

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO



MANUSCRITO FINAL DE TESIS  
PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS  
MENCIÓN NUTRICIÓN

***“EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ZINC Y ENTRENAMIENTO DE FUERZA  
SOBRE LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE  
RATAS DIABÉTICAS”***

**Fecha aprobación proyecto de Tesis:** 18 de Octubre 2021

**Fecha presentación manuscrito:** 08 de Agosto 2022

**Estudiante:**

Gabriel Prado Peñaloza

Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.

**Directores de Tesis:**

Prof. Dr. Álvaro Pérez Bazán

Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.

Prof. Dr. Manuel Ruz Ortiz

Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.

## Dedicatoria

*A mis padres, abuelos y novia; también a mis peluditos.*

*Por su apoyo, amor y confianza, gracias.*

## **Agradecimientos**

*Álvaro Pérez*

*Manuel Ruz*

*Greys Lagos*

*Karla Vásquez*

*Diego García*

*Juana Codoceo*

*Eduarda Aguilera*

*Laura Jara*

*Soledad Reyes*

*Fabian Vidal*

*Matías Rivera*

*Departamento de Nutrición, U. de Chile*

## Índice

Resumen .....	3
Abreviaturas .....	4
Introducción.....	5
Músculo esquelético y su rol en la mantención de la glicemia .....	5
Rol del estrés oxidativo en la disfunción muscular asociada con la DM2.....	6
Tratamiento de la diabetes enfocado en estrés oxidativo.....	10
Zinc, diabetes y estrés oxidativo.....	11
Ejercicio físico, diabetes y estrés oxidativo .....	12
Hipótesis.....	14
Objetivo General .....	14
Objetivos Específicos .....	14
Cumplimiento de Objetivos.....	14
Métodos.....	16
Establecimiento de modelo murino de DM2 .....	16
Suplementación con zinc y entrenamiento de fuerza .....	17
Validación del modelo de intervención .....	19
Medición de la expresión génica .....	19
Medición de la actividad enzimática .....	21
Análisis estadísticos .....	22
Resultados .....	24
Entrenamiento de fuerza .....	27
Efecto de la suplementación con zinc y entrenamiento de fuerza en la respuesta antioxidante: Expresión génica de <i>Nrf2</i> , <i>Cat</i> y <i>Sod1</i> .....	28
Efecto de la suplementación con zinc y entrenamiento de fuerza en la respuesta antioxidante: Niveles de GSH/GSSG .....	30
Efecto de la suplementación con zinc y entrenamiento de fuerza en la respuesta antioxidante: Actividad de Catalasa .....	32
Discusión.....	34
Conclusión.....	45
Anexos .....	53
Anexo 1. Programa de entrenamiento de fortalecimiento muscular .....	53
Anexo 2. Certificado Aprobación Comité de Bioética Facultad de Medicina Universidad de Chile .....	54
Anexo 3. Análisis de normalidad prueba de Shapiro-Wilk.....	55
Anexo 4. Correlaciones (tabla y gráficos).....	56

## Resumen

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad de alta prevalencia a nivel mundial, caracterizada por déficit y resistencia a la insulina e hiperglicemia. El estrés oxidativo (EO) ocupa un lugar central en su progresión y el desarrollo de alteraciones secundarias, entre las cuales se encuentra la disfunción músculo esquelética, la cual se manifiesta con debilidad e intolerancia al ejercicio, asociados a un menor contenido y función mitocondrial. Algunas estrategias enfocadas a controlar el EO asociado a la DM2 han mostrado mejorar la expresión y actividad de enzimas antioxidantes, efectos que podrían estar mediados por el factor nuclear eritroide 2 relacionado al factor 2 (NRF2), factor de transcripción que regula la expresión de distintos antioxidantes celulares. Entre estas, el zinc podría estimular la activación de la proteína quinasa B (AKT) impidiendo la activación de la proteína Fyn y sus efectos inhibitorios sobre NRF2, mientras que el ejercicio de resistencia, además de activar AKT, podría estimular la formación de complejos de actina con NRF2, y la activación de sus efectos. Como objetivo de esta investigación se evaluó el efecto combinado y por separado de la suplementación con zinc y entrenamiento de fuerza en la expresión génica de *Nrf2*, catalasa (*Cat*) y superóxido dismutasa (*Sod*) y la respuesta antioxidante en el músculo gastrocnemio de ratas con DM2. Para esto se utilizaron muestras de músculo gastrocnemio previamente recolectadas de 30 ratas Wistar con DM2 inducida por dieta alta en grasas (HFD) y estreptozotocina, distribuidas en cuatro grupos experimentales: HFD, HFD + zinc (Zn), HFD + entrenamiento (Ex), HFD + zinc + entrenamiento (ZnEx) y tratadas durante 12 semanas. En el músculo gastrocnemio se midió la expresión génica de *Nrf2*, *Cat* y *Sod*, actividad enzimática de Catalasa y niveles de glutatión reducido (GSH), oxidado (GSSG) y su relación (GSH/GSSG). La intervención combinada o aislada no produjo efectos significativamente positivos sobre los parámetros antioxidantes estudiados, aunque el grupo ZnEx presentó un leve aumento sobre la expresión de *Nrf2* y *Cat* en comparación al tratamiento por separado, y el grupo Ex y ZnEx exhibieron una leve mejor relación GSH/GSSG que el grupo HFD. También se observó una correlación positiva entre los niveles de expresión de *Nrf2* y *Cat*. Sin embargo, el resto de los indicadores, especialmente en el grupo Zn, mostraron una disminución en sus niveles producto de la intervención. Además, se observó un aparente antagonismo entre los efectos de la suplementación con zinc y ejercicio de fuerza isométrica. Es posible que las características de la suplementación y la intensidad del entrenamiento hayan determinado la falta de resultados positivos producto de la intervención. Se requiere continuar investigando, poniendo a prueba diferentes dosis de suplementación y protocolos de entrenamiento.

## Abreviaturas

**AKT:** *Proteína quinasa B*

**ARE:** *Elementos de respuesta antioxidante*

**CAT:** *Catalasa*

**Cu:** *Cobre*

**Cys:** *Cisteína*

**EO:** *Estrés oxidativo*

**GCL:**  *$\gamma$ -Glutamyl-cisteina ligasa*

**GGT:**  *$\gamma$ -Glutamyl-transferasa*

**Glu:** *Glutamato*

**Gly:** *Glicina*

**GPx:** *Glutación peroxidasa*

**GS:** *Glutamato sintetasa*

**GSH:** *Glutación reducido*

**GSHt:** *Glutación total*

**GSSG:** *Glutación disulfuro*

**HbA1C:** *Hemoglobina glicosilada*

**HFD:** *Dieta alta en grasas*

**HO-1:** *Hemo-oxigenasa 1*

**IGF-1:** *Factor de crecimiento similar a insulina*

**INSR:** *Receptor de insulina*

**IPGTT:** *Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal*

**IR:** *Resistencia a la insulina*

**IRS:** *Sustrato del receptor de insulina*

**KEAP1:** *Proteína 1 tipo kelch asociada a ECH*

**KPE:** *Buffer de fosfato de potasio con sal disódica EDTA*

**MHT:** *Tiempo máximo de agarre*

**MT:** *Metalotioneínas*

**NQO1:** *NADPH quinona reductasa 1*

**NRF2:** *Factor nuclear eritroide 2 relacionado al factor 2*

**PB:** *Buffer de fosfato*

**PI3K:** *Fosfoinositol-3-quinasa*

**RNS:** *Especies reactivas de nitrógeno*

**ROS:** *Especies reactivas de oxígeno*

**RT-qPCR:** *PCR en tiempo real con cuantificación relativa*

**SOD:** *Superóxido dismutasa*

**STZ:** *Estreptozotocina*

## Introducción

La diabetes corresponde a un grupo de desórdenes metabólicos caracterizados por la presencia de hiperglicemia crónica. La forma más común corresponde a la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), de etiología multifactorial, que representa alrededor del 90-95% de los casos (American Diabetes Association, 2022) y se caracteriza por una disminución en la sensibilidad al efecto de la insulina y una reducción en la masa funcional de células  $\beta$ -pancreáticas que lleva al desarrollo de distintos estadios de deficiencia relativa de esta hormona y a la presencia de hiperglicemia (American Diabetes Association, 2015; Christensen & Gannon, 2019). Según la última encuesta nacional de salud, se estima que la prevalencia nacional de diabetes alcanzó un total de 1,7 millones de caso en mayores de 15 años (Ministerio de Salud, 2018), es decir un 12,3% de la población de este grupo etario, mientras que a nivel mundial se estima un total de 415 millones de casos de DM2 entre adultos de 20 a 79 años en 2015, y se proyecta aumentará a 642 millones de casos para el año 2040 (Ogurtsova et al., 2017). Esto se combina con las numerosas complicaciones relacionadas a esta enfermedad, responsables de un significativo aumento en la morbilidad y mortalidad de estos pacientes (Deshpande et al., 2008). Las complicaciones de la diabetes se dividen principalmente en microvasculares como neuropatía, nefropatía y retinopatía, y complicaciones macrovasculares como enfermedad cardiovascular, accidentes cerebrovasculares y enfermedad arterial periférica (Papatheodorou et al., 2018) que contribuyen al 20% a 49% del costo directo total del tratamiento de la DM2 (Einarson et al., 2018).

### **Músculo esquelético y su rol en la mantención de la glicemia**

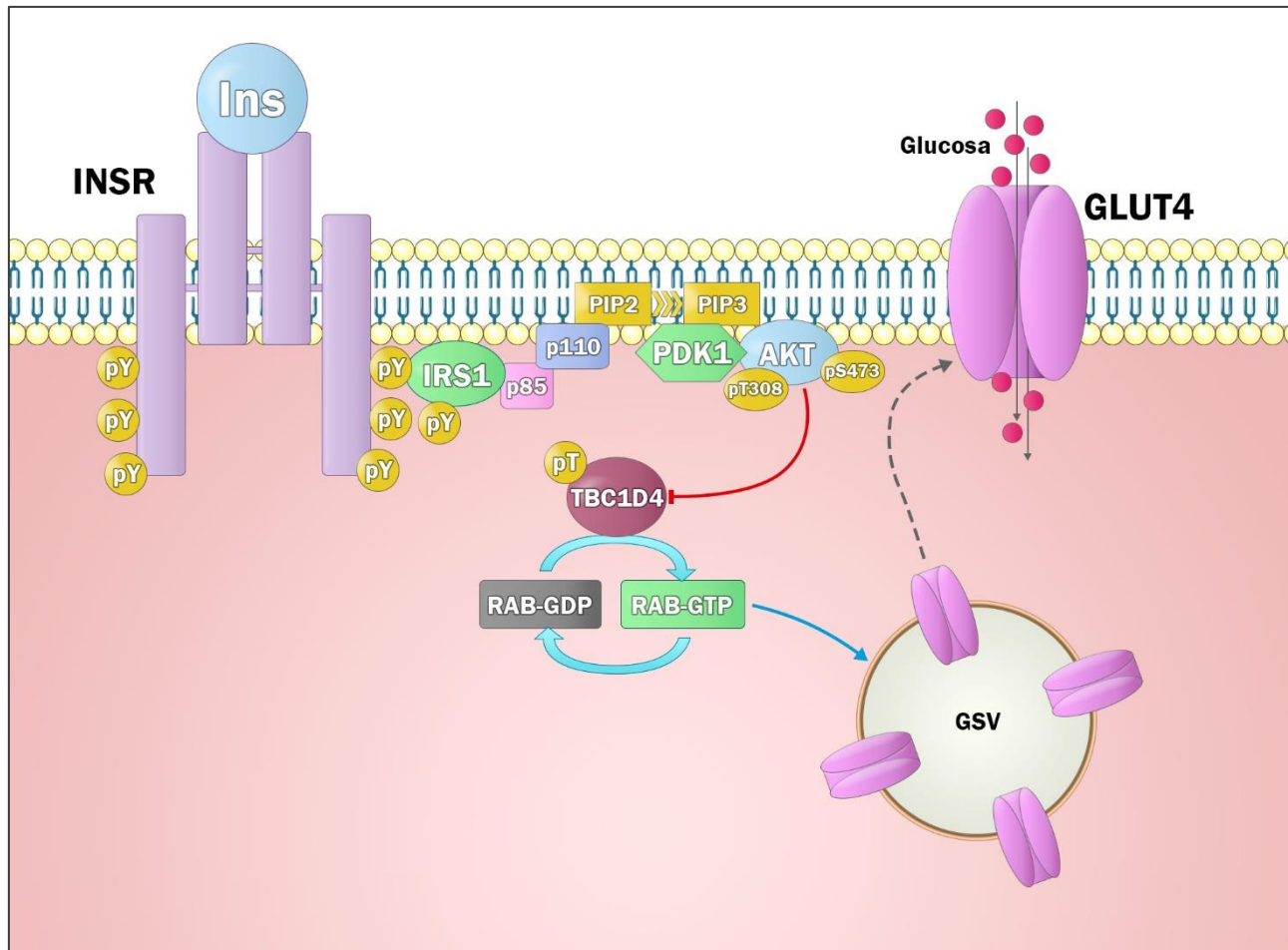
El músculo esquelético (ME) es el tejido más grande en el cuerpo humano y utiliza entre el 70-80% de una carga de glucosa ingerida, haciéndolo uno de los principales destinos para este componente. La insulina y la contracción muscular son los principales estímulos para la captación de glucosa en este tejido, realizada principalmente a través del transportador de glucosa tipo 4 (Por sus siglas en ingles GLUT4) (Deshmukh, 2016). La insulina ejerce todos sus efectos fisiológicos conocidos a través de la unión a su receptor de tipo tirosina quinasa (INSR) presente en la membrana plasmática (Haeusler et al., 2018), permitiendo su trans-autofosforilación en residuos específicos de tirosina (Wei et al., 1995) y la fosforilación y activación de distintas proteínas río abajo como el sustrato del receptor de

insulina (Por sus siglas en inglés IRS) (Hubbard, 2013), fosfoinositol-3-quinasa (PI3K) (Hodakoski et al., 2014) y la proteína quinasa B (AKT), clave en la ramificación de la señalización de insulina (Latva-Rasku et al., 2018) y liberación de vesículas almacenadoras de GLUT4 para permitir el ingreso de glucosa al músculo (Klip et al., 2014) (**Figura 1**). Perturbaciones en esta vía de señalización a nivel muscular generan resistencia a los efectos de la insulina y anomalías en el control glicémico, y se ha definido que el estrés oxidativo (EO) cumpliría un rol clave en el desarrollo de estas alteraciones (Di Meo et al., 2017).

### **Rol del estrés oxidativo en la disfunción muscular asociada con la DM2**

El EO corresponde al desbalance entre la producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (por sus siglas en inglés ROS y RNS) a nivel celular y tisular y la capacidad de los sistemas biológicos para detoxificar estos productos reactivos (Pizzino et al., 2017). Distintos procesos ocurridos en la mitocondria y otros sitios celulares generan la reducción parcial del oxígeno y la formación de radicales libres y ROS. Entre estas últimas se incluye al radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), especie de mayor reactividad, que puede ser generada a través de la reacción de Fenton entre el  $H_2O_2$  e iones de hierro o cobre (Di Meo et al., 2017). Si bien a niveles fisiológicos las ROS resultan esenciales para la modulación de la actividad de distintas vías celulares (Newsholme et al., 2014), una elevada oxidación de glucosa y/o ácidos grasos sin la suficiente capacidad antioxidante promueve la disfunción mitocondrial y la generación de EO, central en la progresión de la DM2 debido a su rol en el desarrollo de alteraciones celulares en tejidos como islotes pancreáticos, músculo, tejido adiposo e hígado (Tiwari et al., 2013). Por lo tanto, debido a la importancia de mantener la homeostasis redox, los miocitos poseen sistemas de defensa antioxidante que permiten reducir el riesgo de daño oxidativo producto del aumento en la producción de ROS. Las fibras musculares poseen sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Entre los primeros destacan las enzimas superóxido dismutasa (SOD), encargada de la dismutación de  $O_2^{\cdot-}$  para formar  $H_2O_2$  y  $O_2$  (Culotta et al., 2006); glutatión peroxidasa (GPx), que utiliza glutatión reducido (GSH) como donante de electrones para catalizar la reducción de  $H_2O_2$  o hidroperóxido orgánico (ROOH) a  $H_2O$  y alcohol (ROH) respectivamente (Drevet, 2006); y catalasa (CAT), que cataliza la hidrólisis de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  y  $O_2$  (Kirkman & Gaetani, 2007).





**Figura 1.** Vía de señalización de insulina en el músculo esquelético

El principal mecanismo de acción para las funciones metabólicas de la insulina corresponde a la vía PI3K/Akt. La insulina interactúa con su receptor en el músculo esquelético generando su autofosforilación en residuos de Tirosina y la activación y fosforilación de IRS1. Esto permite a IRS1 a interactuar con proteínas que poseen dominios SH2 como PI3K, con la cual interactúa a través de la subunidad reguladora de PI3K (p85). De esta forma la subunidad catalítica (p110) accede a su sustrato PIP2 en la membrana plasmática, el cual es fosforilado para formar PIP3. Este último sirve como sitio de unión de quinasas de Serina como PDK1 y AKT, el cual es fosforilado en Thr308 por PDK1 y Ser473 por mTORC2 (no incluido en la figura), activándose y fosforilando diversos sustratos río abajo en distintas vías funcionales. AKT fosforila TBC1D4 impidiendo su acción inhibitoria sobre las GTPasas RAB que controlan el tráfico de vesículas, permitiendo la traslocación de las vesículas almacenadoras de GLUT4 y el ingreso de glucosa al miocito. Ins, *Insulina*; INSR, *Receptor de insulina*; IRS, *Sustrato del receptor de insulina 1*; PIP2, *Fosfatidilinositol-4,5 difosfato*; PIP3, *Fosfatidilinositol-3, 4, 5-trisfosfato*; PDK1, *Proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1*; AKT, *Proteína quinasa B*; GSV, *Vesículas almacenadoras de GLUT4*; GLUT4, *Transportador de glucosa 4*. **Fuente:** Elaboración propia.

Por su parte SOD además posee tres isoformas en los mamíferos, de las cuales dos se ubican dentro de la célula. SOD1 utiliza cobre y zinc como cofactor y es la principal isoforma intracelular, se localiza mayormente en el citosol y en menor proporción en el espacio intermembrana mitocondrial. Por su parte, SOD2 se ubica exclusivamente en la matriz

mitocondrial y utiliza manganeso para la reducción del  $O_2^{\cdot-}$  producido en la cadena respiratoria, siendo relevante para mantener la función de este organelo (Fukai & Ushio-Fukai, 2011). Por otro lado, SOD3 se ubica en el espacio extracelular y utiliza cobre y zinc como cofactor (Culotta et al., 2006). En cuanto a los sistemas antioxidantes no enzimáticos a nivel muscular uno de los más importantes corresponde al GSH. Su síntesis se debe a la acción de la  $\gamma$ -glutamil-cisteína ligasa (GCL) que a partir de glutamato (Glu) y cisteína (Cys) sintetiza  $\gamma$ -glutamil-cisteína, la cual en combinación con glicina (Gly) permite la formación de GSH por acción de la enzima glutamato sintetasa (GS). El GSH formado puede ser degradado hasta formar glu, cys y gly respectivamente, los cuales pueden volver a utilizarse para su síntesis (Bachhawat & Yadav, 2018). El GSH puede reaccionar directamente con numerosos radicales donando un átomo de hidrógeno (Yu, 1994). También, como ya se mencionó es utilizado como sustrato por la enzima GPx y oxidado a glutatión disulfuro (GSSG) para eliminar  $H_2O_2$  y ROOH (Meister & Anderson, 1983). Además, participa en la reducción de otros antioxidantes como la vitamina E (radicales formados en la reacción con lipoperóxidos y radicales alcoxilo) y vitamina C (desde radical semidehidroascorbato producido en el reciclaje de vitamina E) (L & Jh, 2000). Por otro lado, tanto el GSH como el GSSG pueden ser expulsados del citosol por transportadores específicos durante el estrés oxidativo contribuyendo a la regulación del potencial redox celular (Cole & Deeley, 2006; Morgan et al., 2013) y posteriormente ser degradados por acción de la  $\gamma$ -glutamil-transferasa (GGT) y peptidasas de membrana a glu, cys y gly, que pueden ser regresados al interior de la célula por transportadores específicos.

Sumado al GSH, otros antioxidantes no enzimáticos corresponden al ácido  $\alpha$ -lipoico, ácido úrico, bilirrubina y ubiquinona (Powers & Jackson, 2008). Por último, estos se combinan con la acción de antioxidantes dietarios como la vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles) y carotenoides, relevantes en la protección antioxidante de membranas biológicas (El-Agamey et al., 2004; Miyazawa et al., 2019), y vitamina C (ácido ascórbico), la cual puede eliminar radicales superóxido, hidroxilo e hidroperóxidos lipídicos, además de participar en el reciclaje de vitamina E (Padayatty et al., 2003).

Cuando los sistemas de defensa antioxidantes se ven superados por la generación de ROS, se da paso a la generación de daño oxidativo y el desarrollo de alteraciones relevantes para la génesis de enfermedades de carácter metabólico. Entre estas alteraciones, una de la

más relevantes corresponde a la resistencia a la insulina (IR) en el ME, la cual se debe a defectos en los niveles más próximos de la vía de señalización de insulina, tanto en la actividad y fosforilación del INSR, como de IRS1, PI3K y AKT (Kolterman et al., 1981). Debido a que la actividad de muchas proteínas quinasas y fosfatasa es regulada por el estado redox de los tioles de cisteína, se ha propuesto que un ambiente celular más oxidado favorecería los eventos de fosforilación de serinas/treoninas que caracterizan la retroalimentación negativa de la señalización de insulina (Fisher-Wellman & Neuffer, 2012).

Otra importante consecuencia de la DM2 corresponde a la pérdida de la masa muscular (Pupim, Heimbürger, et al., 2005; Workeneh & Bajaj, 2013), la cual sería hasta dos veces más rápida en individuos diabéticos en comparación con sujetos sanos (Park et al., 2007). A su vez, en pacientes sometidos a diálisis crónica, la presencia de DM2 fue el predictor independiente más importante de pérdida muscular (Pupim, Flakoll, et al., 2005; Pupim, Heimbürger, et al., 2005). Por otra parte, la DM2 también induce cambios en el tipo de fibra muscular de oxidativa a glicolítica (Oberbach et al., 2006) y alteraciones en el metabolismo muscular esquelético (Hebert & Nair, 2010; Kelley et al., 2002). Todas estas alteraciones resultan en disfunción muscular esquelética, que se manifiesta con debilidad muscular e intolerancia al ejercicio (Kamei et al., 2004; Poitras et al., 2018; Regensteiner et al., 1995).

Dentro de las principales causas de las alteraciones en el ME asociadas con la DM2 están la disfunción mitocondrial y el EO. Se ha reportado que el ME de pacientes diabéticos exhibe un contenido mitocondrial reducido (Boushel et al., 2007; Goodpaster et al., 2000; Kelley et al., 1999). Sujetos con IR han mostrado una capacidad oxidativa mitocondrial significativamente menor en el ME en comparación a individuos sanos (Petersen et al., 2003), mientras que el cultivo de miocitos de pacientes diabéticos ha permitido observar alteración en la función mitocondrial (Gaster et al., 2004). Las mitocondrias son los principales organelos relacionados a la producción de ROS, que en exceso pueden dañar el DNA nuclear y mitocondrial (Song et al., 2007), y la relación entre la disfunción mitocondrial, EO y diabetes ya ha sido bien establecida. Bonnard et al. observó que la elevación en los niveles de EO en el músculo gastrocnemio de ratones diabéticos se asoció con el desarrollo de disfunción mitocondrial, incluyendo disminución en la cantidad de DNA mitocondrial, aumento en el número de crestas mitocondriales y reducción en la actividad

de la enzima citrato sintasa (Bonnard et al., 2008). Dos Santos et al. encontró reducción en la transcripción del citocromo b en el ME de ratas diabéticas, lo cual se asoció al aumento de ROS en el músculo sóleo, alterando además los mecanismos de reparación mitocondrial y la homeostasis del organelo (dos Santos et al., 2018; Vartanian et al., 2017). El DNA mitocondrial oxidado podría no transcribir suficiente citocromo b, deteriorando la función del complejo III de la cadena transportadora de electrones y llevando al aumento de ROS y la generación de daño oxidativo a nivel muscular (dos Santos et al., 2018). Por otro lado, Anderson et al. observó que la reducción en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial a través del uso de antioxidantes específicos para la mitocondria o modificación de la expresión de CAT en el ME de ratones permitió conservar completamente la sensibilidad a la insulina pese a una dieta alta en grasas (abreviado en inglés como HFD) (Anderson et al., 2009). Estos hallazgos sugieren que la DM2 promueve la reducción en el contenido y función mitocondrial y el aumento en la producción mitocondrial de ROS en el ME, generando un círculo vicioso que contribuiría a la progresión de esta enfermedad y al daño oxidativo y disfunción del ME.

### **Tratamiento de la diabetes enfocado en estrés oxidativo**

Los pilares del tratamiento de la DM2 consideran cambios en los estilos de vida, incluyendo modificaciones alimentarias y ejercicio físico, en combinación con el uso de medicamentos hipoglicemiantes orales enfocados en mejorar la secreción de insulina y la sensibilidad a su acción, además del uso de insulina exógena en etapas avanzadas de la enfermedad (Tan et al., 2019). Debido a su rol clave en el desarrollo de DM2, distintas estrategias terapéuticas enfocadas en controlar el EO han sido puestas a prueba recientemente. Algunos estudios de suplementación con minerales como cromo y zinc han observado efectos positivos sobre el control glicémico, el metabolismo de insulina, el riesgo de DM2 e incluso la expresión y actividad de enzimas antioxidantes (Fernández-Cao et al., 2019; Khodavirdipour et al., 2020; Nazem et al., 2019; San Mauro Martín et al., 2016; X. Wang et al., 2019), efectos que se ha propuesto podrían estar mediados por el factor nuclear eritroide 2 relacionado al factor 2 (NRF2) (S. R. Lee, 2018; Marreiro et al., 2017).

NRF2 es un factor de transcripción maestro que regula a los elementos de respuesta antioxidante (abreviado en inglés como ARE) y promueve la expresión de antioxidantes como hemo-oxigenasa 1 (HO-1), NADPH quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), CAT, SOD,

GCL y GS. La proteína 1 tipo kelch asociada a ECH (por sus siglas en inglés KEAP1) inhibe la actividad transcripcional de NRF2 al inducir su ubiquitinación y posterior degradación proteosomal en condiciones de homeostasis. Bajo condiciones de estrés, los residuos de cisteína del sensor de KEAP1 son modificados, suprimiendo la ubiquitinación de NRF2 (Cuadrado et al., 2019; McMahon et al., 2010; K. Wang et al., 2013). Una vez libre, NRF2 se une a los ARE e induce transcripción de sus genes diana, mejorando la respuesta antioxidante y protegiendo a la célula frente al daño oxidativo. Además, debido a la presencia de secuencias similares a ARE en la región promotora del gen *Nrf2*, este puede activar su propia expresión génica (Mi-Kyoung et al., 2002). Por otro lado, NRF2 puede estimular la producción del gen *Keap1* estimulando su propia degradación, y limitando una señalización descontrolada (O.-H. Lee et al., 2007). Sumado a lo anterior, la sobreexpresión de NRF2 en ratones diabéticos ha mostrado mejorar la resistencia a la insulina y prevenir el desarrollo de DM2. De esta forma, se propone que la vía NRF2/KEAP1/ARE posee un potencial terapéutico frente a los efectos de la DM2 inducidos por EO (Urano et al., 2013).

### **Zinc, diabetes y estrés oxidativo**

El zinc es un micronutriente esencial, que forma parte de alrededor de 300 metaloenzimas necesarias en el metabolismo de macronutrientes, inmunidad y respuesta antioxidante, entre otras numerosas funciones (Jarosz et al., 2017; Livingstone, 2013; Vallee & Falchuk, 1993). Participa en la regulación de la transcripción genética, señalización celular, secreción de hormonas y apoptosis (Truong-Tran et al., 2000). Posee actividad mimética de insulina y participa en la vía de señalización, almacenamiento y secreción de esta hormona (Myers, 2015). El zinc contribuye al control del EO formando parte de la enzima cobre-zinc SOD, la cual elimina ROS al catalizar la dismutación de  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$  y  $O_2$  (Mariani et al., 2008). Además, se ha reportado que los efectos antioxidantes del zinc estarían también mediados por la regulación positiva de NRF2, considerado regulador maestro de la respuesta antioxidante (S. R. Lee, 2018; Marreiro et al., 2017), contribuyendo a disminuir el daño oxidativo inducido por DM2 en distintos órganos (Li et al., 2014). El zinc estimularía la expresión y transcripción de NRF2 a través de la activación de AKT, que a su vez inhibe la activación de FYN, proteína que favorece la exportación de NRF2 desde el núcleo al citosol para su degradación (Li et al., 2014). El zinc induciría la activación de AKT de forma

directa a través de la vía de señalización de insulina, además de impedir su desfosforilación al inhibir la acción de Ser/Thr fosfatasa como la Proteína Fosfatasa 2 (S. Lee et al., 2009).

### **Ejercicio físico, diabetes y estrés oxidativo**

El ejercicio tiene una poderosa acción sobre el metabolismo y puede modificar la función muscular y fenotipo de las fibras. El ejercicio de resistencia aeróbica regular se asocia al aumento en la expresión de cadenas de miosina lentas y a un cambio del fenotipo de las fibras hacia el tipo 1, caracterizadas por tener una mayor capacidad oxidativa y resistencia a la fatiga (Baldwin & Haddad, 2001; Grgic et al., 2018), además de mejorar la capilaridad muscular, aumentar el número y tamaño de las mitocondrias (Prior et al., 2004). Esta modalidad se asocia a un aumento en el consumo de O<sub>2</sub> y demanda energética, estimulando la producción de ATP, y consecuentemente la generación mitocondrial de ROS (Vargas-Mendoza et al., 2019). Por su parte, el ejercicio de fuerza produce aumento de la fuerza muscular esquelética a través de la hipertrofia de las fibras, aumento del uso de sustratos, biogénesis mitocondrial y aumento en la captación de glucosa en el ME, cambios que contribuyen a mejorar el control glicémico (Zanuso et al., 2017). Además de estas adaptaciones, el entrenamiento puede mejorar la sensibilidad muscular a la insulina y restaurar la homeostasis de la glucosa en individuos con trastornos metabólicos como la DM2, considerándose clave en la prevención y tratamiento de esta enfermedad (Moggetti et al., 2016). Es así que el entrenamiento de fuerza ha mostrado beneficios como el aumento en la traslocación de GLUT4 mediado por AMPK (Kido et al., 2016), aumento en la oxidación mitocondrial (Pesta et al., 2017) y aumento en la fosforilación de Akt en Ser<sup>473</sup> y Thr<sup>308</sup> (Camera et al., 2010). Además, en conjunto al factor de crecimiento similar a insulina (IGF)-1, insulina, testosterona y leucina, el ejercicio de fuerza estimula la vía anabólica PI3K/AKT/mTOR, considerada la principal vía de síntesis muscular proteica en respuesta a factores de crecimiento, que también induce la reorganización de filamentos de actina y su despolimerización, permitiendo la formación de un complejo con NRF2, favoreciendo su traslocación al núcleo y su acción sobre la respuesta antioxidante (Vargas-Mendoza et al., 2019). Sumado a esto, se ha observado que la actividad contráctil del músculo estimularía la fosforilación de p62 en Ser<sup>351</sup> estimulando su unión competitiva a KEAP1, permitiendo así su disociación de NRF2 y la traslocación de este último al núcleo (Yamada et al., 2019).

## **Ejercicio físico, zinc, diabetes y estrés oxidativo**

Existe escasa bibliografía respecto de la intervención combinada con zinc y ejercicio en el contexto de diabetes, especialmente estudiando la magnitud del efecto combinado sobre el estrés oxidativo, estado oxidativo y/o respuesta antioxidante. Una extensa búsqueda, entre más de 80 artículos, permitió encontrar solamente una investigación con características similares a las propuestas. Bicer et al. estudió el efecto combinado y/o por separado de la suplementación con zinc y ejercicio de natación agudo en ratas macho Sprague-Dawley de 4 a 6 meses de edad con diabetes inducida por estreptozotocina (STZ). Los animales se distribuyeron entre 8 grupos (control sano, control diabético, zinc, ejercicio, zinc + ejercicio, diabético + zinc, diabético + ejercicio y diabetes + zinc + ejercicio) de los cuales algunos fueron suplementados con 6mg/kg/día de sulfato de zinc intraperitoneal por 4 semanas y/o realizaron 30 minutos de natación (solo una vez) al finalizar la suplementación con zinc y previo al sacrificio. El grupo diabético suplementado con zinc + ejercicio, seguido del grupo diabético suplementado con zinc, mostraron menores concentraciones de malondialdehído y mayores de GSH en plasma, a la vez que una mayor actividad de GPX y SOD en eritrocitos que el grupo control diabético y diabético + ejercicio. Sin embargo, los grupos no diabéticos presentaron los mejores resultados en todos los indicadores producto de la intervención combinada (Bicer et al., 2012). Aunque este protocolo incluyó una única intervención con actividad física y no se estudió su efecto sobre el músculo esquelético, su combinación con zinc produjo resultados positivos y superiores a los de la suplementación aislada con zinc en la respuesta antioxidante y estado oxidativo en el plasma de ratas diabéticas, lo cual podría indicar un efecto sinérgico de ambos tratamientos. Sin perjuicio de lo anterior y considerando la escasa evidencia existente, se vuelve de interés estudiar el efecto y posible sinergia del tratamiento con zinc y ejercicio sobre la respuesta oxidativa de sujetos diabéticos en otros tejidos relevantes en la fisiopatología de la DM2, como el músculo esquelético.

Considerando la evidencia presentada es posible suponer que tanto el zinc como el entrenamiento de fuerza podrían resultar de relevancia en la modulación de la respuesta antioxidante del ME a través de la estimulación de la acción de NRF2, pudiendo así constituir importantes estrategias terapéuticas para el control de la DM2.

## **Hipótesis**

Con los antecedentes ya mencionados, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Puede la suplementación con zinc, en combinación con el entrenamiento de fuerza, aumentar la respuesta antioxidante mediada por NRF2 en el ME de un modelo animal de DM2? Esto permite generar la siguiente hipótesis: La suplementación con zinc en conjunto con entrenamiento de fuerza estimula la actividad transcripcional de *Nrf2* y la respuesta antioxidante celular en el tejido muscular esquelético de ratas con DM2 inducida por HFD y una pequeña dosis de STZ en mayor medida que el tratamiento con zinc y entrenamiento por separado, y estos a su vez más que la ausencia de tratamiento.

## **Objetivo General**

Evaluar el efecto combinado y por separado de la suplementación con zinc y entrenamiento de fuerza en la expresión génica de *Nrf2*, *Cat* y *Sod* y respuesta antioxidante en el músculo gastrocnemio de ratas con DM2 inducida por HFD y una pequeña dosis de STZ.

## **Objetivos Específicos**

1. Evaluar el efecto combinado y por separado de la suplementación con zinc y entrenamiento de fuerza sobre la expresión génica de *Nrf2*, *Cat* y *Sod* en el músculo gastrocnemio de los distintos grupos experimentales a través de la cuantificación de los niveles de mRNA de *Nrf2*, *Cat* y *Sod*.
2. Evaluar el efecto combinado y por separado de la suplementación con zinc y entrenamiento de fuerza sobre la respuesta antioxidante en el músculo gastrocnemio de los distintos grupos experimentales a través de la medición de la actividad enzimática de CAT y SOD y la cuantificación de los niveles de GSH, GSSG y la relación entre GSH/GSSG.

## **Cumplimiento de Objetivos**

Con fecha de finalización del proyecto y de entrega del proyecto de tesis, se logró el cumplimiento total del primer objetivo y parcial del segundo, pudiendo realizar dos de los tres ensayos planificados para este último objetivo. Esto debido a la imposibilidad de efectuar la medición de la actividad enzimática de SOD, a causa de problemas con los reactivos necesarios para su realización. Los reactivos comprados en 2021 fueron recién entregados, de forma parcelada y con muchos meses de retraso producto de la situación sanitaria, durante 2022. En particular, el reactivo BCS (Bathocuproinedisulfonic acid, disodium salt) necesario para el ensayo de actividad enzimática de SOD, fue entregado en



un periodo de casi nula presencia de personal en el departamento de nutrición y pese a señalarse como entregado en la factura, fue el único dentro de varios productos que, a pesar de haber revisado numerosas veces entre los distintos laboratorios del establecimiento, no pudo ser localizado dentro de las dependencias del departamento de nutrición. Sumado a eso, la enzima CAT (también adquirida en 2021) también necesaria para la medición de la actividad de SOD y CAT, recién fue entregada a principios de junio 2022. Ambas situaciones, impidieron la realización del ensayo planificado, y en honor a los plazos establecidos para la finalización del proyecto de tesis, se decidió prescindir del mismo. Sin perjuicio de lo anterior, con el objetivo de publicar la presente investigación en una revista científica en un futuro, se evaluará la realización del ensayo faltante una vez finalizada la tesis.

## Métodos

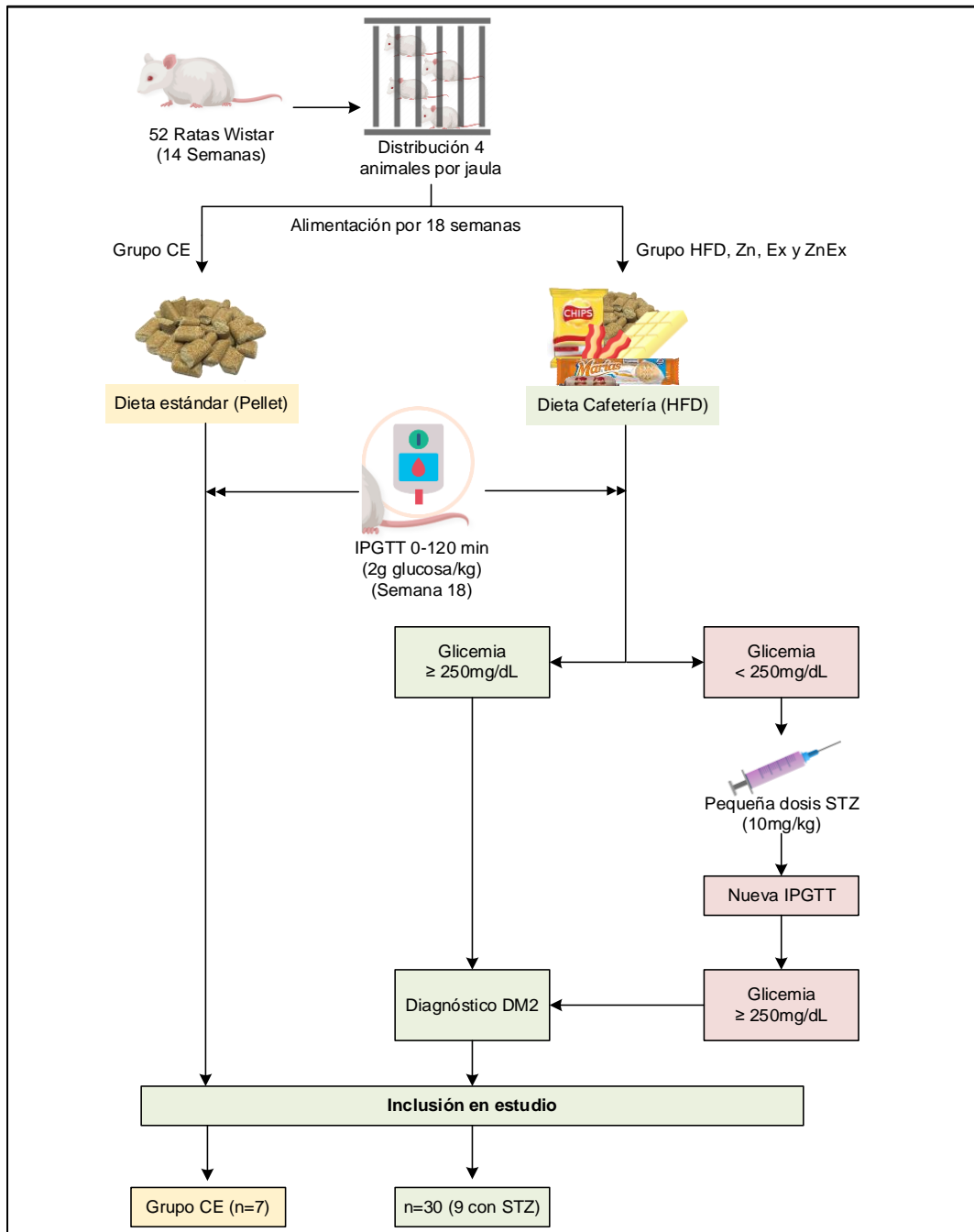
Esta tesis se establece complementariamente al Proyecto FONDECYT N° 1160792 “Interaction between supplemental zinc and muscle-strength training as a key element to improve type-2 diabetes therapy”, utilizando muestras de músculo gastrocnemio previamente recolectadas.

### Establecimiento de modelo murino de DM2

Se utilizó cincuenta y dos ratas Wistar macho de 14 semanas (250-350g) alojadas en grupos de 4 animales por jaula. Para la inducción de DM2 se alimentó a las ratas por 18 semanas con una HFD elaborada en el Departamento de Nutrición de la Universidad de Chile según se ha descrito previamente (García-Díaz et al., 2007) (**Figura 2**). Esta dieta se compuso de paté de cerdo, chocolate blanco, papas fritas, galletas, tocino y pellet estándar en una proporción 2:1:1:1:1:1, y con un 9,3% de energía como proteínas, 31,5% como carbohidratos y 59,2% como lípidos (462 kcal/100g). La ingesta alimentaria se registró cada 2-3 días; y el peso corporal se midió semanalmente. Con propósitos comparativos, un grupo de 7 animales se alimentó con dieta estándar para ratas (CE) (Harlan Ibérica, Barcelona, España) durante el periodo experimental, con un 16,6% de energía como proteínas, 73,1% como carbohidratos y 10,3% como lípidos (349 kcal/100g).

A las 18 semanas, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) con 2 g de glucosa (como solución de glucosa al 30%) / kg de peso corporal y la glucosa en sangre se midió a los 0 y 120 minutos a partir de una gota de sangre de la cola utilizando un glucómetro (Abbott Diabetes Care Ltd., UK). Se consideró como diagnóstico de DM2 valores de glucosa en sangre  $\geq 250$  mg/dL a los 120 min. Aquellas ratas con una glicemia  $< 250$  mg/dL fueron inyectadas con una pequeña dosis de STZ (10 mg/kg de peso corporal). A los 4 días, estas ratas se sometieron a una nueva IPGTT, y se incluyó en la siguiente fase del estudio solo aquellas con glucosa en sangre  $\geq 250$  mg/dL a los 120 minutos.

Treinta de 52 animales continuaron hacia la siguiente fase experimental, de los cuales 9 fueron inyectados con STZ. Estos se distribuyeron equitativamente entre los grupos experimentales: 2 ratas en el grupo Zn, Ex y ZnEx, y 3 en el grupo HFD.



**Figura 2.** Protocolo de Inducción de diabetes con dieta alta en grasas y pequeña dosis de estreptozotocina IPGTT, Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal; STZ, Estreptozotocina.

### Suplementación con zinc y entrenamiento de fuerza

Tras establecer la diabetes, se asignó a las ratas a uno de cuatro grupos experimentales:

- i)** Control alimentado con HFD (HFD; n=7);
- ii)** HFD + suplementación con zinc (Zn; n=8);
- iii)** HFD + entrenamiento (Ex; n=8);
- iv)** HFD + suplementación con zinc + entrenamiento

(ZnEx; n=7). El grupo CE se mantuvo en las mismas condiciones experimentales de la etapa previa (**Figura 3**). Los grupos suplementados con zinc recibieron 250 mg de zinc (como sulfato)/kg de dieta, mientras que los animales alimentados con HFD sin suplementación recibieron 32,1 mg de zinc/kg de dieta. Por su parte, el grupo CE alimentado con dieta estándar (Pellet) recibió 125 mg zinc/kg de dieta.

Los grupos con entrenamiento realizaron un programa de fortalecimiento muscular a través de contracciones isométricas, similar al propuesto por Krüger (Krüger et al., 2013), y descrito previamente por Barham (Barham, 2018). Brevemente, se ubicó a las ratas en una rejilla en sentido vertical y con la cabeza arriba, donde se sujetaron activamente tanto con sus patas delanteras como traseras. En sus colas se fijó una carga externa, correspondiente a un porcentaje de la masa corporal del animal medida en cada sesión de entrenamiento. Esta no generó lesiones corporales, intolerancias ni limitaciones de movimiento. En cada sesión de entrenamiento se realizó 3-4 series de 2 repeticiones de 45 segundos de duración, permitiéndoles descansar 30 segundos entre repeticiones y 2 minutos entre series. El peso de carga se mantuvo entre 0-55% del peso corporal y se aumentó de manera progresiva según la tolerancia del animal (**Anexo 1**). El programa de entrenamiento tuvo una duración de 12 semanas, con una frecuencia de 3 veces a la semana, asegurando un descanso de al menos 48 horas entre cada sesión, en las cuales los animales no realizaron actividad física de forma planificada. La progresión en la capacidad de desarrollar fuerza isométrica se valoró a través del tiempo máximo de agarre (por sus siglas en inglés MHT) en segundos, evaluado a las 0, 6 y 12 semanas de entrenamiento.

Cerca del final de la intervención los animales se sometieron a una IPGTT adicional, según se describió previamente, sumando una determinación de glucosa a los 60 min. Luego de finalizar la semana 12 las ratas se mantuvieron en ayuno durante la noche y se midió la glucosa sanguínea. Posteriormente las ratas fueron anestesiadas, sacrificadas por exanguinación y la sangre se recolectó a través de punción cardiaca. Dentro de los tejidos extraídos, pesados y congelados, se incluyó al músculo gastrocnemio, el cual se ha utilizado de forma habitual para la evaluación de los efectos de la DM2 a nivel de ME (Aragno et al., 2004; Frigero et al., 2018). El estudio se llevó a cabo en el bioterio del Departamento de Nutrición (Facultad de Medicina, Universidad de Chile). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioética sobre Investigación en

Animales de la Facultad de Medicina (Universidad de Chile) (**Anexo 2**) y llevados a cabo según las guías institucionales de cuidado y uso de animales de laboratorio.

### **Validación del modelo de intervención**

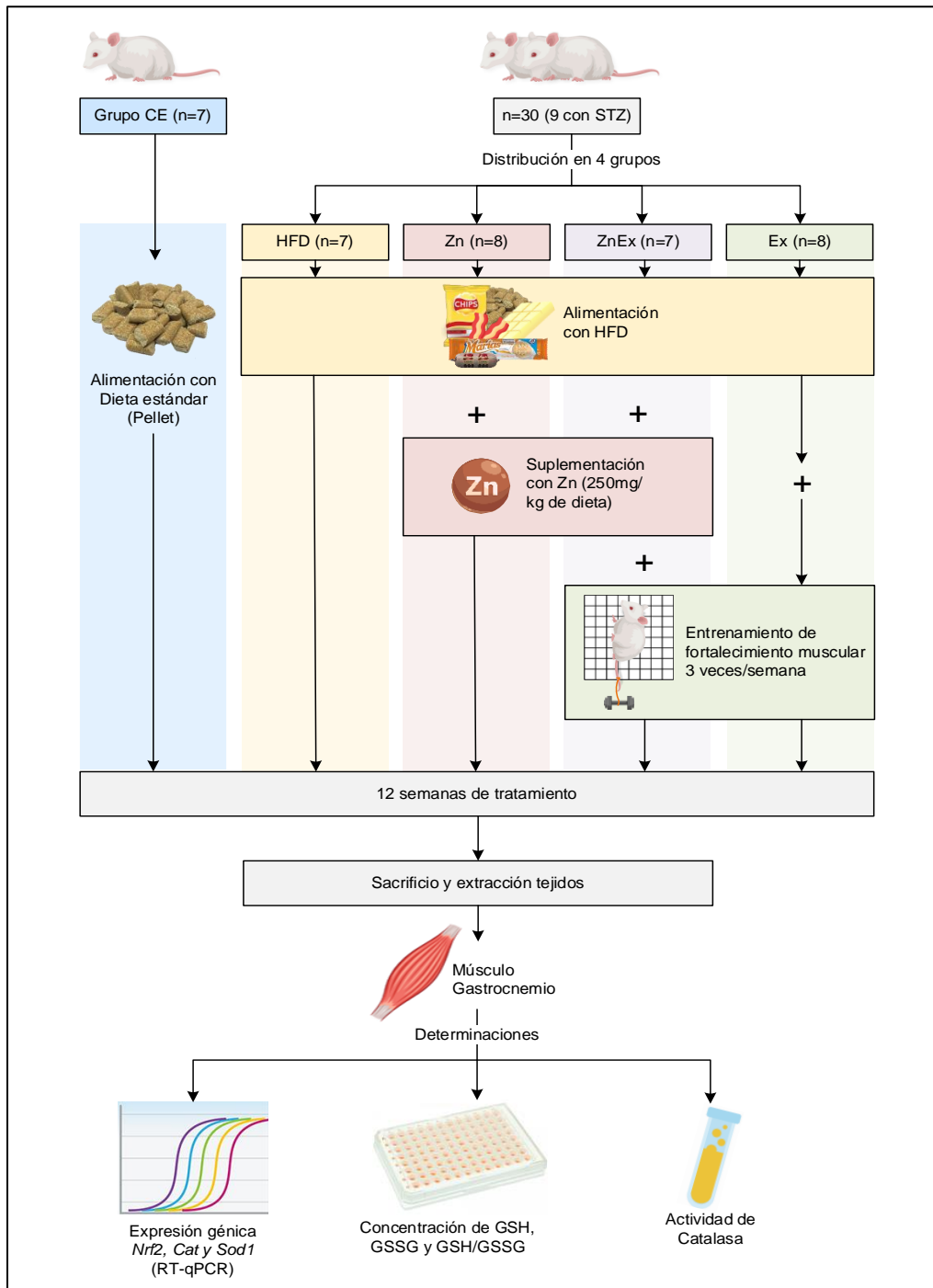
Para la validación del modelo de suplementación con zinc se consideró la concentración de zinc presente en las dietas HFD con y sin suplementación (sub sección “*Suplementación con zinc y entrenamiento de fuerza*”), el consumo estimado de zinc entre los grupos con y sin suplementación, y la concentración de zinc plasmático; en cuanto al modelo de entrenamiento de fuerza se consideró el MHT en la semana 0, 6 y 12, la curva de peso de las ratas durante el periodo de intervención y el peso del músculo gastrocnemio. Por otro lado, se consideraron variables metabólicas para el seguimiento del estado de la DM2, incluyendo glicemia, insulina plasmática y hemoglobina glicosilada (HbA1C).

### **Medición de la expresión génica**

La medición de la expresión génica de *Nrf2*, *Cat* y *Sod* se realizó a través de PCR en tiempo real con cuantificación relativa (RT-qPCR). Brevemente, 100mg de cada muestra de músculo gastrocnemio se homogenizó en 1ml de TRIzol Reagent (Invitrogen) e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se añadió 200µL de cloroformo a cada muestra y se les incubó nuevamente por 3 minutos en las mismas condiciones. Luego se centrifugaron por 15 min a 12000g y 5°C. El sobrenadante acuoso, correspondiente al RNA extraído, se traspasó a un tubo Eppendorf de 1,5 ml al cual se añadió 500uL de isopropanol. Las muestras se incubaron durante la noche a -20°C y centrifugaron a la mañana siguiente a 12000g por 10 minutos y 4°C, eliminando posteriormente el sobrenadante. El pellet de RNA restante fue lavado con 1ml de etanol al 75% y centrifugado por 5 min a 7500g y 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet al aire por 10 minutos, luego se resuspendió con 10µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas e incubó por 10 min a 60°C. El RNA fue cuantificado a 260/280nm utilizando el lector de microplacas NanoQuant Infinite 200 PRO (Tecan, Suiza) en una microplaca de cuarzo. Para evaluar la integridad del RNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X, utilizando bromuro de etidio como agente intercalante.

Se añadió H<sub>2</sub>O libre de nucleasas a 3µg de RNA hasta alcanzar un volumen de 10µL por muestra, a los cuales se agregó 1µL de DNasa y 1µL buffer de reacción 10X (Promega) y

se dejó incubar por 30 min a 37°C. Posteriormente se añadió 2µL de solución stop (Promega), se incubó por 2 min a temperatura ambiente y centrifugó a 10000g por 1,5 min.



**Figura 3.** Protocolo tratamiento con dieta alta en grasas, suplementación con zinc y entrenamiento de fuerza y determinaciones en músculo gastrocnemio.

STZ, *Estreptozotocina*; RT-qPCR, *PCR cuantitativa en tiempo real*; GSH, *Glutación reducida*; GSSG, *Glutación oxidado*.

En un tubo Eppendorf de 0,2 ml se añadió 2,3 µL de RNA tratado con DNasa, 7,7µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y 10µL Improm II Reverse Transcription System (Promega) y se llevó al termociclador por 135 min para la retrotranscripción a cDNA. Al cDNA resultante se añadió 10µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. En strips de 0,2µL se añadió 2µL de cDNA de cada muestra, 1µL de mix de partidores 5µM, 10µL de Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent) y 7µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. La amplificación y detección de los genes se realizó en el equipo AriaMx Real-time PCR System y los resultados fueron analizados utilizando el software AriaMx 1,8 (Agilent). La cuantificación relativa de los genes diana *Nrf2*, *Sod* y *Cat* se realizó utilizando el método del  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Pfaffl, 2004), utilizando como control interno la expresión del gen *Gapdh1*. Los partidores fueron diseñados utilizando el software AmplifiX 1.5.4 (Institute of NeuroPhysiopathology, Aix 182 Marseille Université, Marseille, France) (**Tabla 1**)

**Tabla 1.** Características partidores para análisis de la expresión génica

Gen	Número de acceso	Tm (°C)	Secuencia	Posición
<i>Factor Nuclear Eritroide 2 Relacionado al Factor 2 (Nrf2)</i>	<a href="#">NM_031789.9</a>	56,5	Forward: AAGGCACGGTGGAGTTCAAT	1041
		55,4	Reverse: GTGTTGGCTGTGCTTTAGGT	1216
<i>Catalasa (Cat)</i>	<a href="#">NM_012520.2</a>	55,1	Forward: CATGTGCATGCATGACAACC	1305
		55,1	Reverse: TAGAATGTCCGCACCTGAGT	1453
<i>Superóxido dismutasa 1 (Sod1)</i>	<a href="#">NM_017050.1</a>	55,8	Forward: ATGTTGGAGACCTGGGCAAT	335
		56,3	Reverse: TTCCACCTTTGCCCAAGTCA	335
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 (Gapdh1)</i>	<a href="#">NM_017008.4</a>		Forward: GTGAACGGATTGGCCGTAT Reverse: AGCTCCCATTCTCAGCCTT	

### Medición de la actividad enzimática

La actividad enzimática de CAT se determinó a través de un ensayo espectrofotométrico (Weydert & Cullen, 2010). Brevemente, se utilizó como solución base buffer de fosfato 50mM (PB). 25mg de músculo gastrocnemio fueron homogenizados en 1,5ml de PB y se determinó su concentración de proteínas utilizando el Bio-Rad Bradford Protein Assay Kit II, según las instrucciones del proveedor. Se elaboró una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30mM con PB y se ajustó su absorbancia en 240nm a 1150-1200 diluyendo con PB.

El espectrofotómetro fue calibrado utilizando una cubeta de cuarzo con 3,5 ml de PB. Cada muestra se analizó en duplicado añadiendo 20µL de muestra, 2ml de PB y 1ml de solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30mM a una cubeta de cuarzo de 3,5ml y se midió su absorbancia a 240nm cada 30 segundos durante 2 minutos. Para el blanco se reemplazó la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30mM por

1 ml de PB. La actividad de catalasa se determinó a partir de la disminución en la absorbancia durante 1 minuto y considerando un coeficiente de extinción para el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 43,6 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> y se expresó como U de catalasa/mg de proteína.

### **Medición de los niveles de glutatión**

Los niveles de GSH total (GSht), GSH, GSSG y la relación GSH/GSSG se determinaron a través del método de reciclaje enzimático (Rahman et al., 2006). Brevemente, se utilizó una solución base de 0,1M buffer de fosfato de potasio con sal disódica EDTA 5 mM (KPE). 30mg de músculo gastrocnemio se homogenizaron en 2ml de una solución de extracción de 0,1% tritón-X y 0,6% ácido sulfosalicílico en KPE y posteriormente se centrifugaron a 8000g y 4°C por 10 minutos. Se agregó 100µL de sobrenadante en dos tubos Eppendorf de 1,5ml para la medición de GSht y GSSG, y 100µL de KPE en otros dos tubos que posteriormente fueron utilizados como blanco y se conservaron en hielo. Se le añadió 2µL de solución de 10% 2-vinilpiridina en KPE al tubo de muestra y al blanco para GSSG y se les dejó incubar en oscuridad y a temperatura ambiente durante 60 minutos, luego se añadió 6µL de solución de 16,6% trietanolamina en KPE e incubó por 10 minutos en las mismas condiciones. Se añadió 20µL por cuadruplicado de cada muestra y blanco a una placa de 96 pocillos. 120µL de una mezcla de solución de DTNB y solución de glutatión reductasa en KPE y 60µL de solución de NADPH en KPE se agregó a cada pocillo. La absorbancia se midió a 405nm en el lector de microplacas NanoQuant Infinite 200 PRO (Tecan, Suiza). La concentración de GSht y GSSG se determinó a través de curvas estándares para cada molécula y la concentración de GSH se calculó como GSht – 2GSSG, y expresaron en µmol/g de tejido. La relación GSH/GSSG se calculó como (GSht – 2GSSG)/GSSG y se expresó en µM/µM.

### **Análisis estadísticos**

De acuerdo con un análisis de potencia, el tamaño muestral de 7 y 8 sujetos por grupo permitió observar diferencias de hasta 2.5 U/mg de proteína en la actividad enzimática antioxidante de CAT, considerando una desviación estándar (DE) de 1,9 (Jenkins, 1981; Lammi-Keefe et al., 1984), con una potencia del 80% y una confianza del 95%.

Para verificar el supuesto de normalidad se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk (**Anexo 3**). Valores con distribución normal se expresaron como promedios ± DE, y aquellos con distribución no normal se expresaron como medianas y rangos intercuartiles.



Para el análisis estadístico entre grupos se utilizó ANOVA de una vía con la prueba post hoc de Tukey si la distribución de la variable estudiada era normal, y la prueba de Kruskal-Wallis con la prueba post hoc de Dunn si la distribución de la variable estudiada era no normal. En el caso de medidas repetidas se utilizó ANOVA de medidas repetidas (distribución normal) y la prueba de Friedman (distribución no normal). Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar variables distribuidas de forma no normal entre dos muestras independientes. Se utilizó ANOVA de dos vías para analizar la relación entre los tratamientos combinados sobre las variables de estudio (Concentración de GSH, GSSG y relación GSH/GSSG; Expresión relativa de *Nrf2*, *Cat* y *Sod1*; Actividad de CAT), para lo cual se incorporó la suplementación con zinc y el entrenamiento de fuerza como variables nominales. Se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman para estudiar la relación entre el MHT, el zinc plasmático y la expresión relativa de *Nrf2*, *Cat* y *Sod1* con las variables de estudio.

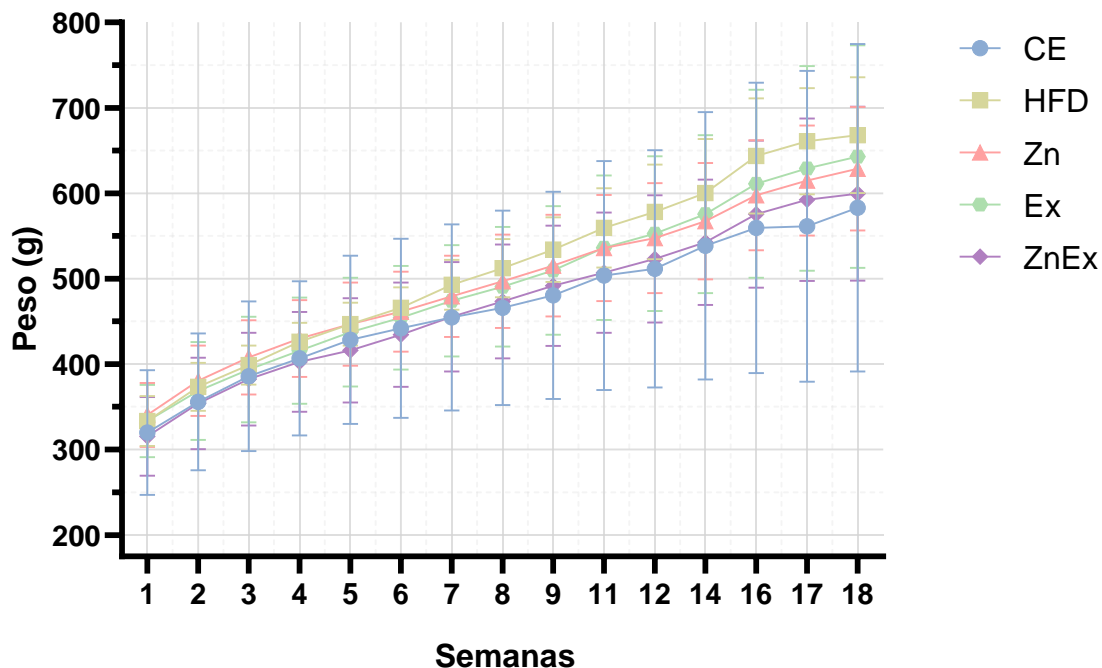
Se consideró como diferencias significativas *valores p* menores a 0,05. Se utilizó los softwares GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, Inc.) y SPSS Statistic 23 (IBM Corporations) para Windows para el análisis estadístico.

### **Financiamiento**

La presente tesis se financió por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) como parte del proyecto FONDECYT 1160792. Financiamiento otorgado a Dr. Manuel Ruz Ortiz.

## Resultados

En la **Figura 4** se presenta una curva de peso según grupo y semana durante el periodo de inducción de diabetes (18 semanas), previo al periodo de tratamiento con zinc y/o entrenamiento de fuerza. De esta forma, en esta etapa el nombre asignado a cada grupo solo hizo referencia a su distribución. Todos los grupos fueron alimentados con HFD, a excepción del grupo CE alimentado con dieta estándar. Se observó un aumento significativo del peso a través de las semanas (ANOVA de medidas repetidas,  $p < 0,0001$ ), además todos los grupos mostraron diferencias significativas entre el peso en la semana 1 vs la semana 6, 12 y 18 ( $p < 0,01$ ,  $< 0,05$  y  $< 0,05$  respectivamente). Solo los grupos alimentados con HFD mostraron diferencias significativas entre el peso en la semana 6 vs la semana 12 y 18 ( $p < 0,01$  y  $< 0,05$ ) y la semana 12 vs la semana 18 ( $p < 0,05$ ).

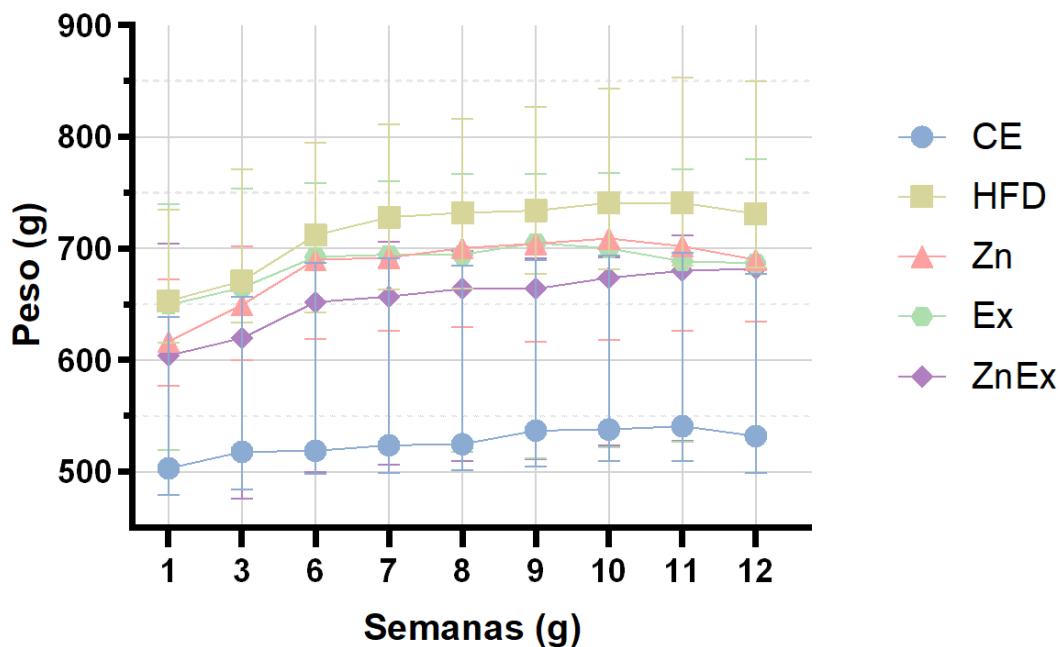


**Figura 4.** Curva de peso ratas durante el periodo de inducción de diabetes

Promedio de peso semanal durante el periodo de 18 semanas para inducción de diabetes, donde el grupo HFD, Zn, Ex y ZnEx fueron alimentados con dieta alta en grasas y el grupo CE, con dieta estándar. El nombre de cada grupo solo hace referencia a su distribución, ya que en este periodo el tratamiento separado o combinado con Zinc y/o entrenamiento de fuerza no había comenzado. ANOVA de medidas repetidas,  $p < 0,0001$ . Los valores son presentados como promedios  $\pm$  DE.

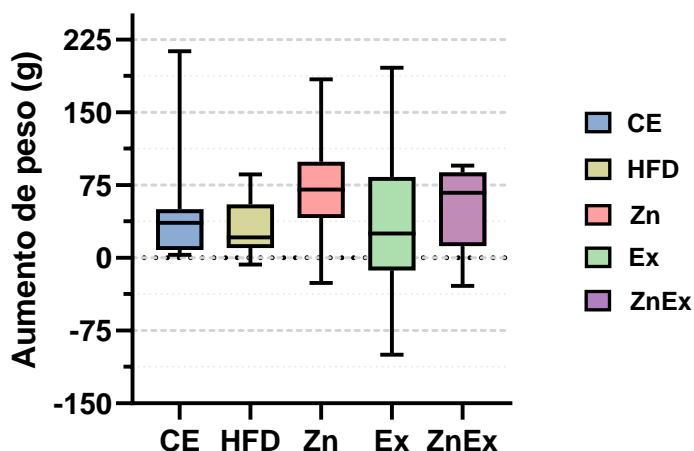
Durante el periodo de tratamiento con zinc y/o entrenamiento de fuerza (**Figura 5**) se observó una variación significativa del peso en todos los grupos (prueba de Friedman,  $p <$

0,01). Todos los grupos, a excepción del grupo Ex, mostraron un aumento estadísticamente significativo de peso entre la semana 1 y 12 ( $p < 0,05$ ). En cuanto a la ganancia de peso total durante el periodo de intervención, no se encontró diferencias significativas entre grupos ( $p = 0,507$ ) (**Figura 6**). La ingesta estimada de alimento (g/día) fue de  $31,6 \pm 20,9$  en el grupo HFD,  $31,6 \pm 20,9$  en el grupo Zn,  $32,1 \pm 7,1$  en el grupo Ex y  $32,6 \pm 36,6$  en el grupo ZnEx. No se encontraron diferencias significativas entre grupos. En cuanto a la ingesta de zinc, esta fue significativamente mayor en los grupos suplementados Zn y ZnEx en comparación a los grupos no suplementados HFD y Ex ( $6,7 [6,2 - 7,2]$  vs  $1,2 [0,9 - 1,4]$  mg zinc/rata/día,  $p < 0,001$ ) (**Figura 7**).



**Figura 5.** Curva de peso ratas durante el periodo de inducción de tratamiento

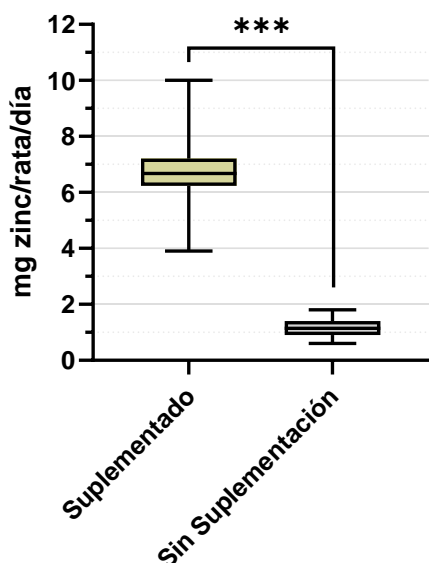
Peso semanal según grupo durante el periodo de 12 semanas de tratamiento con zinc y/o entrenamiento de fuerza. Prueba de Friedman,  $p < 0,01$ . Los datos son presentados como medianas  $\pm$  rangos intercuartiles.



**Figura 6.** Ganancia de peso periodo de intervención.

Ganancia de peso total durante el periodo de tratamiento. Prueba de Kruskal-Wallis y prueba post hoc de Dunn. Los valores son expresados como medianas  $\pm$  rangos intercuartiles.

En la **Tabla 2** se presentan los parámetros antropométricos y bioquímicos de los grupos



**Figura 7.** Consumo de zinc por día grupos suplementados vs no suplementados

Suplementado: Grupo Zn y ZnEx; Sin suplementación: Grupo HFD y Ex. Prueba de U de Mann-Whitney. (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Los valores son expresados como medianas y rangos intercuartiles.

estudiados. Es relevante destacar que el grupo ZnEx se compuso de un número menor de animales en comparación al resto de los otros grupos ( $n= 5$  vs  $7- 8$ ) debido a la pérdida de algunas muestras producto de problemas en el almacenamiento. Todos los grupos alimentados con HFD alcanzaron valores de glucosa en sangre  $\geq 250$  mg/dL (IPGTT 120) y significativamente mayores que el grupo CE al finalizar el periodo de inducción de DM2 excepto el CE (151 [142-235] mg/dL vs 377 [292-466] mg/dL,  $p < 0,001$ ). El grupo HFD alcanzó el peso corporal más alto al finalizar el periodo de tratamiento con 680 g (615 - 750g) y el grupo CE el más bajo con 514 g (489 – 648 g). Al normalizar el peso del músculo gastrocnemio con el peso corporal, el grupo HFD alcanzó el menor valor con  $3,7 \pm 0,69$  mg/g, mientras el grupo CE presentó la relación peso músculo gastrocnemio/peso corporal más alta ( $4,7 \pm 1,13$  mg/g), seguido del grupo ZnEx ( $4,5 \pm 0,63$  mg/g), Ex ( $4,3 \pm 1,1$

mg/g) y Zn ( $4,1 \pm 0,71$  mg/g). En cuanto a los niveles de Zinc plasmático, la concentración

más alta se encontró en el grupo ZnEx con  $147,2 \pm 26,81 \mu\text{g/dL}$ , seguido del grupo CE ( $142,1 \pm 12,5 \mu\text{g/dL}$ ), Ex ( $131,9 \pm 15,33 \mu\text{g/dL}$ ), Zn ( $130,2 \pm 17,5 \mu\text{g/dL}$ ) y por último HFD ( $128,8 \pm 13,1 \mu\text{g/dL}$ ). Ninguno de los parámetros presentados en la **Tabla 2** presentó diferencias estadísticamente significativas a excepción de la IPGTT120 al finalizar el periodo de inducción de diabetes.

**Tabla 2.** Parámetros antropométricos y bioquímicos de los grupos estudiados al finalizar periodo de intervención e IPGTT al finalizar el periodo de inducción de diabetes

	CE	HFD	Zn	Ex	ZnEx	valor <i>p</i>
n	7	7	8	8	5	
Peso corporal (g)	514 (489-648)	680 (615-750)	652 (606-710)	664 (505-743)	650 (483-718)	0,346 <sup>b</sup>
Peso GC (g)	$2,8 \pm 0,11$	$2,7 \pm 0,35$	$2,8 \pm 0,21$	$2,7 \pm 0,24$	$2,8 \pm 0,27$	0,554 <sup>c</sup>
Peso GC / Peso Corporal (mg/g)	$4,7 \pm 1,13$	$3,7 \pm 0,69$	$4,1 \pm 0,71$	$4,3 \pm 1,1$	$4,5 \pm 0,63$	0,370 <sup>c</sup>
IPGTT 120 min (mg/dL) <sup>e</sup>	151 (142-235) <sup>da</sup>	354 (263-454) <sup>da</sup>	305 (282-489) <sup>da</sup>	412 (288-490) <sup>da</sup>	351 (310-441) <sup>da</sup>	0,053 <sup>b</sup>
Glicemia Final (mg/dL)	$276 \pm 23,45$	$279 \pm 65,04$	$347 \pm 75,49$	$315 \pm 60,95$	$328 \pm 60,05$	0,174 <sup>c</sup>
HbA1C (%)	3,80 (3,60-3,90)	4,00 (3,90-4,50)	4,05 (3,75-4,38)	3,95 (3,70-4,35)	3,80 (3,75-4,25)	0,422 <sup>b</sup>
Insulina (ng/mL)	0,11 (0,11-0,13)	0,14 (0,10-0,31)	0,11 (0,09-0,17)	0,14 (0,10-0,18)	0,11 (0,10-0,56)	0,799 <sup>b</sup>
Zinc ( $\mu\text{g/dL}$ )	$142,1 \pm 12,5$	$128,8 \pm 13,1$	$130,2 \pm 17,5$	$131,9 \pm 15,33$	$147,2 \pm 26,81$	0,294 <sup>c</sup>

GC, Músculo Gastrocnemio; IPGTT, Prueba de tolerancia a glucosa intraperitoneal; <sup>a</sup>  $p < 0,001$ ; Los valores son expresados como mediana  $\pm$  rangos intercuartiles o promedios  $\pm$  DE: <sup>b</sup> Prueba de Kruskal-Wallis y prueba post hoc de Dunn, <sup>c</sup> Prueba ANOVA de una vía y prueba post hoc de Tukey o <sup>d</sup> Prueba de Mann Withney entre la mediana de los animales de los grupos de intervención y el grupo CE. <sup>e</sup> Utilizado para confirmar diagnóstico de diabetes ( $\geq 250 \text{ mg/dL}$ ), posterior al periodo de inducción de la enfermedad.

## Entrenamiento de fuerza

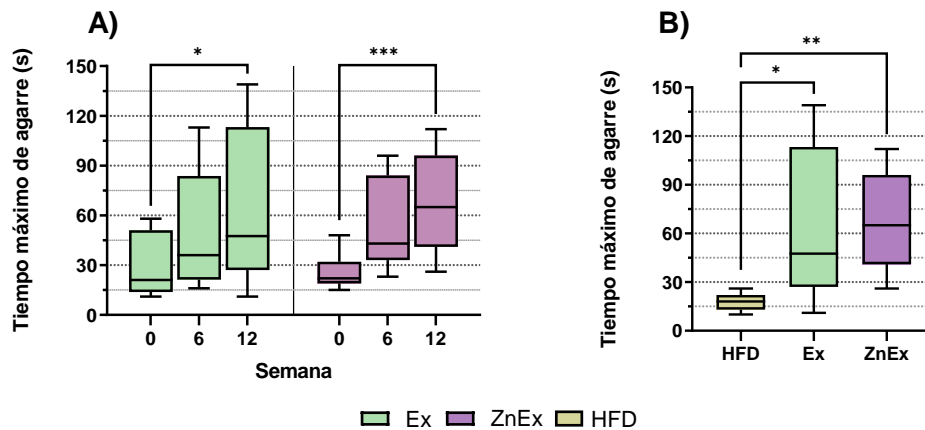
Los resultados del entrenamiento de fuerza se evaluaron a través del MHT en la semana 0, 6 y 12 de entrenamiento y se presentan en la **Tabla 3**. Vale destacar que la medición del MHT del grupo HFD (control no entrenado) se realizó solo al final el periodo de entrenamiento (semana 12), mientras que en el resto de los grupos no entrenados (CE y Zn) el MHT no fue medido, debido a que someterlos a una prueba física podría constituir un estímulo fisiológico en forma aguda, pudiendo alterar los resultados. Ambos grupos entrenados mostraron un aumento significativo del MHT entre la semana 0 y 12 (**Tabla 3** y **Figura 8A**) donde el grupo Ex duplicó (21 [13 - 51] vs 48 [27 - 113] segundos,  $p < 0,05$ ) y el grupo ZnEx triplicó (22 [19 - 32] vs 65 [41 - 96] segundos,  $p < 0,01$ ) su tiempo de agarre. Al comparar entre grupos, no se encontró diferencias significativas entre los grupos Ex y ZnEx en ninguno de los 3 periodos de tiempo. Por otro lado, en la semana 12 (**Figura 8B**) tanto el grupo Ex (48 [27 - 113] vs 18 [13 - 22] segundos,  $p < 0,05$ ) como ZnEx (65 [41 -

96] vs 18 [13 – 22] segundos,  $p < 0,01$ ) alcanzaron una MHT significativamente mayor que el grupo HFD.

**Tabla 3.** Tiempo máximo de agarre (segundos) según semana grupos entrenados y HFD

Grupo	Semana 0	Semana 6	Semana 12	Valor $p$
Ex	21 (14-51) <sup>a</sup>	36 (21-84)	48 (27-113) <sup>ac</sup>	0,018*
ZnEx	22 (19-32) <sup>b</sup>	43 (33-84)	65 (41-96) <sup>bd</sup>	<0,001*
HFD	-	-	18 (13-22) <sup>cd</sup>	
Valor $p$	0,975**	0,694**	0,002***	

(\*) Friedman test; (\*\*) U de Mann-Whitney test; (\*\*\*) Kruskal-Wallis. Los valores son expresados como mediana  $\pm$  rangos intercuartiles. Prueba post Hoc de Dunn: <sup>a</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>b</sup>  $p < 0,01$ ; <sup>c</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>d</sup>  $p < 0,01$ .



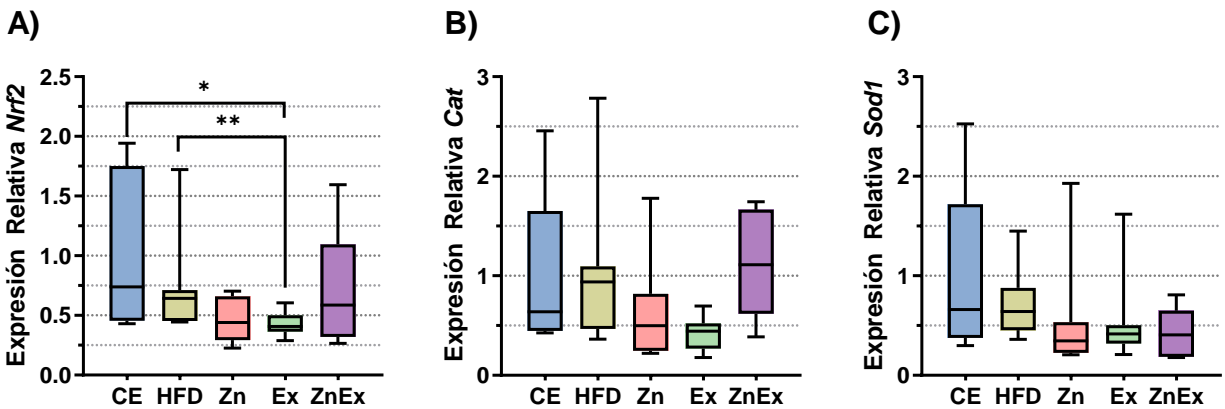
**Figura 8.** Tiempo máximo de agarre semana 0, 6 y 12.

Comparación tiempo máximo de agarre entre la semana 0, 6 y 12 por grupo (A) y comparación tiempo máximo de agarre semana 12 entre grupos. Test de Friedman (A) y prueba de Kruskal-Wallis (B) y prueba post hoc de Dunn (A y B). (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Los valores son expresados como medianas  $\pm$  rangos intercuartiles.

### Efecto de la suplementación con zinc y entrenamiento de fuerza en la respuesta antioxidante: Expresión génica de *Nrf2*, *Cat* y *Sod1*

El grupo CE mostró la expresión relativa más alta de *Nrf2*, seguido del grupo HFD, y ambos lograron una expresión significativamente mayor que el grupo Ex (0,74 [0,46 – 1,8] y 0,64 [0,45 – 0,71] vs 0,41 [0,36 – 0,50],  $p < 0,05$  y 0,01 respectivamente), que presentó los niveles más bajos de expresión. El grupo Zn (0,44 [0,29 – 0,66]) y ZnEx (0,59 [0,32 – 1,1]) no mostraron diferencias significativas con ningún otro grupo (Figura 9A).

En cuanto a la expresión relativa de *Cat* (**Figura 9B**) y *Sod1* (**Figura 9C**) no se encontró diferencias significativas entre los grupos. Sin perjuicio de lo anterior, el grupo ZnEx mostró la expresión relativa más alta de *Cat* (1,1 [0,62 – 1,7]), seguido del grupo HFD (0,94 [0,47 – 1,1]), CE (0,64 [0,45 – 1,7]), Zn (0,50 [0,25 – 0,82]) y por último Ex (0,44 [0,27 – 0,52]), que mostró los niveles más bajos de expresión relativa de *Cat*. Por su parte, la expresión relativa de *Sod1* fue mayor en el grupo CE (0,66 [0,38 – 1,7]), seguido del grupo HFD (0,64 [0,45 – 0,88]), Ex (0,42 [0,32 – 0,53]), ZnEx (0,41 [0,19 – 0,65]) y por último el grupo Zn (0,35 [0,23 – 0,53]).



**Figura 9.** Expresión génica relativa de *Nrf2*, *Cat* y *Sod1*.

Expresión génica relativa de *Nrf2* (**A**) *Cat* (**B**) y *Sod1* (**C**). Prueba de Kruskal-Wallis y prueba post hoc de Dunn. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ . Los valores son expresados como medianas  $\pm$  rangos intercuartiles.

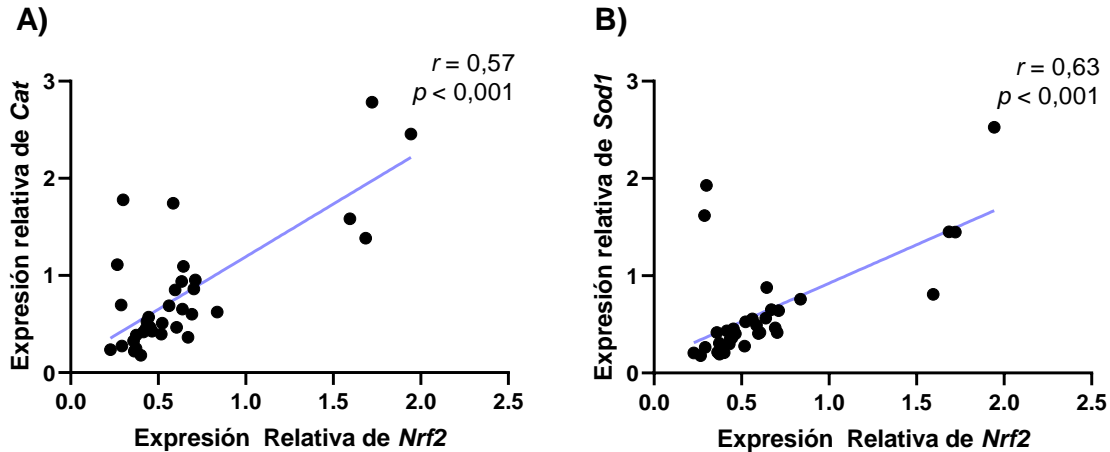
Cuando se analizó la influencia individual o combinada del tratamiento con zinc o entrenamiento de fuerza sobre los niveles de expresión génica relativa de *Nrf2*, *Cat* y *Sod1*, se encontró un efecto significativo el tratamiento combinado sobre la expresión de *Nrf2* y *Cat* (ANOVA de dos vías,  $p < 0,05$ ) (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** ANOVA de dos vías interacción entre suplementación con zinc y entrenamiento de fuerza

	GSH (valor $p$ )	GSSG (valor $p$ )	GSH/GSSG (valor $p$ )	<i>Nrf2</i> <sup>a</sup> (valor $p$ )	<i>Cat</i> <sup>a</sup> (valor $p$ )	<i>Sod1</i> <sup>a</sup> (valor $p$ )	Actividad de Catalasa (Valor $p$ )
Entrenamiento de fuerza	0,061	0,777	0,182	0,609	0,445	0,285	0,449
Suplementación con Zinc	0,388	0,164	0,615	0,467	0,837	0,272	0,087
Entrenamiento x Suplementación	0,081	0,857	0,142	0,030*	0,016*	0,636	0,039*

(\*)  $p < 0,05$ ; (a) Expresión génica.

Al evaluar la relación entre la expresión relativa de *Nrf2*, *Cat* y *Sod1* con la concentración de zinc plasmático o el MHT en la semana 12, no se encontró correlación. Por el contrario, se encontró una correlación positiva moderada entre la expresión de *Nrf2* y la expresión de *Cat* ( $r = 0,57$  [IC 95% 0,27 – 0,76],  $p < 0,001$ ) (**Figura 10A**) y *Sod1* ( $r = 0,63$  [IC 95% 0,37 – 0,80],  $p < 0,001$ ) (**Figura 10B**). El detalle de las correlaciones no significativas puede ser encontrado en el **Anexo 4**.



**Figura 10.** Asociación entre expresión relativa de *Nrf2*, *Cat* y *Sod1*

Correlación entre la expresión relativa de *Nrf2* con *Cat* (A) y *Sod1* (B) en los grupos CE, HFD, Zn, Ex y ZnEx. Coeficiente de correlación de Spearman,  $p < 0,001$ .

### Efecto de la suplementación con zinc y entrenamiento de fuerza en la respuesta antioxidante: Niveles de GSH/GSSG

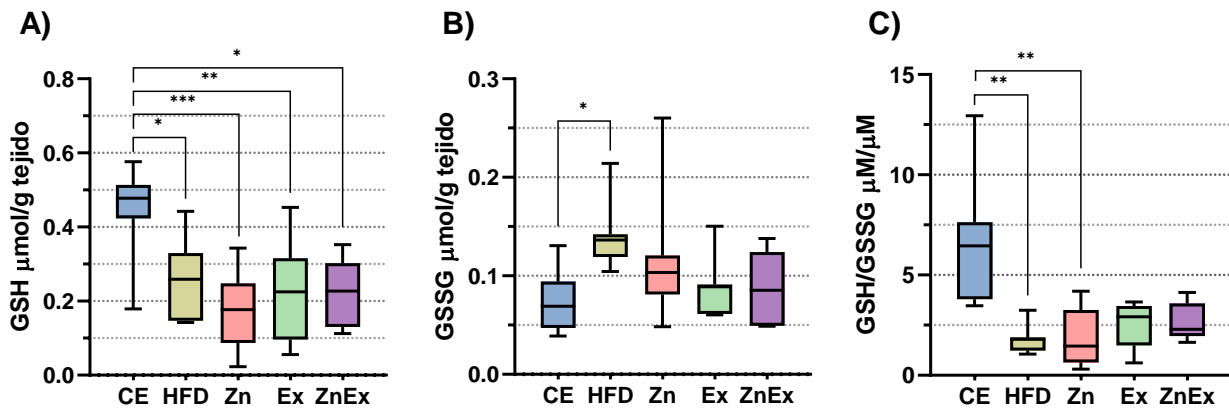
Los niveles de GSht fueron  $0,59 \pm 0,16$   $\mu\text{mol/g}$  de tejido en el grupo CE;  $0,54 \pm 0,15$   $\mu\text{mol/g}$  de tejido en el grupo HFD;  $0,41 \pm 0,17$   $\mu\text{mol/g}$  de tejido en el grupo Zn;  $0,40 \pm 0,18$   $\mu\text{mol/g}$  de tejido en el grupo Ex; y  $0,39 \pm 0,15$   $\mu\text{mol/g}$  de tejido en el grupo ZnEx. El grupo CE presentó los niveles más elevados de GSht mientras que el grupo ZnEx presentó la concentración más baja, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre grupos (ANOVA de una vía,  $p = 0,0919$ ).

Por su parte, los niveles de GSH (**Figura 11A**) en el grupo CE fueron de  $0,45 \pm 0,13$   $\mu\text{mol/g}$  de tejido, concentración significativamente mayor en comparación a los otros grupos de intervención (HFD  $0,25 \pm 0,13$   $\mu\text{mol/g}$  de tejido, Zn  $0,18 \pm 0,10$   $\mu\text{mol/g}$  de tejido, Ex  $0,23 \pm 0,13$   $\mu\text{mol/g}$  de tejido, ZnEx  $0,22 \pm 0,09$   $\mu\text{mol/g}$  de tejido;  $p < 0,05$ ), mientras que el grupo Zn presentó los niveles más bajos de GSH.



Por otro lado, el grupo HFD presentó los niveles más altos de GSSG con 0,14 (0,12 - 0,14)  $\mu\text{mol/g}$  de tejido (**Figura 11B**), logrando una diferencia significativa con el grupo CE que mostró la concentración más baja (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ). No se observó diferencias significativas entre los otros grupos.

Finalmente, la relación entre las concentraciones de GSH/GSSG (**Figura 11C**) fue de 6,45 (3,79 – 7,63) en el grupo CE, valor significativamente mayor en comparación al grupo Zn y HFD ( $p < 0,01$ ) que presentaron la relación más baja entre las concentraciones de GSH/GSSG con 1,45 (0,64 – 3,25) y 1,81 (1,23 – 1,88) respectivamente.

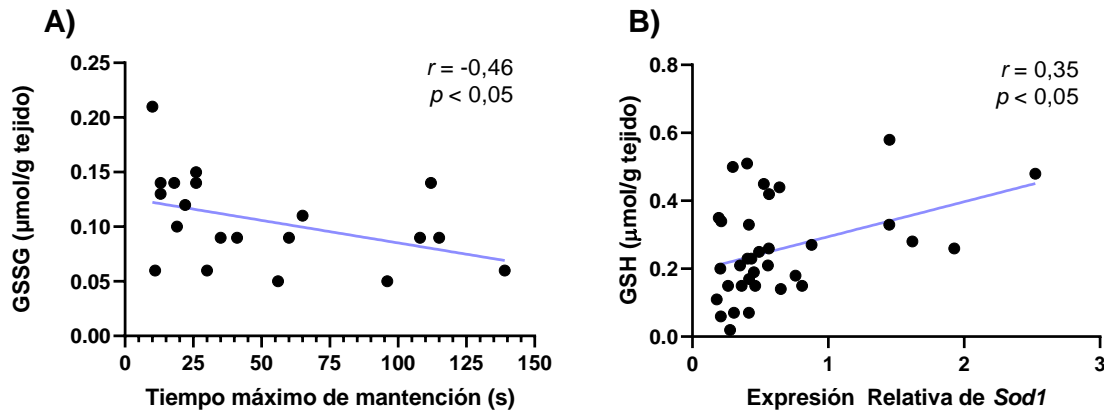


**Figura 11.** Niveles de GSH y GSSG y relación GSH/GSSG

Concentración en músculo gastrocnemio de GSH (A) y GSSG (B) en  $\mu\text{mol/g}$  y relación de GSH/GSSG (C) en  $\mu\text{M}/\mu\text{M}$ . Prueba ANOVA de una vía y prueba post hoc de Tukey (A), Prueba de Kruskal-Wallis y prueba post hoc de Dunn (B y C). (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Los valores son expresados como medianas  $\pm$  rangos intercuartiles. GSH, Glutación reducido; GSSG, Glutación disulfuro.

Al analizar la influencia individual o combinada del tratamiento con zinc o entrenamiento de fuerza sobre los niveles de GSH, GSSG y la relación GSH/GSSG no se encontró un efecto significativo en ninguno de los casos (ANOVA de dos vías,  $p > 0,05$ ) (**Tabla 4**).

Al evaluar la relación entre los niveles de GSH y GSSG con la concentración de zinc plasmático o el MHT en la semana 12, se encontró una correlación negativa moderada entre el MHT y los niveles de GSSG ( $r = -0,46$  [IC 95% -0,76 – -0,01],  $p < 0,05$ ) (**Figura 12A**). En tanto, al examinar su relación con la expresión de los distintos genes analizados, los niveles de expresión génica de *Sod1* mostraron una correlación positiva, aunque baja, con la concentración de GSH ( $r = 0,35$  [IC 95% 0,001 – 0,62],  $p < 0,05$ ) (**Figura 12B**). Las correlaciones no significativas pueden ser encontradas en el **Anexo 4**.

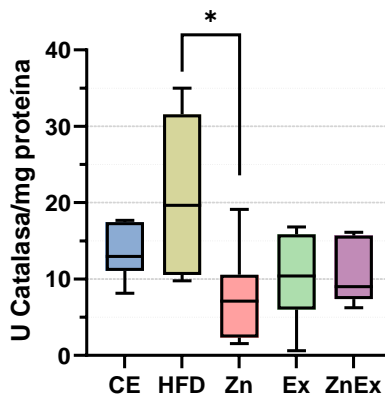


**Figura 12.** Asociación entre GSH y expresión relativa de Sod1, y GSSG y tiempo máximo de mantención

Correlación entre MHT a la semana 12 y concentración de GSSG (A) y correlación niveles de expresión relativa de Sod1 y concentración de GSH (B) en los grupos CE, HFD, Zn, Ex y ZnEx. Coeficiente de correlación de Spearman,  $p < 0,05$ . GSH, *Glutati3n reducida*; GSSG, *Glutati3n disulfuro*.

### Efecto de la suplementaci3n con zinc y entrenamiento de fuerza en la respuesta antioxidante: Actividad de Catalasa

CAT mostr3 la mayor actividad en el grupo HFD con 19,63 (10,53 — 31,56) U/mg de prote3na, logrando una diferencia significativa en comparaci3n al grupo Zn, que present3 el nivel m3s bajo de actividad enzim3tica con 7,11 (2,36 — 10,58) U de catalasa/mg de prote3na (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ) (Figura 13). El grupo CE mostr3 la segunda mayor actividad de CAT (12,96 [11,06 — 17,47] U de catalasa/mg de prote3na), seguido del grupo Ex (10,40 [5,99 — 15,87] U/mg de prote3na) y ZnEx (9,02 [7,38 — 15,70] U/mg de prote3na).

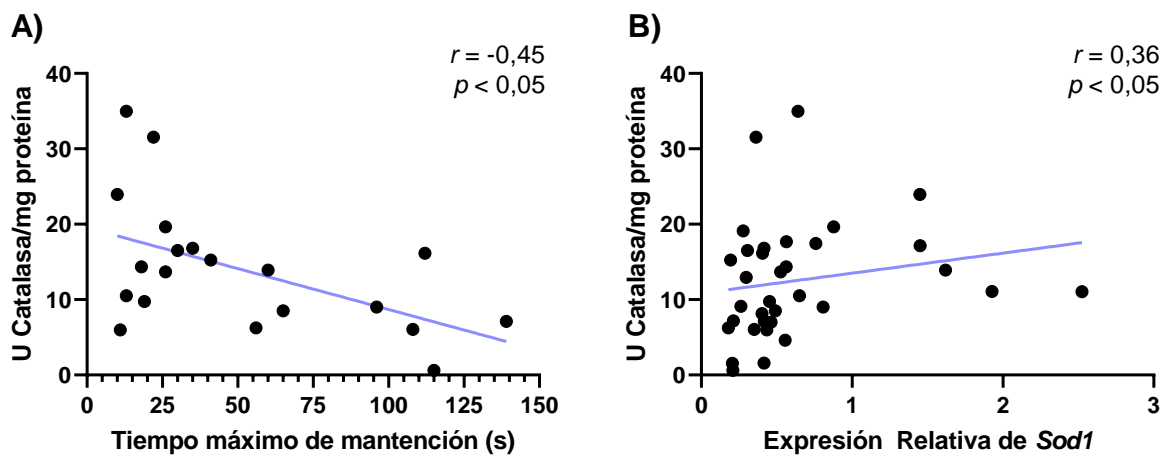


**Figura 13.** Actividad enzim3tica de catalasa

Prueba de Kruskal-Wallis y prueba post hoc de Dunn. (\*)  $p < 0,05$ . Los valores son expresados como medianas y rangos intercuartiles.

Al analizar la influencia individual o combinada del tratamiento con zinc o entrenamiento de fuerza sobre la actividad de CAT, se encontró un efecto significativo del tratamiento combinado sobre esta actividad enzimática (ANOVA de dos vías,  $p < 0,05$ ) (**Tabla 4**).

En cuanto a la relación entre la actividad de catalasa con la concentración plasmática de zinc o el MHT en la semana 12, se encontró una correlación negativa moderada entre el MHT y la actividad de esta enzima ( $r = -0,45$  [IC 95%  $-0,75$  —  $-0,01$ ],  $p < 0,047$ ) (**Figura 14A**). Por otro lado, cuando se evaluó su relación con la expresión de los distintos genes analizados, los niveles de expresión génica de *Sod1* mostraron una correlación positiva baja con la actividad de catalasa ( $r = 0,36$  [0,01— 0,63],  $p < 0,05$ ) (**Figura 14B**). Las correlaciones no significativas pueden ser encontradas en el **Anexo 4**.



**Figura 14.** Asociación entre actividad de catalasa y tiempo máximo de mantención y expresión relativa de *Sod1*

Correlación MHT a la semana 12 y actividad de catalasa (**A**) y correlación niveles de expresión relativa de *Sod1* y actividad de catalasa (**B**) en los grupos CE, HFD, Zn, Ex y ZnEx. Coeficiente de correlación de Spearman,  $p < 0,05$ .

En la **Tabla 5** se presenta un resumen de los principales resultados significativos obtenidos en la investigación.

**Tabla 5.** Resumen principales resultados significativos

<b>Suplementación y Entrenamiento</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Ingesta de zinc en Zn y ZnEx &gt; HFD y Ex <sup>a</sup></li><li>• ↑ MHT semana 12 vs 0 en Ex y ZnEx <sup>b</sup></li><li>• MHT semana 12 en Ex y ZnEx &gt; HFD <sup>c</sup></li></ul>
<b>Expresión Génica</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Expresión <i>Nrf2</i> en CE y HFD &gt; Ex <sup>c</sup></li><li>• Influencia significativa tratamiento combinado sobre expresión <i>Nrf2</i> y <i>Cat</i> <sup>d</sup></li><li>• Correlación positiva expresión <i>Nrf2</i> con expresión <i>Cat</i> y <i>Sod1</i> <sup>e</sup></li></ul>
<b>Niveles de Glutatión</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• [GSH] en CE &gt; HFD, Zn, Ex y ZnEx <sup>f</sup></li><li>• [GSSG] en HFD &gt; CE <sup>c</sup></li><li>• GSH/GSSG en CE &gt; HFD y Zn<sup>c</sup></li><li>• Correlación positiva [GSH] con expresión <i>Sod1</i> <sup>e</sup></li><li>• Correlación negativa [GSSG] con MHT semana 12 <sup>e</sup></li></ul>
<b>Actividad enzimática Catalasa</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Actividad catalasa en HFD &gt; Zn <sup>c</sup></li><li>• Influencia significativa tratamiento combinado sobre actividad catalasa <sup>d</sup></li><li>• Correlación negativa actividad catalasa con MHT semana 12 <sup>e</sup></li><li>• Correlación positiva actividad catalasa con expresión <i>Sod1</i> <sup>e</sup></li></ul>

MHT, *Tiempo máximo de Agarre*; [GSH], Concentración de Glutatión Reducido; [GSSG], *Concentración de Glutatión Oxidado*; GSH/GSSG, *Relación Glutatión Reducido y Glutatión Oxidado*.<sup>a</sup> Prueba U de Mann-Whitney; <sup>b</sup> Test de Friedman; <sup>c</sup> Prueba de Kruskal-Wallis y post hoc de Dunn, <sup>d</sup> ANOVA de dos vías; <sup>e</sup> Coeficiente de correlación de Spearman; <sup>f</sup> ANOVA de una vía y post hoc de Tukey

## Discusión

Se ha sugerido que el zinc y el entrenamiento de fuerza podrían tener efectos positivos sobre la respuesta antioxidante y la modulación del daño oxidativo en el músculo esquelético a causa de la DM2. Es así como en este trabajo se ha propuesto que el zinc, en combinación al entrenamiento de fuerza, podrían modular la respuesta antioxidante en el músculo gastrocnemio de ratas diabéticas a través de la inducción de los efectos de NRF2, proteína que participa en la expresión de distintas moléculas de antioxidantes, incluidas las enzimas SOD y CAT, pudiendo contribuir al aumento de su actividad, y GCL y GS involucradas en la síntesis del GSH (Cuadrado et al., 2019; Vargas-Mendoza et al., 2019; K. Wang et al., 2013; Yamada et al., 2019), pudiendo llevar al aumento en los niveles de esta proteína y generando una mejoría en el estado oxidativo, evaluado a través de la relación GSH/GSSG, en el tejido estudiado.

Para la inducción de diabetes se estableció un protocolo de alimentación con HFD en ratas jóvenes, el cual se prolongó durante 18 semanas y culminó con el diagnóstico de DM2 en aquellos animales con una glucosa en sangre  $\geq 250$  mg/dL a los 120 minutos, administrando una pequeña dosis de STZ en las ratas con una glicemia menor al criterio diagnóstico y evaluando nuevamente el logro del parámetro deseado. Esto permitió que 30 de 52 animales fueran incluidos en la siguiente fase del proyecto, de los cuales 9 fueron administrados con STZ y distribuidos equitativamente entre los grupos de intervención, permitiendo controlar diferencias asociadas al uso de STZ para lograr el diagnóstico de DM2. Las ratas alimentadas con HFD que se incluyeron en la siguiente fase de intervención mostraron una glicemia significativamente mayor a la del grupo CE, mostrando los positivos resultados del modelo de inducción de diabetes a través de HFD y una pequeña dosis de STZ. Este modelo ha exhibido previamente características metabólicas y de progresión natural similar a la DM2 en humanos, además de causar hiperglicemia estable y de larga duración (Gheibi et al., 2017). Ha mostrado utilidad para estudiar los efectos del EO en distintos tejidos, incluyendo el ME (Baldissera et al., 2016), además de alteraciones en parámetros bioquímicos, marcadores inflamatorios, señalización de insulina, entre otras (García-Díaz et al., 2007; Gheibi et al., 2017; Vivero et al., 2021).

En relación con el protocolo de intervención con HFD y suplementación con zinc y/o entrenamiento de fuerza, al final del periodo de tratamiento todos los grupos mostraron un peso mayor en comparación al peso inicial. Pese a que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la ingesta alimentaria entre grupos, al evaluar la ingesta de zinc se observó que los grupos suplementados consumieron en promedio sobre 6 veces más zinc que los grupos no suplementados, diferencia estadísticamente significativa. Resulta llamativo que, pese a la notoria diferencia en la ingesta, la concentración de zinc plasmático no haya mostrado diferencias entre grupos, sin embargo, otros estudios con administración de zinc en cantidades elevadas han reportado resultados similares. Podany et al. estudió los efectos del consumo excesivo de zinc en ratones C57/B16 en periodo neonatal sobre el estrés oxidativo, para lo cual se administró 100ug zinc en 20 $\mu$ L de sucralosa 10% desde el segundo hasta el décimo día neonatal en el grupo suplementado (10 veces la ingesta adecuada), mientras que el control recibió solo 20 $\mu$ L de sucralosa 10%. Al analizar los niveles de zinc plasmático no se encontró diferencias entre los grupos

producto de la suplementación (Control  $32 \pm 6 \mu\text{M}$  vs Suplementado  $31,8 \pm 3,2 \mu\text{M}$ ), mientras la acumulación tisular de zinc en el intestino delgado e hígado mostró ser significativamente mayor producto de la administración de zinc (Podany et al., 2019). Piao et al. evaluó los efectos subtóxicos del zinc en distintos tejidos y órganos de ratas Wistar que recibieron 4mg/kg de zinc ( $\text{Zn}_{\text{Low}}$ ), 8 mg/kg de zinc ( $\text{Zn}_{\text{High}}$ ) o tratamiento control (solución salina) administrados intraperitonealmente una vez cada dos días durante 14 días. Pese a que el grupo  $\text{Zn}_{\text{High}}$  recibió el doble de suplementación que el grupo  $\text{Zn}_{\text{Low}}$  y aún más que el grupo control, los niveles de zinc en sangre resultaron similares en todos los grupos (Control  $6,90 \pm 2,25 \mu\text{g/g}$  vs  $\text{Zn}_{\text{Low}}$   $7,28 \pm 1,62 \mu\text{g/g}$  vs  $\text{Zn}_{\text{High}}$   $7,31 \pm 1,76 \mu\text{g/g}$ ,  $p > 0,05$ ) (Piao et al., 2003). Por el contrario, en el estudio de Bicer et al. donde se administró 6mg/kg/día de sulfato de zinc intraperitoneal en ratas Sprague-Dawley por 4 semanas de forma separada o en combinación a la realización de natación una vez al finalizar el periodo de suplementación, se observó que la suplementación aumentó de forma significativa el zinc en plasma. Sin embargo, la presencia de diabetes disminuyó de forma importante el zinc plasmático pese a su suplementación, haciéndola incluso inferior al grupo control no suplementado. Además, el zinc plasmático en los grupos diabéticos suplementados no mostró diferencias (Diabetes + zinc y Diabetes + zinc + natación). La actividad física también disminuyó el zinc plasmático en todos los grupos en comparación a sus respectivos controles, a excepción de los grupos diabéticos suplementados como se mencionó (Bicer et al., 2012). En consecuencia, es posible que el zinc plasmático no logre reflejar el estatus real de este mineral en el organismo de las ratas frente a la administración de concentraciones elevadas de zinc, especialmente en el contexto de diabetes. Pese a ser uno de los biomarcadores más utilizados y haberse demostrado su utilidad previamente (Lowe et al., 2009), este indicador posee limitaciones debido a que puede verse afectado producto de la inflamación y alimentación, generando variaciones diurnas de hasta 20%. Es por tanto que, para lograr una mejor estimación del estado nutricional de zinc se ha sugerido la medición de sus reservas intercambiables o su contenido en metalotioneínas (MT) (Hess et al., 2007; Wieringa et al., 2015), de la misma forma que podría ser de utilidad medir su concentración en los tejidos estudiados (Podany et al., 2019).

En cuanto al entrenamiento de fuerza, los grupos entrenados mostraron un aumento significativo en el MHT entre el inicio y el final de las 12 semanas de intervención, además

de mostrar un rendimiento significativamente mayor en la prueba física en la semana 12 en comparación el grupo HFD, demostrando el éxito del programa de entrenamiento sobre el fortalecimiento muscular de las ratas. Como se mencionó previamente, en los grupos CE y Zn (no entrenados) no se midió el MHT para evitar la presencia de estímulos fisiológicos que pudiesen alterar el resto de los parámetros evaluados en el estudio. Entre el grupo Zn y ZnEx no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el MHT medido a la mitad y final de la intervención, sin embargo, el grupo ZnEx presentó un rendimiento 20% y 50% mayor en la semana 6 y 12 respectivamente, en comparación al grupo Ex, lo cual podría dar cuenta de un efecto sinérgico de la suplementación con zinc y el entrenamiento de fuerza en el rendimiento físico de los animales. Se ha reportado que los incrementos en el MHT están asociados a hipertrofia de fibras musculares tipo II en el músculo gastrocnemio (aumento en micrometros determinado a partir de la medición del diámetro de las fibras), según observó previamente Kruger et al. en un protocolo de entrenamiento similar al presentado (Krüger et al., 2013). Pese a que la medición de la hipertrofia de las fibras no ha sido motivo de esta investigación, es posible que estas modificaciones estructurales hayan contribuido al fortalecimiento muscular observado en las ratas. No se observaron diferencias en el peso del músculo gastrocnemio de los animales entrenados en comparación a los no entrenados, pero al normalizar el peso muscular por el peso corporal de los animales, el grupo Ex y ZnEx mostraron una relación peso músculo gastrocnemio/peso corporal (mg/g) 16% y 20% mayor al grupo HFD y 5% y 10% mayor que el grupo Zn, respectivamente, aunque menor a la del grupo CE, pudiendo dar cuenta del efecto negativo de la DM2 sobre la integridad del músculo esquelético por sobre el entrenamiento.

Respecto de los parámetros de la respuesta antioxidante estudiados, a diferencia de lo esperado, el tratamiento con zinc y/o entrenamiento de fuerza no produjo un aumento en ninguno de estos en comparación al grupo HFD, a excepción de la expresión génica de *Cat* que alcanzó su mayor magnitud en el grupo ZnEx, aunque esta diferencia no logró ser estadísticamente significativa. Esto eleva la interrogante de si las características del protocolo de suplementación y actividad física fueron las necesarias para lograr los efectos esperados, o si los mecanismos de acción de ambas intervenciones en el músculo gastrocnemio fueron diferentes de lo presupuestado. Al analizar los resultados se observó

que el grupo Zn presentó los menores niveles de expresión de *Sod* y la menor concentración de GSH y actividad de catalasa, mientras que al combinar la suplementación de zinc con entrenamiento de fuerza (ZnEx) el valor de estos parámetros parece haberse restaurado hasta lograr valores cercanos a los del grupo Ex. Esto permite plantear la idea de un posible antagonismo entre los efectos de la suplementación con zinc y el entrenamiento de fuerza, en donde el ejercicio parecería haber disminuido parcialmente los aparentes efectos negativos del zinc observados sobre las variables de la respuesta antioxidante estudiadas en el músculo gastrocnemio. Es sabido que, en niveles adecuados en el organismo, el zinc cumple un rol relevante en la respuesta antioxidante como cofactor de la enzima SOD y a través de su rol en la regulación de la expresión de MT. Además, contribuiría en la regulación de la expresión de distintos sistemas antioxidantes a través de la inducción de la acción de NRF2 (Marreiro et al., 2017; Prasad & Bao, 2019). Es posible cuestionarse si la cantidad de zinc entregada a los grupos suplementados fue reducida o insuficiente, impidiendo así cambios a nivel plasmático y efectos positivos sobre la respuesta antioxidante en el músculo esquelético. Sin embargo, como se mencionó previamente, el grupo Zn y ZnEx recibieron sobre 6 veces más zinc a través de la dieta que los grupos no suplementados. Considerando que todos los grupos, a excepción del CE, fueron alimentados con la misma dieta HFD (sin variaciones en su composición a excepción de la adición de sulfato de zinc) es posible descartar la presencia de elementos en la alimentación que hayan afectado de forma significativa la absorción de zinc, como fitatos o fibra (Lönnerdal, 2000), específicamente en los grupos suplementados en comparación al resto. Además, si ese fuera el caso, sería esperable observar la ausencia de efectos producto de la suplementación con zinc y que el grupo Zn presentara parámetros de respuesta antioxidante similares a los exhibidos por el grupo HFD. Por el contrario, el grupo Zn presentó una disminución en todos los parámetros antioxidantes estudiados en comparación a todos los grupos, incluyendo al grupo HFD, dando cuenta de la presencia de un aparente efecto negativo producto de la suplementación. Ahora bien, se ha propuesto que el requerimiento de zinc en ratas, tanto en periodo de crecimiento como de mantención, corresponde a 12 mg de zinc/kg de dieta (National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal, 1995), mientras que en esta investigación se han utilizado concentraciones de 250 mg de zinc por kg de dieta, concentración elevada que, pese a no alcanzar niveles tóxicos, ha mostrado que puede llevar al desarrollo de deficiencia de Cobre



(Cu) cuando el consumo de este último mineral es proporcionalmente bajo, lo cual se ha relacionado con efectos pro oxidantes en el organismo (Sandstead, 1995). En particular, altas ingestas de zinc afectarían la absorción de Cu (DiSilvestro & Cousins, 1983) debido a su capacidad para regular la síntesis de MT en las células de la mucosa intestinal, las cuales en parte controlan el ingreso de Cu al cuerpo. Cuando las células de las mucosas son ricas en MT, poco cobre es absorbido y, por el contrario, es regresado al lumen intestinal cuando las células de la mucosa se renuevan (Sandstead, 1995). Además, elevadas concentraciones de zinc pueden desplazar competitivamente al Cu desde su proteína de unión y transportadora en el organismo, contribuyendo al desarrollo de deficiencia (Prasad & Bao, 2019). En consecuencia, la reducción en los niveles de Cu llevaría a la disminución en la expresión y actividad de enzimas dependientes de cobre, como la ceruloplasmina, citocromo c oxidasa y la Cu-Zn SOD que posee un rol clave en la respuesta antioxidante. Esto ha llevado a destacar la relevancia de administrar cantidades suficientes y proporcionales de Cu en paralelo a la administración suplementaria de zinc (Maret & Sandstead, 2006). Sumada a la alta concentración de zinc suplementada en esta investigación, es probable que la dieta HFD debido a su composición basada principalmente en alimentos ultra procesados (paté de cerdo, chocolate blanco, papas fritas y galletas) contenga una baja cantidad de micronutrientes, incluyendo un reducido contenido en Cu, o al menos proporcionalmente bajo en comparación al zinc administrado. Por tanto, una posible explicación para los resultados observados en el grupo Zn y, en parte ZnEx es que, debido a un elevado consumo de zinc por tiempo prolongado en contraste con una ingesta no proporcional de Cu, los grupos suplementados hayan visto afectada parte de su respuesta antioxidante producto de un deterioro en su estado nutricional de Cu. Sin perjuicio de lo anterior, es importante destacar que la respuesta antioxidante es un fenómeno amplio y complejo, en el cual participan una serie de diversos componentes (Chan & Decker, 1994; Zuo & Pannell, 2015) y en esta investigación se ha estudiado solo una parte de esta. Es por esta razón, que en futuras investigaciones se sugiere integrar el análisis de variables como el contenido de zinc en el tejido estudiado y la ingesta y estatus nutricional de Cu y otros minerales que puedan verse influidos por la suplementación de elevadas concentraciones de zinc, además de analizar distintas dosis de suplementación y marcadores de daño oxidativo que permitan diferenciar el efecto del consumo elevado de zinc en el músculo sobre la respuesta antioxidante.

Por su parte, es reconocido que la actividad física posee efectos positivos sobre la regulación de la glicemia, parámetros metabólicos y el estatus inflamatorio (Church et al., 2010; Hajizadeh Maleki & Tartibian, 2018; Nunes et al., 2016; Zanuso et al., 2017). En tanto, los efectos del ejercicio sobre el estrés oxidativo, aunque han mostrado ser positivos, exhiben una alta dependencia de la modalidad de entrenamiento utilizada y el estado de salud inicial de los pacientes (Oliveira et al., 2020; Poblete-Aro et al., 2018). En cuanto al ejercicio de fuerza y la contracción muscular se ha propuesto que estos podrían estimular la respuesta antioxidante a través de la inducción de NRF2 (Vargas-Mendoza et al., 2019; Yamada et al., 2019). Sin embargo, son pocos los estudios que han incluido un protocolo de entrenamiento isométrico de larga duración para el fortalecimiento muscular y estudiado su impacto en el estrés oxidativo como en la presente investigación. Neves et al. comparó el efecto de un entrenamiento de fuerza dinámico (DRT) vs isométrico (IRT) 5 veces/semana durante 12 semanas en la capacidad redox muscular, el estado inflamatorio, la fuerza e hipertrofia muscular de ratas Wistar sanas. Además, al grupo IRT se le añadió cargas del 30% del Peso de Carga Máxima. El grupo DRT mostró mejoras significativas en la homeostasis glicémica, el estatus redox y el balance inflamatorio en comparación al control y el grupo IRT. En particular, el grupo IRT mostró niveles de óxido nítrico, actividad de catalasa y niveles de glutatión (GSH, GSSG y GSH/GSSG) en el músculo tibial anterior sin diferencias al grupo control, mientras que la capacidad antioxidante total (equivalentes trolox) y la actividad de SOD resultaron menores en el grupo IRT (diferencia no estadísticamente significativa). De forma similar al estudio de Neves et al., en nuestra investigación el entrenamiento de fuerza isométrico no mostró efectos estadísticamente significativos sobre los parámetros antioxidantes. En particular, al igual que el tratamiento con zinc, la expresión de *Nrf2* (diferencia estadísticamente significativa) y enzimas antioxidantes, y la actividad de Catalasa resultó menor en el grupo Ex en comparación al grupo HFD. Sin embargo, el entrenamiento parece haber tenido un efecto positivo de baja intensidad sobre el estado oxidativo en el músculo gastrocnemio, logrando una relación GSH/GSSG levemente mayor que el grupo HFD, aunque significativamente menor en comparación al grupo CE. Esta idea parece verse reforzada al observar una relación negativa de moderada intensidad al correlacionar los niveles de GSSG con el MHT en la semana 12. Por tanto, es posible que el entrenamiento haya influenciado la respuesta antioxidante por medio de factores no estudiados en esta investigación e independientes

de NRF2, debido a que el grupo Ex presentó la menor expresión de este factor de transcripción. Peters et al. encontró que un entrenamiento isométrico de 6 semanas en adultos hipertensos, basado en contracciones de 45 segundos utilizando el dinamómetro de mano, produjo mejoras en las defensas antioxidantes medidas por la relación GSH/GSSG en plasma en comparación al inicio de la intervención, mientras que no se observaron modificaciones en los demás parámetros antioxidantes estudiados (Peters et al., 2006). Tal como se observó en el estudio de Neves et al., el tipo de ejercicio, así como su intensidad y frecuencia jugarían un rol relevante en las modificaciones a nivel muscular, incluyendo los parámetros oxidativos. Además, logró observar que las mejoras en el perfil glicémico se asociaron a mejoras en el estatus redox (Neves et al., 2019). Kruger et al., pese a no haber estudiado los efectos del entrenamiento isométrico sobre la respuesta antioxidante, comparó los efectos del entrenamiento de fuerza isométrico con un entrenamiento aeróbico, encontrando que este último generó una mayor mejora en la tolerancia a la glucosa en ratones obesos y un aumento significativo en los niveles de GLUT4 en el músculo gastrocnemio, lo cual podría estar relacionado con mejoras en el perfil oxidativo (Krüger et al., 2013). Por tanto, es posible que el protocolo de entrenamiento utilizado en la presente investigación no haya tenido la intensidad suficiente para producir mejoras significativas en la respuesta antioxidante en contraste a lo observado con ejercicio de fuerza dinámico o ejercicio aeróbico, especialmente considerando que no se observaron mejoras en el perfil glicémico producto de la intervención. Por otro lado, es importante considerar que a diferencia de otras investigaciones, este estudio contó con ratas diabéticas que fueron expuestas a HFD por un periodo prolongado (30 semanas), probablemente alterando su capacidad de respuesta metabólica y antioxidante al entrenamiento, así como se ha observado en otros estudios, donde los animales diabéticos entrenados presentaron niveles de actividad enzimática antioxidante en plasma menores a los grupos diabéticos control (Bicer et al., 2012).

Tal como se mencionó previamente, a diferencia de lo esperado, la intervención combinada con zinc y entrenamiento de fuerza no mostró un aumento significativo sobre los parámetros de la respuesta antioxidante estudiados en comparación al grupo HFD. El análisis estadístico (ANOVA de dos vías) mostró una influencia significativa producto del tratamiento combinado sobre la expresión de *Nrf2* y *Cat*, sin embargo, dichos parámetros

no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el grupo ZnEx en comparación al resto de los grupos. Sin perjuicio de lo anterior, es posible observar una tendencia no significativa al aumento en los niveles de expresión de *Nrf2* en el grupo ZnEx en comparación al grupo Zn y Ex, y en los niveles de expresión de *Cat* en comparación al grupo Zn, Ex y HFD. Además, se observó una correlación positiva de moderada intensidad entre los niveles de expresión de *Nrf2* y *Cat*. Esto podría dar cuentas de la existencia de un efecto positivo sinérgico entre ambas intervenciones sobre la expresión de *Nrf2*, y parcialmente a través de la acción de este último, sobre la expresión de *Cat*. Ahora bien, es probable que la intensidad de estos efectos se haya visto influida por los factores discutidos en los párrafos previos. Sumado a lo anterior, los niveles de expresión génica de *Cat* no se correlacionaron con su actividad enzimática, lo cual podría estar asociado a mecanismos de regulación post transcripcional de la expresión final de la enzima (Sadi et al., 2014). En paralelo, se observó que el tratamiento combinado redujo los niveles de GSH/GSSG y la actividad de catalasa, aunque en un grado menor que la suplementación aislada con zinc y un poco mayor que el entrenamiento aislado. Esto podría indicar un posible efecto antagónico de ambas intervenciones en dichos parámetros en el músculo gastrocnemio, en donde el entrenamiento parecería contrarrestar parcialmente los aparentes efectos del zinc. Sin embargo, es relevante mencionar que la relación GSH/GSSG presentó una tendencia no significativa al aumento en el grupo ZnEx en comparación al grupo HFD, aunque de menor intensidad que en el grupo Ex. El ejercicio ha mostrado tener un importante efecto sobre la regulación de la homeostasis del zinc. En particular se ha observado un aumento en la expresión y niveles de MT producto del ejercicio en distintos tejidos, incluyendo el músculo gastrocnemio (Saxena et al., 2010), tejido aórtico (Bobillier et al., 2001), células del túbulo proximal renal (Podhorska-Okolów et al., 2006), hipocampo (Ni et al., 2011) y médula espinal (Hashimoto et al., 2009). Las MT resultan claves en la regulación de los niveles de zinc y su distribución en el espacio intracelular, y frente a elevadas concentraciones de este mineral lo unen fuertemente, pudiendo además secuestrarlo hacia organelos o exportarlo de la célula (Palmiter, 2004). Por otro lado, el ejercicio ha mostrado regular positivamente a distintos transportadores intracelulares de zinc, pudiendo favorecer su movilización desde el citosol a organelos celulares (Ni et al., 2011). Sumado a lo anterior, el ejercicio contribuiría a la redistribución del zinc no solo a nivel celular sino a lo largo del organismo. Es así, que luego de 10

semanas de entrenamiento en hombres jóvenes se observó un aumento de los niveles de zinc en plasma y una reducción en eritrocitos (Toro-Román et al., 2022), mientras que el entrenamiento prolongado en el tiempo en ratas mostró una disminución de los niveles de zinc en el músculo soleo y gastrocnemio, en paralelo a un aumento a nivel renal (Kuru et al., 2003). De esta forma, y considerando lo discutido previamente, es posible que el entrenamiento haya favorecido la redistribución de los niveles de zinc a través de distintas vías, influyendo positivamente sobre su homeostasis y contribuyendo a la disminución de posibles efectos negativos sobre los parámetros antioxidantes estudiados producto de una elevada administración de zinc.

Resulta llamativo que los grupos tratados con zinc y/o entrenados mostraron una concentración de GSht ( $0,40 \pm 0,16 \mu\text{mol/g}$  tejido promedio entre los grupos Zn, Ex y ZnEx) menor que el grupo CE ( $0,59 \pm 0,16 \mu\text{mol/g}$  de tejido) y HFD ( $0,54 \pm 0,15 \mu\text{mol/g}$ ). Esta tendencia no significativa a la disminución en los niveles de GSht podría reflejar un posible efecto de las intervenciones sobre su síntesis o eflujo desde los tejidos. Sin embargo, no se encontró evidencia en la bibliografía que permita apoyar esta idea. Sin considerar la dirección de las modificaciones en los parámetros estudiados, es interesante discutir brevemente la magnitud de los valores de GSH y GSSG encontrada en el tejido estudiado. En relación con el GSH, existe una alta heterogeneidad en la unidad utilizada para expresar los niveles de esta molécula y su contraparte oxidada, los cuales en esta investigación se han expresado en  $\mu\text{mol/g}$  de tejido, dando concentraciones aparentemente bajas y menores a 1. Mientras que la mayoría de los estudios expresan la concentración de GSH por mg de proteína, Barazzoni et al. encontró concentraciones de GSH y GSSG en torno a 200-300 pmol/mg tejido ( $0,2-0,3 \mu\text{mol/g}$  tejido) y 18-35 pmol/mg tejido ( $0,018-0,035 \mu\text{mol/g}$  tejido) en el músculo gastrocnemio de ratas sometidas a una infusión de insulina, glucosa y ácidos grasos no esterificados (Barazzoni et al., 2012), concentraciones bastante similares a las encontradas en la presente investigación. Otros estudios en el músculo gastrocnemio de ratas diabéticas han exhibido concentraciones en torno a  $\sim 8 \mu\text{M/mg}$  proteína para GSht (Sánchez-Duarte et al., 2021),  $\sim 0,7-1,8 \text{ nmol/mg}$  proteína para GSH y  $\sim 0,017 \text{ nmol/mg}$  proteína para GSSG (Diniz Vilela et al., 2016; Herlein et al., 2009). Estas diferencias en la forma de expresar el contenido de GSH dificulta la comparación con nuestros resultados, especialmente considerando que el contenido de proteína utilizado para este ensayo no fue

cuantificado. Por otro lado, es importante considerar que existen diferencias entre las metodologías utilizadas en los estudios presentados que contribuyen a la heterogeneidad de resultados. Si perjuicio de lo anterior, los valores presentados por Barazzoni et al. permitirían señalar que el contenido de GSH y GSSG en el músculo gastrocnemio presente en este estudio es comparable a los resultados obtenidos en otros estudios en el músculo gastrocnemio de ratas.

En paralelo a todo lo ya mencionado, es importante destacar que, pese a la dirección de las modificaciones observadas en los parámetros estudiados, la magnitud de las diferencias entre los grupos de intervención no logró ser estadísticamente significativa en la mayoría de los casos. De la misma forma y como ya se mencionó, la respuesta antioxidante es un fenómeno amplio, en el cual participan distintos componentes, tanto a nivel muscular como en el organismo y en este estudio se estudió solo una pequeña parte de esta en un tejido específico. Es así que, a pesar de no obtenerse los resultados esperados sobre los parámetros antioxidantes estudiados en el músculo gastrocnemio, no es posible descartar que la intervención haya tenido efectos sobre otros parámetros antioxidantes no estudiados en este u otros tejidos, y de la misma manera, no es posible asegurar que los resultados locales observados sean un reflejo global de la respuesta antioxidante y estado oxidativo en el organismo de ratas diabética tratadas con suplementación con zinc y/o entrenamiento de fuerza.

Dentro de las limitaciones de este proyecto, el efecto de la intervención sobre los niveles de NRF2 se evaluó a través de la expresión génica y no proteica de este factor de transcripción, pudiendo existir diferencias entre los niveles de mRNA y proteínas de NRF2 producto de modificaciones post transcripcionales. No se ha incluido la medición de la expresión proteica de NRF2, a través de por ejemplo western blot, debido a la cantidad limitada de muestra de tejido de músculo gastrocnemio y recursos disponibles para los análisis. Sin perjuicio de lo anterior, la evidencia ha mostrado concordancia entre la dirección del cambio en los niveles de mRNA y proteínas de NRF2 (Neilson et al., 2021). Además, la medición de la expresión génica de *Cat* y *Sod*, la cual es regulada en parte por NRF2, constituye un indicador de la actividad de esta proteína. Sumado a lo anterior, todos los marcadores estudiados fueron analizados una vez finalizado el periodo de intervención, impidiendo detectar adaptaciones, cambios a través del tiempo en dichos parámetros o

modificaciones agudas sobre estos productos del entrenamiento. Es importante destacar que durante el diseño del presente proyecto se consideró la inclusión de la determinación del daño oxidativo a través de la medición de proteínas carboniladas y/o isoprostanos, sin embargo, la cantidad de muestra necesaria para dichos ensayos, en contraste con la cantidad de muestra disponible, sumado a los recursos disponibles dentro del proyecto, impidieron la inclusión de estas determinaciones. En otro aspecto, aunque el modelo de DM2 inducida por HFD en ratas es una buena aproximación para el estudio de potenciales estrategias terapéuticas para esta enfermedad, se ha propuesto que la duración de los protocolos puede afectar el desarrollo de alteraciones fisiopatológicas (Heydemann, 2016), pudiendo limitar la interpretación de los resultados y la extrapolación de conclusiones a modelos de mayor complejidad. Sumado a lo anterior, y como se discutió en la sección “Cumplimiento de objetivos”, la medición de la actividad de SOD no pudo llevarse a cabo, pudiendo representar la pérdida de información útil para el análisis de los efectos de la intervención.

### **Conclusión**

La presente investigación estudió los efectos del tratamiento de suplementación con zinc y/o entrenamiento de fuerza isométrico sobre parámetros de la respuesta antioxidante en el músculo gastrocnemio de ratas con diabetes inducida por HFD y una pequeña dosis de STZ. La intervención combinada o aislada no produjo efectos significativamente positivos sobre los parámetros de la respuesta antioxidante estudiados, aunque se observó un leve efecto positivo de la suplementación en conjunto con entrenamiento sobre la expresión de *Nrf2* y *Cat* en comparación al tratamiento por separado. Además, el entrenamiento y el tratamiento combinado mostraron un leve efecto positivo sobre el estado oxidativo medido por GSH/GSSG. Sin embargo, la intervención mostró efectos aparentemente negativos en el resto de los indicadores, especialmente en el grupo suplementado con zinc. Sumado a lo anterior, se observó un aparente antagonismo entre los efectos de la suplementación con zinc y ejercicio de fuerza isométrica. Es posible que las características de la suplementación y la intensidad del entrenamiento hayan determinado la falta de resultados positivos producto de la intervención.

Hasta donde se sabe, esta sería la primera investigación en estudiar el efecto del tratamiento combinado con zinc y entrenamiento de fuerza isométrica sobre la respuesta

antioxidante a nivel muscular, y se han obtenido interesantes resultados que motivan a extender la investigación en esta dirección. Futuros estudios que evalúen el efecto de distintas dosis de suplementación con zinc en combinación a protocolos de entrenamiento de distintas características e intensidades sobre la respuesta antioxidante a nivel muscular son necesarios para ampliar nuestro conocimiento sobre la interacción de dichos tratamientos y su potencial efecto coadyuvante sobre la DM2.



## Bibliografía

- American Diabetes Association. (2015). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*, 38(Supplement 1), S8 LP-S16. <https://doi.org/10.2337/dc15-S005>
- American Diabetes Association. (2022). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care*, 45(Supplement 1), S17 LP-S38. <https://doi.org/10.2337/dc18-S002>
- Anderson, E. J., Lustig, M. E., Boyle, K. E., Woodlief, T. L., Kane, D. A., Lin, C.-T., Price III, J. W., Kang, L., Rabinovitch, P. S., Szeto, H. H., Houmard, J. A., Cortright, R. N., Wasserman, D. H., & Neuffer, P. D. (2009). Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(3), 573–581. <https://doi.org/10.1172/JCI37048>
- Aragno, M., Mastrocola, R., Catalano, M. G., Brignardello, E., Danni, O., & Boccuzzi, G. (2004). Oxidative Stress Impairs Skeletal Muscle Repair in Diabetic Rats. *Diabetes*, 53(4), 1082 LP – 1088. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.4.1082>
- Bachhawat, A. K., & Yadav, S. (2018). The glutathione cycle: Glutathione metabolism beyond the  $\gamma$ -glutamyl cycle. *IUBMB Life*, 70(7), 585–592. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/iub.1756>
- Baldissera, G., Sperotto, N. D. M., Rosa, H. T., Henn, J. G., Peres, V. F., Moura, D. J., Roehrs, R., Denardin, E. L. G., Dal Lago, P., Nunes, R. B., & Saffi, J. (2016). Effects of crude hydroalcoholic extract of *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaves and continuous aerobic training in rats with diabetes induced by a high-fat diet and low doses of streptozotocin. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 1012–1021. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.056>
- Baldwin, K. M., & Haddad, F. (2001). Invited Review: Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *Journal of Applied Physiology*, 90(1), 345–357. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.1.345>
- Barazzoni, R., Zanetti, M., Cappellari, G. G., Semolic, A., Boschelle, M., Codarin, E., Pirulli, A., Cattin, L., & Guarnieri, G. (2012). Fatty acids acutely enhance insulin-induced oxidative stress and cause insulin resistance by increasing mitochondrial reactive oxygen species (ROS) generation and nuclear factor- $\kappa$ B inhibitor (I $\kappa$ B)–nuclear factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) activation in rat muscle, in the . *Diabetologia*, 55(3), 773–782. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2396-x>
- Barham, A. (2018). *EFFECTO DE UN PROGRAMA DE FORTALECIMIENTO MUSCULAR SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA MEDIADA POR TLR9 , EN RATAS OBESAS y DIABÉTICAS*. Universidad de Chile.
- Bicer, M., Gunay, M., Baltaci, A., Uney, K., Mogulkoc, R., & Akil, M. (2012). Effect of zinc supplementation on lipid peroxidation and lactate levels in rats with diabetes induced by streptozotocin and subjected to acute swimming exercise. *Bratislava Medical Journal*, 113(4), 199–205. [https://doi.org/10.4149/BLL\\_2012\\_046](https://doi.org/10.4149/BLL_2012_046)
- Bobillier, S., Maupoil, V., Jacques, J., & Berthelot, A. (2001). Effect of exercise training on metallothionein levels of hypertensive rats. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 33(5).
- Bonnard, C., Durand, A., Peyrol, S., Chanseau, E., Chauvin, M.-A., Morio, B., Vidal, H., & Rieusset, J. (2008). Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(2), 789–800. <https://doi.org/10.1172/JCI32601>
- Boushel, R., Gnaiger, E., Schjerling, P., Skovbro, M., Kraunsøe, R., & Dela, F. (2007). Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. *Diabetologia*, 50(4), 790–796. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0594-3>
- Camera, D. M., Edge, J., Short, M. J., Hawley, J. A., & Coffey, V. G. (2010). Early Time Course of Akt Phosphorylation after Endurance and Resistance Exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 42(10).
- Chan, K. M., & Decker, E. A. (1994). Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(4), 403–426. <https://doi.org/10.1080/10408399409527669>
- Christensen, A. A., & Gannon, M. (2019). The Beta Cell in Type 2 Diabetes. *Current Diabetes Reports*, 19(9), 81. <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1196-4>
- Church, T. S., Blair, S. N., Cocreham, S., Johannsen, N., Johnson, W., Kramer, K., Mikus, C. R., Myers, V., Nauta, M., Rodarte, R. Q., Sparks, L., Thompson, A., & Earnest, C. P. (2010). Effects of Aerobic and Resistance Training on Hemoglobin A1c Levels in Patients With Type 2 Diabetes : A Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 304(20), 2253–2262. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1710>
- Cole, S. P. C., & Deeley, R. G. (2006). Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(8), 438–446. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.06.008>
- Cuadrado, A., Rojo, A. I., Wells, G., Hayes, J. D., Cousin, S. P., Rumsey, W. L., Attucks, O. C., Franklin, S., Levonen, A.-L., Kensler, T. W., & Dinkova-Kostova, A. T. (2019). Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(4), 295–317. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0008-x>
- Culotta, V. C., Yang, M., & O'Halloran, T. V. (2006). Activation of superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(7), 747–758. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.05.003>
- Deshmukh, A. S. (2016). Insulin-stimulated glucose uptake in healthy and insulin-resistant skeletal muscle. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 26(1), 13–24. <https://doi.org/doi:10.1515/hmbci-2015-0041>
- Deshpande, A. D., Harris-Hayes, M., & Schootman, M. (2008). Epidemiology of Diabetes and Diabetes-Related Complications. *Physical Therapy*, 88(11), 1254–1264. <https://doi.org/10.2522/ptj.20080020>
- Di Meo, S., Iossa, S., & Venditti, P. (2017). Skeletal muscle insulin resistance: role of mitochondria and other ROS sources. *Journal of Endocrinology*, 233(1), R15–R42.

- <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0598>
- Diniz Vilela, D., Gomes Peixoto, L., Teixeira, R. R., Belele Baptista, N., Carvalho Caixeta, D., Vieira de Souza, A., Machado, H. L., Pereira, M. N., Sabino-Silva, R., & Espindola, F. S. (2016). The Role of Metformin in Controlling Oxidative Stress in Muscle of Diabetic Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 6978625. <https://doi.org/10.1155/2016/6978625>
- DiSilvestro, R. A., & Cousins, R. J. (1983). Physiological Ligands for Copper and Zinc. *Annual Review of Nutrition*, 3(1), 261–288. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.03.070183.001401>
- dos Santos, J. M., de Oliveira, D. S., Moreli, M. L., & Benite-Ribeiro, S. A. (2018). The role of mitochondrial DNA damage at skeletal muscle oxidative stress on the development of type 2 diabetes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 449(1), 251–255. <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3361-5>
- Drevet, J. R. (2006). The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 250(1), 70–79. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.027>
- Einarson, T. R., Acs, A., Ludwig, C., & Panton, U. H. (2018). Economic Burden of Cardiovascular Disease in Type 2 Diabetes: A Systematic Review. *Value in Health*, 21(7), 881–890. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2017.12.019>
- El-Agamey, A., Lowe, G. M., McGarvey, D. J., Mortensen, A., Phillip, D. M., Truscott, T. G., & Young, A. J. (2004). Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430(1), 37–48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.03.007>
- Fernández-Cao, J. C., Warthon-Medina, M., H. Moran, V., Arijia, V., Doepking, C., Serra-Majem, L., & Lowe, N. M. (2019). Zinc Intake and Status and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. In *Nutrients* (Vol. 11, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/nu11051027>
- Fisher-Wellman, K. H., & Neuffer, P. D. (2012). Linking mitochondrial bioenergetics to insulin resistance via redox biology. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(3), 142–153. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.12.008>
- Frigero, M., dos Santos, S. A., Serra, A. J., dos Santos Monteiro Machado, C., Portes, L. A., Tucci, P. J. F., Silva, F., Leal-Junior, E. C., & de Carvalho, P. de T. C. (2018). Effect of photobiomodulation therapy on oxidative stress markers of gastrocnemius muscle of diabetic rats subjected to high-intensity exercise. *Lasers in Medical Science*, 33(8), 1781–1790. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2540-7>
- Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(6), 1583–1606. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999>
- García-Díaz, D., Campión, J., Milagro, F. I., & Martínez, J. A. (2007). Adiposity dependent apelin gene expression: relationships with oxidative and inflammation markers. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 305(1), 87–94. <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9531-5>
- Gaster, M., Rustan, A. C., Aas, V., & Beck-Nielsen, H. (2004). Reduced Lipid Oxidation in Skeletal Muscle From Type 2 Diabetic Subjects May Be of Genetic Origin. *Diabetes*, 53(3), 542 LP – 548. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.3.542>
- Gheibi, S., Kashfi, K., & Ghasemi, A. (2017). A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: Incorporating a high-fat diet and streptozotocin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 605–613. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.098>
- Goodpaster, B. H., Theriault, R., Watkins, S. C., & Kelley, D. E. (2000). Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 49(4), 467–472. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(00\)80010-4](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(00)80010-4)
- Grgic, J., Homolak, J., Mikulic, P., Botella, J., & Schoenfeld, B. J. (2018). Inducing hypertrophic effects of type I skeletal muscle fibers: A hypothetical role of time under load in resistance training aimed at muscular hypertrophy. *Medical Hypotheses*, 112, 40–42. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mehy.2018.01.012>
- Haeusler, R. A., McGraw, T. E., & Accili, D. (2018). Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(1), 31–44. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.89>
- Hajizadeh Maleki, B., & Tartibian, B. (2018). Resistance exercise modulates male factor infertility through anti-inflammatory and antioxidative mechanisms in infertile men: A RCT. *Life Sciences*, 203, 150–160. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.039>
- Hashimoto, K., Hayashi, Y., Inuzuka, T., & Hozumi, I. (2009). Exercise induces metallothioneins in mouse spinal cord. *Neuroscience*, 163(1), 244–251. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.05.067>
- Hebert, S. L., & Nair, K. S. (2010). Protein and energy metabolism in type 1 diabetes. *Clinical Nutrition*, 29(1), 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2009.09.001>
- Herlein, J. A., Fink, B. D., O'Malley, Y., & Sivitz, W. I. (2009). Superoxide and Respiratory Coupling in Mitochondria of Insulin-Deficient Diabetic Rats. *Endocrinology*, 150(1), 46–55. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0404>
- Hess, S. Y., Peerson, J. M., King, J. C., & Brown, K. H. (2007). Use of Serum Zinc Concentration as an Indicator of Population Zinc Status. *Food and Nutrition Bulletin*, 28(3\_suppl3), S403–S429. <https://doi.org/10.1177/15648265070283S303>
- Heydemann, A. (2016). An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 2902351. <https://doi.org/10.1155/2016/2902351>
- Hodakoski, C., Hopkins, B. D., Barrows, D., Mense, S. M., Keniry, M., Anderson, K. E., Kern, P. A., Hawkins, P. T., Stephens, L. R., & Parsons, R. (2014). Regulation of PTEN inhibition by the pleckstrin homology domain of P-REX2 during insulin signaling and glucose homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), 155 LP – 160. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213773111>
- Hubbard, S. R. (2013). The Insulin Receptor: Both a Prototypical and Atypical Receptor Tyrosine Kinase. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008946>
- Jarosz, M., Olbert, M., Wyszogrodzka, G., Młyniec, K., &

- Librowski, T. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- $\kappa$ B signaling. *Inflammopharmacology*, 25(1), 11–24. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0309-4>
- Jenkins, R. R. (1981). Catalase activity in skeletal muscle of varying fibre types. *Experientia*, 37(1), 67–68. <https://doi.org/10.1007/BF01965573>
- Kamei, Y., Miura, S., Suzuki, M., Kai, Y., Mizukami, J., Taniguchi, T., Mochida, K., Hata, T., Matsuda, J., Aburatani, H., Nishino, I., & Ezaki, O. (2004). Skeletal Muscle FOXO1 (FKHR) Transgenic Mice Have Less Skeletal Muscle Mass, Down-regulated Type I (Slow Twitch/Red Muscle) Fiber Genes, and Impaired Glycemic Control \* [boxs]. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 41114–41123. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400674200>
- Kelley, D. E., He, J., Menshikova, E. V., & Ritov, V. B. (2002). Dysfunction of Mitochondria in Human Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 51(10), 2944 LP – 2950. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.10.2944>
- Kelley, D. E., Williams, K. V., & Price, J. C. (1999). Insulin regulation of glucose transport and phosphorylation in skeletal muscle assessed by PET. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 277(2), E361–E369. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1999.277.2.E361>
- Khodavirdipour, A., Haddadi, F., & Keshavarzi, S. (2020). Chromium Supplementation; Negotiation with Diabetes Mellitus, Hyperlipidemia and Depression. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 19(1), 585–595. <https://doi.org/10.1007/s40200-020-00501-8>
- Kido, K., Ato, S., Yokokawa, T., Makanae, Y., Sato, K., & Fujita, S. (2016). Acute resistance exercise-induced IGF1 expression and subsequent GLUT4 translocation. *Physiological Reports*, 4(16), e12907. <https://doi.org/https://doi.org/10.14814/phy2.12907>
- Kirkman, H. N., & Gaetani, G. F. (2007). Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.003>
- Klip, A., Sun, Y., Chiu, T. T., & Foley, K. P. (2014). Signal transduction meets vesicle traffic: the software and hardware of GLUT4 translocation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 306(10), C879–C886. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00069.2014>
- Kolterman, O. G., Gray, R. S., Griffin, J., Burstein, P., Insel, J., Scarlett, J. A., & Olefsky, J. M. (1981). Receptor and postreceptor defects contribute to the insulin resistance in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation*, 68(4), 957–969. <https://doi.org/10.1172/JCI110350>
- Krüger, K., Gessner, D. K., Seimetz, M., Banisch, J., Ringseis, R., Eder, K., Weissmann, N., & Mooren, F. C. (2013). Functional and Muscular Adaptations in an Experimental Model for Isometric Strength Training in Mice. *PLOS ONE*, 8(11), e79069.
- Kuru, O., Sentürk, Ü. K., Gündüz, F., Aktekin, B., & Aktekin, M. R. (2003). Effect of long-term swimming exercise on zinc, magnesium, and copper distribution in aged rats. *Biological Trace Element Research*, 93(1), 105–111. <https://doi.org/10.1385/BTER:93:1-3:105>
- L, J., & Jh, L. (2000). Antioxidant defense: effects of aging and exercise. In Z. Radak (Ed.), *Free radicals in exercise and aging* (1st ed., pp. 35–72). Human Kinetics.
- Lammi-Keefe, C. J., Swan, P. B., & Hegarty, P. V. J. (1984). Evidence for Increased Peroxidative Activity in Muscles from Streptozotocin-Diabetic Rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 176(1), 27–31. <https://doi.org/10.3181/00379727-176-41837>
- Latva-Rasku, A., Honka, M.-J., Stančáková, A., Koistinen, H. A., Kuusisto, J., Guan, L., Manning, A. K., Stringham, H., Gloyn, A. L., Lindgren, C. M., Collins, F. S., Mohlke, K. L., Scott, L. J., Karjalainen, T., Nummenmaa, L., Boehnke, M., Nuutila, P., & Laakso, M. (2018). A Partial Loss-of-Function Variant in  $\text{AKT2}$  Is Associated With Reduced Insulin-Mediated Glucose Uptake in Multiple Insulin-Sensitive Tissues: A Genotype-Based Callback Positron Emission Tomography Study. *Diabetes*, 67(2), 334 LP – 342. <https://doi.org/10.2337/db17-1142>
- Lee, O.-H., Jain, A. K., Papusha, V., & Jaiswal, A. K. (2007). An Auto-regulatory Loop between Stress Sensors  $\text{I}n\text{r}2$  and  $\text{Nrf}2$  Controls Their Cellular Abundance \*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(50), 36412–36420. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706517200>
- Lee, S., Chanoit, G., McIntosh, R., Zvara, D. A., & Xu, Z. (2009). Molecular mechanism underlying Akt activation in zinc-induced cardioprotection. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 297(2), H569–H575. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00293.2009>
- Lee, S. R. (2018). Critical Role of Zinc as Either an Antioxidant or a Prooxidant in Cellular Systems. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 9156285. <https://doi.org/10.1155/2018/9156285>
- Li, B., Cui, W., Tan, Y., Luo, P., Chen, Q., Zhang, C., Qu, W., Miao, L., & Cai, L. (2014). Zinc is essential for the transcription function of  $\text{Nrf}2$  in human renal tubule cells in vitro and mouse kidney in vivo under the diabetic condition. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(5), 895–906. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jcmm.12239>
- Livingstone, C. (2013). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and clinical nutrition. *Clinical Science*, 125(6), 265–280. <https://doi.org/10.1042/CS20120663>
- Lönnerdal, B. (2000). Dietary factors influencing zinc absorption. *The Journal of Nutrition*, 130(5S Suppl), 1378S–83S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1378S>
- Lowe, N. M., Fekete, K., & Decsi, T. (2009). Methods of assessment of zinc status in humans: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89(6), 2040S–2051S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27230G>
- Maret, W., & Sandstead, H. H. (2006). Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 20(1), 3–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2006.01.006>
- Mariani, E., Mangialasche, F., Feliziani, F. T., Cecchetti, R., Malavolta, M., Bastiani, P., Baglioni, M., Dedoussis, G., Fulop, T., Herbein, G., Jajte, J., Monti, D., Rink, L., Mocchegiani, E., & Mecocci, P. (2008). Effects of zinc supplementation on antioxidant enzyme activities in healthy old subjects. *Experimental Gerontology*, 43(5), 445–451. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.10.012>
- Marreiro, D. D., Cruz, K. J., Morais, J. B., Beserra, J. B., Severo, J. S., & De Oliveira, A. R. (2017). Zinc and Oxidative

- Stress: Current Mechanisms. In *Antioxidants* (Vol. 6, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/antiox6020024>
- McMahon, M., Lamont, D. J., Beattie, K. A., & Hayes, J. D. (2010). Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(44), 18838 LP – 18843. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007387107>
- Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). GLUTATHIONE. *Annual Review of Biochemistry*, *52*(1), 711–760. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.003431>
- Mi-Kyoung, K., Ken, I., Masayuki, Y., & W., K. T. (2002). Enhanced Expression of the Transcription Factor Nrf2 by Cancer Chemopreventive Agents: Role of Antioxidant Response Element-Like Sequences in the nrf2 Promoter. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(9), 2883–2892. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.9.2883-2892.2002>
- Ministerio de Salud. (2018). Encuesta Nacional de Salud 2016-2017: Diabetes Mellitus. In *Informe Encuesta Nacional de Salud 2016-2017*.
- Miyazawa, T., Burdeos, G. C., Itaya, M., Nakagawa, K., & Miyazawa, T. (2019). Vitamin E: Regulatory Redox Interactions. *IUBMB Life*, *71*(4), 430–441. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/iub.2008>
- Moghetti, P., Bacchi, E., Brangani, C., Donà, S., & Negri, C. (2016). Metabolic Effects of Exercise. In *Frontiers of Hormone Research* (Vol. 47, pp. 44–57). <https://doi.org/10.1159/000445156>
- Morgan, B., Ezeriņa, D., Amoako, T. N. E., Riemer, J., Seedorf, M., & Dick, T. P. (2013). Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis. *Nature Chemical Biology*, *9*(2), 119–125. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1142>
- Myers, S. A. (2015). Zinc Transporters and Zinc Signaling: New Insights into Their Role in Type 2 Diabetes. *International Journal of Endocrinology*, *2015*, 167503. <https://doi.org/10.1155/2015/167503>
- National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal. (1995). Nutrient Requirements of the Laboratory Rat. In National Academies Press (US) (Ed.), *Nutrient Requirements of Laboratory Animals* (Fourth Rev, pp. 11–79).
- Nazem, M. R., Asadi, M., Jabbari, N., & Allameh, A. (2019). Effects of zinc supplementation on superoxide dismutase activity and gene expression, and metabolic parameters in overweight type 2 diabetes patients: A randomized, double-blind, controlled trial. *Clinical Biochemistry*, *69*, 15–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.05.008>
- Neilson, L. E., Quinn, J. F., & Gray, N. E. (2021). Peripheral Blood NRF2 Expression as a Biomarker in Human Health and Disease. In *Antioxidants* (Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/antiox10010028>
- Neves, R. V. P., Rosa, T. S., Souza, M. K., Oliveira, A. J. C., Gomes, G. N. S., Brix, B., Souza, L. H. R., Deus, L. A., Simões, H. G., Stone, W. J., Prestes, J., & Moraes, M. R. (2019). Dynamic, Not Isometric Resistance Training Improves Muscle Inflammation, Oxidative Stress and Hypertrophy in Rats. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 10).
- Newsholme, P., Cruzat, V., Arfuso, F., & Keane, K. (2014). Nutrient regulation of insulin secretion and action. *Journal of Endocrinology*, *221*(3), R105–R120. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0616>
- Ni, H., Li, C., Feng, X., & Cen, J. (2011). Effects of Forced Running Exercise on Cognitive Function and Its Relation to Zinc Homeostasis-Related Gene Expression in Rat Hippocampus. *Biological Trace Element Research*, *142*(3), 704–712. <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8793-z>
- Nunes, P. R. P., Barcelos, L. C., Oliveira, A. A., Furlanetto Júnior, R., Martins, F. M., Orsatti, C. L., Resende, E. A. M. R., & Orsatti, F. L. (2016). Effect of resistance training on muscular strength and indicators of abdominal adiposity, metabolic risk, and inflammation in postmenopausal women: controlled and randomized clinical trial of efficacy of training volume. *AGE*, *38*(2), 40. <https://doi.org/10.1007/s11357-016-9901-6>
- Oberbach, A., Bossenz, Y., Lehmann, S., Niebauer, J., Adams, V., Paschke, R., Schön, M. R., Blüher, M., & Punkt, K. (2006). Altered Fiber Distribution and Fiber-Specific Glycolytic and Oxidative Enzyme Activity in Skeletal Muscle of Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, *29*(4), 895 LP – 900. <https://doi.org/10.2337/diacare.29.04.06.dc05-1854>
- Ogurtsova, K., da Rocha Fernandes, J. D., Huang, Y., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Cho, N. H., Cavan, D., Shaw, J. E., & Makaroff, L. E. (2017). IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *128*, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.03.024>
- Oliveira, E. M. de, Ribeiro, A. K. P. de L., Silva, D. D. de O., Nunes, E. F. C., Santos, G. S., Kietzer, K. S., & Carvalho, P. de T. C. de. (2020). PHYSICAL TRAINING ON GLYCEMIA AND OXIDATIVE STRESS IN TYPE 2 DIABETES: A SYSTEMATIC REVIEW. *Rev Bras Med Esporte*, *26*(1), 70–76. <https://doi.org/10.1590/1517-869220202601187572>
- Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.-H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S. K., & Levine, M. (2003). Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, *22*(1), 18–35. <https://doi.org/10.1080/07315724.2003.10719272>
- Palmiter, R. (2004). Protection against zinc toxicity by metallothionein and zinc transporter 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(14), 4918–4923. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401022101>
- Papatheodorou, K., Banach, M., Bekiari, E., Rizzo, M., & Edmonds, M. (2018). Complications of Diabetes 2017. *Journal of Diabetes Research*, *2018*, 3086167. <https://doi.org/10.1155/2018/3086167>
- Park, S. W., Goodpaster, B. H., Strotmeyer, E. S., Kuller, L. H., Broudeau, R., Kammerer, C., de Rekeneire, N., Harris, T. B., Schwartz, A. V., Tylavsky, F. A., Cho, Y., & Newman, A. B. (2007). Accelerated Loss of Skeletal Muscle Strength in Older Adults With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, *30*(6), 1507 LP – 1512. <https://doi.org/10.2337/dc06-2537>
- Pesta, D. H., Goncalves, R. L. S., Madiraju, A. K., Strasser, B., & Sparks, L. M. (2017). Resistance training to improve type 2 diabetes: working toward a prescription for the future. *Nutrition & Metabolism*, *14*(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s12986-017-0173-7>

- Peters, P. G., Alessio, H. M., Hagerman, A. E., Ashton, T., Nagy, S., & Wiley, R. L. (2006). Short-term isometric exercise reduces systolic blood pressure in hypertensive adults: Possible role of reactive oxygen species. *International Journal of Cardiology*, *110*(2), 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2005.07.035>
- Petersen, K. F., Befroy, D., Dufour, S., Dziura, J., Ariyan, C., Rothman, D. L., DiPietro, L., Cline, G. W., & Shulman, G. I. (2003). Mitochondrial Dysfunction in the Elderly: Possible Role in Insulin Resistance. *Science*, *300*(5622), 1140 LP – 1142. <https://doi.org/10.1126/science.1082889>
- Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. In S. Bustin (Ed.), *In A–Z of Quantitative PCR*. La Jolla: International University Line.
- Piao, F., Yokoyama, K., Ma, N., & Yamauchi, T. (2003). Subacute toxic effects of zinc on various tissues and organs of rats. *Toxicology Letters*, *145*(1), 28–35. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00261-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00261-3)
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Poblete-Aro, C., Russell-Guzmán, J., Parra, P., Soto-Muñoz, M., Villegas-González, B., Cofré-Bola-Dos, C., Herrera-Valenzuela, T., Poblete-Aro, C., Russell-Guzmán, J., Parra, P., Soto-Muñoz, M., Villegas-González, B., Cofré-Bola-Dos, C., & Herrera-Valenzuela, T. (2018). Efecto del ejercicio físico sobre marcadores de estrés oxidativo en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Revista Médica de Chile*, *146*(3), 362–372. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872018000300362>
- Podany, A., Rauchut, J., Wu, T., Kawasawa, Y. I., Wright, J., Lamendella, R., Soybel, D. I., & Kelleher, S. L. (2019). Excess Dietary Zinc Intake in Neonatal Mice Causes Oxidative Stress and Alters Intestinal Host–Microbe Interactions. *Molecular Nutrition & Food Research*, *63*(3), 1800947. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mnfr.201800947>
- Podhorska-Okolów, M., Dziegiel, P., Dolińska-Krajewska, B., Dumańska, M., Cegielski, M., Jethon, Z., Rossini, K., Carraro, U., & Zabel, M. (2006). Expression of metallothionein in renal tubules of rats exposed to acute and endurance exercise. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, *44*(3), 195–200.
- Poitras, V. J., Hudson, R. W., & Tschakovsky, M. E. (2018). Exercise intolerance in Type 2 diabetes: is there a cardiovascular contribution? *Journal of Applied Physiology*, *124*(5), 1117–1139. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00070.2017>
- Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiological Reviews*, *88*(4), 1243–1276. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2007>
- Prasad, A. S., & Bao, B. (2019). Molecular Mechanisms of Zinc as a Pro-Antioxidant Mediator: Clinical Therapeutic Implications. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *8*(6), 164. <https://doi.org/10.3390/antiox8060164>
- Prior, B. M., Yang, H. T., & Terjung, R. L. (2004). What makes vessels grow with exercise training? *Journal of Applied Physiology*, *97*(3), 1119–1128. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00035.2004>
- Pupim, L., Flakoll, P., Majchrzak, K., Aftab Guy, D., Stenvinkel, P., & Alp Ikizler, T. (2005). Increased muscle protein breakdown in chronic hemodialysis patients with type 2 diabetes mellitus. *Kidney International*, *68*(4), 1857–1865. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00605.x>
- Pupim, L., Heimbürger, O., Qureshi, A. R., Ikizler, T., & Stenvinkel, P. (2005). Accelerated lean body mass loss in incident chronic dialysis patients with diabetes mellitus. *Kidney International*, *68*(5), 2368–2374. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00699.x>
- Rahman, I., Kode, A., & Biswas, S. K. (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, *1*(6), 3159–3165. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>
- Regensteiner, J. G., Sippel, J., McFarling, E. T., Wolfel, E. E., & Hiatt, W. R. (1995). Effects of non-insulin-dependent diabetes on oxygen consumption during treadmill exercise. In *Medicine & Science in Sports & Exercise* (Vol. 27, Issue 5, pp. 661–667). Lippincott Williams & Wilkins. <https://doi.org/10.1249/00005768-199505000-00007>
- Sadi, G., Bozan, D., & Yildiz, H. B. (2014). Redox regulation of antioxidant enzymes: post-translational modulation of catalase and glutathione peroxidase activity by resveratrol in diabetic rat liver. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *393*(1), 111–122. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2051-1>
- San Mauro Martín, I., Ruiz León, A. M., Camina Martín, M. A., Garicano Vila, E., Collado-Yurrita, L., Mateo-Silleras, B. de, & Redondo del Río, M. de P. (2016). Chromium supplementation in patients with type 2 diabetes and high risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. In *Nutrición Hospitalaria* (Vol. 33, pp. 156–161). scieloes .
- Sánchez-Duarte, S., Márquez-Gamiño, S., Montoya-Pérez, R., Villicaña-Gómez, E. A., Vera-Delgado, K. S., Caudillo-Cisneros, C., Sotelo-Barroso, F., Melchor-Moreno, M. T., & Sánchez-Duarte, E. (2021). Nicorandil decreases oxidative stress in slow- and fast-twitch muscle fibers of diabetic rats by improving the glutathione system functioning. *Journal of Diabetes Investigation*, *12*(7), 1152–1161. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jdi.13513>
- Sandstead, H. H. (1995). Requirements and toxicity of essential trace elements, illustrated by zinc and copper. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *61*(3), 621S–624S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/61.3.621S>
- Saxena, S., Shukla, D., Saxena, S., Khan, Y. A., Singh, M., Bansal, A., Sairam, M., & Jain, S. K. (2010). Hypoxia preconditioning by cobalt chloride enhances endurance performance and protects skeletal muscles from exercise-induced oxidative damage in rats. *Acta Physiologica*, *200*(3), 249–263. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02136.x>
- Song, F., Jia, W., Yao, Y., Hu, Y., Lei, L., Lin, J., Sun, X., & Liu, L. (2007). Oxidative stress, antioxidant status and DNA damage in patients with impaired glucose regulation and newly diagnosed Type 2 diabetes. *Clinical Science*, *112*(12), 599–606. <https://doi.org/10.1042/CS20060323>
- Tan, S. Y., Mei Wong, J. L., Sim, Y. J., Wong, S. S., Mohamed Elhassan, S. A., Tan, S. H., Ling Lim, G. P., Rong Tay, N.

- W., Annan, N. C., Bhattamisra, S. K., & Candasamy, M. (2019). Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 13(1), 364–372. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.10.008>
- Tiwari, B. K., Pandey, K. B., Abidi, A. B., & Rizvi, S. I. (2013). Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. *Journal of Biomarkers*, 2013, 378790. <https://doi.org/10.1155/2013/378790>
- Toro-Román, V., Siquier-Coll, J., Bartolomé, I., Grijota, F. J., Muñoz, D., & Maynar-Mariño, M. (2022). Influence of physical training on intracellular and extracellular zinc concentrations. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 19(1), 110–125. <https://doi.org/10.1080/15502783.2022.2054665>
- Truong-Tran, A. Q., Ho, L. H., Chai, F., & Zalewski, P. D. (2000). Cellular Zinc Fluxes and the Regulation of Apoptosis/Gene-Directed Cell Death. *The Journal of Nutrition*, 130(5), 1459S–1466S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1459S>
- Uruno, A., Furusawa, Y., Yagishita, Y., Fukutomi, T., Muramatsu, H., Negishi, T., Sugawara, A., Kensler, T. W., & Yamamoto, M. (2013). The Keap1-Nrf2 System Prevents Onset of Diabetes Mellitus. *Molecular and Cellular Biology*, 33(15), 2996 LP – 3010. <https://doi.org/10.1128/MCB.00225-13>
- Vallee, B. L., & Falchuk, K. H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews*, 73(1), 79–118. <https://doi.org/10.1152/physrev.1993.73.1.79>
- Vargas-Mendoza, N., Morales-González, Á., Madrigal-Santillán, E. O., Madrigal-Bujaidar, E., Álvarez-González, I., García-Melo, L. F., Anguiano-Robledo, L., Fregoso-Aguilar, T., & Morales-Gonzalez, J. A. (2019). Antioxidant and Adaptive Response Mediated by Nrf2 during Physical Exercise. In *Antioxidants* (Vol. 8, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/antiox8060196>
- Vartanian, V., Tumova, J., Dobrzyn, P., Dobrzyn, A., Nakabeppu, Y., Lloyd, R. S., & Sampath, H. (2017). 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) deficiency elicits coordinated changes in lipid and mitochondrial metabolism in muscle. *PLOS ONE*, 12(7), e0181687.
- Vivero, A., Ruz, M., Rivera, M., Miranda, K., Sacristán, C., Espinosa, A., Codoceo, J., Inostroza, J., Vásquez, K., Pérez, Á., García-Díaz, D., & Arredondo, M. (2021). Zinc Supplementation and Strength Exercise in Rats with Type 2 Diabetes: Akt and PTP1B Phosphorylation in Nonalcoholic Fatty Liver. *Biological Trace Element Research*, 199(6), 2215–2224. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02324-3>
- Wang, K., Zhang, T., Dong, Q., Nice, E. C., Huang, C., & Wei, Y. (2013). Redox homeostasis: the linchpin in stem cell self-renewal and differentiation. *Cell Death & Disease*, 4(3), e537–e537. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.50>
- Wang, X., Wu, W., Zheng, W., Fang, X., Chen, L., Rink, L., Min, J., & Wang, F. (2019). Zinc supplementation improves glycemic control for diabetes prevention and management: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 110(1), 76–90. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz041>
- Wei, L., Hubbard, S. R., Hendrickson, W. A., & Ellis, L. (1995). Expression, Characterization, and Crystallization of the Catalytic Core of the Human Insulin Receptor Protein-tyrosine Kinase Domain (&#x2217;). *Journal of Biological Chemistry*, 270(14), 8122–8130. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.14.8122>
- Weydert, C. J., & Cullen, J. J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature Protocols*, 5(1), 51–66. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.197>
- Wieringa, F. T., Dijkhuizen, M. A., Fiorentino, M., Laillou, A., & Berger, J. (2015). Determination of Zinc Status in Humans: Which Indicator Should We Use? In *Nutrients* (Vol. 7, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/nu7053252>
- Workeneh, B., & Bajaj, M. (2013). The regulation of muscle protein turnover in diabetes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(10), 2239–2244. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.028>
- Yamada, M., Iwata, M., Warabi, E., Oishi, H., Lira, V. A., & Okutsu, M. (2019). p62/SQSTM1 and Nrf2 are essential for exercise-mediated enhancement of antioxidant protein expression in oxidative muscle. *The FASEB Journal*, 33(7), 8022–8032. <https://doi.org/https://doi.org/10.1096/fj.201900133R>
- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, 74(1), 139–162. <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.1.139>
- Zanuso, S., Sacchetti, M., Sundberg, C. J., Orlando, G., Benvenuti, P., & Balducci, S. (2017). Exercise in type 2 diabetes: genetic, metabolic and neuromuscular adaptations. A review of the evidence. *British Journal of Sports Medicine*, 51(21), 1533 LP – 1538. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2016-096724>
- Zuo, L., & Pannell, B. K. (2015). Redox Characterization of Functioning Skeletal Muscle. *Frontiers in Physiology*, 6, 338. <https://doi.org/doi.org/10.3389/fphys.2015.00338>

## Anexos

### Anexo 1. Programa de entrenamiento de fortalecimiento muscular

Semana/ Día	n° repeticiones x series	Resistencia externa añadida (% masa corporal)	Semana/ Día	n° repeticiones x series	Resistencia externa añadida (% masa corporal)
<b>Evaluación inicial (Semana 0)</b>			<b>Evaluación Intermedia (Semana 6)</b>		
S1/ D1	2x3	0	S7/ D1	2x3	40
S1/ D2	2x4	0	S7/ D2	2x4	15
S1/ D3	2x3	5	S7/ D3	2x3	45
S2/ D1	2x4	5	S8/ D1	2x4	40
S2/ D2	2x3	0	S8/ D2	2x3	15
S2/ D3	2x4	10	S8/ D3	2x4	45
S3/ D1	2x3	15	S9/ D1	2x3	45
S3/ D2	2x4	5	S9/ D2	2x4	20
S3/ D3	2x3	20	S9/ D3	2x3	50
S4/ D1	2x4	20	S10/ D1	2x4	45
S4/ D2	2x3	5	S10/ D2	2x3	20
S4/ D3	2x4	25	S10/ D3	2x4	50
S5/ D1	2x3	35	S11/ D1	2x3	50
S5/ D2	2x4	10	S11/ D2	2x4	25
S5/ D3	2x3	40	S11/ D3	2x3	55
S6/ D1	2x4	35	S12/ D1	2x4	50
S6/ D2	2x3	10	S12/ D2	2x3	25
S6/ D3	2x4	40	S12/ D3	2x4	55
			<b>Evaluación Final (Semana 12)</b>		



## Anexo 2. Certificado Aprobación Comité de Bioética Facultad de Medicina Universidad de Chile



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE BIOÉTICA SOBRE INVESTIGACION EN ANIMALES

### CERTIFICACIÓN


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

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

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

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

  
**Dr. Carlos Valenzuela Y.**  
Presidente (S)  
Comité de Bioética sobre Investigación en Animales



Santiago, 14 de junio de 2016.

---

Comité de Bioética sobre Investigación en Animales  
Facultad de Medicina – Universidad de Chile  
Avda. Independencia 1027, Independencia 8380453, Santiago, Chile  
Fono: 2 978 6923, Email: [cba@med.uchile.cl](mailto:cba@med.uchile.cl)



### Anexo 3. Análisis de normalidad prueba de Shapiro-Wilk

**Tabla 6. Prueba de normalidad Shapiro-wilk**

Variable dependiente	Estadístico	gl	Valor p
Peso Final Ratas	0,875	35	0,001*
Peso músculo gastrocnemio	0,965	35	0,331
Relación peso GC/Peso corporal	0,975	35	0,606
Glicemia Final	0,952	33	0,152
IPGTT 120	0,928	35	0,025*
Hb1Ac	0,569	35	0,000*
Insulina Plasma	0,589	33	0,000*
Zinc en plasma	0,985	33	0,926
MHT Semana 0	0,866	13	0,047*
MHT Semana 6	0,887	13	0,088
MHT Semana 12	0,849	20	0,005*
Concentración GSht	0,952	35	0,132
Concentración GSH	0,957	35	0,181
Concentración GSSG	0,882	35	0,001*
GSH/GSSG	0,805	35	0,000*
Expresión relativa <i>Nrf2</i>	0,713	34	0,000*
Expresión relativa <i>Cat</i>	0,807	34	0,000*
Expresión relativa <i>Sod1</i>	0,732	34	0,000*
Actividad enzimática Catalasa	0,930	35	0,028*
Peso Inducción DM2 Semana 1	0,974	37	0,530
Peso Inducción DM2 Semana 2	0,972	37	0,456
Peso Inducción DM2 Semana 3	0,969	37	0,380
Peso Inducción DM2 Semana 4	0,975	37	0,547
Peso Inducción DM2 Semana 5	0,964	37	0,278
Peso Inducción DM2 Semana 6	0,964	37	0,279
Peso Inducción DM2 Semana 7	0,964	37	0,269
Peso Inducción DM2 Semana 8	0,956	37	0,150
Peso Inducción DM2 Semana 9	0,957	37	0,161
Peso Inducción DM2 Semana 11	0,953	37	0,116
Peso Inducción DM2 Semana 12	0,955	37	0,143
Peso Inducción DM2 Semana 14	0,941	37	0,051
Peso Inducción DM2 Semana 16	0,954	37	0,127
Peso Inducción DM2 Semana 17	0,958	37	0,175
Peso Inducción DM2 Semana 18	0,943	37	0,058
Peso Tratamiento Semana 1	0,945	37	0,068
Peso Tratamiento Semana 3	0,931	37	0,025*
Peso Tratamiento Semana 6	0,901	37	0,003*
Peso Tratamiento Semana 7	0,905	37	0,004*
Peso Tratamiento Semana 8	0,902	37	0,003*
Peso Tratamiento Semana 9	0,891	37	0,002*
Peso Tratamiento Semana 10	0,889	37	0,002*
Peso Tratamiento Semana 11	0,886	37	0,001*
Peso Tratamiento Semana 12	0,882	37	0,001*
Peso Tratamiento Semana 13	0,894	37	0,002*
Peso Tratamiento Semana 14	0,884	37	0,001*
Ganancia Peso Tratamiento	0,917	37	0,009*
Pérdida de peso Semana Tratamiento 12 a 14	0,888	37	0,001*

$p \leq 0,05$  se rechaza hipótesis nula (datos tienen distribución normal) y se acepta la hipótesis alterna (datos no tienen una distribución normal);  $p > 0,05$  se acepta hipótesis nula (datos tienen distribución normal) y se rechaza hipótesis alterna (datos no tienen distribución normal). (\*),  $p < 0,05$ ; IPGTT, Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal; HbA1c, Hemoglobina Glicosilada; MHT, Tiempo máximo de agarre; GSht, Glutación total; GSH, Glutación Reducido; GSSG, Glutación oxidado.

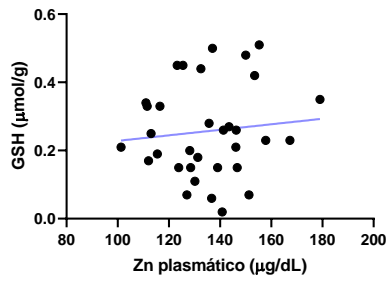
## Anexo 4. Correlaciones (tabla y gráficos)

**Tabla 7.** Correlaciones Spearman Zinc plasmático, MHT semana 12 y expresión relativa *Nrf2*, *Cat* y *Sod1* con variables de estudio

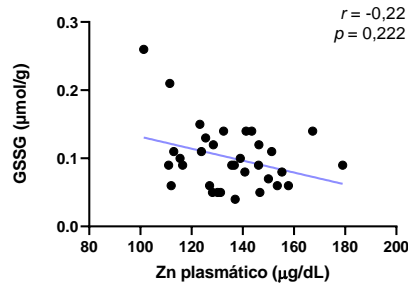
	GSH	valor <i>p</i>	GSSG	valor <i>p</i>	Expresión relativa <i>Nrf2</i>	valor <i>p</i>	Expresión relativa <i>Cat</i>	valor <i>p</i>	Expresión Relativa <i>Sod1</i>	valor <i>p</i>	Actividad Catalasa	valor <i>p</i>
Zinc plasmático	0,092		-0,22		0,088		0,11		0,019		0,051	
(IC 95%)	(-0,27-0,43)	0,610	(0,54- -0,15)	0,222	(-0,28-0,43)	0,631	(-0,26-0,45)	0,548	(-0,34-0,37)	0,919	(-0,31-0,40)	0,779
MHT semana 12	-0,32		-0,46 <sup>c</sup>		-0,3		-0,09		-0,41		-0,45 <sup>c</sup>	
(IC 95%)	(-0,67- -0,16)	0,172	(-0,76- -0,01)	0,039*	(-0,66-0,18)	0,200	(-0,52-0,38)	0,700	(-0,73-0,06)	0,074	(-0,75- -0,01)	0,047*
Expresión <i>Nrf2</i>	0,15		0,25		-		0,57 <sup>a</sup>		0,63 <sup>a</sup>		0,30	
(IC 95%)	(-0,21-0,47)	0,397	(-0,11-0,55)	0,153	-	-	(0,27-0,76)	<0,001*	(0,37-0,80)	<0,001*	(-0,051-0,59)	0,083
Expresión <i>Cat</i>	0,26		0,29		-		-		-		0,26	
(IC 95%)	(-0,09-0,56)	0,140	(-0,06-0,58)	0,098	-	-	-	-	-	-	(-0,09-0,56)	0,137
Expresión <i>Sod1</i>	0,35 <sup>b</sup>		0,32		-		-		-		0,36 <sup>b</sup>	
(IC 95%)	(0,001-0,62)	0,043*	(-0,03-0,60)	0,063	-	-	-	-	-	-	(0,01-0,63)	0,037*

R de Spearman con IC 95%. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,001$ ; (a) Correlación positiva moderada; (b) Correlación positiva baja; (c) Correlación negativa moderada.

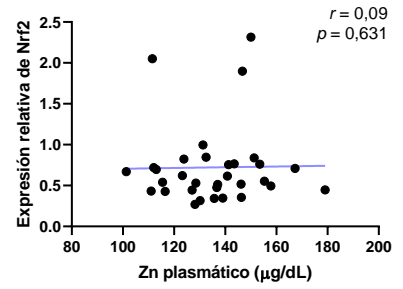
Correlación entre Zinc plasmático y concentración de GSH



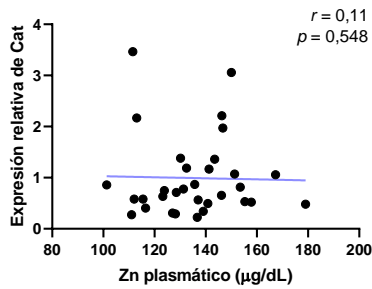
Correlación entre Zinc plasmático y concentración de GSSG



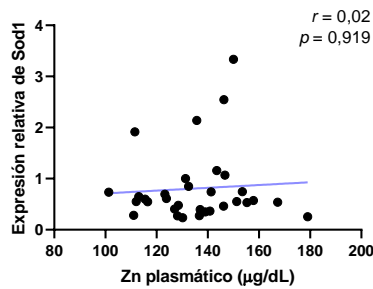
Correlación entre Zinc plasmático y expresión relativa de Nrf2



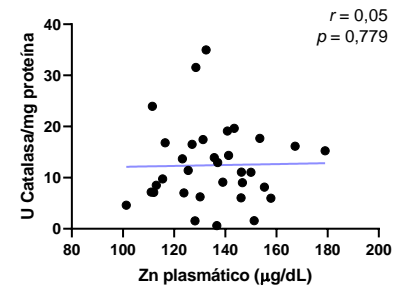
Correlación entre Zinc plasmático y expresión relativa de Cat



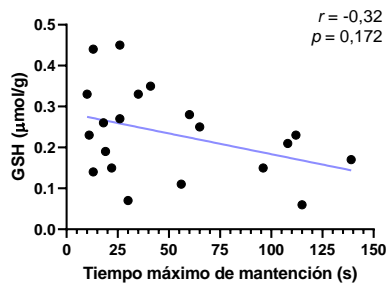
Correlación entre Zinc plasmático y expresión relativa de Sod1



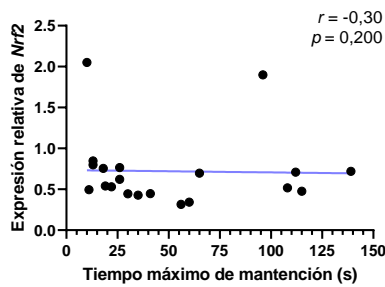
Correlación entre Zn plasmático y actividad de catalasa



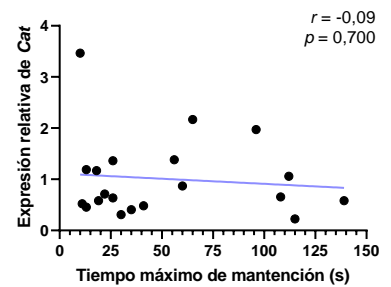
Correlación entre MHT semana 12 y concentración de GSH



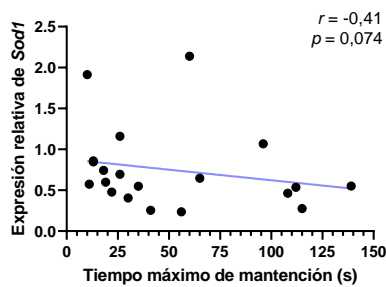
Correlación entre MHT semana 12 y expresión relativa de Nrf2



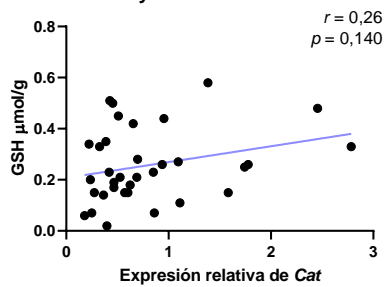
Correlación entre MHT semana 12 y expresión relativa de Cat



Correlación entre MHT semana 12 y expresión relativa de Sod1



Correlación entre expresión relativa de Cat y concentración de GSH



Correlación entre expresión relativa de Cat y concentración de GSSG

