad de la enzima deteriora y exacerba todo el sistema antioxidante (Poblete-Aro et al. 2018). Se ha propuesto que las ERO generadas por esta enzima participan en la activación de distintas vías de señalización como lo son las vías p38 y MAPK, AMPK y mTORC1 las cuales a su vez confluyen en la activación de factores transcripcionales tales como los factores Nrf2, NF- κ B y el cofactor de transcripción PGC-1 α que participan en la expresión de enzimas antioxidantes (Jackson et al.

2016), lo que podría explicar lo observado en nuestros resultados en los grupos ejercitados en cuanto al aumento de la defensa antioxidante en ambos músculos. Con estos resultados y en apoyo de lo que se observó en los grupos A y EA, donde se observó una reducción significativa en el contenido de GSH, se evidencia la importancia de la NOX2 en condiciones fisiológicas y en el ejercicio. Otro punto importante a destacar en nuestros resultados, es la notable diferencia en el contenido de glutatión entre los dos músculos analizados, siendo mayores en el músculo sóleo. Dado que estos dos músculos difieren en su composición de tipo de fibra, se puede inferir que tanto el ejercicio así como la inhibición de la NOX2 podrían afectar su estado rédox de distinta manera bajo condiciones saludables o patológicas; recientemente por nuestro grupo de trabajo (Sánchez-Duarte et al. 2021) se reportó una modulación distinta inducida por el fármaco antioxidante (Nicorandil) de manera específica en el músculo en ratas diabéticas inducidas por STZ. El músculo sóleo está formado por fibras lentas de tipo I, en comparación con el EDL, formado predominantemente por fibras rápidas tipo IIb (Gregory et al. 2001; Schiaffino, 2018). En este contexto, se ha reportado que los niveles de GSH en las fibras musculares se correlacionan con el perfil metabólico y que el contenido de glutatión es mayor en las fibras tipo I, lo que es consistente con nuestros datos (Baldelli et al. 2019). Por lo tanto, nuestros resultados confirman que el estado rédox de GSH está regulado diferencialmente de una manera específica del músculo.

En el presente estudio, las diversas alteraciones metabólicas observadas como consecuencia de la deficiencia de insulina provocada por la STZ, provocaron una sobreproducción de ERO en ambos músculos de las ratas diabéticas mostrándose aún más afectado el músculo sóleo (Figura 10A). Bajo condiciones patológicas como la DM, este incremento de ERO en el músculo esquelético se le ha atribuido al incremento de la actividad de la enzima NOX2, como principal generadora sobre otras fuentes. Interesantemente, a través de la inhibición por la apocinina los niveles de ERO se observaron reducidos en ambos

músculos (Figura 10A, B), lo cual es consistente a lo observado por nuestro grupo de trabajo recientemente (Sánchez-Bravo et al. 2021), en donde la administración de apocinina (3 mg/kg/día) logró reducir los niveles de ERO en el tejido cardíaco y ahora por primera vez demostrado en el musculo esquelético en este proyecto. Por otro lado, se demostró que bajo condiciones fisiológicas en reposo y ejercicio la NOX2 es la principal generadora de ERO siendo activada por la contracción muscular; las cuales toman un papel como moléculas de señalización necesarias para el buen funcionamiento (Henriquez-Holguin et al. 2019). Tomando en cuenta el paradójico papel de la NOX2, en el grupo DEA la combinación de ambos tratamientos mostró un efecto sinérgico al disminuir los niveles de ERO de manera significativa respecto al diabético (Figura 10A, B). Es preciso mencionar y basándose en las diferencias estructurales y metabólicas de las fibras que conforman los músculos, bajo las distintas combinaciones de tratamientos y aun bajo la condición diabética, el músculo sóleo mostró mayores niveles de ERO, lo que podría deberse a las características del tipo de fibras que lo conforman que presentan un metabolismo predominantemente aeróbico, lo que implica una mayor actividad mitocondrial y por lo tanto una mayor generación de ERO. Por lo tanto, estos resultados sugieren otras fuentes además de la NOX en este músculo sobre todo en la condición patológica, que sondas químicas como la DCF no permite medir.

En este estudio se analizaron los niveles de expresión de la NOX2 y NOX4 en los dos músculos, debido a que se ha reportado una posible expresión diferencial dependiente del tipo de fibra en el músculo esquelético de ratas sanas y ejercitadas según Osorio-Alves et al. (2020). Por otro lado, esta teoría también se ha apoyado por lo sugerido respecto a que las NOX están implicadas en el acoplamiento excitación-contracción del músculo esquelético por lo que podría existir un patrón característico de NOX para cada tipo de fibra; ya que la velocidad de contracción es distinta (Cameiro-Loureiro et al. 2016). Sin embargo, en nuestros resultados no hubo diferencias entre los niveles de expresión de NOX2 y

NOX4 en la condición control y ejercitada entre los músculos (Figura 12A, 12B), posiblemente está influyendo el tiempo del protocolo de ejercicio ya que en trabajos anteriores los protocolos de ejercicio solo fueron durante 3 semanas. Además, también se ha propuesto que la NOX2 tanto por su expresión y actividad regula a la NOX4 (Cameiro-Laureiro et al. 2016). En la condición diabética, como era de esperarse los niveles de expresión de NOX2 y NOX4 se observaron significativamente incrementadas respecto al control, siendo mayor la expresión de NOX2 en el sóleo (Figura 12) y de NOX4 en el EDL (Figura 12 B). De la NOX4 todavía no está muy bien definida cuál es su función biológica, pero se ha propuesto que debido a su localización subcelular, afecta a los receptores de rianodina (RyR) a través de mecanismos de nitrosilación. Los RyR poseen grupos tiol en sus residuos de cisteína (Cys) los cuales son susceptibles a las especies reactivas de oxígeno o nitrógeno (ERO / ERN). Se ha documentado que tanto los RyR1 como RyR2 presentan óxido nítrico (NO) unido a las cisteínas, lo que permite que se produzca una modificación postraducciona como lo es la S-nitrosilación, esta modificación postraducciona de la proteína conduce a cambios en el estado redox del RyR, aumentando el estado abierto o cerrado del canal, alterando de esta manera su función y como consecuencia el manejo de Ca y en combinación la producción acelerada de ERO por la NOX4, mecanismo ya estudiado en modelos animales de distrofia muscular de Duchene (Cully y Rondey, 2020). Por otro lado, los niveles de expresión de NOX4 se observaron notablemente disminuidas en los grupos DA y DEA en comparación al grupo diabético en el músculo EDL (Figura 12B) mayormente que en el sóleo y de manera significativa, lo que se correlaciona con lo observado en la mejora de la función muscular en estos mismos grupos en el EDL. En cuanto a la expresión de la NOX2 en estos dos grupos también se observó significativamente disminuida en el EDL, sin embargo, en el sóleo permaneció sin cambios respecto al diabético (Figura 12A). En estudios anteriores se ha observado que en modelos animales donde se elimina la expresión de la NOX4 o se inhibe, la NOX2 aumenta; al contrario de cuando se inhibe la NOX2, entonces la NOX4 aumenta. La regulación positiva de NOX4 podría ser un mecanismo compensatorio para regular el estado

rédox dentro del microdominio tríadico (Cully y Rondey, 2020). Este antecedente podría explicar lo que se observó en el grupo ejercitado apocinina (EA) en ambos músculos.

Como parte de analizar la participación de la NOX2 en las adaptaciones al ejercicio en el músculo esquelético de ratas diabéticas ejercitadas. En este estudio se analizó la implicación de esta enzima sobre la expresión de genes que participan en la respuesta antioxidante: Nrf2 y Nf- κ B y en el metabolismo como GLUT4 de forma comparativa entre los músculos EDL y sóleo. En las ratas diabéticas los niveles de expresión de Nrf2 se observaron notablemente disminuidos en ambos músculos como era de esperarse, evidenciado por la baja defensa antioxidante que presentó este grupo (Figura 13), bajo esta misma condición más el inhibidor de la NOX2 se incrementaron los niveles de expresión de manera más marcada en el músculo EDL. Las ERO generadas durante la realización de ejercicio inducen adaptaciones siguiendo el principio de “hormesis”, permitiendo activar distintas vías de señalización, las cuales a su vez confluyen en la activación de factores transcripcionales tales como los factores Nrf2 y NF- κ B. Tras la estimulación oxidativa, se modifican covalentemente los grupos tiol de Keap1 disociándose de Nrf2, permitiendo que éste transloque al núcleo uniéndose a los ARE (“Antioxidants Response Elements”) que aumentan la expresión de enzimas antioxidantes (Poblete-Aro et al. 2018). Lo que explica los altos niveles de expresión en ambos músculos en el grupo ejercitado así como la mejora en la defensa antioxidante. Un efecto similar a los grupos ejercitados, se observó en el grupo DE y DEA, siendo mayor en este último en ambos músculos (Figura 13).

En el caso de NF- κ B, éste puede traslocarse al núcleo, unirse al ADN e iniciar la transcripción asociadas a citocinas como IL-6 y enzimas como SOD, CAT y GPx de manera dependiente de la NOX2 en el ejercicio (Poblete-Aro et al. 2018). Sin embargo, bajo condiciones patológicas este factor se ha relacionado con atrofia muscular, participando en la liberación de citosinas como TNF- α , IL-6 e IL-8, LT- β y quimiocinas como CXCL8 (IL-8), CCL2 y CCL5 reguladas por la

activación de este factor, mediada por radicales libres (Merry y Ristow, 2016). Este antecedente es consistente con lo observado en el grupo diabético, de manera más marcada en el músculo sóleo, donde se incrementó notablemente la expresión quizá por las propiedades metabólicas y estructurales de las fibras predominantes en este músculo (tipo I). Tras la inhibición por la apocinina en la diabetes disminuyeron de manera significativa en este mismo músculo con respecto al diabético. Efecto que se observó en el grupo DE y de manera más significativa y aun mayor tras la inhibición de la NOX2 en las ratas diabéticas ejercitadas, siendo importante resaltar el efecto potencializado (Figura 14). En el músculo EDL no se observaron diferencias significativas en estos grupos, sólo un incremento significativo en el grupo ejercitado con respecto a los demás grupos. Finalmente, Henriquez-Olguin et al. (2019), demostraron que la NOX2 es una fuente importante de ERO miocelular, que regula la capacidad de transporte de glucosa durante el ejercicio de moderada intensidad estudiado en humanos y en modelos de pérdida de la función de la NOX2. En este trabajo se utilizaron ratones Rac1 mKO (ratones knockout de Rac1 muscular), debido a que previamente se vinculó la pequeña subunidad GTPasa, Rac1 del complejo NOX2 con la translocación de GLUT4 estimulada por la insulina a través de la remodelación del citoesqueleto de actina, por lo que se sugirió como un regulador del transporte de glucosa en el músculo esquelético, y además también se utilizaron ratones *ncf1** (ratones con mutación en *p47phox*); en donde mediante la oxidación de p47roGFP (un biosensor codificado genéticamente sensible a rédox) y DCFH tras la realización ejercicio de moderada intensidad, se observó una reducción de en la captación de glucosa y menor translocación de GLUT4, además de similitudes fenotípicas entre los músculos de los ratones Rac1 mKO y *ncf1**. Esta semejanza entre los dos modelos confirmo que Rac1 regula la translocación de GLUT4 y la captación de glucosa estimulada por el ejercicio vía dependiente de la NOX2. Este antecedente se relaciona con nuestros resultados observados en el músculo EDL en el grupo ejercitado (Figura15), donde se evidenció una elevada expresión del trasportador de manera significativa en comparación al control, y notablemente mayor que en el músculo sóleo. En relación a lo reportado por Henriquez-Olguin

et al.2019 En la condición diabética, como era de esperarse los niveles de expresión en ambos músculos se mostraron disminuidos correlacionándose con los altos niveles de glucemia en este grupo y consistente con lo observado por Souto et al. (2015) en un modelo de RI. Tras la inhibición de la NOX2 en la diabetes se observó un incremento en la expresión en ambos músculos, efecto que también se observó en el grupo DE. Sin embargo, en las ratas diabéticas ejercitas más la apocinina a pesar de que la expresión incremento en los músculos esta fue mayor en el músculo EDL. Estas diferencias en los niveles de expresión del GLUT 4 entre los músculos, podrían estar relacionadas a que las fibras de contracción rápida (tipo IIb) que se encuentran en el EDL presentan un metabolismo glucolítico a diferencia de la tipo I. Además, se demostró la importancia de la NOX2 a nivel transcripcional sobre el GLUT4 en condiciones control ya que la expresión en el grupo A y EA se observó considerablemente disminuida, incluso respecto al control (Figura 15).

Conclusiones

- 1) La inhibición de la NOX2 por la apocinina y el ejercicio mejoró la glucemia, y la sensibilidad a la insulina después de 8 semanas de tratamiento en ratas con diabetes experimental.
- 2) La inhibición de la NOX2 en combinación con el ejercicio contribuyó en mejorar la función muscular en el músculo rápido de manera más significativa que en músculo lento en ratas con diabetes.
- 3) La inhibición de la NOX2 en las ratas diabéticas ejercitadas incrementó el contenido total y el estado redox del glutatión en los músculos rápido y lento.
- 4) La inhibición de la NOX2 logró modular positivamente y de manera diferencial según el tipo de músculo la expresión de genes que participan en la respuesta antioxidante: Nrf2 y NF- κ B y en el metabolismo GLUT4, siendo mayor en el músculo rápido (EDL) de ratas diabéticas ejercitadas.

Perspectivas

- 1) Determinar la actividad de la NADPH oxidasa de forma comparativa entre las fibras rápidas y lentas del músculo esquelético de ratas diabéticas ejercitadas.

- 2) Evaluar el efecto de la inhibición de la NOX2 y el ejercicio sobre el perfil lipídico durante la diabetes.

- 3) Determinar la participación de la NOX2 sobre la expresión de genes que participan en mecanismos de atrofia muscular mediante el análisis RT-qPCR, en el músculo esquelético de ratas diabéticas ejercitadas.

Bibliografía

Alam U, Ashgar O, Azmi S, Malik RA. General aspects of diabetes mellitus (2014). Handbook of Clinical Neurology 126, 211-222. 10.1016/B978-0-444-53480-4.00015-1

Andersen, H., Gjerstad, M. D., and Jakobsen, J. (2004). Atrophy of foot muscles: a measure of diabetic neuropathy. Diabetes Care 27, 2382–2385. doi: 10.2337/10.2382

Baldelli S , Ciccarone F , Limongi D , et al . Glutación y óxido nítrico: elementos clave del equipo en el uso y desuso del músculo esquelético . Nutrientes 2019 ; 11 : 2318

Bravo-Sánchez E, Peña-Montes D, Sánchez-Duarte S, Saavedra-Molina A, Sánchez-Duarte E, Montoya-Pérez R. Effects of Apocynin on Heart Muscle Oxidative Stress of Rats with Experimental Diabetes: Implications for Mitochondria. Antioxidants (Basel). 2021 Feb 24;10(3):335. doi: 10.3390/antiox10030335.

Cully TR, Rodney GG. Nox4 - RyR1 - Nox2: Regulators of micro-domain signaling in skeletal muscle. Redox Biol. 2020 Sep;36:101557. doi: 10.1016/j.redox.2020.101557. Epub 2020 May 26. PMID: 32506037; PMCID: PMC7283154.

D'Souza, DM, Al-Sajee, D., y Hawke, TJ (2013). Miopatía diabética: impacto de la diabetes mellitus en las células progenitoras del músculo esquelético. Fronteras en fisiología , 4 , 379. doi: 10.3389 / fphys.2013.00379

Diabetes Care (2012). Estándares de atención médica en diabetes. (Suplemento 1): S11 - S63. American Diabetes Association. doi.org/10.2337/dc12-s011

Díaz-Vegas A, Campos C, Contreras-Ferrat A, Casas M, Buvinic S, Jaimovich E, et al. ROS Production via P2Y1-PKC-NOX2 Is Triggered by Extracellular ATP after Electrical Stimulation of Skeletal Muscle Cells. *Plos One* 2015; 10 (6): e0129882.

Fritzsche, K., Blüher, M., Schering, S., Buchwalow, I. B., Kern, M., Linke, A., et al. (2008). Metabolic profile and nitric oxide synthase expression of skeletal muscle fibers are altered in patients with Type 1 diabetes. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 116, 606–613. doi: 10.1055/s-2008-1073126

Gregory CM, Vandenborne K , Dudley GA . Enzimas metabólicas y expresión fenotípica entre los músculos locomotores humanos. *Muscle Nerve* 2001; 24: 387 - 393.

Gil-Ortega, I .; Kaski, JC Miocardiopatía diabética. *Medicina. Clin.* 2006, 127, 584–594.

Gimenes , R., Gimenes, C., Rosa C.M., Javier N.P.(2018) Influence of apocynine on cardiac remodeling in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* (2018) 17:15 doi.org/10.1186/s12933-017-0657-9

Gomez- Caberra 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

Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel JL, Hasenfuss G, et al. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 41:2164–71

Henríquez-Olguín C, Boronat S, Cabello-Verrugio C, Jaimovich E, Hidalgo E, Jensen TE. The Emerging Roles of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase 2 in Skeletal Muscle Redox Signaling and Metabolism. *Antioxid Redox Signal*. 2019 Dec 20; 31(18):1371-1410. doi: 10.1089/ars.2018.7678. Epub 2019.

Henríquez-Olguín C, Renani LB, Arab-Ceschia L, Raun SH, Bhatia A, Li Z, Knudsen JR, Holmdahl R, Jensen TE. Adaptations to high-intensity interval training in skeletal muscle require NADPH oxidase 2. *Redox Biol*. 2019 Jun; 24:101188. doi: 10.1016/j.redox.2019.101188. Epub 2019 Apr 3

Henríquez-Olguin C, Knudsen JR, Raun SH, Li Z, Dalbram E, Treebak JT, Sylow L, Holmdahl R, Richter EA, Jaimovich E, Jensen TE. Cytosolic ROS production by NADPH oxidase 2 regulates muscle glucose uptake during exercise. *Nat Commun*. 2019 Oct 11; 10(1):4623. doi: 10.1038/s41467-019-12523-9.

Jackson MJ, Vasilaki A, McArdle A. Cellular mechanisms underlying oxidative stress in human exercise. *Free Radic Biol Med* 2016; 98: 13-7.

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

Kalra, S., Sahay, R. Diabetes Fatigue Syndrome. *Diabetes Ther* 9, 1421–1429 (2018). <https://doi.org/10.1007/s13300-018-0453-x>

Kottaisamy CPD, Raj DS, Prasanth Kumar V, Sankaran U. Experimental animal models for diabetes and its related complications-a review. *Lab Anim Res*. 2021 Aug 24; 37(1):23. doi: 10.1186/s42826-021-00101-4. PMID: 34429169; PMCID: PMC8385906.

Krause MP, Moradi J, Nissar AA, et al. Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 restores skeletal muscle regeneration in untreated type 1 diabetic mice. *Diabetes* 2011; 60: 1964– 1972.

Laddha AP, Kulkarni YA. NADPH oxidase: A membrane-bound enzyme and its inhibitors in diabetic complications. *Eur J Pharmacol*. 2020 Aug 15; 881:173206. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173206. Epub 2020 May 19. PMID: 32442539.

Lamb GD, Westerblad H . Efectos agudos de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno sobre la función contráctil del músculo esquelético. *J Physiol* 2011; 589: 2119 - 2127 .

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

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) method. *Methods* 2001; 25: 402– 408.

Mañon W, Garrido G, Núñez A. Biomarcadores del estrés oxidativo en la terapia antioxidante. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research* 2016; 4 (2): 6283.

Meng, R ; Zhu, DL; Bi, Y .; Yang, DH; Wang, YP Apocynin mejora la resistencia a la insulina al suprimir la inflamación en ratones obesos inducidos por una dieta alta en grasas. *Mediat. Inflamm.* 2010, 2010, 858735.

Nonaka K, Une S, Tatsuta N, et al. Changes in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in extensor digitorum longus muscles of streptozotocin-diabetic rats may contribute to muscle atrophy. *Acta Physiol Hung* 2014; 101: 421– 428.

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

Padron de Figueiredo A, Salmon A, Bruno F, Jiménez F, Martínez H, Halade G, et al. Nox2 Mediates Skeletal Muscle Insulin Resistance Induced by a High Fat Diet. *The Journal of Biological Chemistry* 2015; 290: 1342739. 19.

Perry CG, Lally J , Holloway GP , Heigenhauser GJ , Bonen A y Spriet LL . Las explosiones repetidas y transitorias de ARNm preceden a los aumentos en las proteínas transcripcionales y mitocondriales durante el entrenamiento en el músculo esquelético humano. *J Physiol* 588: 4795–4810, 2010. Crossref , Medline, Google Académico

Petersmann A, Nauck M, Müller-Wieland D, Kerner W, Müller UA, Landgraf R, Freckmann G, Heinemann L. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2018 Jul; 126(7):406-410. doi: 10.1055/a-0584-6223. Epub 2018 Jul 5. PMID: 29975979.

Poblete-Aro, Carlos, Russell-Guzmán, Javier, Parra, Pablo, Soto-Muñoz, Marcelo, Villegas-González, Bastián, Cofré-Bola-Dos, Cristián, & Herrera-Valenzuela, Tomás. (2018). Efecto del ejercicio físico sobre marcadores de estrés oxidativo en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Revista médica de Chile*, 146(3), 362-372. doi.org/10.4067/s0034-98872018000300362

Pouvreau C, Dayre A, Butkowski EG , et al . Marcadores de inflamación y estrés oxidativo en diabetes e hipertensión. *J Inflamm Res* 2018; 11: 61 - 68.

Sánchez-Duarte S, Márquez-Gamiño S, Montoya-Pérez R, Villicaña-Gómez EA, Vera-Delgado KS, Caudillo-Cisneros C, Sotelo-Barroso F, Melchor-Moreno MT, Sánchez-Duarte E. Nicorandil decreases oxidative stress in slow- and fast-twitch muscle fibers of diabetic rats by improving the glutathione system functioning. *J Diabetes Investig*. 2021 Jul; 12(7):1152-1161. doi: 10.1111/jdi.13513.

Sánchez-Gómez FJ, Espinosa-Díez C, Dubey M, et al. S-glutationilación: relevancia en diabetes y papel potencial como biomarcador. *Biol Chem* 2013; 394: 1263 - 1280.

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

Pouvreau, C., Dayre, A., Butkowski, E. G., de Jong, B., & Jelinek, H. F. (2018). Inflammation and oxidative stress markers in diabetes and hypertension. *Journal of inflammation research*, 11, 61–68. doi:10.2147/JIR.S148911

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

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

Rodrigo R, Brito R, González-Montero J, Benedetti V. Antioxidants in human disease: Potential therapeutic opportunities. *Clin Pharmacol Transl Med* 2017; 1 (2): 44-53.

Röckl K. S, Witczak C. A y Goodyear L. J (2008) Diabetes, mitocondrias y ejercicio. *Rev Esp Cardiol Supl.* 8:27C-34C

Saeedi, A .; Petersohn, I .; Salpea, P .; Malanda, B .; Kururanga, S .; Unwin, N .; Colagiuri, S .; Guarguata, L .; Motala, AA; Ogurtsova, K .; et al. Estimaciones de la prevalencia de diabetes a nivel mundial y regional para 2019 y proyecciones para 2030 y 2045: Resultados del Atlas de Diabetes de la Federación Internacional de Diabetes, 9a edición. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2019, 157 , 1–10.

Schiaffino S. Muscle fiber type diversity revealed by anti-myosin heavy chain antibodies. *FEBS J.* 2018 Oct; 285(20):3688-3694. doi: 10.1111/febs.14502. Epub 2018 May 24. PMID: 29761627.

Souto Padron de Figueiredo A, Salmon AB, Bruno F, Jimenez F, Martinez HG, Halade GV, Ahuja SS, Clark RA, DeFronzo RA, Abboud HE, El Jamali A. Nox2 mediates skeletal muscle insulin resistance induced by a high fat diet. *J Biol Chem*. 2015 May 22; 290(21):13427-39. doi: 10.1074/jbc.M114.626077. Epub 2015 Mar 30.

Stabley JN, Prisby RD, Behnke BJ, Delp MD.(2015) Type 2 diabetes alters bone and marrow blood flow and vascular control mechanisms in the ZDF rat.*J Endocrinol.* ; 225(1):47-58. doi: 10.1530/JOE-14-0514

Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. Baishideng Publishing Group Inc 2015; 6 (3): 456-80. 20

Thomas D, Elliott E, Naughton G a. Exercise for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 3 (1): CD002968

Umpierre D, Ribeiro P, Kramer C, Leitao C, Zucatti A, Azevedo M, et al. Physical activity advice only or structured exercise training and association with HbA1c levels in type 2 diabetes: a systematic review and meta- analysis. *J Am Med Assoc* 2011; 305 (17): 1790-9.

Van den Worm E, Beukelman CJ, Van den Berg AJ, Kroes BH, Labadie RP, Van Dijk H. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. *Eur J Pharmacol*. 2001; 433:225–30.

Winiarska, K .; Grabowski, M .; Rogacki, MK La inhibición de la gluconeogénesis renal contribuye a la acción hipoglucémica del inhibidor de NADPH oxidasa, apocinina. Chem. Biol. Interactuar. 2011