

**TESIS
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE POSTGRADO



**“EFECTO DE APIGENINA SOBRE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN
ASOCIADOS A RESPUESTA GENÓMICA ANTIOXIDANTE Y SU ROL
EN LA CONDICIÓN FÍSICA EN UN MODELO ANIMAL”**

Carlos Poblete Aro

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOMEDICAS**

Fecha Aprobación Proyecto de Tesis: 28 noviembre 2018

Fecha Presentación del Informe:

Dr. Ramón Rodrigo

Dr. Diego García Díaz

Directores de Tesis

INFORME DE APROBACION TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por el candidato

CARLOS EMILIO POBLETE ARO

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 20 de Julio de 2022

Dr. Ramón Rodrigo Salinas
Director de Tesis
Programa Farmacología
molecular y clínica
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina

Dr. Diego García Díaz
Co- Director de Tesis
Departamento de Nutrición
Facultad de Medicina,
Universidad de Chile
Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Dra. Gladys Tapia

Dr. Hermann Zbinden

Dr. Marco Tulio Nuñez

Dr. Pablo Caviedes
Presidente Comisión

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a los Dres. Ramón Rodrigo y Diego García-Díaz por confiar en mí y apoyarme en este proceso, que comenzó con el Magister el año 2014. Ambos doctores fueron esenciales en mi formación de post grado desde el magister en el cual el Dr. Ramón Rodrigo fue mi tutor de tesis y el Dr. Diego García fue parte de la comisión evaluadora de ese proceso. Ambos me han inspirado con su profesionalismo y por, sobre todo, su gran calidad humana. Gracias a ustedes doctores, me decidí por seguir este camino, que muchas veces es difícil y complejo, pero muy satisfactorio. Su apoyo y entrega a significado mucho para mí, no sólo en lo académico, sino también en lo humano. En los momentos más difíciles de la pandemia, estuvieron conmigo en la distancia generada por las cuarentenas, dándome palabras de apoyo. Les estaré eternamente agradecido por su entrega y excelente disposición. Marcaron mi vida y espero honrar sus enseñanzas.

Le agradezco a la comisión revisora compuesta por los Doctores Pablo Caviedes, Gladys Tapia, Marco Tulio Nuñez y Hermann Zbinden, ya que su apoyo, recomendaciones, paciencia y compromiso permitieron llegar a un buen puerto este proyecto, pese a todas las dificultades vividas.

También, agradezco a la Dra. Paola Llanos y Dr. Rodrigo Troncoso por su comprensión, gentileza, solidaridad, y por facilitarme las dependencias de sus laboratorios en los cuales pude realizar parte importante de los experimentos que me permitieron terminar la presente tesis.

Agradezco a Cecilia Carter por cumplir de manera excepcional su gran labor como secretaria del programa, por su orientación, consejos, su dedicación y gestión. Su trabajo ha permitido que este camino sea más llano y fluido para todos los estudiantes del programa del Doctorado en Ciencias Biomédicas.

A mis colegas, amigos y amigas que sin su apoyo, colaboración, energía y experiencia, este proyecto no se podría haber terminado, a Carlos Sepúlveda, Juan Carlos Bórquez, Javier Russell, Cynthia Cadagán, Luan Da Silva, Javier Quezada, Karla Vázquez, Greys Lagos, Kharen Espinoza, Nashla Gasaly, Francisca Echeverría, Lisette Duarte, Amanda Ramírez, Carolina Oliva, Patricia Carvajal, Patricia

Reuquén, Juan Pinto, Diego Soto, Dominique Asenjo, Patricia Laubreaux, Constanza Cárcamo, Esteban Quezada, Denisse Valladares, Matías Monsalve y a muchos más que me dieron una palabra de aliento, un consejo, algún artículo de lectura, recomendaciones con las técnicas de laboratorio, o alguna reflexión que me ha permitido ampliar mi visión del mundo y de la vida académica.

Agradezco a mi familia, mi padre Juan Carlos (QEPD), mi madre Luz Marisol, y mi hermano Ignacio, que me han acompañado y apoyado desde siempre. Muchas gracias familia por todo lo que me han entregado. Espero que puedan sentir orgullo de su hijo y hermano.

Por último, quiero agradecer a mi pareja Solange Morales. Sin su apoyo, su tiempo, consejos y energía, este proyecto de vida, no se hubiera podido terminar. Gracias por confiar en mí, por estar presente en los momentos más difíciles de mi vida, que fueron noches frías de pena y angustia. Gracias por ser mi compañera de vida, de estudios nocturnos y fines de semanas de trabajo maratónico. Gracias por tu paciencia, y, sobre todo, por tu entrega y amor incondicional en los momentos más difíciles, pero también, gracias por estar conmigo en los momentos más alegres, por compartir una sonrisa y una taza de café.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi padre, Juan Carlos Poblete Venegas, que, como muchos, falleció durante la pandemia de COVID-19. El presente trabajo, se ideó para tratar de mejorar la calidad de vida de las personas que, como mi padre, pasaban horas en el trabajo, sentados en labores administrativas y que, al momento de llegar a sus hogares, debían seguir trabajando. Lamentablemente fueron estas personas, con factores de riesgo alto y hábitos de vida sedentarios, las que más sufrieron las complicaciones y muertes por el COVID-19. Ellos dejaron atrás familias y sueños. Sin embargo, la ciencia nos dio una luz de esperanza gracias a las vacunas que nos han permitido controlar esta enfermedad, y poder reencontrarnos.

Esta tesis cierra un proceso que comenzó como un sueño en pregrado en el año 2010, cuando cursaba tercer año de Licenciatura en Ciencias de la Actividad Física en la Universidad de Santiago de Chile, cuando la posibilidad de entrar al mundo de la ciencia se volvía más claro. El primer paso se dio con el ingreso al magister en fisiología el año 2014, y termina este gran ciclo el presente año 2022, con el Doctorado en Ciencias Biomédicas. Gracias, papá, por haberme apoyado todos estos años, por tu apoyo incondicional y por tu fe, ya que muchas veces fuiste tú quien me empujó a seguir adelante. Tu partida marcó un antes y un después en mi vida, pero llevaré tus enseñanzas por siempre en mi corazón y tu voz en mi mente. Espero poder contribuir desde la ciencia y la educación, a mejorar la calidad de vida de las personas, como siempre lo conversamos, estamos aquí para eso, para compartir y dejar huella.

Esta tesis fue realizada en los laboratorios de Nefrotoxicidad y Estrés Oxidativo, Programa de Farmacología molecular y clínica, Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. En el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Nutrición, Universidad de Chile. En el Laboratorio de Investigación en Nutrición y Actividad Física (LABINAF) del Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos INTA, y en el Laboratorio de Metabolismo Muscular, Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Fue financiada por los proyectos FONDECYT Regular 1211850 y FONDECYT Regular 1171550 además de los gastos operacionales de la beca de Doctorado Nacional ANID 21181461.

Indice

| | |
|--|----|
| 1. Resumen | 9 |
| 2. Abstract | 10 |
| 3.1. Estrés Oxidativo en patologías metabólicas..... | 11 |
| 3.2. Ejercicio y Patologías Asociadas a Estrés Oxidativo..... | 11 |
| 3.3. Suplementación Antioxidante y Ejercicio | 12 |
| 3.4. Apigenina y ejercicio | 14 |
| 4.Racional | 15 |
| 5.Hipotesis | 16 |
| 6.Objetivo General | 16 |
| 7.Objetivos Específicos..... | 16 |
| 7.2. Objetivo Específico 2:..... | 16 |
| 7.3. Objetivo Específico 3:..... | 16 |
| 8. Metodología | 17 |
| 8.1. Animales de experimentación: | 17 |
| 8.2. Protocolo de alimentación:..... | 17 |
| 8.3. Determinación variables objetivo específico 1:..... | 17 |
| 8.4. Fuerza extremidades:..... | 17 |
| 8.5. Test de resistencia:..... | 18 |
| 8.6. Determinación de variables objetivo específico 2: | 18 |
| 8.6.1. <i>Capacidad antioxidante del plasma</i> | 18 |
| 8.6.2. <i>Malondialdehído (MDA)</i> | 18 |
| 8.6.3. <i>Superóxido dismutasa (SOD)</i> | 19 |
| 8.6.4. <i>Catalasa (CAT)</i> | 19 |
| 8.6.5. <i>Glutación Peroxidasa (GPX)</i> | 19 |
| 8.7. Determinación variables objetivo específico 3:..... | 20 |
| 8.7.1. <i>Transcrito de ARN</i> | 20 |
| 8.7.2. <i>Western blot</i> | 20 |
| 9.Tamaño muestral:..... | 21 |
| 10. Análisis estadístico: | 21 |
| 11. Resultados..... | 22 |
| 11.1. Objetivo 1: Evaluar el efecto de la suplementación de apigenina en la fuerza y velocidad máxima en un modelo in vivo de ejercicio. | 22 |
| 11.2. Objetivo 2: Evaluar el efecto de la suplementación de apigenina sobre la defensa antioxidante general en un modelo in vivo. | 23 |
| 11.3. Objetivo 3: Evaluar el efecto de diferentes dosis de apigenina sobre la expresión de transcrito y niveles proteicos de la vía PGC-1 α /Nrf2 y de enzimas antioxidantes en un modelo in vivo. | 26 |
| 12. Discusión | 38 |
| 12.1. Efectos de apigenina sobre la condición física. | 38 |
| 12.2. Efectos de apigenina en el estado redox general | 38 |
| 12.3. Efecto de apigenina en la ruta Pgc-1 α /Nrf2 y enzimas antioxidantes. | 40 |
| 13. Conclusiones..... | 46 |
| 14. Referencias..... | 47 |

1. Resumen

En la sociedad occidental actual, se ha tratado de potenciar los efectos benéficos del ejercicio en su rol preventivo de patologías metabólicas asociadas al estrés oxidativo, a través de la utilización de diversos suplementos nutricionales, para así obtener las adaptaciones que genera el ejercicio físico a nivel fisiológico y celular con un menor tiempo de entrenamiento o realizando ejercicios con intensidades menores. Es así como se ha tratado de potenciar la adaptación antioxidante inducida por el ejercicio físico a través de suplementación de antioxidantes “scavengers”. Sin embargo, en sujetos sanos que realizan ejercicio, la suplementación de antioxidantes “scavengers” inhibe las adaptaciones de la defensa antioxidante inducidas por el ejercicio. Esto obedece a una menor activación de los factores de transcripción PGC-1 α y Nrf2, y con esto, una menor actividad y contenido proteico de diversas enzimas antioxidantes. Por otra parte, otro tipo de antioxidantes conocidos como “indirectos”, se ha descrito que inducen una ruta de señalización similar al ejercicio, ya que estimulan una producción de bajos niveles de especies reactivas de oxígeno. En particular, el flavonoide apigenina ha demostrado mejorar la defensa antioxidante en modelos de patologías asociadas al estrés oxidativo y en modelos de animales sanos, ya que genera la activación del factor PGC-1 α y Prmt7 asociado a la hipertrofia muscular. No obstante, no se ha analizado el rol de apigenina en la defensa antioxidante y efecto en la condición física en un modelo de sujetos sanos, con una perspectiva preventiva. Debido a lo expuesto se plantea como hipótesis: **“La suplementación de apigenina mejora la condición física y la defensa antioxidante por medio de la vía PGC-1 α /Nrf2 en modelos *in vivo*”.**

Para esto, se utilizó un modelo de ratones C57BL/6 machos sanos suplementados con apigenina para luego evaluar la expresión y contenido proteico de los factores PGC-1 α / Nrf2, junto con la de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa en soleo, FDB y tejido muscular del ventrículo izquierdo. Posterior a la suplementación, se observaron aumentos significativos en el transcrito de PGC-1 α , Nrf2 y de enzimas antioxidantes sólo en el músculo sóleo, sin embargo, el aumento de transcrito no fue acompañado de cambios significativos en el contenido proteico de estos factores y de enzimas antioxidantes.

2. Abstract

In currently Western society, attempts to enhance the beneficial effects of exercise in its preventive role in metabolic pathologies associated with oxidative stress, using various nutritional supplements, to obtain the adaptations generated by physical exercise at the physiological and cellular level, with a shorter training time or performing exercises with lower intensities. Thus, attempts have been made to enhance the antioxidant adaptation induced by physical exercise through the supplementation of 'scavenger' antioxidants. However, in healthy subjects who perform exercise, supplementation with antioxidant scavengers inhibits exercise-induced adaptations in antioxidant defense. This is due to lower activation of the transcription factors PGC-1 α and Nrf2, and with this, a lower activity and protein content of various antioxidant enzymes. On the other hand, another type of antioxidant known as 'indirect' has been described, as inducing a signaling pathway similar to exercise since they stimulate the production of low levels of reactive oxygen species. In particular, the flavonoid apigenin has been shown to improve antioxidant defense in models of pathologies associated with oxidative stress, and in healthy animal models, it generates the activation of the PGC-1 α and Prmt7 factors associated with muscle hypertrophy. However, the role of apigenin in antioxidant defense and its effect on physical condition in a model of healthy subjects, with a preventive perspective has not been analyzed. Due to the above, we hypothesized: **“Apigenin supplementation improves fitness and antioxidant defense via the PGC-1 α /Nrf2 pathway in vivo models”**.

For this, a model of healthy male C57BL/6 mice supplemented with apigenin was used to evaluate the expression and protein content of the PGC-1 α /Nrf2 factors, together with that of the antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in soleus, FDB and muscle tissue of the left ventricle. After supplementation, significant increases in the transcript of PGC-1 α , Nrf2, and antioxidant enzymes were observed only in the soleus muscle. However, the increase in the transcript was not accompanied by significant changes in the protein content of these factors and of antioxidant enzymes.

3.Introducción

3.1. Estrés Oxidativo en patologías metabólicas

El estrés oxidativo (EO) es una condición en la cual se pierde el balance entre factores pro oxidantes y antioxidantes, con predominio de los primeros¹. Algunos factores pro oxidantes de relevancia son especies reactivas de oxígeno (EROS) tales como: radical anión superóxido ($O^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^{\bullet})². En contraposición, los factores antioxidantes pueden ser endógenos, como por ejemplo: las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX)³; o exógenos, tales como: ácido ascórbico (Vitamina C; Vit C), α -tocoferol (Vitamina E; Vit E), diferentes polifenoles, entre otros⁴. Durante el proceso de envejecimiento y obesidad, se ha observado un estado de estrés oxidativo crónico, comprometiendo el funcionamiento de diferentes órganos^{5,6}. En el músculo esquelético, el EO se asocia con la pérdida de la función mitocondrial⁷ y la activación de enzimas pro-oxidantes como NAPH Oxidasa 2 (NOX2)⁸; mientras que en el tejido adiposo visceral, se asocia a una infiltración de macrófagos de tipo M1 (inflamatorios), generando un estado pro-inflamatorio y pro-oxidativo⁹. Además, el aumento en la producción basal de EROS contribuye al desarrollo de patologías asociadas al EO¹⁰, tales como la resistencia a la Insulina (RI)¹¹, diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)¹² e hipertensión arterial (HTA)¹³.

3.2. Ejercicio y Patologías Asociadas a Estrés Oxidativo

Para prevenir las patologías metabólicas asociadas a EO, el ejercicio físico es una herramienta terapéutica eficaz^{14,15}, permitiendo la mejora funcional de diversos sistemas y funciones celulares¹⁵. Dentro de sus beneficios destaca el aumento en la defensa antioxidante endógena, favoreciendo la prevención de la RI¹⁰, DMT2¹⁰ y HTA¹⁴, entre otras. Paradójicamente, el ejercicio genera un EO agudo¹⁶, dado que diversas fuentes de EROS aumentan su actividad durante la contracción muscular¹⁷. Esto se debe a que el ejercicio físico es una situación que desafía los mecanismos homeostáticos de la célula¹⁵, pues aumenta los requerimientos energéticos a nivel celular, induciendo la activación de enzimas como AMPK¹⁸, además de modificar el pH intracelular y extracelular¹⁹, induciendo simultáneamente modificaciones en los flujos iónicos intracelulares generando cambios en el balance redox a través de la producción aguda de EROS²⁰. Las EROS inducidas por el ejercicio tienen, por un lado: un origen

mitocondrial²¹, principalmente por una fuga de electrones desde el complejo I y complejo III^{10,18}; y un origen enzimático, debido al aumento de actividad de enzimas como: NADPH Oxidasa 2 (NOX2), ubicada en los túbulos T del sarcolema del músculo esquelético y del músculo cardiaco al momento de su contracción^{3,17,22}; además del aumento en la actividad de la enzima xantina oxidasa (XO), de origen endotelial, debido a los procesos de isquemia/reperfusión (I/R) inducidos por la contracción muscular que restringen temporalmente el flujo sanguíneo en los músculos activos^{10,23}.

Las EROS generadas durante la realización de ejercicio inducen adaptaciones siguiendo el principio de “*hormesis*”²⁴, en el que aumentos moderados de las concentraciones de EROS inducen una adaptación que permite aumentar el contenido y la actividad de enzimas antioxidantes tanto en el músculo esquelético²⁰, músculo cardiaco²⁵, como en glóbulo rojo¹⁶, mejorando de esta manera el estado redox general debido a una mejor defensa antioxidante^{16,26}. Estas adaptaciones son mediadas por medio de factores de transcripción sensibles al aumento de la concentración de EROS, como el peroxisome proliferator-activated receptor γ y co-activador 1 α (PGC-1 α)²⁷ y el nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2)²⁸, lo que se ha denominado efecto “pre condicionante”²⁹. Durante la realización de ejercicio físico, las EROS, principalmente H₂O₂, inducen una activación de la vía PGC-1 α /Nrf2²⁸, debido a que PGC-1 α actúa como un coactivador transcripcional a través del reclutamiento y la correulación de múltiples factores de transcripción que regulan la expresión génica de diversas proteínas y factores, del músculo esquelético y músculo cardiaco, incluyendo Nrf-2^{18,24,30,31}. Además las EROS pueden inducir cambios conformacionales en el complejo Nrf2, que normalmente se encuentra secuestrado en el citosol por Keap1 y tras el aumento de EROS inducidos por el ejercicio, se modifican covalentemente los grupos tiol de Keap1 disociándose del complejo Nrf2, permitiendo que éste transloque al núcleo uniéndose a los “Antioxidants Response Elements” (ARE), gatillando un aumento en la expresión de enzimas antioxidantes tales como SOD, CAT y GPX^{16,32-32}.

3.3. Suplementación Antioxidante y Ejercicio

Si bien el ejercicio es una herramienta de carácter preventivo de patologías metabólicas asociadas al EO crónico, ya que permite el aumento endógeno del contenido de enzimas antioxidantes en el músculo esquelético mejorando el estado antioxidante general, la suplementación con antioxidantes exógenos se

ha utilizado como co-tratamiento para la obesidad, DMT2 y HTA^{33,34}. Los antioxidantes exógenos pueden cumplir diferentes funciones frente a las EROS^{35,36}, como escindir cadenas de radicales peróxilos, radicales alquilos y alcóxilos, descomponer el $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 . Los antioxidantes que cumplen esas funciones actúan en forma directa y son denominados “scavengers”³⁷. Otros antioxidantes, denominados “antioxidantes indirectos” pueden inducir la activación de factores de transcripción asociados a los ARE por medio de aumentos moderados de niveles de EROS^{38,39} permitiendo el aumento del contenido endógeno de enzimas antioxidantes. Entre los antioxidantes “scavengers” mayormente utilizados en el tratamiento de patologías metabólicas se encuentra la Vit C y Vit E^{13,33,34}, que han demostrado disminuir biomarcadores de daño por EO en sujetos con HTA¹³, además de mejorar parámetros clínicos como las presiones arteriales sistólica y diastólica¹³. **Sin embargo, los intentos de potenciar los efectos adaptativos inducidos por el ejercicio sobre la defensa antioxidante endógena en sujetos sanos que realizan ejercicio a través de la suplementación de antioxidantes “scavengers” han fracasado. Así, la suplementación de antioxidantes “scavengers” ha demostrado disminuir el transcrito y contenido proteico de factores de transcripción asociadas a los ARE, y por consiguiente, se observa una menor cantidad y actividad de enzimas antioxidantes**⁴⁰⁻⁴². En modelos pre-clínicos con animales sanos que realizan ejercicio físico, se ha visto que la suplementación de Vit C y Vit E, ya sea en conjunto o por separadas, disminuye la expresión de PGC-1 α ^{41,43,44} y SOD^{41,43,44} en el músculo esquelético, además de disminuir la actividad de SOD, CAT y GPX⁴²⁻⁴⁴. Junto con lo anterior, en modelos animales que realizan ejercicio físico, la suplementación de antioxidantes “scavengers” ha demostrado disminuir la capacidad aeróbica de estos ratones, y con ello, la tolerancia para realizar ejercicios de larga duración^{41,45}. Estos resultados se deben a que la Vit C y Vit E disminuyen la concentración de diferentes EROS, en especial el radical anión $O_2^{\cdot-}$, lo que impide la formación de H_2O_2 por medio de SOD¹. Las EROS, en particular el H_2O_2 actúa como señalizador celular⁴⁶⁻⁴⁸ ya que participa en la activación de los factores de transcripción como Nrf2^{28,49} y PGC-1 α ^{28,50}; No obstante, es necesaria una cantidad mínima de H_2O_2 para poder ejercer su efecto señalizador^{28,50,51}. Así, el ejercicio pierde sus efectos benéficos asociados a una mejora en la defensa antioxidante endógena en sujetos sanos, cuando se realiza en conjunto a una suplementación de antioxidantes exógenos “scavengers”, dado que este tipo de antioxidante inhibe la vía PGC-1 α /Nrf2, junto con

disminuir la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX⁴¹⁻⁴⁴. **De esta manera, el ejercicio físico pierde su rol preventivo frente a las patologías metabólicas asociadas al EO crónico al realizarse en conjunto a una suplementación de antioxidantes “scavengers”⁴⁰.**

3.4. Apigenina y ejercicio

Los antioxidantes “indirectos” como los ácidos grasos poliinsaturados³⁸ y flavonoides como apigenina^{52,53}, han demostrado poseer un efecto “pre-condicionante” similar al ejercicio⁵⁴, aumentando el transcrito, contenido proteico y actividad de enzimas antioxidantes a través de la vía PGC-1 α /Nrf2 en patologías metabólicas asociadas al EO^{35,55-57}, pero su efecto en las adaptaciones antioxidantes inducidas por el ejercicio físico no ha sido clarificado.

Particularmente, apigenina (4',5,7,-trihidroxi-flavona), un flavonoide presente en una variedad de frutas, vegetales, como naranjas, ajo, propóleos y manzanilla⁵⁸, ha demostrado aumentar la expresión de PGC-1 α y Nrf2 en patologías metabólicas asociadas al EO como el hígado graso no alcohólico³⁵, resistencia a la insulina^{56,59}, disfunción vascular⁵⁹ y cáncer⁶⁰. Además, en modelos animales sanos no entrenados, apigenina ha demostrado aumentar expresión de PGC-1 α y Prmt7 asociados a la hipertrofia muscular⁶¹, ya que no disminuye las concentraciones de H₂O₂⁶², resultado opuesto al observado con antioxidantes “scavengers”⁶³. En cultivo celular primario de músculo cardíaco, se ha observado que diferentes concentraciones de Apigenina no disminuyen la producción de H₂O₂, contrariamente a lo descrito con otros flavonoides, como epicatequina, quercetina y keapferol, los cuales si exhiben un poder reductor y han demostrado disminuir la producción de H₂O₂ en relación al grupo control⁶². Adicionalmente, otros flavonoides como hesperetina y luteonina presentan un poder reductor equivalente a la Vit C y Vit E⁵², mientras que apigenina presenta un potencial reductor significativamente menor que Vit C y Vit E⁵². En líneas celulares 22Rv1⁵⁷, Hela, SiHa y CasKi, C33A⁶⁴, se ha observado que apigenina induce una reducción en el potencial de membrana mitocondrial, induciendo un aumento en la fuga de O₂⁻, y luego de su dismutación por SOD, un aumento en H₂O₂, el que actúa como señalizador celular en la vía PGC-1 α y Nrf2. Junto con lo anterior, posterior a la exposición de apigenina, se ha observado un aumento en la actividad de CAT en líneas celulares Hela, CasKi y C33⁶⁴, mientras que en líneas celulares C2C12, la estimulación con apigenina induce un incremento en la expresión de PGC-1 α ⁶¹.

Son pocas las investigaciones que han caracterizado el efecto de apigenina en la defensa antioxidante en modelos animales sanos. Algunos trabajos que se han aproximado al efecto que tiene apigenina en el ejercicio, han demostrado que en ratones obesos no entrenados, aumenta la distancia recorrida por éstos en un tapiz rodante, comparados con su control obeso sin suplementación⁵⁶. Un estudio de Jin Jang y cols⁶¹ con ratones C57BL/6 sanos no entrenados, alimentados con una dieta con un 0,4% de apigenina, demostró un aumento significativo en la masa muscular del cuádriceps de los ratones, sin modificar el peso total de ellos. Además, lograron recorrer una mayor distancia en una única prueba de carrera comparado con ratones controles al final del tiempo de suplementación y presentaron una mayor expresión de PGC-1 α y PGC-1 α 4 en estos músculos.

Si bien, estos antecedentes muestran un efecto favorable de apigenina en animales sanos, ningún trabajo ha evaluado su efecto en la defensa antioxidante en modelos experimentales y su relación con la condición física.

4.Racional

Por su rol como inductor de EROS en bajo nivel y presentar un efecto pre-condicionante, apigenina ofrece una interesante alternativa como potenciador de la adaptación antioxidante endógena que puede mejorar la condición física en sujetos sanos. Presenta una vía de señalización celular similar al ejercicio a través del aumento de EROS de origen mitocondrial en un bajo nivel, aumentando la expresión de los factores PGC-1 α y Nrf2⁵², sin poseer un potencial reductor como lo la Vit C y la Vit E⁵². Además, apigenina no disminuye la producción de H₂O₂⁶², y por consiguiente, se espera que actúe como un mimético del ejercicio simulando sus efectos adaptativos asociados a la respuesta de la defensa antioxidante, mejorando la condición física de sujetos sanos por medio del aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes. Apigenina, por poseer una ruta de señalización EROS/PGC1- α /Nrf2 similar al ejercicio^{39,61}, podría replicar los efectos adaptativos de este último, mejorando la defensa antioxidante endógena de sujetos sanos junto con la condición física. Este punto de vista conduce a sugerir la asociación con una menor prevalencia de patologías asociadas al EO, y con esto, un menor gasto en la salud pública en el tratamiento de patologías como la HTA, diabetes mellitus tipo 2, cáncer, entre otros.

5.Hipotesis

“La suplementación de apigenina mejora la condición física y la defensa antioxidante junto con la vía PGC-1 α /Nrf2 en modelos *in vivo*”.

6.Objetivo General

Determinar el efecto de la suplementación de apigenina en la condición física, en la vía PGC-1 α /Nrf2 y enzimas antioxidantes en un modelo *in vivo*.

7.Objetivos Específicos

7.1. Objetivo Específico 1:

Evaluar el efecto de la suplementación de apigenina en la fuerza, velocidad máxima y resistencia aeróbica en un modelo *in vivo*.

7.2. Objetivo Específico 2:

Evaluar el efecto de la suplementación de apigenina sobre el estado redox general en un modelo *in vivo*.

7.3. Objetivo Específico 3:

Evaluar el efecto de diferentes dosis de apigenina sobre la expresión de transcrito y niveles proteicos de la vía PGC-1 α /Nrf2 y de enzimas antioxidantes en un modelo *in vivo*.

8. Metodología

8.1. Animales de experimentación:

Para el protocolo de suplementación de Apigenina se utilizarán 40 ratones macho de la cepa C57BL/6 provenientes del Departamento de Nutrición de la Universidad de Chile de 3 meses de edad.

8.2. Protocolo de alimentación:

Los animales serán divididos en 4 grupos, cada grupo tendrá 10 animales divididos de la siguiente forma; un grupo control vehículo (C), y tres grupos que serán suplementados con Apigenina con las siguientes dosis: 30 mg/kg de apigenina, 60 mg/kg de apigenina y 100 mg/kg de apigenina^{58,65,66}. Todos los grupos serán suplementados 6 días a la semana, durante 7 semanas por medio de un vehículo de mantequilla de maní⁶⁷.

8.3. Determinación variables objetivo específico 1:

Posterior al programa de suplementación, se realizaron las siguientes evaluaciones de condición física:

8.4. Fuerza extremidades:

La fuerza muscular de las extremidades de los ratones fue evaluada a través de un test de agarre invertido⁶⁸. Los ratones fueron colocados individualmente en el centro de una rejilla de alambre de 25x25 cm (alambre ancho <0,1 cm y espaciado 0,5 cm), montado 35 cm por encima de una plataforma blanda. Después de invertir suavemente la rejilla, se registró el tiempo de suspensión del ratón (latencia de agarre). Este procedimiento se realizó tres veces y se consideró el promedio de cada evaluación. Los valores de tiempo en suspensión se calcularon para cada ratón. Los datos son presentados en términos de impulso, por lo que son considerados el tiempo de cada ratón en suspensión respecto a su peso.

Test carrera: El test de carrera es adaptado del protocolo utilizado por Del Campo et al.⁶⁸ El protocolo de velocidad incremental que comenzó a una velocidad de 0,8 Km / hora durante 3 minutos y luego la velocidad se incrementó en 0,2 Km/ hora cada 2 minutos hasta el agotamiento para calcular la Velocidad máxima alcanzada.

8.5. Test de resistencia:

Al día siguiente del test de velocidad, se realizó una prueba de resistencia descrita por Del Campo y cols al.⁶⁸. Se utilizará un protocolo que con una velocidad de 0,8 Km / hora durante 3 minutos y luego la velocidad se incrementó al 80% de la velocidad máxima previamente alcanzado por cada ratón. La prueba se realizó hasta el agotamiento y se registró el tiempo en segundos.

8.6. Determinación de variables objetivo específico 2:

Posterior al sacrificio de los ratones con isoflurano, se extrajeron aproximadamente entre 500 µL de sangre por medio de una punción cardiaca, luego la sangre fue transferida a tubos EDTA de 4 mL para luego ser centrifugada y así obtener plasma y glóbulos que fueron hemolizados para su posterior evaluación. Las muestras de sangre fueron separadas en plasma y glóbulos rojos mediante un proceso de centrifugación a 2000 g durante 10 minutos, el plasma fue guardado en tubos Eppendorf de 500 µL para su análisis, mientras que los glóbulos rojos fueron lavados en suero fisiológico y luego hemolizados con agua bidestilada. En el plasma obtenido se evaluó la capacidad antioxidante total del plasma por medio del FRAP ASSAY⁶⁹, mientras que en las muestras hemolizadas de glóbulos rojos se analizaron el contenido de MDA⁷⁰, la actividad de la CAT⁷¹, SOD⁷² y la actividad de GPX⁷³.

8.6.1. Capacidad antioxidante del plasma.

Se midió a través del FRAP ASSAY (del Inglés *The Ferric Reducing Ability of Plasma*) descrito por Benize & Strain⁶⁹, en el cual se mide en bajo pH el cambio de absorbancia a 593 nm debido a la formación de un complejo Fe(II)-tripiridiltriazina de color azul a partir de una sal incolora de Fe(III) en una reacción no específica. El resultado obtenido se describirá como µmol/ litro de plasma.

8.6.2. Malondialdehído (MDA).

La determinación del MDA se realizó a través de la técnica descrita por H Ohkawa⁷⁰ En el cual los radicales libres y especies reactivas de oxígeno oxidan a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y lipoproteínas transformándolos en ácidos grasos peroxidados, los cuales sufren un acortamiento de su cadena lateral liberando MDA, por lo que la concentración sérica de MDA, es proporcional a los ácidos grasos poliinsaturados oxidados siendo un buen indicador de peroxidación

lipídica. La determinación se basa en la reacción colorimétrica de peróxidos lipídicos con TBA (ácido tiobarbitúrico) para dar malondialdehído (MDA). El resultado obtenido será dividido por la concentración de hemoglobina de la muestra para obtener nmol/g de Hb.

8.6.3. Superóxido dismutasa (SOD).

La actividad de la superóxido dismutasa se midió a través de la técnica descrita por Misra & Fridovich⁷⁴, en el cual se mide la inhibición producida por la SOD sobre la reducción del citocromo-c. El citocromo-c se reduce en presencia de anión superóxido, por ello, se procede a la creación de un sistema productor de anión superóxido (sistema xantina-oxidasa). La SOD compite con el citocromo-c por dicho anión, mediante el descenso en la producción de citocromo-c reducido. La curva obtenida es dividida por la concentración de hemoglobina de la muestra para obtener la actividad enzimática medida en unidades de SOD /g de Hb.

8.6.4. Catalasa (CAT).

La actividad de la actividad de catalasa(CAT) se midió a través de la técnica descrita por Bergmeyer⁷¹, en el cual se realiza una lectura de la actividad de la catalasa que promueve la descomposición de H_2O_2 en H_2O y O_2 mediante espectrofotometría a 240 nm en intervalos de 5 ó 10 segundos, durante 1 min. Se calcula el promedio de variación de O.D. por 5 segundos. La curva obtenida es dividida por concentración de hemoglobina de la muestra para obtener la actividad enzimática medida en k/g de Hb. Siendo k la pendiente de la curva de descomposición de H_2O_2 .

8.6.5. Glutación Peroxidasa (GPX).

Para medir la actividad de la Glutación Peroxidasa se utilizó la técnica descrita por Flohé & Gunzler⁷³, en el cual se mide la formación instantánea de glutación oxidado a través de la GPX, y que es reducido de forma continua por un exceso de glutación reductasa activa y NADPH presentes en la mezcla. La subsecuente oxidación de NADPH a NADP+ se mide con espectrofotometría. La curva obtenida es dividida por la concentración de hemoglobina de la muestra para obtener la actividad enzimática medida en unidades de GPX /g de Hb.

8.7. Determinación variables objetivo específico 3:

Posterior al término de la suplementación y sacrificio de los animales de experimentación, se lizará los músculos sóleo, FDB y tejido muscular del ventrículo izquierdo para evaluar la expresión de transcrito de genes mediante qPCR⁷⁵ de PGC1- α , Nrf2, SOD, CAT y GPX por medios de sondas TaqMan. El contenido de proteínas mediante Western Blot^{61,76} PGC1- α , SOD, CAT y GPX, además de la expresión de genes

8.7.1. Transcrito de ARN

Se aisló el ARN total de los músculos soleo, FDB y del tejido ventricular usando Trizol (Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA, EE. UU.), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Luego se cuantificó en el NanoQuant Infinite M200Pro (TECAN, Mannedorf, Suiza). Posteriormente se sintetizó ADNc utilizando el kit de transcripción inversa de cDNA de alta capacidad (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.). Los ADNc se amplificaron con sondas Taqman (Thermo Fisher Scientific) para el peroxisoma coactivador gamma del receptor activado por proliferador 1-alfa (Pgc-1 α) (Mm01208835_m1), nuclear factor, erythroid derived 2, like 2 (Nrf2) (Mm00477784_m1), SOD (Mm01313000_m1), CAT (Mm00437922_m1) y GPX (Mm00656767_g1).

La RT-PCR se realizó con Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, California). Los niveles de ARN mensajero se normalizaron mediante el ARN de Ppia (Mm02342430_g1) para soleo, FDB y BAT y tejido muscular del ventrículo izquierdo. Los datos se analizaron por el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.

8.7.2. Western blot

Los músculos soleo, FDB y del tejido ventricular izquierdo de los ratones utilizados en este proyecto fueron homogenizadas y sonicadas en buffer de lisis RIPA, que contiene NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, BAPTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, Triton X-100 al 1 % y cóctel inhibidor de proteasa (Roche Diagnostics, Alemania). Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida SDS al 10% y luego transferido a una membrana de PVDF. Las membranas fueron transferidas se bloquearon con leche descremada al 5% (Svelty, Nestlé) en TBST. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: Anti-

Pgc1a de ThermoFisher technologies (1:1000; PA5-38021, Canadá), AntiSOD de Cellsignaling technologies (1:1000; D9V9C; EE.UU), AntiCAT de Cellsignaling technologies (1:1000, D5N7V, EE.UU) y AntiGPX de ThermoFisher Technologies (1:200;702762, Canadá), AntiGAPDH como control de carga FDB y tejido muscular de ventrículo izquierdo de Sigma-Aldrich(1:5000;G9545,EE.UU), y por último AntiTubulina de Cellsignaling technologies (1:5000; #2146, EE.UU.)

como control de carga de soleo. La incubación de los anticuerpos primarios se realizó durante 12 horas. Posteriormente, se realizó un lavado de las membranas y se incubaron durante 1,5 h con anticuerpo secundario anti-rata (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Se utilizó para detectar la transferencia el kit de quimioluminiscencia LumiFlash™ Infinity Chemiluminescent Substrate, Taipei, Taiwan, siguiendo las instrucciones del fabricante. La quimioluminiscencia se detectó usando un escáner C-DiGit R Blot y el programa Image Studio software versión 3.1 (LI-COR) para la adquisición de imágenes y análisis densitométrico,

9.Tamaño muestral:

Aceptando un riesgo α de 0.05 y un riesgo β de 0.2, se necesita un n de 8 animales en cada grupo para detectar una diferencia igual o superior al doble de la actividad de Gpx según el trabajo de Hamid y cols⁴². Se asume que la desviación estándar común es de 1.3 unidades de la actividad de GPX. Se ha estimado una tasa de pérdidas de seguimiento del 20%, por lo que será necesario un total de 10 animales por grupo.

10. Análisis estadístico:

Las comparaciones de los datos se realizarán dependiendo de la distribución de los datos, según el test de Shapiro-Wilk. En caso de distribución normal se realizó un análisis one-way ANOVA y un *post hoc* de *Dunnet* para determinar la diferencia significativa entre los grupos. Además, se realizó un análisis de correlación de Pearson entre las variables para cada tejido evaluado. Un valor $p < 0.05$ fue considerado como una diferencia estadísticamente significativa y se utilizó el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA).

11. Resultados

11.1. Objetivo 1: *Evaluar el efecto de la suplementación de apigenina en la fuerza y velocidad máxima en un modelo in vivo de ejercicio.*

Para evaluar el efecto de la suplementación de apigenina en la condición física de los animales de experimentación, se realizaron diversas pruebas para evaluar la velocidad, resistencia y fuerza de cada uno de los animales de experimentación. Para evaluar la velocidad máxima, se utilizó un tapiz rodante en el cual se fue aumentando la velocidad de carrera (m/min) (Figura 1-A) hasta el agotamiento de los ratones. Luego de obtener la velocidad máxima de los animales de experimentación, se realizó un test de resistencia en el cual los animales tuvieron que correr al 80% de la velocidad máxima alcanzada en un tapiz rodante durante el mayor tiempo posible (seg) (Figura 1-B), y por último, para evaluar la fuerza, se realizó un test de agarre invertido, en el cual los animales fueron colgados de una rejilla y se contabilizó el tiempo que permanecieron colgados, y este tiempo fue normalizado por el peso de cada uno (seg/gr) (Figura 1-C). Respecto a las pruebas de velocidad máxima alcanzada, la prueba de resistencia y la prueba de fuerza, no se observaron diferencias significativas entre los animales suplementados con apigenina con las dosis utilizadas (30 mg/kg, 60 mg/kg y 100 mg/kg) en ninguna de las variables de condición física mencionadas anteriormente respecto al grupo control.

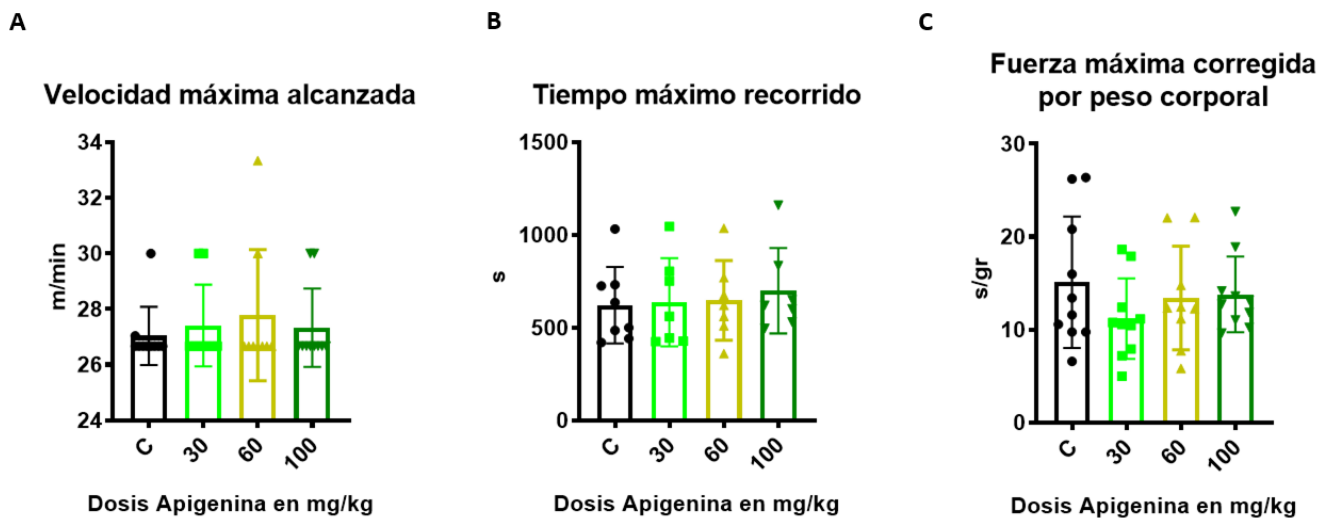


Figura 1. Efecto de apigenina sobre las capacidades Físicas.

Valores en promedios \pm SD posterior a 7 semanas de suplementación de apigenina en las dosis 30 mg/kg; 60 mg/kg y 100 mg/kg y grupo control (C) en; A- Velocidad máxima alcanzada en m/min. B- Tiempo máximo recorrido en segundos. C- Fuerza corregida por peso en s/gr. Las comparaciones de los datos se realizaron con el análisis One-way ANOVA con un post hoc de Dunnett para comparaciones múltiples n= 7 a 10 animales por grupo.

11.2. Objetivo 2: *Evaluar el efecto de la suplementación de apigenina sobre la defensa antioxidante general en un modelo in vivo.*

Para evaluar el estado redox general de los animales de suplementación, se evaluó en plasma la capacidad antioxidante del plasma por medio del FRAP ASSAY, como biomarcador de daño por EO se utilizó el malondialdehído (MDA) en eritrocito, además de evaluar la actividad de las enzimas antioxidantes en eritrocito SOD; CAT y GPX.

Posterior a las 7 semanas de suplementación de apigenina, no se observaron cambios en el contenido de MDA en eritrocito entre los grupos suplementados con apigenina (30 mg/kg, 60 mg/kg y 100 mg/kg) en comparación al grupo control (Figura 2-A). Respecto a la defensa antioxidante general, no se observaron diferencias significativas entre los grupos suplementados con apigenina (30 mg/kg, 60 mg/kg y 100 mg/kg) comparados con el grupo control en el FRAP ASSAY (Figura 2-B).

Por último, para finalizar el objetivo 2, se evaluó la actividad en eritrocito de las enzimas antioxidantes SOD (Figura 2-C), CAT (Figura 2-D) y GPX (Figura 2-E). Posterior a la suplementación de 7 semanas de apigenina, no se observan cambios significativos en los grupos 30 mg/kg, 60 mg/kg y 100 mg/kg en la

actividad de SOD comparados con el grupo control (Figura 2-C). Sin embargo, se observó una disminución significativa en la actividad de CAT en eritrocito en los grupos suplementados con 30 mg/kg ($291,6 \pm 48,7$ unidades/g Hb, $p < 0,02$) y en el grupo suplementado con 60 mg/kg ($292 \pm 44,28$ unidades/g Hb, $p < 0,02$) comparados con el grupo control ($353,9 \pm 49,92$ unidades /g Hb) (Figura 2-D). Además, se observó una disminución significativa en la actividad de GPX en eritrocito en todos los grupos suplementados con apigenina comparados con el grupo control ($5,06 \pm 1,03$ unidades/ g Hb) (Figura 2-E). La actividad de GPX de los grupos suplementados con apigenina fue la siguiente; 30 mg/kg ($3,69 \pm 0,06$ unidades/ g Hb, $p < 0,01$), 60 mg/kg ($2,75 \pm 0,93$ unidades/ g Hb, $p < 0,0001$) y 100 mg/kg ($3,46 \pm 1,33$ unidades/g Hb, $p < 0,003$).

Al realizar las correlaciones entre los resultados de biomarcadores de EO en eritrocito (Figura 3), observamos una correlación positiva entre el contenido de MDA (nmol /gr HB) con la actividad de CAT (k/ g HB) en eritrocito ($r=0,441$ y $p= 0,005$) (Figura 3-A), una correlación positiva entre el contenido de MDA (nmol /gr HB) con la actividad de GPX (U/ g HB) en eritrocito ($r=0,383$ y $p= 0,016$) (Figura 3-B) y una correlación positiva entre la actividad de CAT (k/ g HB) en eritrocito con la actividad de GPX (U/ g HB) en eritrocito ($r= 0,66$ y $p= 0,0001$) (Figura 3-C).

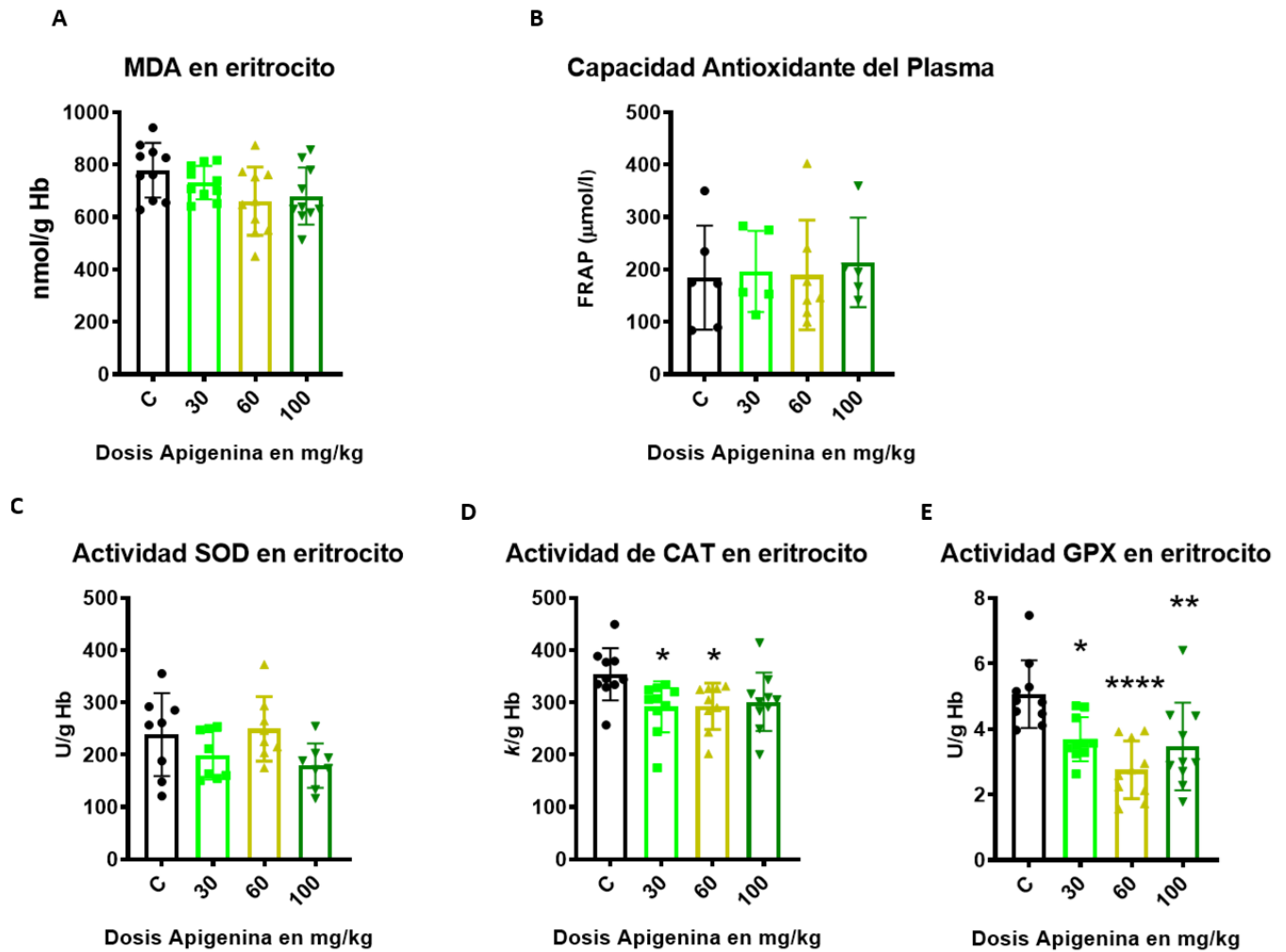


Figura 2. Efecto de apigenina sobre biomarcadores de estrés oxidativo en sangre.

Valores se expresan en promedio \pm SD. Efecto de apigenina posterior a 7 semanas de suplementación en las dosis 30 mg/kg; 60 mg/kg y 100 mg/kg y grupo control (C) en A- MDA en eritrocito (nmol/ g Hb) B- Capacidad antioxidante del plasma medido por el FRAP ASSAY ($\mu\text{mol/l}$) C- Actividad de SOD en eritrocito (U/ g Hb) D- Actividad de CAT en eritrocito ($\kappa/\text{g Hb}$) E- Actividad de GPX en eritrocito (U/ g Hb). Las comparaciones de los datos se realizaron con el análisis One-way ANOVA con un post hoc de Dunnett para comparaciones múltiples * $p < 0,01$; ** $p < 0,003$; **** $p < 0,0001$. n= entre 5 y 10 animales por grupo.

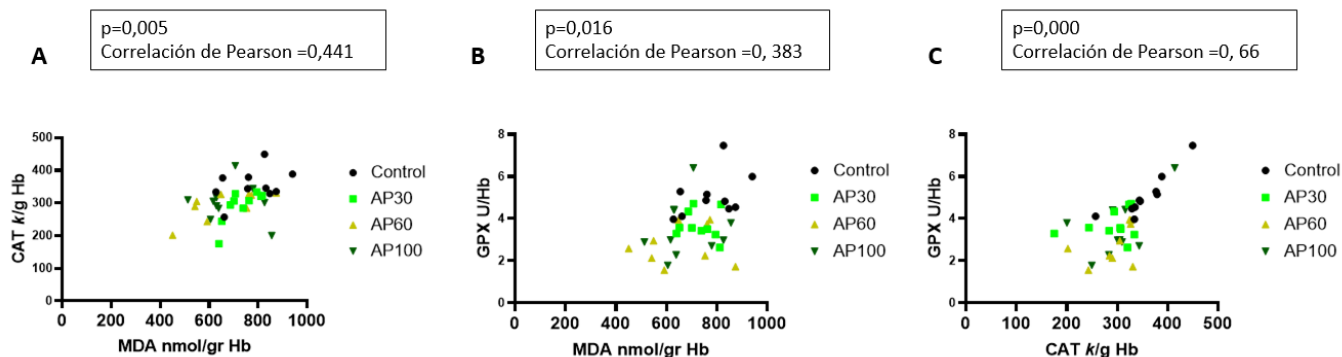


Figura 3. Correlaciones asociadas a biomarcadores de daño por estrés oxidativo en sangre.

Correlación de variables evaluadas en eritrocito en A- Correlación contenido de MDA con actividad de CAT. B- Correlación contenido de MDA con actividad de GPX. C- Correlación actividad de CAT con actividad de GPX.

11.3. Objetivo 3: Evaluar el efecto de diferentes dosis de apigenina sobre la expresión de transcrito y niveles proteicos de la vía PGC-1 α /Nrf2 y de enzimas antioxidantes en un modelo in vivo.

Para cumplir este objetivo y evaluar el efecto de apigenina posterior a la suplementación por 7 semanas en la vía PGC-1 α /Nrf2 además de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX, se utilizaron 3 tejidos musculares diferentes; El músculo soleo que presenta un perfil metabólico predominantemente oxidativo, el músculo FDB que presenta un perfil metabólico predominantemente glucolítico, y tejido muscular del ventrículo izquierdo del corazón, que presenta un perfil metabólico predominantemente oxidativo. Para esto, se realizaron las técnicas de qPCR para evaluar los niveles de ARNm y su expresión relativa mediante el transcrito de estos genes de los grupos suplementados respecto al control, además de la evaluación de los niveles proteicos mediante western blot de los grupos suplementados respecto al grupo control.

Respecto al cofactor PGC-1 α (Figura 4), en el músculo soleo, se observa un aumento significativo en los grupos suplementados con una dosis de 60 mg/kg ($p < 0,03$) (Figura 4-A), con un aumento de $2,02 (\pm 0,62)$ junto con la dosis 100 mg/kg de apigenina ($p < 0,001$) (Figura 4-A), con un aumento de $3,09 (\pm 0,51)$ veces la expresión relativa del transcrito comparado con el grupo control, mientras que al evaluar el contenido de proteínas de PGC-1 α en el músculo soleo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos suplementados y el grupo control (Figura 4-4). Al evaluar la expresión del transcrito de

PGC-1 α en el músculo FDB (Figura 4-C) y en el tejido muscular del ventrículo izquierdo (Figura 4-D), no se observaron diferencias significativas entre los grupos suplementados comparados con el grupo control. Los resultados del contenido de proteínas en FDB y músculo de ventrículo izquierdo por medio de western blot para PGC-1 α no se pudieron obtener.

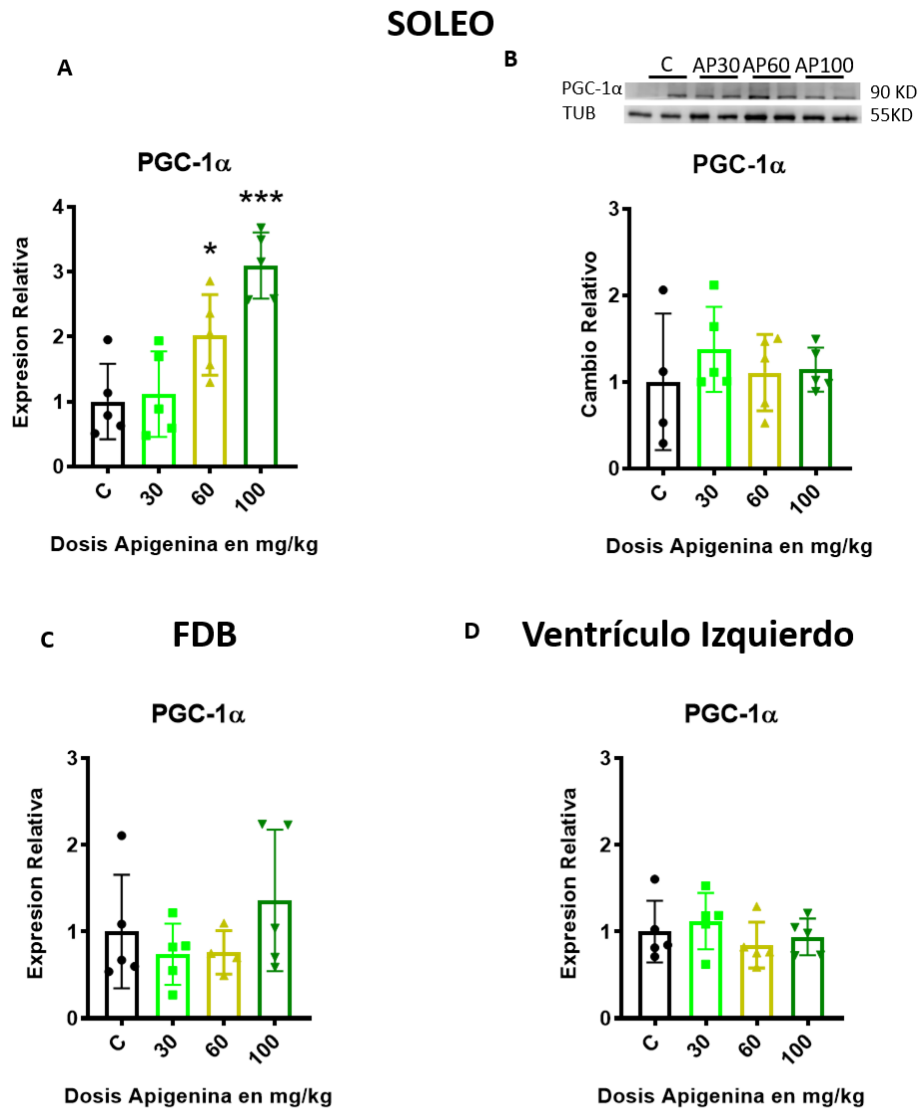


Figura 4. Efecto de la apigenina en los niveles de PGC-1 α en soleo, FDB y tejido muscular ventrículo izquierdo.

Valores se expresan en unidades relativas respecto al control (c) \pm SD. Efecto de apigenina posterior a 7 semanas de suplementación en las dosis 30 mg/kg; 60 mg/kg y 100 mg/kg y grupo control (C) en A- Expresión relativa de PGC-1 α en soleo. B- Cambio relativo de proteínas de PGC-1 α por medio de western blot en soleo. C- Expresión relativa de PGC-1 α en FDB. D- Expresión relativa de PGC-1 α en Ventrículo Izquierdo. Las comparaciones de los datos se realizaron con el análisis One-way ANOVA con un post hoc de Dunnett para comparaciones múltiples; * p < 0,03. *** p < 0,001. n = entre 3 y 5 animales por grupo.

En cuanto al factor Nrf2 (Figura 5), en el tejido soleo (Figura 5-A) se observaron aumentos significativos en la expresión relativa del transcrito con las dosis 60 mg/kg de 2,22 (\pm 0,48) veces ($p < 0,01$) respecto al grupo control, mientras que la dosis de 100 mg/kg mostró un aumento en la expresión del transcrito de Nrf2 de 2,03 (\pm 0,88) veces ($p < 0,04$) respecto al grupo control. La dosis 30 mg/kg no presentó diferencias significativas comparados con el grupo control. Por otra parte, posterior al programa de suplementación de apigenina de 7 semanas, no se observaron cambios significativos en la expresión relativa del transcrito de Nrf2 con las diferentes dosis utilizadas en los tejidos FDB (Figura 5-B) y en el tejido muscular del ventrículo izquierdo (Figura 5-C). Los resultados del contenido de proteínas en soleo, FDB y músculo de ventrículo izquierdo por medio de western blot para Nrf2 no se pudieron obtener.

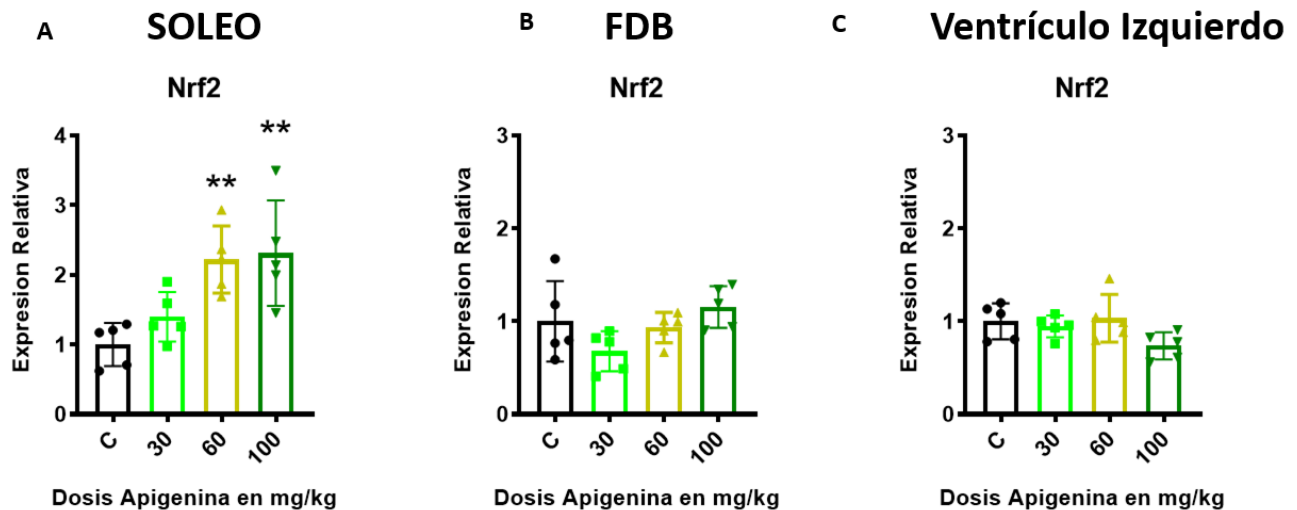


Figura 5. Efecto de apigenina en los niveles de Nrf2 en soleo, FDB y tejido muscular ventrículo izquierdo.

Valores se expresan en unidades relativas respecto al control (c) \pm SD. Efecto de apigenina posterior a 7 semanas de suplementación en las dosis 30 mg/kg; 60 mg/kg y 100 mg/kg y grupo control (C) en A- Expresión relativa de Nrf2 en soleo. B- Expresión relativa de Nrf2 en FDB. C- Expresión relativa de Nrf2 en Ventrículo Izquierdo. Las comparaciones de los datos se realizaron con el análisis One-way ANOVA con un post hoc de Dunnett para comparaciones múltiples; * $p = 0,04$; ** $p < 0,003$. $n =$ entre 3 y 5 animales por grupo.

Referente a la enzima antioxidante SOD (Figura 6), se observó un aumento significativo de la expresión del transcrito en el músculo soleo en todas las dosis de suplementación de apigenina; la dosis 30 mg/kg presentó un aumento de 1,9 veces ($\pm 0,59$) ($p < 0,01$) respecto al grupo control, la dosis 60 mg/kg presentó un aumento de 1,85 ($\pm 0,41$) veces ($p < 0,03$) comparado con el grupo control, mientras que la dosis 100 mg/kg presentó un aumento de 1,95 veces ($\pm 0,51$) ($p < 0,01$) comparados con el grupo (Figura 6-A). Sin embargo, al evaluar el contenido de proteína de SOD por medio de WB en soleo, no se observaron cambios significativos de los grupos suplementados comparados con el grupo control (Figura 6-B). Por otra parte, al evaluar la expresión del transcrito de SOD y contenido de proteínas de SOD en el músculo FDB, no se observaron diferencias significativas en los grupos suplementados respecto al control en la expresión de SOD (Figura 6- C) y al contenido de proteínas de SOD (Figura 6-D). En el caso del músculo de ventrículo izquierdo, no se observaron cambios significativos de los grupos suplementados con apigenina comparados con el grupo control en la expresión del transcrito de SOD (Figura 6-E) y en el contenido de proteínas de SOD en el tejido muscular del ventrículo izquierdo (Figura 6-F).

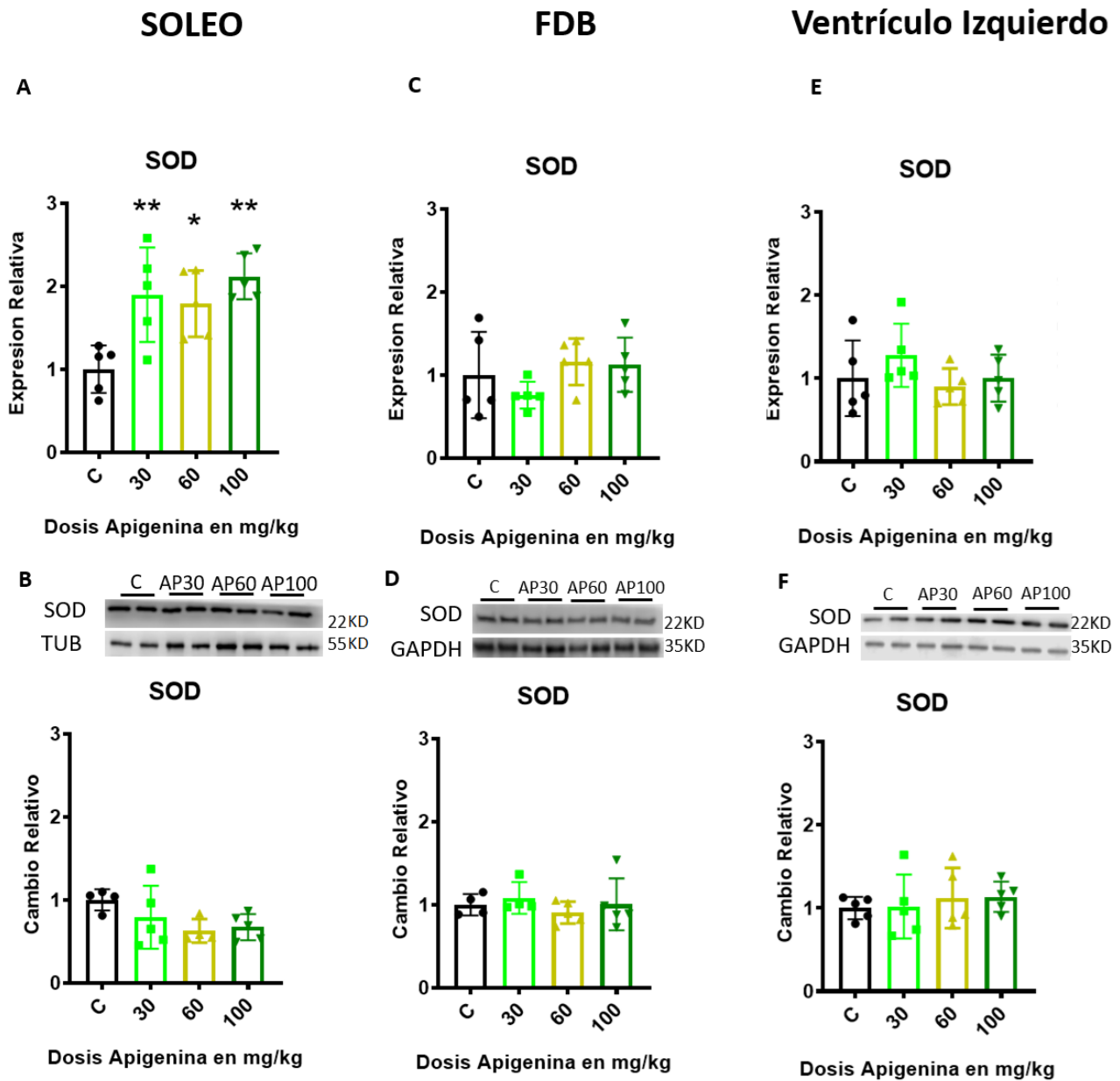


Figura 6. apigenina en los niveles de SOD en soleo, FDB y tejido muscular ventrículo izquierdo. Valores se expresan en unidades relativas respecto al control (C) \pm SD. Efecto de apigenina posterior a 7 semanas de suplementación en las dosis 30 mg/kg; 60 mg/kg y 100 mg/kg y grupo control (C) en A- Expresión relativa de SOD en soleo. B- Cambio relativo de proteínas de SOD por medio de western blot en soleo. C- Expresión relativa de SOD en FDB. D- Cambio relativo de proteínas de SOD por medio de western blot en FDB. E- Expresión relativa de SOD en tejido cardiaco muscular de ventrículo izquierdo. F- Cambio relativo de proteínas de SOD por medio de western blot en tejido cardiaco muscular de ventrículo izquierdo. Las comparaciones de los datos se realizaron con el análisis One-way ANOVA con un post hoc de Dunnett para comparaciones múltiples * $p < 0,01$; ** $p < 0,003$. $n =$ entre 3 y 5 animales por grupo.

Respecto a la enzima antioxidante CAT (Figura 7), se observó un aumento significativo en expresión del transcrito de esta enzima en soleo en las dosis 60 mg/kg ($p < 0,03$) y 100 mg/kg ($p < 0,02$) (Figura 7-A) con un aumento en la expresión en $2,19 (\pm 0,47)$ veces respecto al grupo control para la dosis 60 mg/kg y un aumento de $2,29 (\pm 0,9)$ veces la expresión para la dosis 100 mg/kg comparado con el grupo control. Sin embargo, al evaluar el contenido de proteína de CAT por medio de WB en soleo, no se observaron cambios significativos de los grupos suplementados comparados con el grupo control (Figura 7-B). Respecto al músculo FDB, no se observaron cambios significativos en la expresión del transcrito de CAT de los grupos suplementados comparados con el grupo control (Figura 7-C), y de igual forma, no se observaron cambios significativos en el contenido de proteínas de CAT evaluadas con western blot de los grupos suplementados comparados con el grupo control (Figura 7-D). Con respecto al músculo de ventrículo izquierdo, no se observaron cambios en la expresión del transcrito de CAT (Figura 7-E) ni cambios en el contenido de proteínas de CAT (Figura 7-F) de los grupos suplementados comparados con el grupo control.

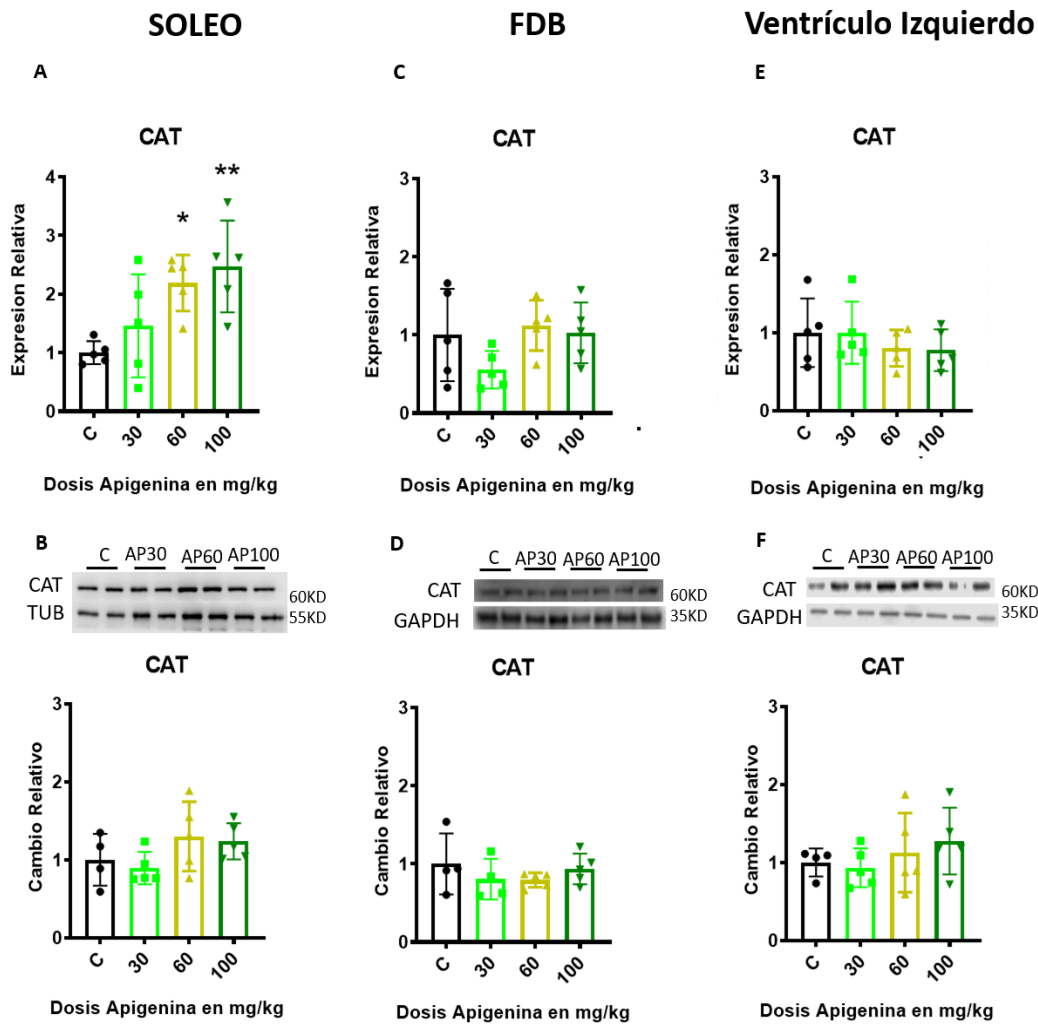


Figura 7. Efecto de apigenina en los niveles de CAT en soleo, FDB y tejido muscular de ventrículo izquierdo.

Valores se expresan en unidades relativas respecto al control (C) \pm SD. Efecto de apigenina posterior a 7 semanas de suplementación en las dosis 30 mg/kg; 60 mg/kg y 100 mg/kg y grupo control (C) en A- Expresión relativa de CAT en soleo. B- Cambio relativo de proteínas de CAT por medio de western blot en soleo. C- Expresión relativa de CAT en FDB. D- Cambio relativo de proteínas de CAT por medio de western blot en FDB. E- Expresión relativa de CAT en tejido cardiaco muscular de ventrículo izquierdo. F- Cambio relativo de proteínas de CAT por medio de western blot en tejido cardiaco muscular de ventrículo izquierdo. Las comparaciones de los datos se realizaron con el análisis One-way ANOVA con un post hoc de Dunnett para comparaciones múltiples * $p < 0,02$; ** $p < 0,003$. $n =$ entre 3 y 5 animales por grupo.

En cuanto a la enzima antioxidante GPX (Figura 8) se observó un aumento significativo en la expresión del transcrito de esta enzima en soleo (Figura 8-A) en las dosis 30 mg/kg ($p = 0,003$) con un aumento en la expresión del transcrito de 2,08 ($\pm 0,48$) veces respecto al grupo control. La dosis 60 mg/kg mostró un aumento significativo en la expresión de GPX ($p = 0,01$) de 1,9 veces ($\pm 0,21$) comparado con el grupo

control, mientras que la dosis 100 mg/kg mostró un aumento significativo ($p= 0,01$) de 1,9 ($\pm 0,54$) veces comparado con el grupo control. Sin embargo, y al igual que en las otras enzimas antioxidantes descritas, no se observaron cambios en el contenido de proteínas de GPX en el músculo soleo evaluados por medio de western blot (Figura 8-B), mientras que en el músculo FDB, no se observaron cambios significativos en los grupos suplementados respecto al grupo control en la expresión del transcrito de GPX (Figura 8-C) y en el contenido proteico de esta enzima (Figura 8-D). De igual forma, en el músculo de ventrículo izquierdo, no se observaron cambios significativos en los grupos suplementados respecto al grupo control en la expresión del transcrito de GPX (Figura 8-E) y en el contenido proteico de esta enzima (Figura 8-F).

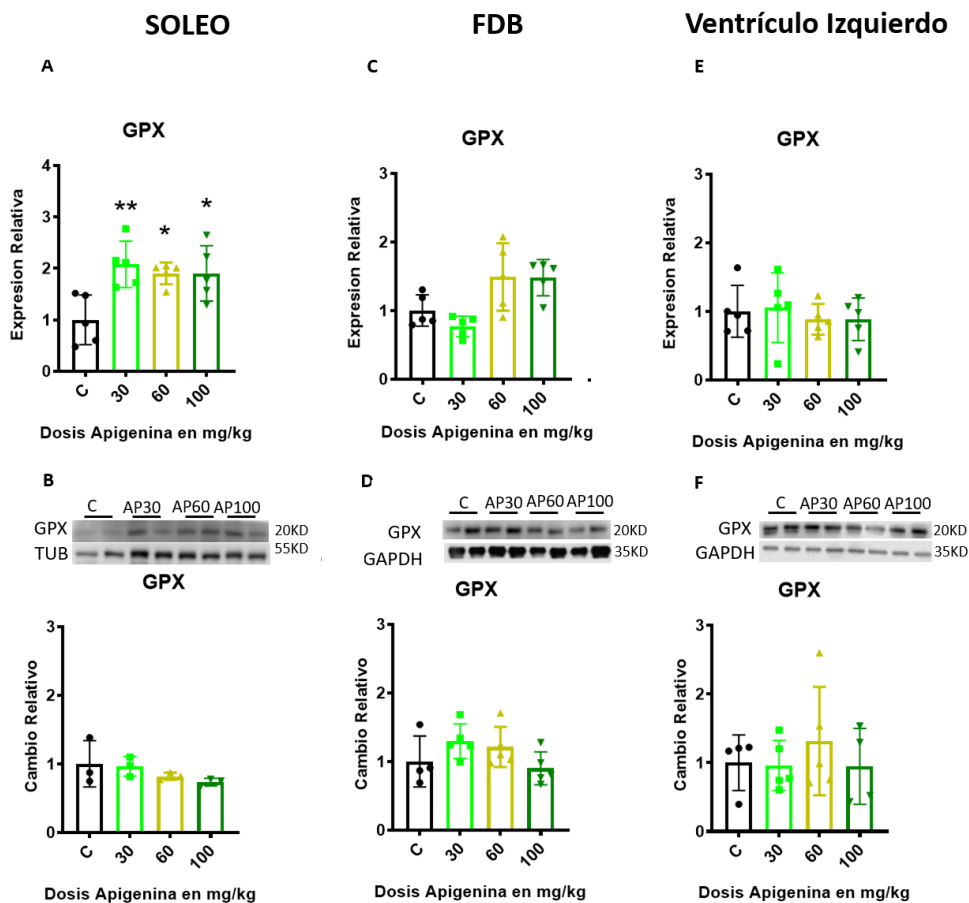


Figura 8. Efecto de apigenina en los niveles de GPX en soleo, FDB y tejido muscular de ventrículo izquierdo.

Valores se expresan en unidades relativas respecto al control (C) \pm SD. Efecto de apigenina posterior a 7 semanas de suplementación en las dosis 30 mg/kg; 60 mg/kg y 100 mg/kg y grupo control (C) en A- Expresión relativa de GPX en soleo. B- Cambio relativo de proteínas de GPX por medio de western blot en soleo. C- Expresión relativa de GPX en FDB. D- Cambio relativo de proteínas de GPX por medio de western blot en FDB. E- Expresión relativa de GPX en tejido cardiaco muscular de ventrículo izquierdo. F- Cambio relativo de proteínas de GPX por medio de western blot en tejido cardiaco muscular de ventrículo izquierdo. Las comparaciones de los datos se realizaron con el análisis One-way ANOVA con un post hoc de Dunnett para comparaciones múltiples * $p < 0,01$; ** $p < 0,003$. n= entre 3 y 5 animales por grupo.

Por último, una vez que se obtuvieron los resultados de las diferentes variables tanto de condición física, estado redox general evaluado en plasma y en eritrocito, y la evaluación del transcrito de genes y contenido proteico de la ruta PGC-1 α / Nrf2 en los músculos soleo, FDB y del tejido del ventrículo izquierdo, se realizó una correlación entre las distintas variables para tratar de observar de mejor

manera la interacción entre estas variables con la suplementación de apigenina. Respecto al músculo soleo (Figura 9), podemos ver que existe una correlación positiva entre la expresión relativa de PGC-1 α con la expresión relativa de Nrf2 ($r= 0,816$ y $p=0,0001$) (Figura 9-A), en la expresión relativa de PGC-1 α con la expresión relativa de SOD ($r=0,641$ y $p=0,002$) (Figura 9-B), en la expresión relativa de PGC-1 α con la expresión relativa de CAT ($r=0,794$ y $p=0,0001$) (Figura 9-C) y en la expresión relativa de PGC-1 α con la expresión relativa de GPX ($r=0,472$ y $p=0,036$) (Figura 9-D).

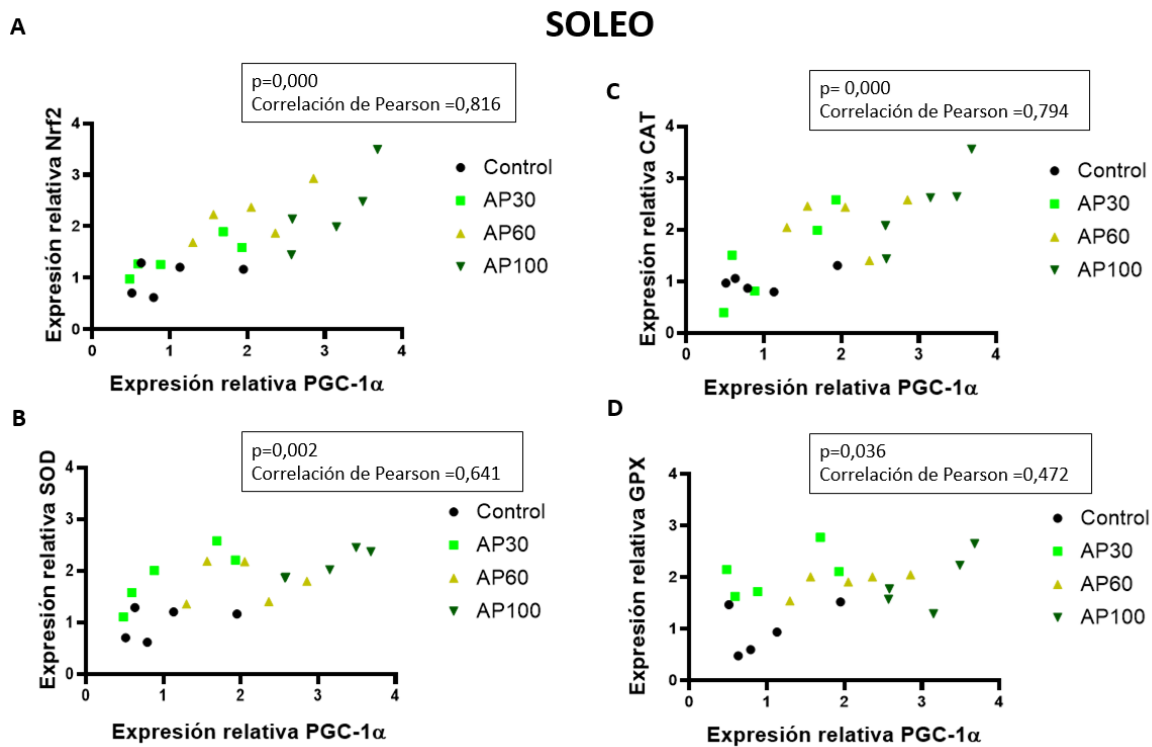


Figura 9. Correlaciones asociadas a la expresión relativa de mRNA en soleo.

Correlación de variables evaluadas en soleo en A- Correlación expresión relativa PGC-1 α con la expresión relativa de Nrf2. B- Correlación expresión relativa PGC-1 α con la expresión relativa de SOD. C- Correlación expresión relativa PGC-1 α con la expresión relativa de CAT. D- Correlación expresión relativa PGC-1 α con la expresión relativa de GPX.

En cuanto al músculo FDB (Figura 10), se observaron correlaciones positivas entre la expresión relativa de PGC-1 α con la expresión relativa de Nrf2 ($r= 0,476$ y $p=0,034$) (Figura 10-A), en la expresión relativa de PGC-1 α con la expresión relativa de SOD ($r=0,503$ y $p=0,024$) (Figura 10-B) y en la expresión relativa de PGC-1 α con la expresión relativa de CAT ($r=0,588$ y $p=0,008$) (Figura 10-C).

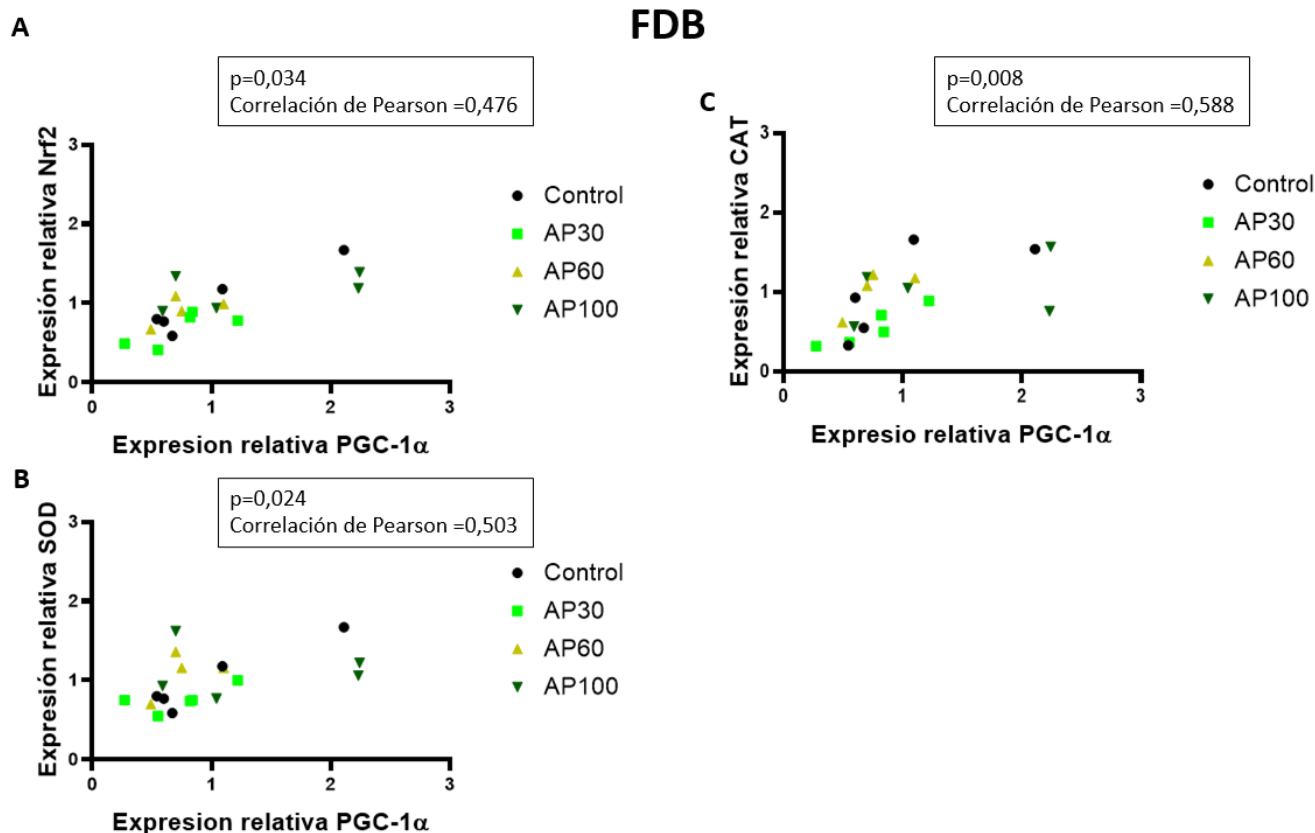


Figura 10. Correlaciones asociadas a la expresión relativa de mRNA en FDB.

Correlación de variables evaluadas en FDB en A- Correlación expresión relativa PGC-1 α con la expresión relativa de Nrf2. B-Correlación expresión relativa PGC-1 α con la expresión relativa de SOD. C- Correlación expresión relativa PGC-1 α con la expresión relativa de CAT.

Por último, referente al músculo de ventrículo izquierdo (Figura 11), podemos ver que existe una correlación positiva entre la expresión relativa de PGC-1 α con la expresión relativa de SOD ($r= 0,8834$ y $p=0,0001$) (Figura 11-A), en la expresión relativa de PGC-1 α con la expresión relativa de CAT ($r= 0,835$ y $p=0,0001$) (Figura 11-B), en la expresión relativa de PGC-1 α con la expresión relativa de GPX ($r= 0,503$ y $p=0,024$) (Figura 11-C). Además, se observó una correlación positiva en el contenido proteico de la enzima SOD con el contenido proteico de la enzima CAT ($r= 0,551$ y $p=0,018$) (Figura 11-D), en el contenido proteico de la enzima SOD con el contenido proteico de la enzima GPX ($r= 0,757$ y $p=0,0001$) (Figura 11-E).

Ventrículo izquierdo

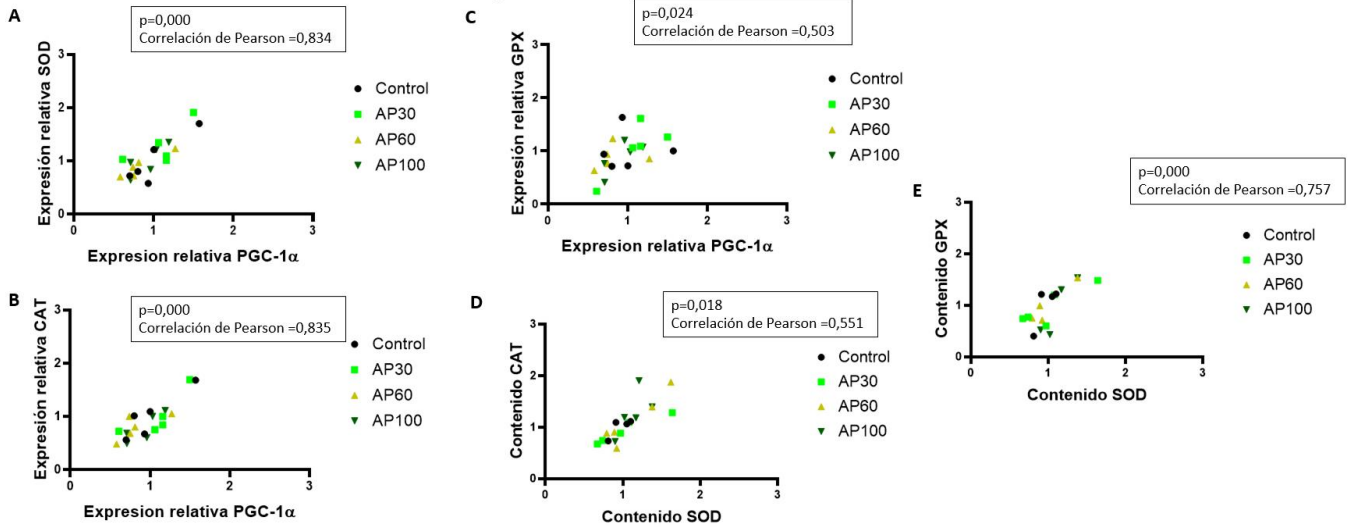


Figura 11. Correlaciones asociadas a la expresión relativa de mRNA y contenido de proteínas en tejido muscular del ventrículo izquierdo.

Correlación de variables evaluadas en tejido muscular del ventrículo izquierdo en en A- Correlación expresión relativa PGC-1 α con la expresión relativa de SOD. B-Correlación expresión relativa PGC-1 α con la expresión relativa de CAT. C- Correlación expresión relativa PGC-1 α con la expresión relativa de GPX. D- Correlación contenido de proteínas de SOD con CAT. E- Correlación contenido de proteínas de SOD con GPX.

12. Discusión

12.1. Efectos de apigenina sobre la condición física.

Posterior a la suplementación durante 7 semanas con apigenina en ratones sanos, no se observaron cambios en la condición física de los ratones asociadas a la fuerza, resistencia y velocidad (Figura 1).

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Jin Jang⁶¹, en el cual ratones suplementados con una dosis de 0,2% y 0,4% de apigenina por medio de una dieta AIN-76 modificada, presentaron un aumento significativo en la distancia recorrida posterior a la suplementación de apigenina por 7 semanas. El test de distancia recorrida utilizado por Jin Jang⁶¹ comenzó con una velocidad de 10 m/min, mientras que en nuestro modelo, por limitaciones técnicas de la trotadora utilizada, el protocolo comenzó con una velocidad de 16 m/min, esto pudo implicar una fatiga mayor en los ratones utilizados en nuestro modelo, y por lo tanto, no presentar una diferencia significativa comparado con el grupo control. En otros trabajos en los cuales se suplementó con apigenina y se observaron mejoras significativas en el test de carrera, fueron con modelos de animales obesos^{56,77} o envejecidos⁷⁸, los cuales al presentar EO y estado redox alterado, apigenina logró mejorar la defensa antioxidante endógena, disminuir marcadores de daño por EO en sangre y tejidos^{56,78}, además de disminuir la atrofia muscular en un modelo de ratones obesos⁷⁷ y envejecidos⁷⁸, y con esto, lograr una mayor fuerza y resistencia en carrera⁷⁸.

12.2. Efectos de apigenina en el estado redox general

Respecto a la defensa antioxidante endógena medida en eritrocito y plasma, no se observaron cambios significativos en el contenido de MDA en eritrocito (Figura 2-A), en la capacidad antioxidante del plasma (Figura 2-B) o en la actividad de SOD (Figura 2- C), y contrario a los resultados esperados, se observó una disminución significativa en la actividad de las enzimas CAT (Figura 2-D) en las dosis 30 mg/kg y 60 mg/kg y en la actividad de GPX en eritrocito se observó una disminución significativa en todas las dosis utilizadas de apigenina (Figura 2- E).

Estos resultados se pueden explicar ya que la sangre es el tejido que recibe parte de la producción de EROS de los diferentes órganos del cuerpo, modificando diversos biomarcadores de EO en el plasma y eritrocito^{79,80}. Margaritelis y cols⁸¹ realizaron una revisión sistemática para evaluar la asociación entre biomarcadores de daño por estrés oxidativo en sangre con diferentes órganos en diversos modelos de

investigación, principalmente en modelo de rata y ratón. En la revisión, dan cuenta que de un total de 42 estudios que evaluaron MDA en sangre, junto con su contenido en diversos tejidos, y observaron que 37 de estos trabajos presentan el mismo cambio direccional (aumento o disminución significativos) en el contenido de MDA en sangre como en los diversos órganos evaluados. En la revisión podemos destacar los resultados obtenidos en el contenido de MDA de corazón, órgano evaluado en 15 estudios de los 42 trabajos incluidos en el trabajo de Magaritelis y cols⁸¹. De los 15 estudios analizados, 13 presentan cambios en la misma dirección en los niveles en sangre de MDA como en corazón. Por otra parte, la enzima SOD, fue evaluada en 28 trabajos, de los cuales, 23 presentan el mismo cambio direccional evaluado en sangre que en tejidos, de los cuales destacan los trabajos que evaluaron corazón (8 artículos) y músculo esquelético (4 artículos). Mientras la actividad de la enzima CAT fue evaluada en 23 artículos, de los cuales, 18 presentan el mismo cambio direccional evaluado en sangre, incluyendo trabajos que evaluaron corazón (6 artículos) y músculo esquelético (2 artículos). Por último, la enzima GPX fue evaluada en 21 trabajos, de los cuales 19 presentan el mismo cambio direccional de GPX en plasma o glóbulos rojos con otros tejidos como corazón (7 artículos) y músculo esquelético (6 artículos). Si bien en nuestros resultados existe una menor actividad de las enzimas CAT y GPX en eritrocito, esta disminución podría no asociarse a un estrés oxidativo, ya que el marcador de daño MDA no sufre modificaciones entre los grupos tratados comparados con el grupo control.

En patologías asociadas al EO y envejecimiento, se ha observado un aumento en el contenido de MDA en eritrocito y una menor capacidad antioxidante del plasma^{13,79}. En nuestro trabajo, la capacidad antioxidante del plasma no se vio afectada, ya que apigenina al no poseer potencial reductor, no generó aumento en la capacidad antioxidante del plasma al contrario de lo evidenciado por otros flavonoides como quercetina⁵², u otros antioxidantes como la Vit-C y Vit-E¹³. Respecto a la disminución en la actividad enzimática de CAT y GPX, se observó que estas presentaron una correlación positiva con el contenido de MDA. Si bien no se observó una disminución significativa en el contenido de MDA en eritrocitos en función de las distintas concentraciones de apigenina, las correlaciones halladas sugieren que las adaptaciones observadas dependen de un menor daño asociado a EO. (Figura 3-A y Figura 3-B). Por lo tanto, si bien no se observó una disminución significativa en el contenido de MDA en eritrocito en los grupos tratados en comparación al grupo control, la disminución significativa de la actividad de CAT y

GPX en los grupos tratados se asoció a menor contenido de MDA posterior al periodo de suplementación de apigenina. Por lo tanto, la disminución de la actividad antioxidante podría no asociarse a un EO, sino a un menor daño oxidativo, evaluado en esta investigación, por medio de MDA. En trabajos previos, en humanos obesos jóvenes, se ha observado una mayor actividad de enzimas antioxidantes además de un mayor contenido de MDA en eritrocito comparado con un grupo joven delgado, mientras que en adultos mayores obesos, se observa una menor actividad de enzimas antioxidantes, además de un mayor contenido de MDA en eritrocito comparado con adultos mayores delgados⁸². Esto se debe a que la actividad antioxidante dependerá de la condición metabólica asociada al peso y composición corporal de los sujetos además de la edad⁸². En patologías metabólicas y envejecimiento, se ha observado un agotamiento de la defensa antioxidante, y con esto, una disminución en la actividad de las enzimas SOD, CAT y GPX⁸², además de un aumento en los niveles de MDA y biomarcadores de daño por EO junto con signos clínicos de enfermedad, por ejemplo, niveles altos de glucosa plasmática⁸³ o hipertensión arterial¹³. En sujetos jóvenes, se ha observado que aumento de la actividad de enzimas antioxidantes se asocia a un aumento en la producción de MDA, con el fin de contrarrestar el daño oxidativo producido por una sesión de ejercicio de alta intensidad¹⁶. En nuestros resultados, la disminución de la actividad de enzimas antioxidantes CAT y GPX estaría asociada a que apigenina generó una disminución en el contenido de MDA, y, por consiguiente, la menor respuesta de las enzimas antioxidantes en su actividad debido a que existe un menor daño oxidativo, por ende, una menor producción de EROS en sangre, lo que podría asociarse a un efecto protector por parte de apigenina en un modelo de ratones sanos, sin embargo, es necesario corroborar esta hipótesis con otros modelos experimentales que evalúen la suplementación de apigenina en modelos sanos en conjunto con modelos de daño por EO y realizar las comparaciones entre dichos grupos.

12.3. Efecto de apigenina en la ruta Pgc-1 α /Nrf2 y enzimas antioxidantes.

Por último, en nuestros resultados se observó en el músculo soleo un aumento en la expresión de los transcritos de los factores PGC-1 α en la dosis de 60 mg/kg y 100 mg/kg, un aumento en la expresión del transcrito de Nrf2 en las dosis de 60 mg/kg y 100 mg/kg mientras que, en las enzimas antioxidantes, se observa un aumento significativo en la expresión del transcrito de SOD en todas las dosis utilizadas de

apigenina, además, se observó un aumento significativo en la expresión del transcrito de CAT en las dosis 60 mg/kg y 100 mg/kg de apigenina, mientras que en la expresión del transcrito de GPX, se observó un aumento significativo en todas las dosis utilizadas de apigenina. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la expresión de los transcritos de los músculos FDB y del ventrículo izquierdo de PGC-1 α , Nrf2, SOD, CAT y GPX posterior a la suplementación de apigenina. Junto con lo anterior, no se observaron cambios significativos en el contenido proteico PGC-1 α en soleo en ninguna de las dosis utilizadas, mientras que el contenido proteico de Nrf2 en los músculos soleo, FDB y del ventrículo izquierdo no pudo ser determinado. Respecto al contenido proteico de las enzimas SOD, CAT y GPX, no se observaron cambios significativos en ninguna de las dosis utilizadas de apigenina en los músculos soleo, FDB y del ventrículo izquierdo.

Estos resultados se pueden explicar ya que apigenina posee una homología química con la quinona de la CoQ del complejo I de la mitocondria, pudiendo acoplarse con los sitios de unión de la quinona generando una inhibición parcial de este complejo por medio de una competencia en la unión del sitio⁶², generando un cambio en el potencial de membrana mitocondria⁸⁴ induciendo una mayor producción de EROS^{53,84} además de un cambio en la relación ADP/ATP permitiendo una mayor actividad de AMPK. El O₂⁻ producido por el complejo I es luego dismutado por la enzima SOD³⁷, que como se observa en la Figura 5-A, mostró un aumento en su expresión en el músculo soleo similar en todas las dosis de apigenina suplementada. Esto se puede deber, a que SOD es la enzima que actúa como primera línea en la defensa antioxidante¹ frente al O₂⁻ producidas por el complejo I de la mitocondria, que aumenta frente a la suplementación de apigenina, es por lo anterior, que independiente de la dosis de apigenina suplementada, SOD aumenta su expresión para contrarrestar la mayor producción de O₂⁻⁶². Sin embargo, la expresión de los factores PGC1 α y Nrf2 presentan una curva dosis dependiente (Figura 4-A y Figura 5-A), ya que para activar estos factores es necesario una cierta cantidad de H₂O₂^{3,85,86}. En el caso de PGC-1 α , sólo la dosis 100 mg/kg generó un aumento significativo en su expresión, esto se puede deber a que PGC-1 α es activado río arriba por AMPK que es sensibilizada por H₂O₂^{50,87} al contrario de Nrf2, que presentó un aumento significativo en su expresión con las dosis 60 mg/kg y 100 mg/kg, ya que Nrf2 es activada directamente por H₂O₂ al disociarla de Keap¹⁸⁵. PGC-1 α y Nrf2 a su vez actúan en los ARE permitiendo el aumento de la expresión de las enzimas SOD, CAT y GPX^{18,85,88}. Las

enzimas CAT y GPX (Figura 7-A y Figura 8-A), al igual que Nrf2 (Figura 5-A), muestran una curva dosis dependiente de apigenina observándose un aumento significativo en la dosis 60 mg/kg y 100 mg/kg en el músculo soleo. Esto se puede deber a que CAT actúa sobre O_2^- producida por SOD¹, y a mayor dosis de apigenina, mayor inhibición del complejo I de la mitocondria, mayor actividad de SOD y por ende, mayor producción de O_2^- que luego debe ser catalizado a H_2O_2 por medio de CAT y GPX³⁷.

Otro mecanismo por el cual apigenina puede generar efectos en la ruta de PGC-1 α , Nrf2 y de las enzimas antioxidantes es mediada por el canal Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4 (TRPV4). Se ha descrito que apigenina es capaz de activar los receptores del canal TRPV4⁸⁹, que es un canal catiónico permeable a Ca^{++} , que induce un ingreso de Ca^{++} extracelular permitiendo la activación de CAMKII β ⁸⁹, lo que permite a su vez la fosforilación y activación de AMPK independientemente de los cambios en la relación AMP/ATP⁹⁰. Se ha observado que el músculo soleo presenta canales TRPV4⁹¹, lo cual explicaría en parte, el efecto de apigenina en este tejido en el aumento de la expresión de PGC-1 α , Nrf2 y de las enzimas antioxidantes, ya que éstas se encuentran debajo de AMPK^{92,93}.

Pese a observarse cambios en la expresión de la ruta PGC-1 α /Nrf2 y de las enzimas antioxidantes de una forma dosis dependiente, no se observaron cambios en el contenido proteico de PGC-1 α , SOD, CAT y GPX respecto al grupo control, esto se puede deber a que, el estrés celular inducido por apigenina, no fue lo suficientemente alto como para inducir una adaptación en el músculo soleo, sino más bien, una estimulación que dio como respuesta, la mayor expresión del transcrito de genes de la defensa antioxidante. Se debe considerar que si bien nuestro modelo utilizó dosis similares a las de otros trabajos⁹⁴, los efectos de apigenina se han visto estudiados de mayor forma en patologías metabólicas^{35,56,77,78,94}, lo que puede influir en el balance redox previo y posterior a la suplementación en los animales de experimentación, y por ende, en la respuesta de apigenina sobre el contenido de proteínas de PGC-1 α y Nrf2, además de las diversas enzimas antioxidantes.

Por otra parte, en la fibra FDB, no se observaron cambios significativos en la expresión de los factores de transcripción evaluados y enzimas antioxidantes ya que, al ser un músculo de contracción rápida⁹⁵, posee menos mitocondrias y con esto apigenina no puede generar la cantidad necesaria de EROS que

permitan la activación de los factores PGC-1 α y Nrf2, y por ende, no se observa un aumento significativo en la expresión de las enzimas antioxidantes⁸⁷.

En estudios anteriores, se observó que la suplementación de apigenina durante 7 semanas en ratones C57BL/6 aumentó el contenido proteico de PGC-1 α , PGC-1 α 1 y PGC-1 α 4, asociándose a un mayor desarrollo de hipertrofia muscular en el músculo cuádriceps⁶¹. En un trabajo realizado por Dongtao Wang⁷⁸ en el cual utilizaron un modelo de ratones envejecidos suplementados con diferentes dosis de apigenina (25 mg/kg, 50 mg/kg y 100 mg/kg) durante 9 meses, logró mejorar significativamente la fuerza y capacidad de resistencia en un test en tapiz rodante comparado con un grupo control envejecido, además, se observó un aumento significativo en el contenido de PGC-1 α en músculo cuádriceps, junto de una mayor actividad de SOD, CAT y GPX y un menor contenido de MDA en el músculo gastrocnemios⁷⁸. En un estudio de Wo Hee Choi⁷⁷, se evaluó el efecto de apigenina en un modelo de ratones obesos y atrofia muscular, que posterior a 8 semanas de suplementación de apigenina, ratones obesos suplementados mostraron un mayor contenido de PGC-1 α en cuádriceps, una mayor actividad de la enzima citrato sintasa en gastrocnemios junto con una mayor expresión de proteínas de la cadena transportadora de electrones comparados con ratones obesos. Estas diferencias entre los resultados obtenidos y los vistos con anterioridad se pueden asociar a los diferentes tipos de fibra muscular utilizados^{95,96} y a cambios en la defensa antioxidante y respuesta del organismo frente al EO dado por la obesidad y envejecimiento respecto a la suplementación con apigenina⁸². Es relevante destacar, que el efecto de apigenina en el músculo esquelético no ha sido descrito en su totalidad, para el año 2018 sólo dos artículos evaluaron el efecto de apigenina como herramienta terapéutica en el tratamiento de las enfermedades metabólicas utilizando como órgano objetivo el músculo esquelético⁹⁷. Al momento de la entrega de la presente tesis, sólo tres artículos han evaluado el efecto de apigenina en los factores PGC-1 α ,Nrf2 o en las enzimas antioxidantes en el músculo esquelético. Estos tres artículos fueron realizados en ratones envejecidos⁷⁸, en ratones obesos⁷⁷ y otro en ratones sanos⁶¹. Es por lo anterior, que aún falta por dilucidar el efecto que posee apigenina en los diversos tipos de fibra muscular esquelética, en condiciones de enfermedades metabólicas como en animales sanos, y en especial, en modelos de ejercicio, ya sea de forma aguda o con un entrenamiento crónico, ya que cada fibra muscular presenta resultados diferentes dependiendo de su metabolismo.

Respecto a la expresión de la ruta PGC-1 α /Nrf2 y enzimas antioxidantes en el músculo de ventrículo izquierdo, no se observaron cambios posteriores a la suplementación de apigenina. Este resultado contrasta con lo observado en un estudio de Huang Huang⁹⁸, en el cual se observó en un modelo de I/R realizado en una cámara de Langendorff en corazones de ratas suplementadas con apigenina durante 3 semanas, una disminución significativa de la actividad de la lactado deshidrogenasa y de la creatinquinasa comparado con corazones de ratas en un modelo I/R sin suplementación de apigenina, lo que se asocia a una mejora en la capacidad oxidativa del corazón. Además, se observó un aumento significativo de la actividad de SOD, CAT y GPX en tejido cardíaco junto una disminución de MDA y daño del tejido cardíaco⁹⁸. En otro estudio realizado por Pei Wang⁹⁹, en un modelo de isquemia reperusión en cual las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente con apigenina (4 mg/kg), 10 min antes de ligar la rama descendente anterior izquierda de la arteria coronaria para inducir la isquemia y posterior sacrificio de los animales, se observó un aumento en la actividad de SOD y CAT, y un menor contenido de MDA en el tejido cardíaco. Los resultados anteriores, muestran un efecto preconditionante generado por apigenina frente a un EO agudo y de gran magnitud como lo es el proceso de I/R. Sin embargo, en nuestro modelo de ratones sanos no observamos un aumento en la expresión de genes asociados a la defensa antioxidante en tejido del ventrículo izquierdo. Esto se puede deber a que apigenina no generó el estrés necesario para inducir una adaptación en este tejido, ya que se ha visto que los músculos oxidativos toleran de mejor manera el daño generado por las EROS¹⁰⁰ además de tener una mayor capacidad de mantención del glutatión comparado con músculos de fibra rápida. El glutatión es el principal antioxidante celular, que permite disminuir la tasa de producción de EROS³⁷. En ratas, se ha observado que el tejido cardíaco presenta un mayor contenido de glutatión (1,7 $\mu\text{mol/g}$ de tejido húmedo en promedio) comparado con soleo (1 $\mu\text{mol/g}$ de tejido húmedo en promedio)¹⁰¹. Junto con lo anterior, se ha observado que el cardíaco presenta comparativamente una mayor actividad de enzimas que regulan la velocidad de la glucólisis como la fosfofructokinasa y enzimas que regulan el metabolismo oxidativo como la citrato sintasa en comparación músculo soleo^{102,103}, en el cual apigenina si mostró mejoras en la expresión de los genes PGC-1 α /Nrf2 y de enzimas antioxidantes en nuestro estudio. Por otra parte, apigenina ha demostrado mejorar el metabolismo oxidativo de una forma

precondicionante un modelo de I/R⁹⁸. En un modelo de ratas Sprague-Dawley hipertensas por medio de un modelo renovascular, en el cual se liga la arteria renal izquierda, y que fueron suplementados con apigenina (50 y 100 mg/kg) durante 4 semanas, presentaron un menor contenido proteico de Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 α y del peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) comparado con el grupo control hipertenso¹⁰⁴. Estos factores de transcripción están asociados a la síntesis de ácidos grasos y a la mayor utilización de la ruta glucolítica citosólica en el tejido cardiaco. Además, las ratas suplementadas con apigenina, presentaron un aumento significativo del contenido proteico del factor PPAR α ¹⁰⁴, factor de transcripción que favorece la utilización de ácidos grasos como sustrato energético por medio de la β -oxidación¹⁰⁵, junto con un aumento de la enzima carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1), que permite el transporte de las cadenas de ácidos grasos desde el citoplasma hacia el espacio intermembrana de la mitocondria, favoreciendo así la utilización de ácidos grasos en el metabolismo oxidativo^{104,106}. Además, en las ratas suplementadas con apigenina se observó un aumento en el contenido proteico de la enzima piruvato deshidrogenasa kinasa 4 (PDK4) que favorece la conversión del piruvato citosólico a Acetil-Coa, y con esto, la utilización de glucosa en el metabolismo oxidativo^{104,107}.

Considerando los antecedentes previos, en los cuales el tejido cardiaco presenta una mayor capacidad oxidativa que el soleo^{102,103}, además de mayores niveles de glutatión¹⁰¹, y que el daño celular generado por las EROS dependerá de la capacidad oxidativa del tejido¹⁰⁰, y que apigenina en el tejido cardiaco favorece el metabolismo lipídico y glucolítico oxidativo¹⁰⁴, el estrés celular generado por las diferentes dosis de apigenina en el músculo del ventrículo izquierdo no fue lo suficientemente alto como para inducir una respuesta y adaptación de la defensa antioxidante inducida por apigenina en este tejido, ya que su alta capacidad oxidativa le permite responder de mejor forma frente a la inhibición del complejo I de la mitocondria generado por apigenina, que es un estrés de bajo nivel, enfrentándose de mejor manera al cambio en la relación ATP/AMP generado por el bloqueo del complejo I, y por lo tanto, una menor activación de AMPK y con ésta, la menor expresión de los genes de la ruta PGC-1 α /Nrf2 y enzimas antioxidantes, en comparación a otros tejidos como el soleo^{102,108}.

13. Conclusiones

En base a nuestros resultados, se puede concluir que:

- 1- Apigenina no genera cambios en la condición física.
- 2- Posee un efecto en la actividad de enzimas antioxidantes en glóbulo rojo, particularmente disminuye la actividad de CAT y GPX.
- 3- Tiene un efecto diferenciado en las expresiones de genes de la ruta PGC-1 α /Nrf2 y de enzimas antioxidantes de musculo esquelético y cardiaco, particularmente sólo se observan aumentos significativos en el transcrito de la vía PGC-1 α /Nrf2 y de enzimas antioxidantes en soleo, sin observar cambios significativos en FDB y tejido cardiaco del ventrículo izquierdo, sin generar cambios en el contenido proteico en ninguno de los tejidos utilizados.

Es por lo anterior, que nuestra hipótesis es nula.

Son necesarias más investigaciones que puedan abordar desde otra arista el efecto que tiene apigenina sobre la señalización de la defensa antioxidante en diversos tejidos, además de su efecto diferenciado en glóbulo rojo.

14. Referencias

1. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*. 2015;97:55-74. doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.040
2. Forman HJ, Maiorino M, Ursini F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry*. 2010;49(5):835-842. doi:10.1021/bi9020378
3. Ristow M, Schmeisser K. Mitohormesis: Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (ROS). *Dose Response*. 2014;12(2):288-341. doi:10.2203/dose-response.13-035.Ristow
4. Rodrigo R, Brito R, González-montero J. Antioxidants in human disease : Potential therapeutic opportunities. *Clin Pharmacol Transl Med*. 2017;1(2)(May):44-53.
5. Checa J, Aran JM. Reactive oxygen species: Drivers of physiological and pathological processes. *J Inflamm Res*. 2020;13:1057-1073. doi:10.2147/JIR.S275595
6. Guillaumet-Adkins A, Yañez Y, Peris-Diaz MD, Calabria I, Palanca-Ballester C, Sandoval J. Epigenetics and Oxidative Stress in Aging. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:8. doi:10.1155/2017/9175806
7. Wang CH, Wu SB, Wu YT, Wei YH. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013;238(5):450-460. doi:10.1177/1535370213493069
8. De Figueiredo ASP, Salmon AB, Bruno F, et al. Nox2 mediates skeletal muscle insulin resistance induced by a high fat diet. *J Biol Chem*. 2015;290(21):13427-13439. doi:10.1074/jbc.M114.626077
9. Le Lay S, Simard G, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:1-18. doi:10.1155/2014/908539
10. Gacitúa T, Karachon L, Romero E, et al. Effects of resistance training on oxidative stress-related biomarkers in metabolic diseases: a review. *Sport Sci Health*. Published online 2017. doi:10.1007/s11332-017-0402-5
11. Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. 2006;440(April):944-949. doi:10.1038/nature04634
12. Kaneto H, Katakami N, Matsuhisa M, Matsuoka T aki. Role of Reactive Oxygen Species in the Progression of Type 2 Diabetes and Atherosclerosis. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:1-11. doi:10.1155/2010/453892
13. Rodrigo R, Prat H, Passalacqua W, Araya J, BACHler J. Decrease in oxidative stress through supplementation of vitamins C and E is associated with a reduction in blood pressure in patients with essential hypertension Clinical Science. *Clin Sci*. 2008;114:625-634. doi:10.1042/CS20070343
14. Korsager Larsen M, Matchkov V V. Hypertension and physical exercise: The role of oxidative stress. *Medicina (B Aires)*. 2016;52(1):19-27. doi:10.1016/j.medic.2016.01.005
15. Hawley JA, Hargreaves M, Joyner MJ, Zierath JR. Integrative biology of exercise. *Cell*. 2014;159(4):738-749. doi:10.1016/j.cell.2014.10.029
16. Bogdanis GC, Stavrinou P, Fatouros IG, et al. Short-term high-intensity interval exercise training attenuates oxidative stress responses and improves antioxidant status in healthy humans. *Food Chem Toxicol*. 2013;61:171-177. doi:10.1016/j.fct.2013.05.046
17. Díaz-Vegas A, Campos CA, Contreras-ferrat A, et al. ROS production via P2Y1-PKC-NOX2 is triggered by extracellular ATP after electrical stimulation of skeletal muscle cells ROS Production via P2Y 1 -PKC-NOX2 Is Triggered by Extracellular ATP after Electrical Stimulation of Skeletal Muscle Cells. *PLoS One*. Published online 2015. doi:10.1371/journal.pone.0129882
18. Merry TL, Ristow M, Merry TL, Ristow M. Mitohormesis in exercise training. *Free Radic Biol Med*. 2015;98(November):123-130. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.032
19. Buchheit M, Laursen PB. High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle: Part

- II: Anaerobic energy, neuromuscular load and practical applications. *Sport Med.* 2013;43(10):927-954. doi:10.1007/s40279-013-0066-5
20. Steinbacher P, Eckl P. Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules.* 2015;5(2):356-377. doi:10.3390/biom5020356
 21. Hey-Mogensen M, Højlund K, Vind BF, et al. Effect of physical training on mitochondrial respiration and reactive oxygen species release in skeletal muscle in patients with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2010;53:1976-1985. doi:10.1007/s00125-010-1813-x
 22. Donoso P, Finkelstein JP, Montecinos L, et al. Stimulation of NOX2 in isolated hearts reversibly sensitizes RyR2 channels to activation by cytoplasmic calcium. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;68:38-46. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.12.028
 23. Powers SK, Nelson WB, Hudson MB. Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(5):942-950. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.009
 24. Ji LL, Kang C, Zhang Y. Exercise-induced hormesis and skeletal muscle health. *Free Radic Biol Med.* Published online February 22, 2016. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.025
 25. Pinho C a, Tromm CB, Tavares AM V, et al. Effects of different physical training protocols on ventricular oxidative stress parameters in infarction-induced rats. *Life Sci.* 2012;90(13-14):553-559. doi:10.1016/j.lfs.2012.01.018
 26. Azizbeigi K, Azarbayjani MA, Atashak S, Stannard SR. Effect of Moderate and High Resistance Training Intensity on Indices of Inflammatory and Oxidative Stress. *Res Sport Med.* 2015;23(1):73-87. doi:10.1080/15438627.2014.975807
 27. Norheim F, Langleite TM, Hjorth M, et al. The effects of acute and chronic exercise on PGC-1 α , irisin and browning of subcutaneous adipose tissue in humans. *FEBS J.* 2014;281(3):739-749. doi:10.1111/febs.12619
 28. Merry TL, Ristow M. Nuclear factor erythroid-derived 2-like2 (NFE2L2, Nrf2) mediates exercise-induced mitochondrial biogenesis and the anti-oxidant response in mice. *J Physiol.* 2016;18:5195-5207. doi:10.1113/JP271957
 29. Domenech RJ. Preconditioning: a new concept about the benefit of exercise. *Circulation.* 2006;113(1):105-108. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.569863
 30. Ferraro E, Giammarioli AM, Chiandotto S, Spoletini I, Rosano G. Exercise-Induced Skeletal Muscle Remodeling and Metabolic Adaptation: Redox Signaling and Role of Autophagy. *Antioxid Redox Signal.* 2014;21(1):154-176. doi:10.1089/ars.2013.5773
 31. Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M. Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(10):1208-1246. doi:10.1089/ars.2011.4498
 32. Çakır-Atabek H, Özdemir F, Çolak R. Oxidative stress and antioxidant responses to progressive resistance exercise intensity in trained and untrained males. *Biol Sport.* 2015;32(4):321-328. doi:10.5604/20831862.1176302
 33. Rodrigo R, Brito R, González-montero J. Antioxidants in human disease : Potential therapeutic opportunities. *Clin Pharmacol Transl Med.* 2017;1(2):44-53.
 34. Garcia-Diaz DF, Lopez-Legarrea P, Quintero P, Martinez JA. Vitamin C in the treatment and/or prevention of obesity. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2014;60(6):367-379. doi:10.3177/jnsv.60.367
 35. Feng X, Yu W, Li X, et al. Apigenin, a modulator of PPAR γ , attenuates HFD-induced NAFLD by regulating hepatocyte lipid metabolism and oxidative stress via Nrf2 activation. *Biochem Pharmacol.* 2017;136:136-149. doi:10.1016/j.bcp.2017.04.014
 36. Teixeira-Lemos E, Nunes S, Teixeira F, Reis F. Regular physical exercise training assists in preventing type 2 diabetes development: focus on its antioxidant and anti-inflammatory properties. *Cardiovasc Diabetol.* 2011;10(1):12. doi:10.1186/1475-2840-10-12
 37. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a Review. *Eur J Med Chem.* 2015;97:55-74. doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.040
 38. Rodrigo R, Prieto JC, Castillo R. Cardioprotection against ischaemia/reperfusion by vitamins C and E plus n-3 fatty acids: molecular mechanisms and potential clinical applications. *Clin Sci (Lond).* 2013;124(1):1-15. doi:10.1042/CS20110663
 39. Paredes-Gonzalez X, Fuentes F, Jeffery S, et al. Induction of Nrf2-mediated gene expression by dietary phytochemical flavones Apigenin and Luteolin. *Biopharm Drug Dispos.* Published online

2015. doi:10.1002/bdd.1956

40. Paulsen G, Cumming KT, Holden G, et al. Vitamin C and E supplementation hampers cellular adaptation to endurance training in humans: a double-blind, randomised, controlled trial. *J Physiol.* 2014;592(8):1887-1901. doi:10.1113/jphysiol.2013.267419
41. Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Romagnoli M, et al. Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(1):142-149. doi:10.1016/S0162-0908(08)79360-7
42. Hamid A, Hasrul MA, Ruzanna RJ, et al. Effect of vitamin E (Tri E ®) on antioxidant enzymes and DNA damage in rats following eight weeks exercise. *Nutr J.* 2011;10:1-7.
43. Strobel NA, Peake JM, Matsumoto AYA, Marsh SA, Coombes JS, Wadley GD. Antioxidant Supplementation Reduces Skeletal Muscle Mitochondrial Biogenesis. *Med Sci Sport Exerc.* 2011;(31):1017-1024. doi:10.1249/MSS.0b013e318203afa3
44. Meier P, Renga M, Hoppeler H, Baum O. The impact of antioxidant supplements and endurance exercise on genes of the carbohydrate and lipid metabolism in skeletal muscle of mice. *Cell Biochem Funct.* 2012;(July). doi:10.1002/cbf.2859
45. Domenech E, Romagnoli M, Arduini A, et al. Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance. *Am J Clin Nutr.* 2018;(March):142-149.
46. Contreras-Ferrat A, Llanos P, Vásquez C, et al. Insulin elicits a ROS-activated and an IP₃-dependent Ca²⁺ release, which both impinge on GLUT4 translocation. *J Cell Sci.* 2014;127(Pt 9):1911-1923. doi:10.1242/jcs.138982
47. Sandström ME, Zhang SJ, Bruton J, et al. Role of reactive oxygen species in contraction-mediated glucose transport in mouse skeletal muscle. *J Physiol.* 2006;575(Pt 1):251-262. doi:10.1113/jphysiol.2006.110601
48. Powers SK, Talbert EE, Adhietty PJ. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *J Physiol.* 2011;589(Pt 9):2129-2138. doi:10.1113/jphysiol.2010.201327
49. Oh S, Komine S, Warabi E, Akiyama K, Ishi A. Nuclear factor (erythroid derived 2) - like 2 activation increases exercise endurance capacity via redox modulation in skeletal muscles. 2017;(September):1-11. doi:10.1038/s41598-017-12926-y
50. Irrcher I, Ljubcic V, Hood DA. Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1α transcription in skeletal muscle cells. *Am j Physiol Cell Physiol.* 2008;3:116-123. doi:10.1152/ajpcell.00267.2007.
51. Ristow M, Zarse K, Oberbach A, et al. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(21):8665-8670. doi:10.1073/pnas.0903485106
52. Pallauf K, Duckstein N, Hasler M, Klotz LO, Rimbach G. Flavonoids as Putative Inducers of the Transcription Factors Nrf2, FoxO, and PPAR γ. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:14-16. doi:10.1155/2017/4397340
53. Andueza A, García-Garzón A, Ruiz De Galarreta M, et al. Oxidation pathways underlying the pro-oxidant effects of apigenin. *Free Radic Biol Med.* 2015;87:169-180. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.003
54. Castillo RL, Quezada M, Quin J. Polyunsaturated fatty acid induces cardioprotection against ischemia-reperfusion through the inhibition of NF-κB and induction of Nrf2 Original Research Polyunsaturated fatty acid induces cardioprotection against ischemia-reperfusion through the inhib. 2016;(May). doi:10.1177/1535370216649263
55. Sang Y, Zhang F, Wang H, et al. Apigenin exhibits protective effects in a mouse model of d-galactose-induced aging via activating the Nrf2 pathway. *Food Funct.* Published online 2017. doi:10.1039/c7fo00037e
56. Jung UJ, Cho YY, Choi MS. Apigenin ameliorates dyslipidemia, hepatic steatosis and insulin resistance by modulating metabolic and transcriptional profiles in the liver of high-fat diet-induced obese mice. *Nutrients.* 2016;8(5). doi:10.3390/nu8050305
57. Shukla, S. Gupta S. Apigenin-induced prostate cancer cell death is initiated by reactive oxygen species and p53 activation. *Free Radic Biol Med.* 2009;44(10):1833-1845. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.02.007.Apigenin-induced
58. Zhou X, Wang F, Zhou R, Song X, Xie M. Apigenin: A current review on its beneficial biological activities. *J Food Biochem.* 2017;41(4). doi:10.1111/jfbc.12376

59. Ren B, Qin W, Wu F, et al. Apigenin and naringenin regulate glucose and lipid metabolism, and ameliorate vascular dysfunction in type 2 diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2016;773:13-23. doi:10.1016/j.ejphar.2016.01.002
60. Banerjee K, Mandal M. Oxidative stress triggered by naturally occurring flavone apigenin results in senescence and chemotherapeutic effect in human colorectal cancer cells. *Redox Biol.* 2015;5:153-162. doi:10.1016/j.redox.2015.04.009
61. Jang YJ, Son HJ, Choi YM, Ahn J, Hwa C. Apigenin enhances skeletal muscle hypertrophy and myoblast differentiation by regulating Prmt7. *Oncotarget.* 2017;8(45):78300-78311.
62. Lagoa R, Graziani I, Lopez-Sanchez C, Garcia-Martinez V, Gutierrez-Merino C. Complex I and cytochrome c are molecular targets of flavonoids that inhibit hydrogen peroxide production by mitochondria. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2011;1807(12):1562-1572. doi:10.1016/j.bbabi.2011.09.022
63. Morrison D, Hughes J, Gatta PA Della, et al. Vitamin C and E supplementation prevents some of cellular adaptation to endurance-training in humans. *Free Radic Biol Med.* Published online 2015. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.412
64. Souza RP, Bonfim-mendonça PDS, Gimenes F, et al. Oxidative Stress Triggered by Apigenin Induces Apoptosis in a Comprehensive Panel of Human Cervical Cancer-Derived Cell Lines. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017.
65. Mao X yuan, Yu J, Liu Z qian, Zhou H hao. Apigenin attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats via suppressing oxidative stress and nitric oxide synthase pathway. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(9):15506-15513.
66. Nair, Anroop Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm.* 2016;7:27-31. doi:10.4103/0976-0105.177703
67. Diogo LN, Faustino I V., Afonso RA, Pereira SA, Monteiro EC, Santos AI. Voluntary oral administration of losartan in rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015;54(5):549-556.
68. Campo A, Hernández IC, Sepúlveda MC, et al. Muscle function decline and mitochondria changes in middle age precede sarcopenia in mice. *Aging (Albany NY).* 2018;(December 2017). doi:10.18632/aging.101358
69. Benzie I, Strain J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power": The FRAP Assay. *Anal Biochem.* 1996;239:70-76.
70. Ohkawa H, Ohishi N. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* Published online 1979. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269779907383%5Cnpapers2://publication/uuid/0E9272DB-6066-4EB6-A630-6859C0AB4747>
71. Bergmeyer HU. Catalase. In: Methods of enzymatic analysis. *Methods Enzym Anal New York Verlag.* Published online 1974:673-683. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Catalase.+In+Methods+in+Enzymatic+Analysis#0>
72. Nebot, C Moutet, M Huet, P Xu, J Yadan, J Chaudiere J. Spectrophotometric Assay of Superoxide Dismutase Activity Based on the Activated Autoxidation of a Tetracyclic Catechol. *Anal Biochem.* 1993;214:442-451.
73. Flohé L, Gunzler W. Assays of Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984;105:114-121.
74. Misra HP, Fridovich I. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *J Biol Chem.* 1972;247(10):3170-3175.
75. Reyes-Farias M, Vasquez K, Ovalle-marin A, et al. Chilean Native Fruit Extracts Inhibit Inflammation Linked to the Pathogenic Interaction Between Adipocytes and Macrophages. *J Med Food.* 2014;00(0):1-8. doi:10.1089/jmf.2014.0031
76. Cárdenas C, Muller M, McNeal, Andrew Lovy, Alenka Jaña, Fabian Bustos, Galdo Urra, Felix Smith, Natalia Molgó J, Diehl A, Ridky T, Foskett T. Selective Vulnerability of Cancer Cells by Inhibition of Ca²⁺ Transfer from Endoplasmic Reticulum to Mitochondria. *Cell Rep.* 2016;(April). doi:10.1016/j.celrep.2016.03.045
77. Choi WH, Son HJ, Jang YJ, Ahn J, Jung CH, Ha TY. Apigenin Ameliorates the Obesity-Induced Skeletal Muscle Atrophy by Attenuating Mitochondrial Dysfunction in the Muscle of Obese Mice. *Mol Nutr Food Res.* 2017;61(12):1-10. doi:10.1002/mnfr.201700218
78. Wang D, Yang Y, Zou X, Zhang J, Zheng Z, Wang Z. Antioxidant Apigenin Relieves Age-Related

- Muscle Atrophy by Inhibiting Oxidative Stress and Hyperactive Mitophagy and Apoptosis in Skeletal Muscle of Mice. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci.* 2020;75(11):2081-2088. doi:10.1093/gerona/glaa214
79. Rossi WM, Sellés AJN, Garrido G. Biomarkers of oxidative stress in antioxidant therapy. *J Pharm Pharmacogn Res.* 2016;4(2):62-83.
 80. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, et al. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxidants Redox Signal.* 2015;23(14):1144-1170. doi:10.1089/ars.2015.6317
 81. Margaritelis N V, Veskoukis AS, Paschalis V, et al. Blood reflects tissue oxidative stress: a systematic review. *Biomarkers.* 2015;00(00):1-12. doi:10.3109/1354750X.2014.1002807
 82. Karaouzene N, Merzouk H, Aribi M, et al. Effects of the association of aging and obesity on lipids, lipoproteins and oxidative stress biomarkers: A comparison of older with young men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2011;21(10):792-799. doi:10.1016/j.numecd.2010.02.007
 83. Poblete-Aro C, Russell-Guzmán J, Parra P, et al. Efecto del ejercicio físico sobre marcadores de estrés oxidativo en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Rev Med Chil.* 2018;146(3):362-372. doi:10.4067/s0034-98872018000300362
 84. Warkad MS, Kim CH, Kang BG, et al. Metformin-induced ROS upregulation as amplified by apigenin causes profound anticancer activity while sparing normal cells. *Sci Rep.* 2021;11(1):1-13. doi:10.1038/s41598-021-93270-0
 85. Oh S, Komine S, Warabi E, et al. Nuclear factor (erythroid derived 2)-like 2 activation increases exercise endurance capacity via redox modulation in skeletal muscles. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-11. doi:10.1038/s41598-017-12926-y
 86. Lovy A, Foskett JK, Cárdenas C. InsP 3 R , the calcium whisperer : Maintaining mitochondrial function in cancer. *Mol Cell Oncol.* 2016;3(4):1-2. doi:10.1080/23723556.2016.1185563
 87. Miotto PM, Holloway GP. Exercise-induced reductions in mitochondrial ADP sensitivity contribute to the induction of gene expression and mitochondrial biogenesis through enhanced mitochondrial H₂O₂ emission. *Mitochondrion.* 2019;46:116-122. doi:10.1016/j.mito.2018.03.003
 88. Gureev AP, Shaforostova EA, Popov VN. Regulation of mitochondrial biogenesis as a way for active longevity: Interaction between the Nrf2 and PGC-1 α signaling pathways. *Front Genet.* 2019;10(MAY):1-12. doi:10.3389/fgene.2019.00435
 89. Wei X, Gao P, Pu Y, et al. Activation of TRPV4 by dietary apigenin antagonizes renal fibrosis in deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt-induced hypertension. *Clin Sci.* 2017;131(7):567-581. doi:10.1042/CS20160780
 90. Gasparrini M, Giampieri F, M. Alvarez Suarez J, et al. AMPK as a New Attractive Therapeutic Target for Disease Prevention: The Role of Dietary Compounds AMPK and Disease Prevention. *Curr Drug Targets.* 2016;17(8):865-889. doi:10.2174/1573399811666150615150235
 91. Pritschow BW, Lange T, Kasch J, Kunert-Keil C, Liedtke W, Brinkmeier H. Functional TRPV4 channels are expressed in mouse skeletal muscle and can modulate resting Ca²⁺ influx and muscle fatigue. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2011;461(1):115-122. doi:10.1007/s00424-010-0883-4
 92. Viollet B. The energy sensor AMPK: Adaptations to exercise, nutritional and hormonal signals. *Res Perspect Endocr Interact.* 2017;(9783319727899):13-24. doi:10.1007/978-3-319-72790-5_2
 93. Di Meo S, Napolitano G, Venditti P. Mediators of physical activity protection against ros-linked skeletal muscle damage. *Int J Mol Sci.* 2019;20(12):1-38. doi:10.3390/ijms20123024
 94. Ali F, Rahul, Naz F, Jyoti S, Siddique YH. Health functionality of apigenin: A review. *Int J Food Prop.* 2017;20(6):1197-1238. doi:10.1080/10942912.2016.1207188
 95. Tarpey MD, Amorese AJ, Balestrieri NP, et al. Characterization and utilization of the flexor digitorum brevis for assessing skeletal muscle function. *Skelet Muscle.* 2018;8(1):1-15. doi:10.1186/s13395-018-0160-3
 96. Augusto V, Padovani CR, Campos GER. Skeletal Muscle Fiber Types in C57BL6J Mice. *Brazilian J Morphol Sci.* 2004;21(2):89-94.
 97. Mazibuko-Mbeje SE, Dlodla P V., Nkambule BB, Obonye N, Louw J. Skeletal Muscle as a Therapeutic Target for Natural Products to Reverse Metabolic Syndrome. In: *Muscle Cell and Tissue - Current Status of Research Field.* ; 2018. doi:10.5772/intechopen.78687
 98. Huang H, Lai S, Luo Y, et al. Nutritional preconditioning of apigenin alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury via the mitochondrial pathway mediated by Notch1/Hes1. *Oxid Med*

- Cell Longev.* 2019;2019. doi:10.1155/2019/7973098
99. Wang P, Sun J, Lv S, Xie T, Wang X. Apigenin alleviates myocardial reperfusion injury in rats by downregulating miR-15b. *Med Sci Monit.* 2019;25:2764-2776. doi:10.12659/MSM.912014
 100. Charles AL, Guilbert AS, Guillot M, et al. Muscles susceptibility to ischemia-reperfusion injuries depends on fiber type specific antioxidant level. *Front Physiol.* 2017;8(FEB):1-12. doi:10.3389/fphys.2017.00052
 101. Atalay M, Seene T, Hänninen O, Sen CK. Skeletal muscle and heart antioxidant defences in response to sprint training. *Acta Physiol Scand.* 1996;158(2):129-134. doi:10.1046/j.1365-201X.1996.540305000.x
 102. Zonderland ML, Bär PR, Reijneveld JC, Spruijt BM, Keizer HA, Glatz JFC. Different metabolic adaptation of heart and skeletal muscles to moderate-intensity treadmill training in the rat. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1999;79(5):391-396. doi:10.1007/s004210050527
 103. Leeuwenburgh C, Hollander J, Leichtweis S, Griffiths M, Gore M, Ji LL. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 1997;272(1 41-1):363-369. doi:10.1152/ajpregu.1997.272.1.r363
 104. Zhu ZY, Gao T, Huang Y, Xue J, Xie ML. Apigenin ameliorates hypertension-induced cardiac hypertrophy and down-regulates cardiac hypoxia inducible factor-1 α in rats. *Food Funct.* 2016;7(4):1992-1998. doi:10.1039/c5fo01464f
 105. Raalte DH Van, Li M, Pritchard PH, Wasan KM. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)- α : A Pharmacological Target with a Promising Future. *Rev Lit Arts Am.* 2004;21(9).
 106. Duncan JG. Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Alpha (PPAR α) and PPAR Gamma Coactivator-1alpha (PGC-1 α) Regulation of Cardiac Metabolism in Diabetes. *Pediatr Cardiol.* 2012;32(3):323-328. doi:10.1007/s00246-011-9889-8.Peroxisome
 107. Zhang S, Hulver MW, McMillan RP, Cline MA, Gilbert ER. The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility. *Nutr Metab.* 2014;11(1):1-9. doi:10.1186/1743-7075-11-10
 108. De Sousa E, Lechêne P, Fortin D, et al. Cardiac and skeletal muscle energy metabolism in heart failure: Beneficial effects of voluntary activity. *Cardiovasc Res.* 2002;56(2):260-268. doi:10.1016/S0008-6363(02)00540-0