

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

PAPEL DE LOS RADICALES LIBRES EN EL EJERCICIO
FÍSICO AGOTADOR. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN
DE ANTIOXIDANTES.

M^a CARMEN GÓMEZ CABRERA

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2004

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 30 d'Abril de 2004 davant un tribunal format per:

- D. Manuel Castillo Garzón
- D. Juan Sastre Belloch
- D. Malcom J. Jackson
- D. Santiago Lamas Peláez
- D. Francisco Javier Miranda Alonso

Va ser dirigida per:

D. José Viña Ribes

D. Federico Pallardó Calatayud

©Copyright: Servei de Publicacions
M^a Carmen Gómez Cabrera

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6000-1

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

VNIVERSITAT  VALÈNCIA

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA ACTIVIDAD
FÍSICA Y EL DEPORTE**

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



**PAPEL DE LOS RADICALES LIBRES EN EL
EJERCICIO FÍSICO AGOTADOR.
EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE
ANTIOXIDANTES.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

M^a Carmen Gómez Cabrera

Dirigida por:

Prof. D. José Viña Ribes

Prof. D. Federico V. Pallardó Calatayud

Valencia, 2004



FACULTAD DE MEDICINA Y
ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Prof. **D. José Viña Ribes**, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Prof. **D. Federico V. Pallardó Calatayud**, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que Dña. M^a Carmen Gómez Cabrera, Licenciada en Ciencias de la Actividad Física y el Deporte por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección la presente tesis titulada.

**“ PAPEL DE LOS RADICALES LIBRES EN EL
EJERCICIO FÍSICO AGOTADOR.
EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN
DE ANTIOXIDANTES”**

para la obtención del título de Doctora.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación.

Valencia, a 30 de Enero de 2004

Fdo. Prof. D. José Viña Ribes

Fdo. Prof. D. Federico V. Pallardó Calatayud

A MI FAMILIA

A JUANJO

AGRADECIMIENTOS

A mis directores:

José Viña, por aceptarme en tu grupo y abrirme así las puertas de un mundo completamente desconocido para mí, el de la investigación. Gracias por la supervisión constante durante todos estos años (creo que mis viernes se van a seguir apellidando, durante mucho tiempo, reunión) pero sobre todo gracias por tantísima confianza y por poner más que ilusión en el proyecto.

Federico Pallardó, fuiste la primera persona que conocí al llegar al Departamento y sin duda el responsable de que tomase la decisión de quedarme. Tu historia sobre “la excitante batalla entre los malos, los radicales, y los buenos, los antioxidantes” me conmovió. Quiero agradecerte lo mucho que me has enseñado, como persona y como científico, me has llevado de la mano todo este tiempo y has acabado convenciéndome de que todo esto valía la pena.

Ha sido todo un placer conoceros y poder trabajar para vosotros.

A **Juan Sastre**, de ti he aprendido que hay tres cosas fundamentales: el trabajo, trabajar y no descansar demasiado. Has sido un ejemplo de dedicación para mí.

A **Miguel Asensi**, contigo empecé Miguel y a ti he recurrido en innumerables ocasiones para solucionar las múltiples dudas sobre protocolos, material, reactivos, cálculos etc. Siempre has tenido tiempo para mí. Muchas gracias.

A **Ana Lloret**, poca gente he conocido que disfrute tanto del laboratorio como tú. De ti he aprendido que el día puede llegar a tener más de 24 horas y que el tiempo, cuando de ciencia se trata, no tiene demasiada importancia. Por tantas horas compartidas. Gracias Ani.

A **Consuelo Borrás**, tu aportación a esta tesis, aunque algo más que valiosa en el ámbito experimental, seguramente lo ha sido mucho más en el personal. Gracias por estar siempre.

A **Javier Pereda, Julián Carretero y Ángel Ortega**. Creo que hay muy pocas cosas en esta tesis en las que no hayáis participado por alguna razón u otra. De vosotros he aprendido que todo tiene un porqué y, sobre todo, a trabajar con el

convencimiento de que siempre hay solución, siempre hay alguna alternativa (si vuestro móvil está cerca). Gracias por hacer que las cosas hayan parecido fáciles.

A **Dolores Royo**, nuestra **Pain**. Gran profesional pero seguramente mejor persona y compañera. En este tiempo en el que hemos trabajado juntas te has ganado todo mi respeto dentro y fuera del laboratorio. Digna sustituta de **Juana Belloch**, a la que me gustaría agradecer también su inestimable ayuda durante los primeros años de trabajo.

A **Juan Bautista Miñana** por estar tan presente en las primeras y últimas fases de la tesis. No te quiero presionar pero ahora te toca a ti.

A **Diana Rus**, todo un ejemplo de dedicación y de ilusión en el laboratorio, tanta que ha conseguido contagiarme en más de una ocasión. Muchas gracias.

A **Jelena Markovic** y a **Juan Gambini** por los buenos momentos compartidos en el Departamento.

A **Marco** y muy especialmente a **Lele**, la nueva generación. Gracias por vuestra paciencia, por compartir conmigo el día a día y por todo el tiempo invertido en las últimas fases de esta tesis.

A **M^a Carmen Desco**, **Patricia Bayo** y **Rafa Márquez**. Empezamos siendo yo aprendiz y vosotros maestros. Ahora muy buenos amigos.

A **Amparo Gimeno** y **Rafa Aranda** cuyas tesis han sido mi libro de cabecera en los últimos meses.

A **Laia**, **David**, **Luis Gómez**, **Gustavo Santángelo**, **Amparo Buenestado**, **Juan Esteve**, **Juan Mompó**, **Lauri**, **Carolina**, **Andrea** y **María** por el tiempo compartido.

A los miembros del Departamento de Bioquímica y muy especialmente a **Juan Viña** y a **Concha García** por el trato tan afectuoso y por el interés que siempre han mostrado por mi trabajo.

A **Javier Miranda** y **Toni Alabadí**. Vosotros me iniciasteis en el mundo de la Fisiología del Ejercicio, me recomendasteis el grupo en el que estoy y habéis seguido mis pasos en todo estos años. Creo que hay mucho que agradecer.

A **Luis Such**, a **Antonio Alberola** y a su grupo: **Luis**, **Ana**, **Laura** e **Isabel**, con los que he podido colaborar en alguna ocasión y con los que comparto el interés por el ejercicio físico.

A **Asun**, **Vicente**, **Ruth** y **Consuelo** por vuestra ayuda con los animales y por hacerme tan agradable el día a día.

A **Elena Plano**, **Elena Caveró** y **Eva Giménez** porque burocracia deja de ser la tortuga de Mafalda cuando vosotras os encargáis de hacer las gestiones.

A **Marilyn Noyes** por tu ayuda con el inglés y los buenos consejos.

A **Antonio Iradi**, a **Rafa Ortí** y a **Gaetano Serviddio** por vuestra inestimable ayuda en el todavía oscuro mundo para mí de la estadística.

Al resto de miembros del Departamento de Fisiología.

A los miembros del Departamento de Farmacología y en especial a **Tani** por su ayuda con los ensayos de retardo.

A **Kelvin Davies** y su grupo de la University of Southern California: **Reshma**, **Cheryl**, **Gennady** y **Vince** por iniciarme en las técnicas de biología molecular.

A **Li Li Ji** y a todos los miembros del Departamento de Kinesiología de la Universidad de Wisconsin-Madison: **Kathleen O'Moore**, **Nathan Steinhafel** y **Anna Toldy**. Parte de esta tesis han sido el resultado de mis estancias en este laboratorio, en el que he pasado muy buenos momentos.

A **Malcolm Jackson**, **Anne McArdle** y su grupo del Departamento de Medicina de la Universidad de Liverpool, por abrirme las puertas de su laboratorio y acceder a formar parte del tribunal de la presente tesis.

A mis amigos: **Pedro**, **Desa**, **Dani**, **Rocio** y **Gema**. Espero que a partir de ahora podamos volver a compartir entrenamientos, películas, charlas, cafés... Tenemos muchas cosas pendientes. Gracias por ser tan poco exigentes.

A mi hermano **Pedro** y a mi **padre** que aunque piensan que defender la teoría de los radicales libres debe ser cuanto menos anticonstitucional, siguen confiando en mi reinserción. Me gustaría escribir un agradecimiento muy especial, en este apartado dedicado a mi familia, a mi hermana **Merche** y a mi **madre**, mis puntos de referencia, por estar siempre pendientes de mis evoluciones, de mis altibajos, por tanta paciencia y tantos buenos consejos. Muchas gracias.

No me gustaría olvidarme del resto de la familia y dedicarles unas líneas "amb molt de carinyo " a **Joan**, **Tere**, **Albert** i **Guillem**, " per tot el seu suport ".

Este último AGRADECIMIENTO y con mayúsculas es para **Juanjo**. Por ser siempre tantísimo para mí. Porque nada de esto tendría demasiado sentido sin ti. Siempre que se ha perdido, has estado tú para dárselo.

A TODOS, MUCHAS GRACIAS.

Los efectos beneficiosos del ejercicio físico moderado se conocen desde hace mucho tiempo. El ejercicio forma parte del tratamiento de enfermedades tan comunes como la diabetes mellitus o las cardiopatías. Mejora el perfil lipídico del plasma, aumenta la densidad ósea, ayuda a perder peso y alarga la vida media de distintas especies, entre otros efectos.

Estos beneficios, sin embargo, desaparecen con el agotamiento o con la falta de entrenamiento. De hecho, el ejercicio físico agotador, genera tal cantidad de especies reactivas de oxígeno que las defensas antioxidantes titulares se ven superadas e incapaces de prevenir el daño que éstas inducen.

Los resultados experimentales de los últimos años de investigación indican que los radicales libres, no sólo provocan daño, sino que desempeñan un papel en la señalización celular y, por tanto, en la regulación de la función muscular.

La respuesta adaptativa al ejercicio físico puede, por tanto, estar mediada por la generación de especies reactivas del oxígeno. De esta forma la prevención del estrés oxidativo asociado al ejercicio físico podría resultar perjudicial al condicionar dicha respuesta.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1-124
1. Radicales libres	1-24
1.1. Concepto de radical libre	1-2
1.2. Clases de radicales libres	2-7
1.3. Génesis de ERO.....	7-24
2. Teorías del estrés oxidativo	24-33
2.1. Estrés oxidativo y daño a biomoléculas.....	24-30
2.2. Indicadores de estrés oxidativo.....	30-33
3. Antioxidantes	33-55
3.1. Antioxidantes enzimáticos.....	34-38
3.2. Antioxidantes no enzimáticos.....	38-48
3.3. Otras sustancias antioxidantes.....	48-55
4. Ejercicio Físico	55-58
4.1. Concepto.....	55-56
4.2. Ejercicio físico agotador y fatiga.	56-57
4.3. Radicales libres y ejercicio.....	65-124
II. OBJETIVOS	125-126
III. MATERIALES Y MÉTODOS	127-177
1. Materiales	127-138
1.1. Animales de experimentación	127-132

1.2. Seres humanos	132-134
1.3. Aparatos.....	134-136
1.4. Reactivos	136-138
2. Métodos	138-176
2.1. Determinación de los valores de glutatión total	138-143
2.2. Determinación del glutatión oxidado (GSSG)	143-144
2.3. Determinación de lipoperóxidos en forma de malondialdehído	144-146
2.4. Determinación de L-Lactato	144-147
2.5. Determinación de Creatin kinasa (CK)	147-148
2.6. Determinación de Aspartato-aminotransferasa (GOT)	148-149
2.7. Determinación de la actividad xantina oxidasa/xantina deshidrogenasa en plasma	149-152
2.8. Extracción de proteínas citoplasmáticas a partir de tejido muscular	152-153
2.9. Extracción de proteínas nucleares a partir de tejido muscular	153-155
2.10. Ensayo de Retardo en Gel de Acrilamida (EMSA) para el estudio de la activación del factor de transcripción NF- κ B	155-159
2.11. Estudio de la expresión y fosforilación de I κ B- α , IKK- β e IKK- α y de la fosforilación de las MAP Kinasas Erk1/2 (p44/42) y p38 mediante Electroforesis en Geles de Poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)	159-162
2.12. Estudio de la oxidación de proteínas musculares	162-164
2.13. Aislamiento de RNA a partir de tejido	164-167
2.14. Northern Blotting	167-169
2.15. Retrotranscripción-Amplificación del RNA (RT-PCR)	169-172
2.16. Retrotranscripción-Amplificación cuantitativa del RNA (RT-PCR en tiempo real)	172-176
3. Análisis estadístico de los resultados	177

IV. RESULTADOS ----- 179-215

- 1.- Estudio del estrés oxidativo asociado a los procesos de isquemia-reperusión. Resultados en animales y en humanos 179-183
- 2.- Estudio del efecto de la administración de alopurinol sobre el daño muscular asociado al ciclismo de alta competición. Resultados en humanos. 184-188
- 3.- Estudio del estrés oxidativo asociado a la práctica de ejercicio físico agotador en ratas. Efecto de la administración de alopurinol189-193
- 4.- Estudio de la activación de NF- κ B tras la realización de un ejercicio físico agotador en músculo vasto interno de rata. 194-204
- 5.- Estudio de la expresión de la Mn SOD tras la realización de un ejercicio físico agotador en músculo de rata. 205-206
- 6. Estudio de la activación de NF- κ B en músculo gastrocnemio de rata tras la realización de un ejercicio físico agotador. Efecto de la administración de alopurinol..... 207-211
- 7. Estudio de la expresión de la Mn SOD, iNOS y eNOS tras la realización de un ejercicio físico agotador en músculo de rata... 212-215

V. DISCUSIÓN ----- 217-255

- 1.- Los procesos de isquemia-reperusión provocan un estrés oxidativo en sangre tanto en modelos animales como en modelos humanos.217-224
- 2.- Estudio del efecto de la administración de alopurinol sobre el daño muscular asociado al ciclismo de alta competición. 225-235
- 3.- Estudio del estrés oxidativo asociado a la práctica de ejercicio físico agotador en ratas. Efecto de la administración de alopurinol 235-243

4.- Estudio de la activación de NF- κ B y su efecto sobre la expresión de la Mn-SOD, iNOS y eNOS tras la realización de un ejercicio físico agotador en músculo de rata..... 244-256

VI. SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION -257-284

1.- Ischaemia-reperfusion induced blood oxidative stress in human and rat models 257-263

2.- Allopurinol and markers of muscle damage and oxidative stress among participants in the Tour de France..... 264-270

3.- Oxidative stress associated to exhaustive physical exercise in a rat model. Effect of allopurinol administration..... 270-274

4.- NF- κ B activation and its effect in MnSOD, iNOS and eNOS gene expression in rat skeletal muscle after exhaustive physical exercise. 275-284

VII. CONCLUSIONES ----- 285-286

VIII. BIBLIOGRAFÍA ----- 287-335

Artículo publicados por la doctoranda relacionados con la tesis:

- Gómez-Cabrera, M.C.; Pallardo, F.V.; Sastre, J; Viña, J and García del Moral, L (2003) Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour of France. *JAMA*. 289: 2503-2504
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&opt=Abstract&list_uids=12759321
- Vina, J.; Gómez-Cabrera, M.C.; Lloret, A.; Márquez, R.; Miñana, J.B.; Pallardó, F.V. and Sastre, J (2000) Free Radicals in Exhaustive Physical Exercise: Mechanism of Production, and Protection by antioxidants. *IUBMB Life*. 50: 271-277.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&opt=Abstract&list_uids=11327321

ÍNDICE DE FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN

Figura I.1.	Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial	9
Figura I.2.	Control Respiratorio Mitocondrial	10
Figura I.3.	Formas reducidas y oxidadas de la XOR	13
Figura I.4.	Esquema de la degradación de las purinas	14
Figura I.5.	Reacción de oxidación del NADH por la xantina óxidoreductasa	15
Figura I.6.	Reacciones de reducción del nitrito a óxido nítrico por la XOR	16
Figura I.7.	Conversión de la XDH a XO de forma reversible e irreversible	19
Figura I.8.	Producción de O_2^{\bullet} y H_2O_2 durante el proceso de isquemia-reperfusión	21
Figura I.9.	Mecanismo de peroxidación lipídica	25
Figura I.10.	Sistemas antioxidantes celulares	38
Figura I.11.	Estructura química del glutatión	39
Figura I.12.	Ciclo del γ -glutamilo	41
Figura I.13.	Ciclo redox del glutatión	43
Figura I.14.	Estructura de la Vitamina C	44
Figura I.15.	Estructura de la Vitamina E	45
Figura I.16.	Estructura del β -caroteno	47
Figura I.17.	Estructura básica de los flavonoides	48
Figura I.18.	Estructura química del ácido lipoico	50
Figura I.19.	Inhibición de la xantina oxidasa por el alopurinol ...	51
Figura I.20.	Posibles fuentes de generación de radicales libres en el músculo esquelético	67
Figura I.21.	Producción de radicales libres por la mitocondria en el ejercicio físico	69
Figura I.22.	Producción de radicales libres por las células fagocíticas	70

Figura I.23. XOR en el daño asociado a los procesos de isquemia-reperusión	72
Figura I.24. Representación de los efectos del estado redox celular sobre la fuerza isométrica. El modelo integra datos de músculos fatigados y no fatigados	92
Figura I.25. Esquema de las principales dianas del NO [*] en músculo esquelético	95
Figura I.26. Diagrama del papel potencial de las ERO en el proceso contráctil.....	97
Figura I.27. Vías de activación de las MAP Kinasas	104
Figura I.28. Interacción de NF-κB con su proteína inhibidora IκB	106
Figura I.29. Mecanismos de regulación de la activación de NF-κB	110

II. OBJETIVOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura III.1. Esquema del Ensayo de Retardo en Gel de Acrilamida para NF-κB	158
Figura III.2. Esquema de la técnica del Western blotting	162
Figura III.3. Curvas de amplificación RT-PCR en tiempo real ...	173
Figura III.4. Curvas de amplificación tras transformar el eje de ordenadas en logarítmico	173
Figura III.5. Esquema de la PCR cuantitativa	176

IV. RESULTADOS

Figura IV.1. Niveles de glutatión sanguíneo en ratas sometidas a un proceso de isquemia-reperusión.....	180
Figura IV.2. Cociente (GSSG/GSH)*100 en sangre de ratas sometidas a un proceso de isquemia-reperusión	180

Figura IV.3a. Niveles de glutatión sanguíneo en alpinistas durante su ascenso al GII	182
Figura IV.3b. Cociente (GSSG/GSH)*100 en sangre de alpinistas durante su ascenso al GII	182
Figura IV.4. Presión barométrica y presión parcial de oxígeno a distintas alturas	183
Figura IV.5a. Valores individuales de actividad plasmática de la enzima CK en ciclistas durante su participación en el Tour de Francia	185
Figura IV.5b. Valores de las medias de actividad plasmática de la enzima CK en ciclista durante su participación en el Tour de Francia	185
Figura IV.6a. Valores individuales de la actividad plasmática de la enzima GOT en ciclistas durante su participación en el Tour de Francia	186
Figura IV.6b. Valores de las medias de actividad plasmática de la enzima GOT en ciclistas durante su participación en el Tour de Francia	187
Figura IV.7. Incrementos en los niveles de malondialdehído en plasma de ciclistas durante su participación en el Tour de Francia	188
Figura IV.8. Actividad xantina oxidasa en plasma de ratas sometidas a un ejercicio físico agotador	190
Figura IV.9. Niveles de GSSG en músculo gastrocnemio de ratas tras la realización de un ejercicio físico agotador	191
Figura IV.10. Valores de las medias de actividad plasmática de la enzima CK en ratas sometidas a un protocolo de ejercicio físico agotador	192
Figura IV.11. Western Blot de proteínas oxidadas en músculo gastrocnemio de ratas sometidas a un protocolo de ejercicio físico agotador	193
Figura IV.12. Densitometría del Western Blot de proteínas oxidadas en músculo gastrocnemio de ratas sometidas a un protocolo de ejercicio físico agotador	193

Figura IV.13. Ensayo de retardo en gel de acrilamida de NF- κ B en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos **196**

Figura IV.14. Densitometría del ensayo de retardo en gel de acrilamida de NF- κ B en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos **196**

Figura IV.15. Western Blot de la subunidad p65 de NF- κ B en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos **197**

Figura IV.16. Densitometría del Western Blot de NF- κ B (p65) en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos **198**

Figura IV.17. Western Blot de I κ B α en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos**199**

Figura IV.18. Densitometría del Western Blot de I κ B α en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos**199**

Figura IV.19. Western Blot de I κ B α fosforilado en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos **200**

Figura IV.20. Densitometría del Western Blot de I I κ B α fosforilado en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos **201**

Figura IV.21. Western Blot de IKK α en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos **202**

Figura IV.22. Densitometría del Western Blot de IKK α en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos **202**

Figura IV.23. Western Blot de IKK α , IKK β fosforiladas en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos **203**

Figura IV.24. Densitometría del Western Blot de IKK α fosforilada en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos **204**

Figura IV.25. Western Blot representativo de α actina en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos **204**

Figura IV.26. Porcentaje de aumento de RNAm de MnSOD en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos **205**

Figura IV.27. Porcentaje de aumento del contenido proteico de MnSOD en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos **206**

Figura IV.28. Ensayo de retardo en gel de acrilamida de NF- κ B en músculo gastrocnemio de ratas ejercitadas hasta el agotamiento **207**

Figura IV.29. Densitometría del ensayo de retardo en gel de acrilamida de NF- κ B en músculo gastrocnemio de ratas ejercitadas hasta el agotamiento **208**

Figura IV.30. Western Blot de p38^{MAPK} fosforilada en músculo gastrocnemio de ratas ejercitadas hasta el agotamiento **210**

Figura IV.31. Densitometría del Western Blot de p38^{MAPK} fosforilada en músculo gastrocnemio de ratas ejercitadas hasta el agotamiento..... **210**

Figura IV.32. Western blot de Erk1/2^{MAPK} fosforilada en músculo gastrocnemio de ratas ejercitadas hasta el agotamiento **210**

Figura IV.33. Densitometría de Western blot de Erk 1/2^{MAPK} fosforilada en músculo gastronemio de ratas ejercitadas hasta el agotamiento **210-211**

Figura IV.34. Western Blot representativo de α actina en músculo gastrocnemio de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos **211**

Figura IV.35. Representación gráfica de la expresión de la MnSOD en músculo gastrocnemio de rata **213**

Figura IV.36. Representación gráfica de la expresión de la iNOS en músculo gastrocnemio de rata **214**

Figura IV.37. Representación gráfica de la expresión de la eNOS en músculo gastrocnemio de rata **215**

V. DISCUSIÓN

Figura V.1. Cociente (GSSG/GSH) x100 en sangre de ratas sometidas a un proceso de isquemia-reperfusión **220**

Figura V.2. Cociente (GSSG/GSH) x100 en sangre de alpinistas durante su ascenso al GII **224**

Figura V.3. Valores individuales de actividad plasmática de la enzima CK y GOT en ciclistas durante su participación en el Tour de Francia..... **229**

Figura V.4. Modelo de activación de la xantina oxidasa en el ejercicio (Modificado de Hellsten, 1994) **238**

Figura V.5. Densitometría del Western Blot de proteínas oxidadas en músculo gastrocnemio de ratas sometidas a un protocolo de ejercicio físico agotador **243**

Figura V.6. Mecanismos de regulación de la activación de NF- κ B. **245**

Figura V.7. Esquema de la secuencia temporal de fosforilación de I κ B α en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos..... **247**

Figura V.8. Esquema de la secuencia temporal de fosforilación de IKK α y β en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos..... **248**

Figura V.9. Esquema de la secuencia temporal de activación de NF- κ B por ensayo de retardo (A) y por Western Blot NF- κ B (p65) (B) en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos. **248**

Figura V.10. Porcentaje de aumento de RNAm (A) y contenido proteico de MnSOD en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos **249**

Figura V.11. Fosforilación de p38MAPK inducida por el ejercicio físico en músculo gastrocnemio de rata. Efecto de la administración de alopurinol. **251**

Figura V.12. Fosforilación de ERK 1/ 2^{MAPK} inducida por el ejercicio físico en músculo gastrocnemio de rata. Efecto de la administración de alopurinol. **252**

Figura V.13. Activación de NF-κB inducida por el ejercicio físico en músculo gastrocnemio de rata. Efecto de la administración de alopurinol.. **252**

Figura V.14. Expresión de MnSOD, iNOS y eNOS, en músculo gastrocnemio de rata, inducida por el ejercicio agotador. Efecto de la administración de alopurinol. **253**

Figura V.15. Regulación de la función celular por el ejercicio físico. Efecto de la administración de alopurinol. **256**

VI. SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

Figure VI.1. Blood (GSSG/GSH) x100 ratio in rats after ischaemia-reperfusion process **259**

Figure VI.2. Blood (GSSG/GSH) x100 in humans during the climb of the G2 (8034 m) **263**

Figure VI.3. Plasma activity of CK and AAT in US Postal Team Cyclists who received placebo or allopurinol during the 2001 Tour de France **265**

Figure VI.4. Schematic representation of xanthine oxidase activation during the exercise (Modified from Hellsten, 1994) **269**

Figure VI.5. Muscle oxidative stress after exhaustive physical exercise. Densitometry data showing carbonylated proteins in rat gastrocnemius muscle using cytosolic extract **274**

Figure VI.6. Mechanism of NF-κB regulation and activation **276**

Figure VI.7. Time course for IκBα phosphorylation in rat deep vastus lateralis muscle after exercise until exhaustion **277**

Figure VI.8. Time course for IKKα and β phosphorylation in rat deep vastus lateralis muscle after exercise until exhaustion **278**

Figure VI.9. Time course for NF- κ B activation and nuclear P65 content in rat deep vastus lateralis muscle after exercise until exhaustion **279**

Figure VI.10. Time course for MnSOD gene expression in rat deep vastus lateralis muscle after exercise until exhaustion at different times **280**

Figure VI.11. Exercise-induced phosphorylation of p38^{MAPK} in rat gastrocnemius muscle. Effect of allopurinol administration **281**

Figure VI.12. Exercise-induced phosphorylation of ERK 1/ 2^{MAPK} in rat gastrocnemius muscle. Effect of allopurinol administration **282**

Figure VI.13. Exercise-induced activation activation of NF- κ B in rat gastrocnemius muscle. Effect of allopurinol administration. **282**

Figure VI.14. Exercise-induced up-regulation of the expression of MnSOD, iNOS and eNOS in rat gastrocnemius muscle. Effect of allopurinol administration. **283**

Figure VI.15. Schematic representation of the role of ROS in the regulation of cell function in exercise **284**

VII. CONCLUSIONES

VIII. BIBLIOGRAFÍA

ÍNDICE DE TABLAS

I. INTRODUCCIÓN

Tabla I.1.	Vida media de los algunos radicales libres celulares.....	2
Tabla I.2.	Principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.....	7
Tabla I.3.	Inhibidores de la XOR.....	21-22
Tabla I.4.	Sistemas más importantes que generan la oxidación de proteínas.....	27
Tabla I.5.	Tipos de SOD y localización celular mayoritaria.....	35
Tabla I.6.	Diferentes localizaciones celulares de la Cu,Zn-SOD.....	36
Tabla I.7.	Alteración en la homeostasis del calcio y su efecto sobre la fatiga.....	64
Tabla I.8.	Efecto de la suplementación con vitamina E en el ejercicio físico.....	77
Tabla I.9.	Efecto de la suplementación con vitamina C en el ejercicio físico.....	78
Tabla I.10.	Efecto de la suplementación con Selenio y β -caroteno el ejercicio físico.....	79
Tabla I.11.	Efecto de la suplementación con coenzima Q10 en el ejercicio físico.....	79
Tabla I.12.	Efecto de la suplementación con alopurinol en el ejercicio físico.....	80
Tabla I.13.	Efecto de la suplementación con GSH en el ejercicio físico.....	82-83
Tabla I.14.	Efecto de la suplementación con ésteres de GSH en el ejercicio físico.....	83
Tabla I.15.	Efecto de la suplementación con enzimas antioxidantes en el ejercicio físico.....	84
Tabla I.16.	Efecto de la suplementación con combinaciones de antioxidantes.....	84

Tabla I.17. Selección de estudios en animales en los que se investiga el efecto de los antioxidantes en el rendimiento físico...	86
Tabla I.18. Selección de estudios con humanos en los que se investiga el efecto de los antioxidantes en el rendimiento físico...	87
Tabla I.19. Ejercicio físico agudo y actividad SOD en humanos.....	88
Tabla I.20. Ejercicio físico crónico y actividad SOD en humanos.....	88
Tabla I.21. Componentes y presencia de los principales dominios funcionales de las familias NF- κ B/Rel/Dorsal e I κ B.....	107-108
Tabla I.22. Selección de agentes inductores de la activación de NF- κ B.....	111-112
Tabla I.23. Selección de genes regulados por NF- κ B.....	112-115
Tabla I.24. Compuestos implicados en la modulación de la activación de NF- κ B.....	119

II. OBJETIVOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla III.1. Composición de la dieta administrada a las ratas incluidas en el estudio	127
Tabla III.2. Diseño del estudio sobre el efecto del agotamiento en ratas Wistar. Número de animales por grupo	128
Tabla III.3. Adaptación del protocolo de Davies en tapiz rodante para animales	128-129
Tabla III.4. Diseño del estudio sobre el efecto de la hipoxia y la reoxigenación en ratas Wistar. Número de animales por grupo..	129
Tabla III.5. Diseño del estudio con ratas Sprague-Dawley. Tiempos de sacrificio tras el agotamiento y número de animales por grupo.....	131

Tabla III.6. Diseño del estudio con alpinistas. Diferentes alturas en las que se realizaron las extracciones de sangre **133**

Tabla III.7. Diseño del estudio con ciclistas. Distintas etapas en las que se realizaron las extracciones de sangre**134**

Tabla III.8. Descripción de los anticuerpos utilizados para Western Blotting **161**

IV. RESULTADOS

Tabla IV.1. Valores de pesos, tiempos de carrera y lactato tras el protocolo de ejercicio físico en tapiz rodante**189**

Tabla IV.2. Expresión de la MnSOD en músculo gastrocnemio de rata tras la realización de un ejercicio físico agotador por RT-PCR en tiempo real. Efecto de la administración de alopurinol **212**

Tabla IV.3. Expresión de la iNOS en músculo gastrocnemio de rata tras la realización de un ejercicio físico agotador por PCR en tiempo real. Efecto de la administración de alopurinol **213**

Tabla IV.4. Expresión de la eNOS en músculo gastrocnemio de rata tras la realización de un ejercicio físico agotador por PCR en tiempo real. Efecto de la administración de alopurinol **214**

V. DISCUSIÓN

VI. SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

VII. CONCLUSIONES

VIII. BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

- AA:** Aminoácidos.
- AAA:** Aminoácidos aromáticos.
- AAR:** Aminoácidos ramificados.
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- ADP:** Adenosín-5'-difosfato.
- AL:** Ácido lipoico.
- Alopurinol:** 4-hidroxipirazolo(3,4-d) pirimidina.
- ALT:** Alanino Amino Transferasa.
- AMP:** Adenosín-5'-monofosfato.
- APS:** Persulfato amónico.
- ARN:** Ácido ribonucleico.
- ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero.
- AST:** Aspartato Amino Transferasa.
- ATP:** Adenosín-5'-trifosfato.
- BPDS:** Ácido batofenantrolindisulfónico.
- BSA :** Suero Bovino Albúmina.
- BSO:** L-Butionina-(S,R)-Sulfoximina.
- CDNB:** Cloro dinitrobenceno.
- CHES:** 2-(N-hidroxietyl)piperacina-N'-(2-ácido etanosulfónico).
- CK:** Creatin Kinasa.
- CK2:** Caseín kinasa II.
- COX:** Citocromo oxidasa.
- CS:** Citrato Sintasa.
- CSPD:** Disodio 3-(4-motox yspiro (2- dioxitano-3,2'-(5'-cloro)tricyclo(3.3.1.1^{3,7}) decano)-4-yl) fenil fosfato.
- Cu,Zn-SOD:** Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc.
- DHLA:** Ácido dihidrolipoico.
- DMSO:** Dimetil sulfóxido.
- DNPH:** 2,4-dinitrofenilhidrazina.
- DNP-hidrazona:** 2,4-dinitrofenilhidrazona.
- DPI:** Difenieleniodonio.
- DTT :** DL-Ditiotreitól.

- EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético.
- EF:** Ejercicio físico.
- EGTA:** Etileno glicol-bis (aminoetil eter)- N,N,N',N'- ácido tetracético.
- EMSA :** Ensayo de retardo en gel de acrilamida.
- EPOC:** Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.
- Erk1/2^{MAPK}:** Kinasas activadas por señales extracelulares 1 y 2.
- ERN:** Especies Reactivas de Nitrógeno.
- ERO:** Especies Reactivas de Oxígeno.
- FAD:** Flavín adenín dinocluótido.
- FDNB:** 1-fluor-2,4dinitrobenceno.
- Fe-SOD:** Superóxido dismutasas dependientes de hierro.
- FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos.
- γ-Glu-Glu:** γ-glutamilglutamato.
- GAPDH:** Gliceraldehído-3-Fosfato deshidrogenasa.
- GCS:** γ-glutamilcisteína sintetasa.
- GGT:** γ-Glutamil-transpeptidasa.
- GMPc:** Guanosina monofostato cíclico.
- GOT:** Glutámico-Oxalacético-Transaminasa.
- GPx:** Glutación peroxidasa.
- GS:** Glutación sintetasa.
- GSH:** Glutación reducido.
- GSSG:** Glutación oxidado.
- H₂O₂ :** Peróxido de hidrógeno.
- HEPES:** N-(2-hidroxiethyl)piperacina-N'-(2-ácido etanosulfónico).
- HOCl:** Ácido hipocloroso.
- HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución.
- HSP:** Proteína de estrés térmico.
- IFN-γ:** Interferón-γ.
- IGF-1:** Factor de crecimiento insulínico.
- IGF-1:** Factor de crecimiento insulínico (IGF-1).
- IKAP:** Proteína asociada al complejo IKK
- IKK:** IκB kinasa.
- IL-1:** Interleucina-1.
- IL-6:** Interleucina-6.
- IMP:** Inosina monofosfato.
- JNK^{MAPK}:** c-Jun NH2-Terminal Kinasa.

- Kb:** Kilobase.
- Kd:** Kilodalton.
- KOH:** Hidróxido potásico.
- LDH:** Lactato deshidrogenasa.
- L-NAME:** N^ω-nitro-L-arginina metil éster.
- LPS:** Lipopolisacárido.
- MAPK:** Protein kinasas activadas por mitógenos.
- MEKK1:** MAPK/ERK kinasa.
- MDA:** Malondialdehído.
- mmHg:** Milímetros de mercurio.
- Mn-SOD:** Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
- MOPS:** Ácido propano sulfónico.
- mtADN:** ADN mitocondrial.
- NAC:** N-acetilcisteína.
- NAD:** Nictotinamida adenin dinucleótido.
- NEM:** N-etilmaleimida.
- NEMO:** Modulador esencial de NFκB
- NIK:** Kinasa inductora de NFκB.
- NFκB:** Factor Nuclear kappa B.
- NO[•]:** Óxido nítrico.
- NO₂[•]:** Radical nitrógeno dióxido
- NO₂Cl:** Cloro nitrilo.
- NOS:** Óxido nítrico sintasa (e-NOS, NOS endotelial; iNOS, NOS inducible; nNOS, NOS neuronal)
- ¹O₂:** Oxígeno singlete.
- O₂^{•-}:** Anión superóxido.
- OH[•]:** Radical hidroxilo.
- ONOO⁻:** Peroxinitrito.
- OR:** Óxidoreductasa.
- 8oxodG:** 8-hidroxi-2' deoxiguanosina:
- p/v:** peso/volumen.
- p38^{MAPK}:** Protein kinasa activada por estrés.
- Pb:** Presión barométrica.
- PBS:** Fosfato tampón salino.
- PC:** Fosfocreatina.
- PDTC:** Pirrolidin ditiocarbamato.

PKC ζ : Protein kinasa C activa.

PFK: Fosfofructoquinasa.

PI₃K/Akt: Fosfoinositide 3-kinasa.

PKC: Protein Kinasa C.

PLA₂ : Fosfolipasa A₂.

PMSF: Fenil metil sulfonil fluoride.

PO₂: Presión parcial de Oxígeno.

RL: Radicales libres.

ROO[•]: Radical peroxilo.

RPE: Resonancia Paramagnética de electrones.

Rpm: Revoluciones por minuto.

RT-PCR: Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa.

SDS: Sodio dodecil sulfato

Se: Selenio.

Ser: Serina.

SERCA: ATPasa calcio-dependiente del retículo sarcoplásmico.

sGC: Guanilato ciclasa soluble

SOD: Superóxido dismutasa.

TBA: Ácido tiobarbitúrico.

TBARS: Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico.

TBS: Tris tampón salino.

TBS-T: Tris Tampón Salino con Tween 20

TEMED: N,N,N,N'-tetrametilnetilenodiamina.

Tir: Tirosina.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

Tr : Treonina.

TRIS: 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol.

Tween 20: Polioxietileno sorbitan monooleato.

UI: Unidades internacionales.

v/v: volumen/volumen

VO₂máx: Consumo máximo de oxígeno.

W: Watios.

XD: Xantina deshidrogenasa.

XO: Xantina oxidasa.

XOR: Xantina oxidoreductasa.

I.INTRODUCCIÓN

1. Radicales libres

1.1. Concepto de radical libre

Un radical libre es una molécula o fragmento de molécula, que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital externo. Tienen una vida media del orden de milisegundos debido a su gran reactividad, aunque varía según el tipo de radical libre.

Estas moléculas o átomos tremendamente reactivos, se encuentran implicados en el inicio y desarrollo de diversas enfermedades (Gutteridge, 1993). La evidencia del papel patológico de estos compuestos ha dado lugar a numerosas vías de investigación con el fin de desarrollar captadores, inhibidores enzimáticos o moduladores de los mismos. En el medio biológico, los radicales libres son compuestos generalmente oxigenados y se les llaman especies reactivas de oxígeno (ERO). Debido a que los organismos existen y se desarrollan en presencia de oxígeno, están asociados con la generación de estas ERO, que son tóxicas y se consideran responsables del daño oxidativo de macromoléculas biológicas como el ADN, lípidos, carbohidratos y proteínas (Halliwell y Gutteridge, 1989; Sies, 1993; Halliwell, 1996). Se han visto implicadas en muchos procesos patológicos como algunos cánceres, diabetes (Tasaku y cols., 1992; Okamoto, 1985; Reardon y cols., 1992; Gerbitz, 1992), patologías cardiovasculares (Byers, 1993), procesos reumáticos (Wolf y cols., 1986), patologías gastroentéricas y afecciones broncopulmonares (Slade y cols., 1993; Tenenbern y cols., 1992) así como en procesos neurodegenerativos como la Enfermedad de Alzheimer (Cross y cols., 1987). También están implicados en procesos fisiológicos como en el envejecimiento (Bondy, 1992; Pacifi y cols., 1991), el daño causado por el ejercicio físico agotador (Helaine, 1993; Sastre y cols., 1992), y otros.

Asimismo, existen también radicales libres nitrogenados o especies de nitrógeno reactivas (ERN), cuya importancia ha crecido considerablemente en los últimos tiempos.

Tabla 1. Vida media de los algunos radicales libres celulares.

<i>Radical</i>	<i>Sustrato^a</i>	<i>Concentración^b</i>	<i>Vida media (a 37°C)</i>
HO•	LH ^c	1 M	10 ⁻⁹ seg.
RO•	LH	100 mM	10 ⁻⁶ seg.
ROO•	LH	1 mM	7 seg.
L•	O ₂	20 μM	10 ⁻⁸ seg.
Q•		-	Días

- El sustrato elegido son moléculas diana típicas de las especies de la primera columna.
- Los valores de concentración tratan de reproducir la selectividad *in vivo* del radical por su molécula diana.
- Estas especies reactivas están sujetas *in vivo*, a descomposición por acción de diversos enzimas y por lo tanto, su vida media sólo puede ser calculada si las concentraciones de todas las especies reactivas y enzimas antioxidantes son similares a las existentes *in vivo*.

1.2. Clases de Radicales libres

Existen muchas clases de radicales libres, tanto ERO como ERN. Algunos de los radicales libres más importantes son:

1.2.1. Anión superóxido (O₂⁻)

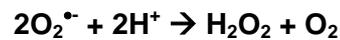
Estado de reducción del oxígeno de un electrón, formado en muchas reacciones de autooxidación. Es relativamente poco reactivo, pero potencialmente tóxico, ya que puede iniciar reacciones que den lugar a otros intermediarios a su vez muy reactivos. Puede formarse como producto de muchas reacciones catalizadas enzimáticamente, como en las reacciones de deshidrogenasas flavoproteínicas: xantina oxidasa, aldehído oxidasa, purina oxidasa, etc. (Korycka-Dahi y Richardson, 1981; Behard y cols., 1979), de oxidasas e hidroxilasas (diamino oxidasa, galactosa oxidasa, citocromo p₄₅₀, etc.) , también en reacciones no enzimáticas del oxígeno con la cisteína (Viña y cols., 1983; Saez y cols., 1982) o

la rivo flavina (Barton *y cols.*, 1979), o bien se produce en la cadena respiratoria mitocondrial (Boveris *y cols.*, 1972).



1.2.2. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Estado de reducción de dos electrones del oxígeno, formado a partir del radical O₂^{•-} por dismutación, o directamente del O₂



No es un radical libre, pero su toxicidad es importante ya que atraviesa fácilmente las membranas. Muchas enzimas producen agua oxigenada a partir de oxígeno: superóxido dismutasa, glucosa oxidasa, la D-aminoácido oxidasa, uricasa, etc. (Fridovich, 1986; Romero *y cols.*, 1987), y también puede producirse por reacciones químicas, como la autooxidación del ácido ascórbico catalizada por el cobre (Korycka-Dahi *y cols.*, 1981). Se convierte en agua por acción de la catalasa, un proceso que determina su vida media. Parece que el H₂O₂ está implicada en la regulación de la transducción de la señal de expresión de genes a través del NFκB y AP-1. Ambos son factores de transcripción capaces de inducir la transcripción de genes tales como el de la interleuquina 2 (IL-2), el factor de necrosis tumoral α (TNF-α), antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad y c-fos. (Schreck y Baeuerle, 1994; Sen y Packer, 1996).

1.2.3. Radical hidroxilo (OH[•])

Estado de reducción de tres electrones de la molécula de oxígeno. Es la especie más reactiva con una vida media estimada de alrededor de 10⁻⁹ s (Liochev y Fridovich, 1994). Puede generarse *in vivo* como consecuencia de radiaciones de alta energía (rayos X, rayos γ) que puede provocar rotura homolítica del agua corporal. La luz UV no tiene suficiente energía como para escindir una molécula de agua, pero puede dividir el agua oxigenada en 2 moléculas de radical hidroxilo. Otro proceso todavía más importante en la formación del radical hidroxilo es la llamada reacción de Fenton (Fenton, 1894):



También a partir de agua oxigenada y del radical superóxido puede formarse el radical hidroxilo, por la Reacción de Haber-Weiss (Haber y Weiss, 1934):



Esta reacción es catalizada por metales como hierro o cobre.

1.2.4. Radical peroxilo (ROO[•])

Formado a partir de hidroperóxidos orgánicos, por ejemplo lípidos, o ROOH por pérdida de hidrógeno. Tiene una vida media relativamente larga (del orden de segundos).

1.2.5. Oxígeno singlete (¹O₂)

Es una forma excitada del oxígeno molecular. No es un radical libre y se forma *in vivo* por acción de la luz sobre las moléculas de oxígeno. Su vida media es alrededor de 10⁻⁶ segundos, dependiendo de la naturaleza de la matriz circundante. Puede interaccionar con otras moléculas transfiriéndoles su energía de excitación o combinándose químicamente con ellas. Puede formarse en la oxidación del NADPH en los microsomas, en la actividad de varias enzimas como la xantina oxidasa, la lactoperoxidasa, lipooxigenasa y prostanglandinsintetasa, entre otras (Kanofsky, 1989).

1.2.6. Óxido nítrico (NO[•])

El óxido nítrico ha cobrado gran relevancia en los últimos años por la importante función fisiológica que desempeña, además de ser considerado un intermediario tóxico importante por su condición de radical libre.

Es un gas lipofílico e hidrosoluble, cuya vida media es relativamente larga (3-5 s). Su formación tiene lugar por una reacción enzimática en la que la enzima óxido

nítrico sintasa cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina dando como subproducto NO[•] en numerosos tipos celulares (Moncada y cols., 1991; Bush y cols. 1992). Dicha enzima presenta tres isoformas: la neuronal nNOS (tipo I), la endotelial eNOS (tipo III) y la inducible iNOS (tipo II) (Bredt y cols. 1991; Lamas y cols. 1992)

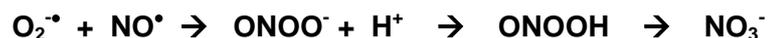
El óxido nítrico juega un papel fundamental en numerosos procesos fisiológicos. Entre ellos, actúa como regulador del flujo sanguíneo local, inhibidor de la agregación plaquetaria, se produce por los macrófagos activados contribuyendo a la defensa inmunitaria primaria y también actúa como neurotransmisor, siendo el cerebro el órgano con mayor actividad óxido nítrico sintasa (Czapski y Goldstein, 1995).

Otro efecto del NO[•] reside en su capacidad de reacción con el hierro de proteínas intracelulares, principalmente mitocondriales, siendo inactivadas por él la mayoría de las enzimas que poseen un grupo prostético hemo. Puede reaccionar con ácidos nucleicos dando lugar a mutaciones y roturas del ADN, y también puede producir necrosis, entre otros fenómenos.

El NO[•] posee una acción antiinflamatoria importante, a la vez que tiene la capacidad de promover la disfunción celular y tisular a través de un efecto proinflamatorio. Para entender este doble efecto Grisham y cols. (1999) proponen que los efectos reguladores y antiinflamatorios del óxido nítrico ocurren cuando éste ejerce una acción directa sobre una molécula biológica, lo cual ocurre en condiciones fisiológicas, en las que la producción de NO[•] es baja. Sin embargo, cuando las concentraciones de NO[•] aumentan, el NO[•] tiene efectos indirectos, a través de los metabolitos derivados de él, pudiendo reaccionar con el oxígeno o el radical superóxido, lo cual ocurre en situaciones de inflamación.

Así pues, un exceso de óxido nítrico es citotóxico. Parte de su citotoxicidad se cree que es debida al [•]O₂, con el que reacciona para dar lugar a anión peroxinitrito (ONOO⁻), que no es un radical, pero sí un intermediario oxidante que puede protonarse y descomponerse con facilidad de modo que es altamente reactivo (Lipton y cols., 1993). Es capaz de inducir la peroxidación lipídica en lipoproteínas, interferir con la señalización celular por nitración de residuos tirosina, oxidar grupos tioles y guanosinas, de degradar carbohidratos y de fragmentar ADN (Beckman y cols. 1994; Beckman y cols. 1996).

El óxido nítrico genera anión peroxinitrito (ONOO⁻) al reaccionar con el anión superóxido (Miles y cols., 1996), tal como se muestra en la siguiente reacción:



La producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y NO^{\bullet} *in vivo* espaciotemporalmente es diferente, y se solapa escasamente, con lo que la producción de peroxinitrito ocurre siempre con exceso de uno o de otro (Grisham y cols. 1999). Algunos autores establecen que tanto las reacciones de oxidación como de nitración mediadas por el peroxinitrito están influenciadas en gran medida por el flujo de producción relativo de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y NO^{\bullet} (Jourdeuil y cols. 2001). Dichos autores establecen que las más altas tasas de oxidación se producen con exceso de NO^{\bullet} , produciéndose la oxidación a través de del $\cdot\text{OH}$ y del $\cdot\text{NO}_2$ formados a partir del peroxinitrito. Sin embargo, la reacción del peroxinitrito con el CO_2 es la vía más importante por la que se descompone el peroxinitrito *in vivo* (Lymar y cols. 1995), formando al final N_2O_3 , que es un potente agente nitrante.

Además de las reacciones de oxidación, el peroxinitrito tiene la capacidad para nitrar compuestos fenólicos en condiciones fisiológicas, como los anillos de tirosina (Goldstein y cols. 2000). Los residuos de tirosina son oxidados por los radicales derivados del peroxinitrito formando el radical tirosilo, que a su vez reacciona con el NO^{\bullet} para formar 3-nitrotirosina. La nitración mediada por peroxinitrito *in vivo* podría ser inhibida por un exceso de producción relativa de $\text{O}_2^{\bullet-}$, debido a la competencia entre éste y el NO^{\bullet} por el radical tirosilo, por lo que la formación de 3-nitrotirosina sería inhibida cuando la tasa de formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ superara la de NO^{\bullet} (Goldstein y cols. 2000; Goldstein y cols. 2000). Asimismo, algunos autores han presentado la reacción de formación del peroxinitrito como una forma de eliminación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ sin la consiguiente formación de H_2O_2 , lo cual supone un efecto detoxificante y antiinflamatorio (Granger y Kubes, 1996).

1.2.7. Dióxido de nitrógeno (NO_2^{\bullet})

El dióxido de nitrógeno es un radical libre contaminante producido primariamente a partir de la oxidación del NO^{\bullet} atmosférico (Postlethwait y cols., 1995). Es un iniciador muy efectivo de la cadena de peroxidación lipídica (Kaur y Halliwell, 1994).

1.2.8. Radicales de átomos derivados de carbono (R^{\bullet})

Los radicales centrados en un átomo de carbono (R^\bullet) surgen del ataque de un radical oxidante sobre una molécula biológica. En el primer paso se arranca un átomo de hidrógeno (H^\bullet) de un grupo metileno situado entre dos enlaces dobles. Este tipo de radicales es muy inestable y reacciona rápidamente con el oxígeno, dando lugar a un radical peróxido (ROO^\bullet). A su vez, estos radicales pueden participar en otras reacciones radicalarias y generar otras especies radicales (Frei, 1994).

1.2.9. Radicales de átomos derivados de azufre (RS^\bullet)

Los átomos de azufre también pueden ser el centro de un radical libre (RS^\bullet) formado, por ejemplo, a partir de la cisteína. Ésta se autooxida con facilidad dando lugar a la formación de radicales tiilo e hidroxilo (Estrela y cols., 1983).

Tabla 2. Principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

ESPECIE	SÍMBOLO
Radical superóxido	O_2^\bullet
Radical hidroperóxido	HO_2^\bullet
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Radical hidroxilo	HO^\bullet
Radical alcóxido	RO^\bullet
Radical peróxido	ROO^\bullet
Óxido nítrico	NO^\bullet
Dióxido de nitrógeno	NO_2^\bullet

1.3. Génesis de las ERO

Todos los radicales libres descritos anteriormente corresponden a especies cuya formación es endógena, pero el organismo también está expuesto a radicales libres procedentes de fuentes externas. Con la dieta son ingeridos muchos compuestos de naturaleza prooxidante, el humo del tabaco da lugar a radicales

libres, la polución ambiental, el ozono, etc. (Pryor y cols., 1995; Rock y cols., 1996; Ames, 1983). Las especies reactivas del oxígeno pueden tener un origen endógeno o exógeno (Freeman y Crapo, 1982; Frei, 1994). Algunas de ellas surgen como “accidentes químicos”, es decir, reacciones secundarias no deseadas entre las biomoléculas o en la detoxificación de xenobióticos, pero otras especies activadas de oxígeno se generan in vivo con un fin determinado, como en el caso de los fagocitos activados, que producen $O_2^{\bullet -}$ y H_2O_2 (Halliwell, 1991).

1.3.1. Fuentes exógenas.

Las fuentes exógenas más importantes en la generación de especies activadas de oxígeno son:

1.3.1.1. Muchos agentes antineoplásicos tales como la adriamicina, bleomicina, daunorrubicina y algunos antibióticos (Doroshov y Davies, 1983) que dependen de grupos quinoides o de unión a metales para su actividad. Algunos de los efectos de estas drogas se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.

1.3.1.2. La irradiación de los organismos debido a las radiaciones electromagnéticas (rayos X y γ) o debido a radiaciones de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas α y β) (Von Sonntag, 1994).

1.3.1.3. Factores ambientales, como contaminantes aéreos fotoquímicos, hiperoxia, pesticidas, humo del tabaco, solventes, anestésicos e hidrocarburos aromáticos. Estos agentes, o bien poseen radicales libres, como el humo del tabaco, o bien se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación (Trush y cols, 1982).

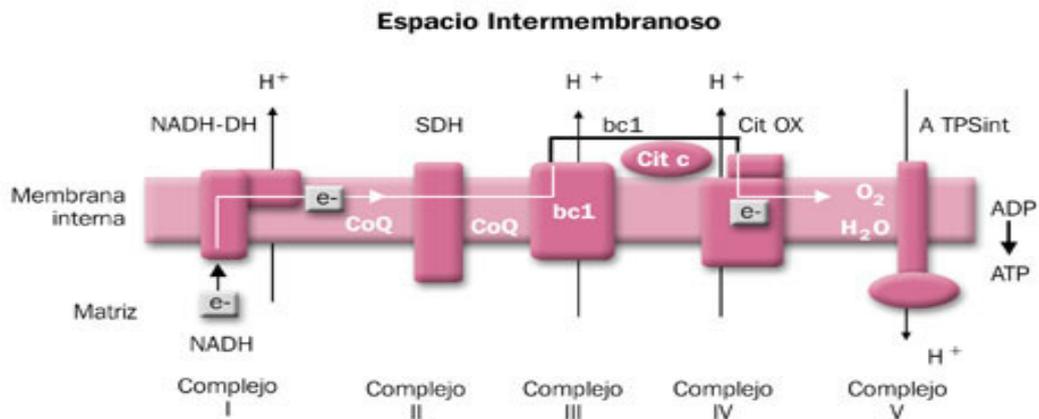
1.3.2. Fuentes endógenas

1.3.2.1. La cadena de transporte electrónico mitocondrial.

La cadena de transporte electrónico mitocondrial (Figura 1) es una de las principales fuentes de radicales libres en la célula. Son muchas las patologías en

las que se ha descrito que la mitocondria genera radicales libres, siendo la causa del estrés oxidativo que sufre la célula.

Figura 1. Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.



1.3.2.1.1. Producción de radicales libres en los distintos estados mitocondriales.

Se calcula que entre el 2 y el 5% de los electrones transportados por la cadena de transporte electrónico mitocondrial en estado 4 (cuando todo el ADP está en forma de ATP) no llegan al complejo IV y producen reducciones parciales del oxígeno (Cadenas y cols., 1977; Frei y cols., 1994). Debido a las propiedades del oxígeno, su reducción tetravalente requiere la transferencia sucesiva de 4 electrones al orbital antienlazante.

El citocromo a_3 del complejo IV de la cadena respiratoria es capaz de mantener estrechamente unidas a su centro activo todas las especies parcialmente reducidas del oxígeno hasta que se completa la transferencia de 4 electrones y 4 protones al O_2 y con ello la formación de H_2O (Benzi y Moretti, 1995). Por tanto, la citocromo c oxidasa perteneciente al complejo IV de la cadena respiratoria no produce este radical. Además, exhibe cierta actividad superóxido dismutasa. Sin embargo, otros elementos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial tienen la capacidad de transferir un electrón directamente al O_2 , pero por el contrario no son capaces de retener el ión superóxido formado (Benzi y Moretti, 1995). Así pues, se produce $\cdot O_2^-$, que puede dismutar a su vez generando peróxido de hidrógeno, el cual es capaz de atravesar las membranas y salir al citoplasma, donde puede reaccionar con otras especies formando diversos tipos de radicales

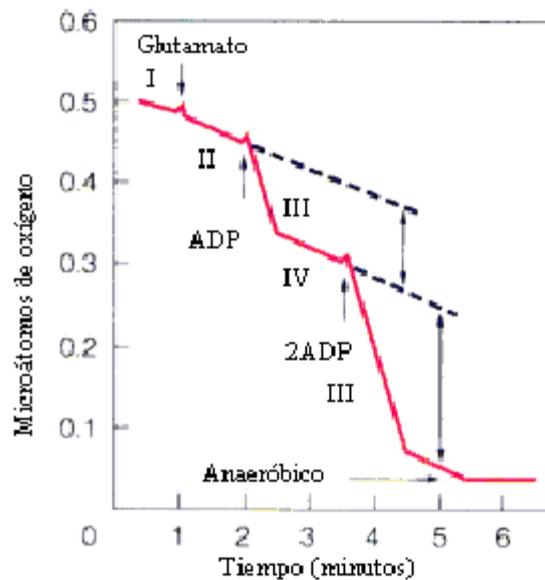
libres (Boveris y cols., 1972). La producción mitocondrial del peróxido de hidrógeno fue inicialmente descrita por Jensen en 1966 (Jensen 1966). Estudios posteriores demostraron que la mayor parte del peróxido de hidrógeno mitocondrial, procedía de la dismutación del radical superóxido (Boveris y cols. 1975).

Se ha estimado que se producen del orden de 10^{10} moléculas de $\cdot\text{O}_2^-$ por célula y por día (Ames y cols., 1993).

Los procesos de formación de anión superóxido son una serie de reacciones no enzimáticas cuya velocidad aumenta linealmente con la concentración de oxígeno presente en el medio.

Utilizando mitocondrias aisladas se puede determinar experimentalmente el consumo de oxígeno por la mitocondria, fenómeno denominado Control Respiratorio (Ver Figura 2). En ausencia de sustrato o de ADP, el consumo de oxígeno causado por la oxidación de sustratos endógenos es bajo. Este estado respiratorio se define como estado 1. Añadiendo un sustrato oxidable, como glutamato o malato, este consumo aumenta levemente (estado 2).

Figura 2. Control respiratorio mitocondrial.

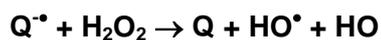


El estado 3 de la cadena de respiración mitocondrial se define como el consumo de oxígeno en presencia de sustrato y ADP, es decir, cuando tiene lugar transporte de electrones y síntesis de ATP. El estado 4 se alcanza cuando el ADP ha sido consumido, y el gradiente electroquímico generado por la cadena de transporte electrónico no puede ser empleado en sintetizar ATP. El mantenimiento

del Control Respiratorio depende de la integridad de la membrana mitocondrial, si ésta recibe algún daño, se desacopla el transporte de electrones y la síntesis de ATP. Las mitocondrias que consumen la misma cantidad de oxígeno en estado 3 que en estado 4 están desacopladas (Rickwood y cols, 1987)

La producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno aumenta cuando el aporte de sustratos a la cadena de transporte electrónico mitocondrial excede la demanda energética, es decir, en condiciones cercanas al estado 4, en las cuales el cociente ATP/ADP es elevado. En estas condiciones, aumentan la presión parcial de O₂ y el grado de reducción de los transportadores redox de los complejos I, II, y III, con el consiguiente incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno. Así pues, el estado reducido de los elementos redox de los complejos I y III también contribuyen al aumento de la velocidad de generación de [•]O₂⁻ (Skulachev y cols., 1996). Puesto que se postula que las mitocondrias se encuentran en un estadio intermedio entre el estado 3 y el estado 4 (Brand y Murphy, 1987), la generación de especies reactivas de oxígeno por los complejos I y III puede ser de gran importancia en el envejecimiento mitocondrial.

Experiencias *in vitro* demuestran que formas solubles de la semiquinona son capaces de producir O₂[•] por autooxidación en medios oxigenados, por lo que se propuso que la ubisemiquinona mitocondrial era una de las fuentes de ion superóxido (Cadenas y cols, 1977). Sin embargo, consideraciones termodinámicas descartan un papel directo de la dismutación de la ubisemiquinona en la producción de este radical *in vivo*, porque el ciclo redox de la ubiquinona tiene lugar enteramente en la fase apolar de la membrana, y en tales condiciones la autooxidación de las quinonas se ve desfavorecida (Benzi y Moretti, 1995). La ubisemiquinona, en cambio, podría estar implicada en la formación de HO[•] a partir de H₂O₂. Puesto que el peróxido de hidrógeno puede atravesar fácilmente las membranas biológicas puede entrar en contacto con la ubisemiquinona y producirse la reacción siguiente (Benzi y Moretti, 1995):



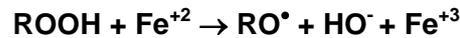
1.3.2.2. Reacción de Fenton-Haber-Weiss.

Consiste en la reducción del H₂O₂ por iones de metales de transición, sobre todo el ion ferroso (Fe⁺²) y, en menor medida, el cuproso (Cu⁺) y otros iones. El peróxido de hidrógeno o agua oxigenada (H₂O₂) es una molécula relativamente

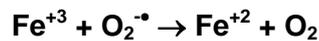
estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Fenton (Fenton, 1894) descubrió, a finales del siglo pasado, que se podían oxidar moléculas orgánicas por mezclas de peróxido de hidrógeno y Fe^{+2} (reactivo de Fenton). Fueron Haber y Weiss quienes dieron una primera explicación del mecanismo de reacción: el Fe^{+2} reduce al H_2O_2 , que a su vez se descompone en el radical hidroxilo y el ion hidroxilo (Haber y Weiss, 1932). Esto puede representarse como sigue:



Y en general,



Aunque esta reacción puede tener lugar con varios metales, el hierro parece ser el más importante en sistemas biológicos. El Fe^{+2} se oxida a Fe^{+3} con mucha facilidad, y éste es muy insoluble. Por ello, el hierro libre que pueda haber en los sistemas biológicos estará en muy pequeñas cantidades y en forma férrica (Halliwell y Gutteridge, 1986). Pero el ion férrico puede ser reducido por el ascorbato (Rawley y Halliwell, 1983; Sawyer, 1988) y por el radical superóxido (Frei, 1994), con lo que se genera un ciclo de producción continua de radicales hidroxilo:



Aún no ha podido explicarse claramente cómo los iones metálicos son capaces de actuar como catalizadores redox en sistemas biológicos en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, es decir, la reducción del H_2O_2 catalizada por metales. Los procesos de captación y distribución del hierro y de los iones metálicos en general están muy finamente regulados en los mamíferos. Hay un gran número de proteínas de unión a metales (ferritina, transferrina, ceruloplasmina...) que actúan como reserva de iones metálicos y que, además, impiden que estos iones participen en reacciones redox (Halliwell, 1991; Rouault y Klausner, 1996).

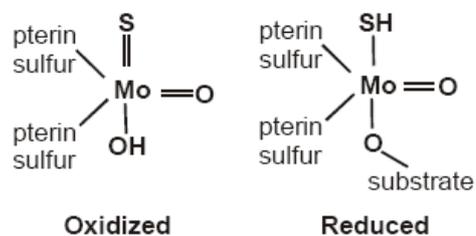
1.3.2.3. El sistema hipoxantina/xantina oxidasa

La enzima xantina óxidoreductasa (XOR) es una enzima descrita originalmente como una aldehído oxidasa en 1902 (Scharfinger, 1902). Esta enzima está ampliamente distribuida entre seres vivos de distinta complejidad, habiéndose demostrado su existencia desde organismos tan sencillos como las bacterias hasta los mamíferos más evolucionados como el hombre. Esta enzima en las distintas especies cataliza la hidroxilación de una amplia gama de sustratos como purinas, pirimidinas, pterinas y aldehídos.

1.3.2.3.1. Estructura y función.

La XOR es un dímero consistente en dos monómeros de 150 kDa. Cada monómero contiene un dominio N-terminal monómero de 20 kDa con dos centros Fe-S, un dominio intermedio de 20 kDa que contiene FAD y un dominio C-terminal de 85 kDa que contiene el cofactor molibdenopterina y el sitio de unión al sustrato (Hille y Massey, 1981). La XOR posee en las distintas especies un peso molecular y una estructura similar de los centros de oxidación-reducción (Hille y cols., 1995) La xantina óxidoreductasa es sintetizada como xantina deshidrogenasa (XDH) y se mantiene mayoritariamente como tal en la célula, pero puede convertirse rápidamente en la forma oxidasa (XO) mediante oxidación de los residuos sulfhidrilo o mediante proteólisis. En tejidos sanos, entre un 10 y un 30% de la actividad total de la enzima procede de la forma oxidasa (Chambers y cols., 1985), pero en determinadas circunstancias se puede producir una conversión de la forma deshidrogenasa a la oxidasa (Ver apartado 1.3.2.3.4.).

Figura 3. Formas reducidas y oxidadas de la XOR.

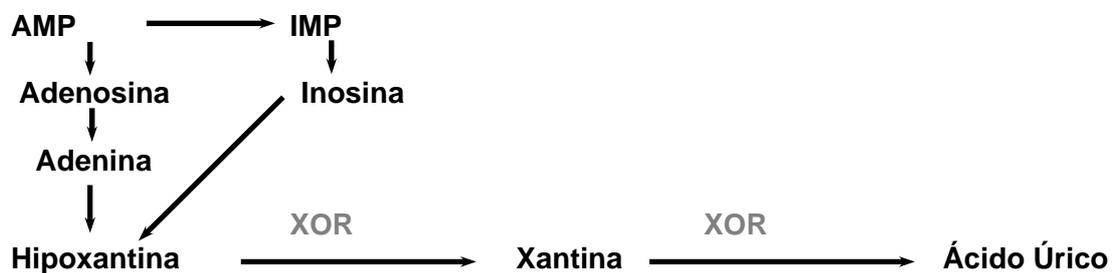


1.3.2.3.2. Vías metabólicas en las que intervine.

En 1963 Berne y Gerlach con sus colaboradores vieron que, en órganos aislados, los productos de degradación de los nucleótidos de adenina se acumulaban durante la hipoxia, y uno de los productos liberados desde la célula era la hipoxantina. En los mamíferos, la enzima cataliza la hidroxilación de esta hipoxantina a xantina, y esta a su vez para dar lugar a ácido úrico (Ver Figura 4) La xantina oxidasa utiliza hipoxantina y oxígeno (como aceptor de electrones), para dar lugar a xantina (eventualmente ácido úrico) y a radical superóxido, mientras que la xantina deshidrogenasa, que es la forma predominante en condiciones fisiológicas, utiliza xantina y NAD⁺ (como aceptor de electrones) (Parks y cols., 1986).

La xantina deshidrogenasa es capaz de utilizar tanto el NAD⁺ como el oxígeno como aceptor de electrones, aunque tiene preferencia por el primero. La xantina oxidasa sólo es capaz de utilizar el oxígeno como aceptor de electrones.

Figura 4. Esquema de la degradación de las purinas.

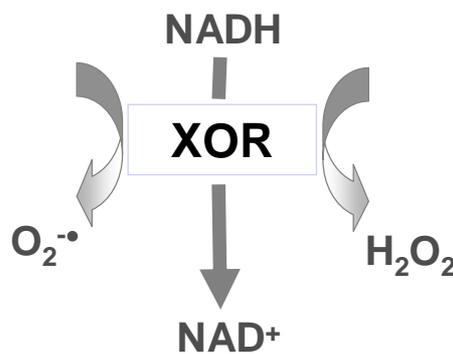


Esta enzima es la única del organismo capaz de sintetizar ácido úrico. En el ser humano y los primates, hasta hace poco tiempo, se pensaba que éste era el último escalón en la degradación de las purinas, mientras que en otros mamíferos la vía de degradación de éstas seguía a alantoína, ácido alantoico, ácido glioxílico y finalmente ácido oxálico. La enzima responsable de que continúe esta reacción es la uricasa, la cual no se expresa en el hombre y hace que la concentración de ácido úrico en plasma sea 10 veces mayor que la concentración en las especies que sí la expresan. En un artículo reciente de Hellsten y cols. (2001) los autores encontraron un marcado incremento en los niveles de alantoína en músculo tras un ejercicio físico intenso submáximo. Esta observación sugiere, en primer lugar, que el urato es utilizado como antioxidante en músculo y, en segundo lugar, que se generan

radicales libres durante el ejercicio submáximo ya que, en ausencia de uricasa, son las ERO las reponsables de la oxidación del urato a alantoína.

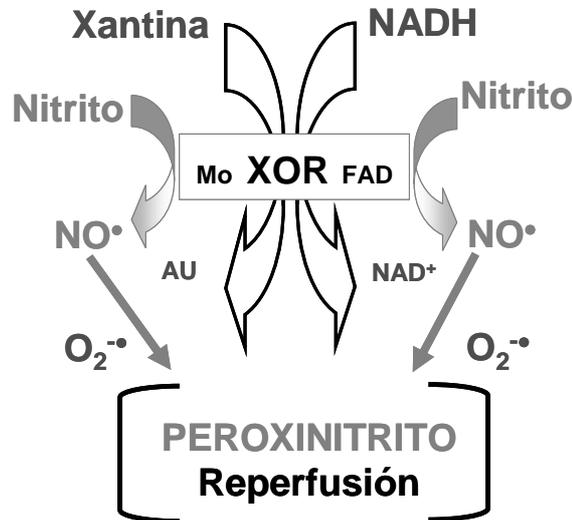
Otra reacción que es catalizada por la XOR es la oxidación de NADH en presencia de oxígeno, produciendo radical superóxido (Nakamura, 1991). Esta actividad NADH oxidasa ha sido escasamente estudiada aunque se considera que puede ser relevante en cuanto a la producción de ERO *in vivo*. La XDH produce dos moléculas de $O_2^{\bullet -}$ y una de H_2O_2 por cada molécula de NADH oxidada (Sanders y cols. 1997) . La oxidación del NADH y su consiguiente producción de superóxido es claramente más rápida por parte de la XDH que de la XO, tanto en humanos como en vacas (Sanders y cols. 1997).

Figura 5. Reacción de oxidación del NADH por la xantina óxidoreductasa.



Por otra parte se sabe que la enzima XOR cataliza además la reducción de nitrato a nitrito en condiciones anaeróbicas (Fridovich y cols. 1962), y en la misma línea se ha descubierto recientemente que la XO cataliza también la subsiguiente reacción de reducción del nitrito para la formación de NO^{\bullet} en condiciones de hipoxia (Millar y cols. 1997). Algunos estudios han visto que en casos de isquemia de algunos tejidos, como el corazón, se produce óxido nítrico a través de una vía diferente a la óxido nítrico sintetasa (NOS), a partir de nitrito, sobretudo en situación de acidosis (Samouilov y cols. 1998).

Figura 6. Reacciones de reducción del nitrito a óxido nítrico por la xantina óxidoreductasa.



Tanto la xantina como el NADH pueden ceder electrones en la reacción, aunque la xantina es la más eficiente (Li y cols. 2001). Cuando la xantina es el sustrato reductor el nitrito se une al sitio molibdeno, mientras que cuando el reductor es el NADH, éste lo hace al sitio FAD, el cual transfiere los electrones al sitio molibdeno, donde está el nitrito (Li y cols. 2001).

Así como un exceso de NADH no tiene efecto inhibitorio en la reacción, un exceso de xantina provoca la inhibición de la reacción, probablemente por la unión de la xantina al sitio molibdeno, bloqueando la unión del nitrito (Li y cols. 2001). Además, se ha demostrado que a pH ácido se favorece la reacción, por lo que en condiciones anaeróbicas o hipóxicas la enzima XO cataliza la formación de NO•, formándose dos moléculas de NO• por cada molécula de NADH, el cual cede dos electrones que reducen cada uno una molécula de nitrito. En caso de ser la xantina el sustrato reductor, por cada molécula de xantina oxidada se produce una molécula de NO• (Godber y cols. 2000), si bien otros autores refieren que son dos las moléculas de nitrito reducidas por cada molécula de xantina oxidada (Li y cols. 2001)

Tanto la xantina oxidasa como la xantina deshidrogenasa pueden formar NO•, siendo esta última 50 veces más eficiente que la forma oxidasa (Godber y cols. 2000), lo cual hay que considerar teniendo en cuenta que in vivo la concentración intracelular de XDH es la forma predominante de la XOR. Así, la

formación de NO[•] por esta vía puede alcanzar los niveles que alcanza la formación de NO[•] a través de la NOS. Si se tiene en cuenta que la NOS en condiciones de hipoxia y acidosis se desnaturaliza, primero reversiblemente para luego hacerlo de forma irreversible, la formación de NO[•] a través de la xantina óxidoreductasa puede tener gran importancia. Inicialmente el NO[•] formado se acumularía durante el período isquémico, provocando una vasodilatación compensatoria, mientras que en la fase de reperfusión, éste podría reaccionar con el anión superóxido para formar peroxinitrito, el cual produce nitración (nitrosilación) de proteínas y daño celular (Beckman y cols. 1990).

1.3.2.3.3. Distribución orgánica, celular y transporte de la enzima.

La actividad XOR ha sido detectada en todas las especies examinadas, incluidas las bacterias. En los tejidos de mamíferos la actividad está ampliamente distribuida, aunque los niveles más altos se encuentran en hígado e intestino (Parks y Granger, 1986). Sin embargo hay muchas diferencias entre especies ejemplificada por el amplio rango de niveles encontrados en sangre (Parks y Granger, 1986) y corazón (Werns y Lucchesi, 1990). En humanos la XOR ha sido detectada principalmente en hepatocitos, células de Kupfer, enterocitos del yeyuno y en glándula mamaria (Linder y cols., 1999). Además la enzima ha sido encontrada en el endotelio capilar del yeyuno, endotelio capilar del músculo esquelético, macrófagos, mastocitos (Hellsten-Westing, 1993) y riñón.

Con respecto a la localización celular de la XOR se sabe que ésta se encuentra en el citosol de la células endoteliales de tejido bovino (Jarasch y cols. 1981) y en la superficie externa de la membrana celular (Rouquette y cols., 1998). Posteriormente se ha detectado la actividad de esta enzima en peroxisomas de hepatocitos de rata (Angermuller y cols., 1987). Recientemente se ha visto que la enzima se distribuye en todo el citoplasma celular de las células endoteliales y epiteliales humanas, pero con una concentración mayor alrededor del núcleo, lo cual puede significar una localización estratégica para la activación de factores de transcripción nucleares a través de los radicales libres que produce la enzima (Rouquette y cols. 1998). Además, estos autores han demostrado la presencia de la XOR en la cara externa de la membrana celular, en la que muestra una distribución polarizada, de forma que se concentra en la superficie que tiene contacto con células vecinas, lo cual podría favorecer también la transmisión de señales entre células a través de los radicales libres formados por la enzima.

La unión de la enzima a la superficie celular está respaldada por la demostración tanto de la enzima como de las consecuencias de su actividad en tejidos que originalmente presentan poca actividad XOR, de forma que tras aumentar la liberación de esta enzima en otros órganos, aquellos presentan un incremento de daño producido por la XOR transportada a través de la sangre (Terada y cols. 1992) (Terada y cols. 1991), y además son protegidos por inhibidores de la XOR (Grum y cols. 1986; Zimmerman y cols., 1988). Así pues, la XOR liberada desde órganos isquémicos es capaz de producir efectos en órganos a distancia, como el pulmón (Weinbroum y cols. 1995).

Por otra parte, la unión de la XO a la superficie celular influye en las propiedades catalíticas, en la capacidad de producir agentes oxidantes y en la estabilidad de la propia XOR (Radi y cols. 1997). Un proceso similar sufre la enzima cuando es liberada al plasma, cambiando sus propiedades. La XOR antes de ser liberada por las células, contiene cierta actividad XDH, y al liberarse al plasma se convierte inmediatamente en XO (Tan y cols. 1993). Por lo tanto, tanto la liberación de la enzima a la circulación como la subsiguiente unión a las células promueven la producción de ERO.

Por último, citar que además de circular por el plasma de forma libre, la enzima circula también formando inmunocomplejos. De hecho, la actividad XO en plasma humano es escasamente detectable en condiciones normales (Giler y cols. 1975), en parte debido a que la XOR humana forma inmunocomplejos con los anticuerpos IgM, siendo el 3% de estos anti-XOR (Benboubetra y cols., 1997).

1.3.2.3.4. Conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa.

Así como la Xantina Oxidasa se relaciona con diversos procesos patológicos y produce un daño oxidativo a los tejidos, la Xantina Deshidrogenasa puede ser un importante componente de la defensa del organismo contra el daño provocado por las ERO a través de la acción antioxidante del ácido úrico, que es un potente antioxidante (Becker, 1993).

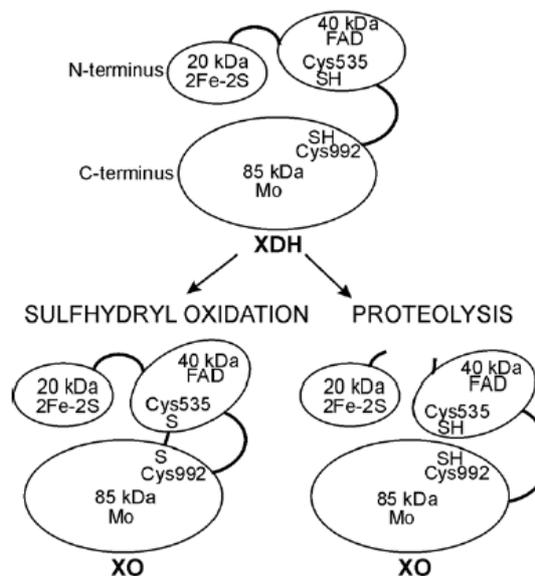
La enzima, *in vivo*, está mayoritariamente en la forma deshidrogenasa, y esta enzima puede transformarse en la forma oxidasa en ciertas condiciones (Stirpe y cols. 1969): proteólisis, calentamiento a 37°C, almacenamiento a -20°C y anaerobiosis entre otras.

La conversión de XDH a XO de forma reversible se lleva a cabo mediante calentamiento o mediante oxidación de los grupos tiol de los residuos de cisteína para formar puentes disulfuro (Stirpe y Della Corte, 1969). La conversión de la

enzima de forma irreversible se produce por proteólisis (Amaya y cols. 1990). La proteasa responsable del proceso todavía no ha sido identificada. (Ver Figura 7)

A pesar de estas diferencias entre la Xantina Deshidrogenasa y la Xantina Oxidasa, entre las dos enzimas, únicamente se observan cambios electrostáticos en el entorno del FAD. Éste no cambia estructuralmente en la conversión de Xantina Deshidrogenasa a Xantina Oxidasa y simplemente sufre un ligero desplazamiento. No obstante, el cambio estructural del entorno bloquea el acceso del NAD^+ a su sitio de unión, reduciendo asimismo considerablemente el poder reductor del par FAD/FADH_2 .

Figura 7. Conversión de la XDH a XO de forma reversible e irreversible. (Modificado Nishino, 1994)



1.3.2.3.5. Procesos en los que tiene una participación relevante.

Derivado de la capacidad de la forma oxidasa de la enzima para generar especies reactivas del oxígeno, la xantina óxidoreductasa ha sido estudiada como mecanismo en el daño tisular por infarto de miocardio, hipertensión y aterosclerosis (Jeroudi y cols. 1994) y muchas otras patologías (White y cols., 1996).

La isquemia-reperfusión se considera un importante factor en la regulación de la enzima, habiéndose demostrado que ésta provoca un aumento de la actividad de la XOR (Hassoun y cols. 1994; Terada y cols. 1997), así como un aumento en

los niveles mRNA (Hassoun y cols. 1994; Terada y cols. 1997) y de la expresión de la proteína *in vivo* (Hassoun y cols. 1998) e *in vitro* (Terada y cols. 1997). Durante el proceso de isquemia los niveles celulares de ATP disminuyen, tanto por el descenso en su producción como por su rápida defosforilación a ADP. Éste es degradado vía adenosina e inosina a hipoxantina.

Debido a la depleción del ATP se produce una desregulación de los canales ATP-dependientes y un aumento del Ca^{+2} intracelular. Como consecuencia de este incremento, se produce la activación de proteasas dependientes de Ca^{+2} responsables de la conversión de la XDH en XO (Della Corte y Stirpe, 1968). Durante la reperfusión y debido a la acumulación del sustrato y de la xantina oxidasa en los tejidos isquémicos, se inicia una cascada de reacciones cuyo resultado es un gran aumento en la formación de radicales libres. (Ver Figura 8).

En principio, el único papel fisiológico para la XOR, se pensó que era su participación en el catabolismo de las purinas. Sin embargo, en los últimos años, se han estudiado otras funciones de la enzima. En este sentido se han sugerido varias hipótesis y entre ellas se encuentra la que destaca su papel en la inmovilización del hierro (Biernacki y cols., 1986) y en la regulación del tono vascular (Hong y cols., 1989). Una tercera posibilidad es que la XO funcione como mediador en los procesos inmunológicos debido a la capacidad del radical superóxido generado por la enzima para actuar como agente quimiotáctico atrayendo los neutrófilos (Petroni y cols., 1980; McCord, 1986). Se ha comprobado, también, que los neutrófilos en un cultivo de células endoteliales son capaces de mediar la conversión de la XDH a XO vía contacto celular (Phan y cols., 1989). El tratamiento de ratones con interferón o sus precursores se ha comprobado que eleva la actividad de la XO sin afectar al ratio XDH/XO, lo que supone un aumento en la cantidad de proteína (Ghezzi y cols., 1984). En estudios posteriores se ha comprobado que el tratamiento con interferón aumenta los niveles de XDH mRNA en varios tejidos (Terao y cols., 1992). Efectos muy similares sobre la actividad XO tiene la histamina, que ha demostrado aumentarla significativamente en células endoteliales con 5 minutos de exposición (Friedl y cols., 1989)

El alopurinol, como análogo de la hipoxantina, junto con otros, se considera un inhibidor de su actividad y de la generación de oxidantes (Ver Tabla 3)

Figura 8. Producción de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 durante el proceso de isquemia-reperfusión.

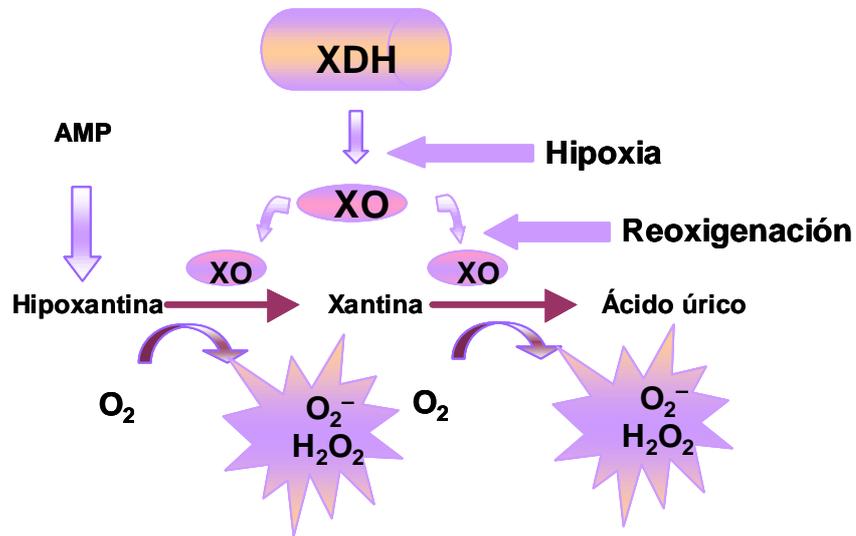


Tabla 3. Inhibidores de la XOR.

Inhibidor	Modificación	Efecto	Referencia
Alopurinol	Modificación sitio molibdeno	Inhiben las reacciones de la enzima con la xantina, hipoxantina y nitritos	(Massey y cols., 1970)
Amflutizol	Modificación sitio molibdeno	Inhiben las reacciones de la enzima con la xantina, hipoxantina y nitritos	(Werns y cols., 1991)
BOF-4272	Modificación sitio molibdeno	Inhiben las reacciones de la enzima con la xantina, hipoxantina y nitritos	(Okamoto y cols., 1995)
Tungsteno	Modificación sitio molibdeno	Inhiben las reacciones de la enzima con la xantina, hipoxantina y nitritos	(Johnson y cols., 1974)
DPI (difeniliodonio),	Modificación sitio FAD	Inactiva NADPH oxidasa.	(Zhang y cols., 1998)
Ayuno 24 horas Dieta hipoproteica	Inactivación post-transduccional	Disminuyen la actividad enzimática.	(Frederiks y Bosch 1996).
Hierro Quelantes de Hierro	Control transcripcional	Aumenta la actividad XOR Disminuyen la actividad XOR	(Ghio y cols., 2002)

Kinasas p38 y CK2	Fosforilación	Regulan la actividad XOR	(Kayyali, y cols. 2001).
TNF- α ;IFN- γ ;IL-1 e IL-6	Aumentan la transcripción	Aumentan la actividad XOR	(Pfeffer y cols., 1994)
SOD	Previene la conversión de la XDH a XO	Disminuye la actividad XO	McCord, 1987

1.3.2.4. Los sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico.

Estos sistemas de membrana contienen los citocromos P₄₅₀ y b₅, que pueden oxidar ácidos grasos insaturados (Capdevila y cols., 1981) y xenobióticos (Aust y cols., 1993). Bajo la denominación de citocromos P₄₅₀ se engloba un número muy elevado de proteínas con grupos hemo ampliamente distribuidas entre los seres vivos. Son los más poderosos oxidantes *in vivo*, aunque también pueden actuar como agentes reductores. Son monooxigenasas que actúan activando el oxígeno molecular a especies electrofílicas de oxígeno (bien radicales o bien generadoras a su vez de radicales) que pueden ser liberadas en la célula (Dolphin, 1988; Foster y Estabrook, 1993).

1.3.2.5. Fagocitos activados.

Los fagocitos activados (neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos) poseen diversas enzimas que les permiten generar O₂^{-•} y H₂O₂ como uno de los mecanismos para defenderse de los microorganismos (Babior, 1978).

1.3.2.6. Microsomas o peroxisomas.

Los microsomas o peroxisomas son una fuente importante de peróxido de hidrógeno. Poseen una concentración elevada de oxidasas, como la D-aminoácido oxidasa y la acil-CoA oxidasa, enzimas utilizadas en la degradación de ácidos grasos y amino ácidos, que producen peróxido de hidrógeno como producto de la reacción que catalizan (Boveris y cols., 1972). La catalasa peroxisomal metaboliza la mayor parte del peróxido de hidrógeno formado en ellos (Freeman y Crapo,

1982; Frei, 1994). Por otro lado, el citocromo P₄₅₀ tiene un papel importante en los microsomas en la detoxificación de xenobióticos (Philpot, 1991).

1.3.2.7. Autooxidación de pequeñas moléculas.

Existen en la célula una gran variedad de componentes solubles, capaces de producir reacciones de oxidación-reducción, tales como los tioles, hidroquinonas, catecolaminas, flavinas y tetrahidropterinas. En todos estos casos, el radical superóxido es el radical primario formado por la reducción del dioxígeno por estas moléculas (Baccarini 1978). Asimismo, también se produce peróxido de hidrógeno como producto secundario, a partir de la dismutación del radical superóxido, bien espontáneamente, o bien catalizado enzimáticamente por la superóxido dismutasa (SOD).

1.3.2.8. Enzimas solubles y proteínas.

Enzimas como xantina oxidoreductasa, óxido nítrico sintasa, aldehído oxidasa, dihidroorotato deshidrogenasa, flavinproteín deshidrogenasa y triptófano dioxigenasa, generan radicales libres durante su ciclo catalítico (Aleman y cols. 1967).

1.3.2.9. Membrana plasmática.

Los radicales libres generados extracelularmente deben cruzar la membrana plasmática antes de reaccionar con otros componentes celulares y, por tanto, pueden iniciar reacciones tóxicas en la misma. Los ácidos grasos insaturados presentes en la membrana y las proteínas transmembrana que tienen aminoácidos oxidables son susceptibles de ser alterados por los radicales libres. Estas reacciones alteran las propiedades de las membranas de tal modo que cambian su fluidez, aumentan la permeabilidad de la membrana, disminuyen el potencial de membrana, hacen perder las funciones secretoras e inhiben los procesos metabólicos celulares, todo ello provocado por la peroxidación lipídica, o la oxidación de importantes proteínas estructurales (Freeman and Crapo, 1982).

La enzima NAD(P)H-oxidasa presente en la membrana plasmática de las células fagocíticas, es una importante fuente biológica de producción de radicales libres, debido a la activación de los polimorfonucleares y macrófagos que

consumen gran cantidad de oxígeno, el cual será transformado en radical superóxido. Estos radicales libres de oxígeno pueden dañar a la propia célula que los origina y a células próximas a los fagocitos estimulados. También se ha visto que la NADH oxidasa es una importante fuente de radicales libres en células musculares lisas arteriales y endotelio (Jones, 1994).

Cabe destacar el papel de las enzimas unidas a la membrana plasmática, tales como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa, en la producción de radicales libres fruto del metabolismo de su producto, el ácido araquidónico, para dar potentes productos biológicos: prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (White y Hecklet, 1990).

2. Teoría del estrés oxidativo

2.1. Estrés oxidativo y daño a biomoléculas.

La formación de cierta tasa de radicales libres es un proceso normal e inevitable (Slater, 1984), ya que son producto de infinidad de reacciones químicas imprescindibles para la vida celular. Estas especies tan reactivas, no causan daño oxidativo en condiciones normales debido a que la célula está provista de gran cantidad de mecanismos antioxidantes. Sin embargo, cuando la capacidad de los mecanismos antioxidante se ve superada por las agresiones oxidativas, nos encontramos ante un estrés oxidativo. En estas circunstancias, para paliar el daño que los pro-oxidantes pueden causar en el organismo, está indicado protegerlo incrementando su capacidad antioxidante. Uno de los modos en que se puede conseguir esto, consiste en la administración de antioxidantes bien como fármacos, bien como complemento dietético (Ames, 1983).

2.1.1. Daño oxidativo a lípidos.

De los principales tipos de biomoléculas, los lípidos, y sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados, son los más susceptibles de ser atacados por radicales libres (Cheeseman y Slater, 1993). Los radicales libres que pueden iniciar esta reacción son: el radical hidroxilo (HO^\bullet), el peróxido (ROO^\bullet), el alcóxido (RO^\bullet) y el alquílico (R^\bullet).

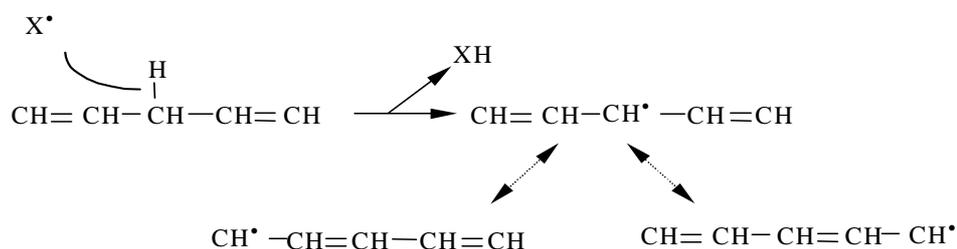
El proceso de ataque oxidativo a los lípidos (Figura 9), denominado peroxidación lipídica, comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la

cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico (Frei, 1994; Halliwell, 1994). Esta reacción se produce preferentemente en los carbonos contiguos a enlaces dobles de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que los radicales formados se pueden estabilizar por resonancia con el enlace doble. Este radical centrado en un átomo de carbono reacciona con el O_2 y forma un radical peróxido, $R-COO^\bullet$ (Figura 9B). Los radicales peróxido pueden reaccionar con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes (Figura 9C), se forma un radical alquílico ($R'-CH^\bullet$) y un peróxido lipídico ($R-COOH$), con lo que se propaga la reacción en cadena radicalaria (Halliwell, 1994).

De esta manera, un solo ataque por un radical libre da lugar a la formación de un gran número de productos de oxidación, sobre todo aldehídos como malondialdehído y 4-hidroxinonenal, e hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano (Freeman y Crapo, 1982; Halliwell, 1991; Cheeseman y Slater, 1993; Halliwell, 1994). Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, con lo que causan mutaciones en el ADN, y producen daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas (Frei, 1994). La peroxidación lipídica se considera como un factor muy importante en el envejecimiento de células aeróbicas (Lippman, 1985). El daño oxidativo a los lípidos de membrana constituye, muy probablemente, un factor importante en la disminución de la fluidez de las membranas (Shigenaga y cols., 1994).

Figura 9. Mecanismo de peroxidación lipídica.

A) Ataque oxidativo a un ácido graso insaturado.



B) Formación de un radical peróxido, COO^\bullet .



C) Propagación de la reacción.**2.1.2. Daño oxidativo a proteínas.**

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, sobre todo por el radical hidroxilo (Stadtman, 1992). Dentro de los aminoácidos fisiológicos, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los que más procesos oxidativos sufren (Davies, 1987). Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína y, por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica. En condiciones anaeróbicas, los radicales libres promueven un entrecruzamiento considerable entre proteínas, mientras que en presencia de oxígeno los radicales libres provocan una gran fragmentación de la cadena peptídica (Stadtman, 1992).

Otro mecanismo muy importante de oxidación de proteínas son los llamados "Sistemas de oxidación de función mixta" o "Sistemas de oxidación catalizada por metal", que poseen como dianas más comunes los residuos de arginina, histidina, lisina, prolina y cisteína (Stadtman y cols., 1992). Estos sistemas catalizan una serie de reacciones acopladas, enzimáticas o no, que implican la reducción del O_2 a H_2O_2 y del Fe^{+3} a Fe^{+2} (Fucci y cols., 1983; Amicci y cols., 1989). La producción de H_2O_2 y de Fe^{2+} es la única función que tienen en común los sistemas de oxidación catalizada de metal. Los sistemas más relevantes son diversas NADH y NADPH oxidasas, xantina oxidasa y citocromo P_{450} reductasas (Stadtman y cols., 1992).

En la Tabla 4 se resumen los sistemas fisiológicamente más importantes que producen la oxidación de proteínas.

Tabla 4. Sistemas más importantes que generan la oxidación de proteínas.

ENZIMÁTICOS
NADPH oxidasas/NADPH/Fe(III)/O ₂
Xantina Oxidasa/Hipoxantina/Fe(III)/O ₂
Citocromo P ₄₅₀ reductasa/Citocromo P ₄₅₀ /NADPH/Fe(III)/O ₂
Citocromo P ₄₅₀ reductasa/redoxina/Citocromo P ₄₅₀ /NADH/Fe(III)/O ₂
Nicotinato hidroxilasa/NADPH/Fe(III)/O ₂
NO ENZIMÁTICOS
Ascortato/Fe(III)/O ₂
RSH/Fe(III)/O ₂
Fe(II)/O ₂
Fe(II)/H ₂ O ₂ (reactivo de Fenton)

En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como lisina, prolina y arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas (Stadtman y cols., 1992). Otros aminoácidos como histidina, cisteína y metionina, también sufren daño oxidativo, pero no forman derivados de tipo carbonilo (Stadtman y cols., 1992). El daño oxidativo suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína (Dean y cols., 1993).

Se ha propuesto que la oxidación de enzimas mediada por radicales libres, es un paso de marcaje dentro del recambio proteico (Stadtman y cols., 1992), lo que se ve confirmado por las siguientes observaciones:

- Muchas proteasas comunes degradan proteínas oxidadas más oxidadas que las formas no oxidadas (Davies y cols., 1987).
- La mayoría de los tejidos animales poseen una proteasa alcalina neutra que degrada las formas oxidadas de los enzimas, pero que apenas tiene actividad sobre las formas no oxidadas (Rivett, 1985).
- La degradación *in vivo* de proteínas endógenas en mitocondrias de hígado y corazón y en eritrocitos se ve estimulada por la adición de sistemas generadores de radicales libres (Davies y Lin, 1988).

- La exposición *in vitro* de proteínas purificadas a radicales libres aumenta su susceptibilidad a la degradación por proteasas no dependientes de 5'-trifosfatos (Davies y cols., 1987).

2.1.3. Daño oxidativo al ADN.

El ADN también es susceptible de daño oxidativo en todos sus componentes. Se sabe que el oxígeno es capaz de adicionarse a las bases o al azúcar del ADN formándose radical peroxil. Las posteriores reacciones de estas especies radicalarias en el ADN dan lugar a un gran número de productos.

El número de bases modificadas diferentes encontradas en el ADN tras un ataque oxidativo, supera la veintena. La alteración de este tipo que se observa con más frecuencia es la 8-hidroxi-2' deoxiguanosina (8oxodG). Su importancia reside en su poder mutagénico ya que durante la replicación producirá transversiones T por C (Kasai y Nishimura, 1984; Shibutani y cols., 1992). El daño oxidativo asociado a proteínas y al ADN no deben ser considerados de manera independiente. La acumulación de formas inactivas de enzimas reparadores puede aumentar la acumulación de daño oxidativo en el ADN, por lo que se pueden potenciar uno a otro. Cuando la replicación del ADN dañado tiene lugar antes de la reparación o cuando un ADN dañado se repara de manera incorrecta, tiene lugar una mutación (Halliwell y Auroma, 1991; Breen y Murphy, 1995). Por ello, las lesiones oxidativas al ADN parecen estar implicadas no sólo en el envejecimiento celular, sino también en la patogénesis de las enfermedades asociadas a la edad avanzada. El ADN dañado es reparado por enzimas que cortan la parte afectada, que es entonces excretada por la orina (Ames y cols., 1993). Puesto que las enzimas reparadoras no llegan a eliminar todas las lesiones se acumulan, con lo que el número de mutaciones aumenta con la edad (Ames y cols., 1993).

El daño al ADN por radicales libres puede ocurrir de dos modos principales:

- Reacción con los residuos desoxirribosa.
- Reacción con las bases del ADN.

Cuando un radical libre ataca a una desoxirribosa del ADN, generalmente produce un ruptura de la hebra. Sin embargo, la hebra intacta puede mantener juntos los dos extremos de la hebra dañada hasta que actúen las enzimas

reparadoras, por lo que este tipo de daño no es usualmente crítico para la célula a no ser que haya una rotura cercana en las dos cadenas (Breen y Murphy, 1995).

La adición a las bases del ADN es más habitual que la ruptura de las cadenas, y da lugar a una gran variedad de productos derivados. El principal modo de reacción consiste en la adición a los carbonos C-5 y C-6 de las pirimidinas y C-4 y C-8 de las purinas (Breen y Murphy, 1995). El resultado del ataque a estos carbonos de las purinas y pirimidinas es un conjunto de formas radicales de las bases, las cuales sufren diversas reacciones hasta obtener productos finales muy variados. En presencia de oxígeno, los aductos de purinas con radicales libres pueden sufrir en ciertos casos una reconversión a la purina inicial (Breen y Murphy, 1995). La oxidación de la desoxiguanosina a 8-oxoguanosina es una de las lesiones más frecuentes, y reviste gran importancia por su alto efecto mutagénico (Shibutani y cols., 1992).

El ADN mitocondrial sufre mucho más daño oxidativo que el ADN nuclear (Richter y cols., 1988). El genoma mitocondrial presenta ciertos rasgos que le hacen especialmente susceptible de ser atacado por agentes oxidantes: carece de histonas que puedan recibir el ataque en lugar del ADN (Johns y cols., 1995); el sistema de reparación es poco efectivo (Suter y Richter, 1999; Shen y cols. 1995) y, por último, se encuentra muy cerca de la cadena de transporte mitocondrial, uno de los sistemas principales de producción de especies activadas de oxígeno (Giulivi y cols, 1998). Otro factor distintivo del ADN mitocondrial es que no posee intrones, de manera que la modificación de cualquier base afecta usualmente a una zona de ADN codificante (Linnane y cols., 1989; Ames y cols., 1993) y su repercusión suele ser, por tanto, más importante.

2.1.4. Daño oxidativo a glúcidos.

Los glúcidos reaccionan con facilidad con los radicales hidroxilo. Los mono y disacáridos resisten la acción de los radicales libres de oxígeno. La glucosa constituye un captador del radical superóxido, al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas. La manosa y el manitol son eliminadores del radical hidroxilo. Por ello, se ha observado que diversos polisacáridos actúan como agentes protectores celulares (Albertini y cols., 1996).

El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres (Borel y cols., 1988) dando lugar a procesos degenerativos.

Un caso especial es el del ácido hialurónico cuya función estructural reside en mantener la viscosidad del fluido sinovial. La exposición a agentes oxidantes (sobre todo radical superóxido) provoca su fragmentación, lo que conduce a la desestabilización del tejido conectivo y a la pérdida de viscosidad del fluido sinovial, como es el caso de la artritis reumatoide (Greenwald y Moy, 1980; Grootveld y cols, 1991). Se ha observado que la superóxido dismutasa es capaz de proteger frente a la despolimerización del ácido hialurónico, en el líquido sinovial (McCord, 1974). Los proteoglicanos están sujetos a rotura oxidativa de forma similar (Greenwald y cols. 1980).

Se ha observado una relación directa entre los radicales libres y el estrés oxidativo con la *diabetes mellitus*, una enfermedad inicialmente caracterizada por una pérdida en la homeostasis de la glucosa, así como también, con las complicaciones diabéticas. Se postula que una anormal regulación en el metabolismo de los peróxidos y los metales de transición colabora en el establecimiento de la enfermedad, así como en las complicaciones que aparecen a largo plazo (Wolff y cols. 1987; Oberley, 1988; Wolff, 1993).

2.2. Indicadores de estrés oxidativo.

Dada la importancia del daño que el estrés oxidativo puede producir en las células y en el organismo, en los últimos años se ha intentado encontrar índices que nos permitan medirlo. Entre los indicadores propuestos, los más relevantes son el cociente GSSG/GSH como indicador de daño oxidativo en el citosol, el malondialdehído y el hidroxinonenal como indicadores de daño a los lípidos, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina que es un índice de daño oxidativo en el ADN, pentano y etano también como índices de lipoperoxidación lipídica, grupos carbonilo en proteínas y 2-oxohistidina como daño en proteínas (Hageman y cols., 1992).

2.2.1. Indicadores de daño oxidativo en el citosol.

2.2.1.1 Cociente GSSG/GSH.

El glutatión (γ -glutamil cisteinil glicina) es un tripéptido que desempeña diversas funciones metabólicas de gran importancia, sobre todo relacionadas con la protección antioxidante de las células (Viña, 1990). El grupo activo es el sulfhidrilo del residuo de cisteína, por lo que el glutatión puede ejercer su papel protector

cuando se presenta en su forma reducida (GSH). Dos moléculas de GSH pueden oxidarse cediendo un electrón cada una y combinándose entre sí dando lugar la forma disulfuro (GSSG). Por ello, un indicador característico de estrés oxidativo es el aumento de la concentración de glutatión oxidado con la consiguiente alteración del estado redox del glutatión, aumentando el cociente GSSG/GSH (Sies, 1986). Sin embargo, existen problemas metodológicos importantes en la determinación correcta del GSSG. En condiciones fisiológicas, los niveles de GSH son de dos a tres órdenes de magnitud mayores que los de GSSG (Kosower y Kosower, 1978). Además, el GSH se autooxida con facilidad a GSSG, sobre todo a pH neutro (Asensi y cols., 1994). Esto hace que una pequeña oxidación del GSH suponga un aumento muy importante del GSSG, con el falseamiento consiguiente del índice GSSG/GSH. Estos problemas se han conseguido solucionar gracias al método propuesto por nuestro grupo, consistente en el bloqueo del grupo tiol con N-etilmaleimida inmediatamente después de la extracción y posterior análisis del GSSG por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (H.P.L.C.) (Asensi y cols., 1994).

2.2.2. Indicadores de daño oxidativo a lípidos.

2.2.2.1. Malondialdehído e hidroxinonenal.

La degradación de los lipoperóxidos da lugar a la formación de una gran variedad de aldehídos. Los indicadores de daño oxidativo a lípidos más empleados son el malondialdehído y el 4-hidroxinonenal. Se han descrito varios métodos para la determinación de malondialdehído (Bird y Draper, 1984; Esterbauer y cols., 1991). La mayoría son poco específicos, ya que utilizan el ácido tiobarbitúrico como reactivo y éste reacciona con todos los aldehídos de la muestra. Estos métodos se han mejorado gracias a la separación, por cromatografía líquida de alta resolución, del aducto malondialdehído-ácido tiobarbitúrico de otras sustancias que puedan interferir en la determinación (Knight y cols., 1988). El 4-hidroxinonenal es un producto muy abundante de la peroxidación lipídica. Las técnicas convencionales de cuantificación incluyen la derivatización de la muestra con dinitrofenilhidracina para formar un aducto estable y no volátil con el aldehído, y una cromatografía por H.P.L.C. para separar y cuantificar el pico correspondiente al 4-hidroxinonenal (Esterbauer y Zollner, 1989).

2.2.2.2. Pentano y etano.

El etano y el pentano son dos hidrocarburos de cadena corta que se forman como productos terminales en la lipoperoxidación de los ácidos grasos poliinsaturados ω -3 y ω -6 (Dumelin y Tappel, 1977). Debido a su volatilidad, se eliminan por vía pulmonar y se pueden identificar por cromatografía de gases. Al ser una técnica no invasiva, la cuantificación de estos alcanos se ha empleado mucho en seres humanos como índice de peroxidación lipídica (Wispe y cols., 1985; Wispe y cols., 1986).

2.2.3. Indicadores de daño oxidativo al ADN.

2.2.3.1. 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

Una de las bases modificadas cuyo contenido aumenta en el ADN tras un estrés oxidativo es la 8-hidroxiguanina (Kasai y cols., 1986). Esta lesión puede repararse por una glicosilasa, que elimina la base nitrogenada (8-hidroxiguanina), o por una endonucleasa, que elimina el nucleósido (8-hidroxi-2'-desoxiguanosina) (Tchou y Grollman, 1993); ambas se eliminan por la orina. La cantidad del nucleósido 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina en órganos o en orina se utiliza como índice del daño oxidativo al ADN *in vivo* (Fraga y cols., 1990). Se prefiere la detección del nucleósido y no de la base, porque la excreción de la base oxidada en orina está muy influenciada por la ingesta.

2.2.4. Indicadores de daño oxidativo a proteínas.

2.2.4.1. Grupos carbonilos en proteínas.

Los métodos para la detección de los grupos carbonilo producidos en las proteínas por el estrés oxidativo se pueden agrupar en dos: marcaje con borohidruro de sodio tritiado, y reacción con fenilhidrazinas (Lewisch y Levine, 1995). El método más empleado se basa en la reactividad de la 2,4-dinitrofenilhidrazina con los grupos carbonilo para formar 2,4-dinitrofenilhidrazona, que se cuantifica mediante espectrofotometría (Oliver y cols., 1987; Lewisch y Levine, 1995).

2.2.4.2. 2-oxohistidina.

La histidina es uno de los aminoácidos más vulnerables al ataque oxidativo. Uno de los productos de la oxidación de la histidina es la asparagina (Amici y cols., 1989; Stadtman, 1990). Sin embargo ésta no resulta un marcador apropiado debido a que aparece de manera natural en las proteínas, y además se hidroliza a aspartato con facilidad en medio ácido (Uchida y Kawakishi, 1993). La oxidación del carbono 2 del imidazol de la histidina da lugar a la formación de 2-oxohistidina, que se ha empleado como indicador del daño oxidativo a las proteínas (Lewisch y Levine, 1995).

3. Antioxidantes

El organismo posee una serie de sistemas de naturaleza enzimática y no enzimática diseñados para protegerse de la acción de los radicales libres por él generados: se denominan antioxidantes. Halliwell en 1995 definió antioxidante como "cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato" (Sies, 1993; Halliwell y Gutteridge, 1995; Halliwell, 1996).

Pueden actuar de las siguientes formas:

- Previniendo la formación de ERO
- Interceptando el ataque de ERO,
- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas enos reactivas
- Amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de ERO;
- Facilitando la reparación del daño causado por ERO y, por último
- Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.

Bajo el punto de vista de la fisiología celular, los podemos dividir en antioxidantes primarios, secundarios y terciarios.

Los antioxidantes primarios previenen la formación de nuevas especies de radicales libres. Estos antioxidantes actúan por conversión de los radicales libres existentes en moléculas menos dañinas, o impidiendo su formación desde otras moléculas. Dentro de este grupo se incluye a la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, la catalasa y las proteínas ligadoras de metales (ferritina y ceruloplasmina) que limitan la disponibilidad de hierro necesario para la formación del radical OH^\bullet (Gutteridge y Stocks, 1981; Halliwell y Gutteridge, 1989).

Los antioxidantes secundarios son protectores no enzimáticos o captadores de radicales libres que intervienen cuando hay superproducción de radicales libres y los sistemas enzimáticos están desbordados, previniendo así las reacciones en cadena. Se incluye el glutatión, la vitamina E, vitamina C, ácido úrico, bilirrubina y albúmina (Halliwell y Gutteridge, 1990).

Los antioxidantes terciarios reparan biomoléculas dañadas por los radicales libres. Entre ellos se encuentran los sistemas proteolíticos intracelulares, que actúan degradando proteínas dañadas oxidativamente, evitando de este modo su acumulación (Davies, 1987; Pacifi y Davies, 1991). También podemos destacar las enzimas reparadoras de ADN, la metionina sulfóxido reductasa y la fosfolipasa A2 que corta los fosfolípidos oxidados de la membrana (Demple y Halbrook, 1983; Sevanian y Kim, 1985; Dizdaroglu, 1993).

Otra forma de clasificar a los antioxidantes, muy utilizada en la literatura, es desde un punto de vista bioquímico. Así, podríamos clasificarlos en antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos.

3.1. Antioxidantes enzimáticos

3.1.1. Superóxido dismutasa

Bajo este nombre se incluye a una familia de metaloproteínas ampliamente distribuida en la Naturaleza, presente en todas las células que utilizan en su metabolismo el oxígeno, e incluso en algunas bacterias anaeróbicas estrictas y facultativas (Hassan, 1989).

Su actividad fue descrita por primera vez por McCord y Fridovich en 1969 (McCord y Fridovich, 1969). La superóxido dismutasa (SOD) transforma el radical superóxido en peróxido de hidrógeno, constituyendo el primer medio natural de defensa (McCord y cols., 1974; Fridovich, 1978).



Cabe destacar que el radical superóxido es inestable en medio acuoso y dismuta espontáneamente formando H_2O_2 . Sin embargo, la velocidad de dismutación espontánea no enzimática es relativamente baja (a pH fisiológico, está alrededor $2 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$). La catálisis de la reacción de dismutación llevada a cabo por la enzima superóxido dismutasa incrementa esta velocidad del orden de 10.000 veces (Fridovich, 1974).

Hay descritas cuatro formas diferentes de superóxido dismutasas (Fridovich, 1974), según el grupo prostético metálico ligado al enzima.

Tabla 5. Tipos de SOD y localización celular mayoritaria.

ENZIMA	GRUPO PROSTÉTICO	LOCALIZACIÓN CELULAR
Cu,Zn-SOD	Cu,Zn	Citosol Núcleo
Mn-SOD	Mn	Matriz mitocondrial Citosol
Mn-SOD	Mn	Bacterias
Fe-SOD	Fe	Bacterias

3.1.1.1. Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (Cu,Zn-SOD).

La superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (Cu,Zn-SOD) aparece en la mayoría de las células eucariotas. Es una proteína soluble que contiene como cofactores iones de cobre y de zinc. Existe en muchas formas isoméricas que se distinguen por el contenido en iones metálicos (Ischiropoulos, 1990). La más abundante de las formas isoméricas se localiza mayoritariamente en el citosol, y en menor cantidad en el núcleo (ver Tabla 5) (Chang, 1988), aunque también tiene otras localizaciones. Su transcripción se lleva a cabo a partir del ADN nuclear. A escala tisular, esta isoforma se encuentra a elevadas concentraciones en hígado, cerebro y testículos, y en menor proporción en eritrocitos, pulmón y páncreas.

Extracelularmente aparece una isoforma caracterizada por su gran peso molecular (Marklund, 1982). Aunque esta isoforma es detectable en plasma, se localiza principalmente en la matriz extracelular, probablemente para interceptar el

daño causado por el superóxido que liberan neutrófilos y macrófagos al ejercer su función (Fridovich, 1997).

Tabla 6. Diferentes localizaciones celulares de la Cu,Zn-SOD.

LOCALIZACION CELULAR	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
CITOSOL	Bannister y cols., 1987
LISOSOMAS	Geller y Winge, 1982
MITOCONDRIAS	Rabinowitch y cols., 1983.
NÚCLEOS	Yusa y cols., 1984
PEROXISOMAS	Crapo y cols., 1992
EXTRACELULAR	Fridovich, 1995.

3.1.1.2. Superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD).

Hay dos tipos de superóxido dismutasas que contienen manganeso. Una de ellas se encuentra mayoritariamente en la matriz mitocondrial (Weisger y Fridovich, 1973; Kinnula y cols., 1995) y en menor medida en el citosol (McCord y cols., 1977; Fridovich, 1983; Parkery y cols., 1984). Su transcripción tiene lugar a partir del ADN mitocondrial, y su presencia en la mitocondria es de gran importancia puesto que como se ha señalado con anterioridad, la cadena respiratoria mitocondrial es una de las principales fuentes generadoras de radicales libres en las células (Boveris y Chance, 1973), de modo que constituye una de las barreras frente al daño oxidativo originado por los radicales libres.

La otra SOD dependiente de manganeso, se encuentra en bacterias tales como *Escherichia coli* y *Streptococcus mutans* (Vance y cols., 1972).

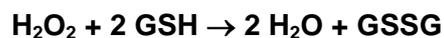
3.1.1.3. Superóxido dismutasas dependientes de otros metales.

Otras superóxido dismutasas contienen hierro, como la que se halla en *Escherichia coli* (Yost y Fridovich, 1973). Más recientemente, se han descubierto algunas superóxido dismutasas denominados atípicas que contienen como cofactores en su grupo prostético diferentes combinaciones de los metales mencionados anteriormente u otros metales (Duke y Salin, 1985; Barkley y Gregory, 1990; Ciriolo y cols., 1994).

3.1.2. Glutación peroxidasa

La glutación peroxidasa (GPx) es también un antioxidante primario. Convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos de lípidos en moléculas inofensivas (Chance y cols., 1979). Hay dos tipos de glutación peroxidasa, y ambas requieren glutación reducido como dador de equivalentes reductores:

- Glutación peroxidasa selenio dependiente: es una proteína tetramérica, con cuatro átomos de selenio, que cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos (Ketterer, 1986). Su centro activo contiene una cisteína en la que el azufre ha sido sustituido por selenio (Parastrom y cols., 1978). Su actividad se ve muy afectada por el contenido en selenio de la dieta (Ketterer, 1986).



- Glutación peroxidasa no selenio dependiente: sólo tiene actividad frente a peróxidos orgánicos (Ketterer, 1986). La mayor parte de la actividad glutación peroxidasa se encuentra en el citosol, aunque también está presente en la matriz mitocondrial (Ketterer, 1986).

3.1.3. Catalasa

La catalasa participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno, dando lugar a agua y a una molécula de oxígeno (Chance y cols., 1979).

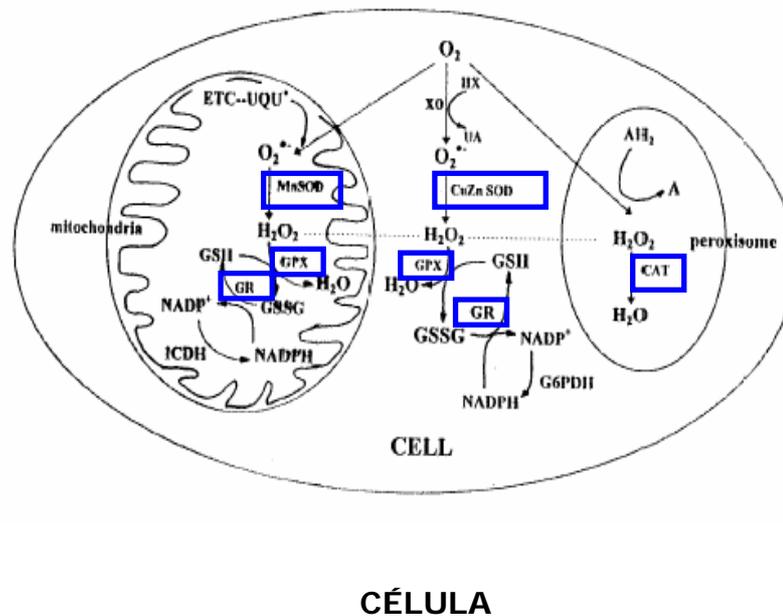


También es capaz de catalizar ciertas reacciones de peroxidación en presencia de H_2O_2 , actuando sobre algunos alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos como sustratos (Aruoma y cols., 1989).



La catalasa se halla principalmente en los peroxisomas (Tolbert y Essner, 1981), si bien en años recientes se ha descrito cierta actividad catalasa también en mitocondrias y citosol (Rodríguez y cols., 2000).

Figura 10. Sistemas antioxidantes celulares.



3.2. Antioxidantes no enzimáticos

3.2.1. El glutatión

Es el tiol no proteico más abundante en las células de mamíferos. Fue descubierto por Hopkins en 1921 y está constituido por 3 aminoácidos: ácido

glutámico, cisteína y glicina. Su estructura le confiere ciertas características que hacen que el glutatión tenga una funcionalidad amplia e importante en la célula.

El glutatión se puede encontrar en 2 formas según su estado de óxido-reducción: como GSH o glutatión reducido, o como GSSG o glutatión oxidado que está compuesto por 2 moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las cisteínas.

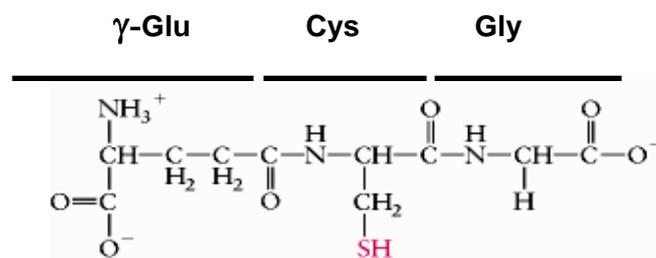
El GSH desempeña numerosas e importantes funciones metabólicas (Viña, 1990), una de ellas es la de proteger a la célula contra los radicales libres, los peróxidos y otros compuestos tóxicos, así como proteger frente al efecto nocivo de las radiaciones.

3.2.1.1. Estructura química del glutatión

Muchas de las funciones fisiológicas que desempeña el GSH se deben a 2 características de su estructura química:

- 1.-El grupo tiol (-SH) de la cisteína, que es el que interviene en las reacciones redox del glutatión.
- 2.-El enlace γ - glutamilo que le hace resistente a la degradación por peptidasas celulares. Este enlace sólo es hidrolizable por la enzima γ -glutamil transpeptidasa situada en la membrana celular (Viña y cols., 1992).

Figura 11. Estructura química del glutatión.



3.2.1.2. Propiedades físico-químicas del glutatión

El glutatión, gracias a su grupo tiol, puede intervenir en reacciones de tipo redox, intercambiando electrones a través del azufre de la cisteína que contiene en

su estructura (Kosower y Kosower, 1978). Así, puede actuar de las siguientes formas:

1.- Reacción directa con un radical libre.

El GSH reacciona con un radical libre formándose el radical GS^{\bullet} . Este radical es estable y persiste hasta encontrar otro radical y formar una molécula de GSSG.



2.- Intercambio tiol – disulfuro



3.- Oxidación dieléctrica.

A través de la formación de un intermediario, seguida por la sustitución de una molécula adecuada. Este mecanismo es uno de los empleados para deplecionar GSH de forma no enzimática:



3.2.1.3. Síntesis y degradación del glutatión: ciclo del γ -glutamilo

El conjunto de las seis reacciones que participan en la síntesis y degradación del glutatión constituye el llamado ciclo del γ -glutamilo (Meister y Anderson, 1983).

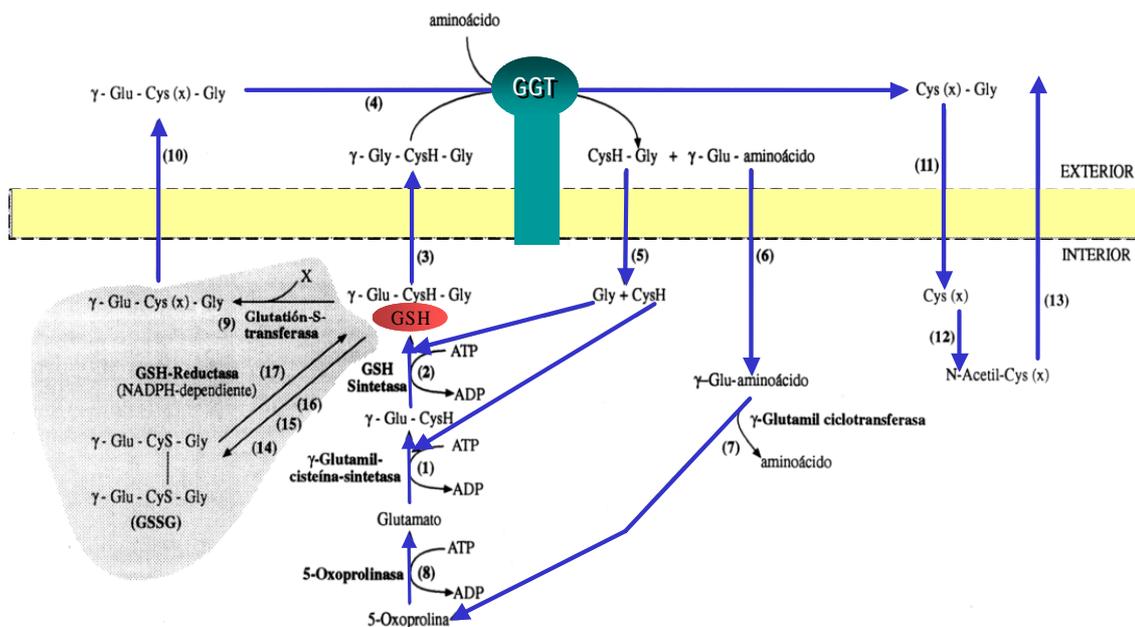
En la síntesis de GSH intervienen dos enzimas. La primera es la γ -glutamilcisteína sintetasa (GCS) (ver Figura 7), que da lugar a la γ -glutamilcisteína a partir de L-glutámico y L-cisteína. En situaciones fisiológicas, el paso limitante para la síntesis de GSH es la disponibilidad de cisteína (Tateishi y cols., 1974; Tateishi y cols., 1977). La síntesis de glutatión está regulada por retroalimentación, ya que el GSH inhibe la GCS (Richman y Meister, 1975). El segundo paso de la síntesis de GSH (ver Figura 16, reacción 2) está catalizado por la glutatión sintetasa (GS), que une una glicina a la γ -glutamil cisteína.

La catabolización del glutatión la inicia la γ -glutamil transpeptidasa (GGT), que cataliza dos tipos de reacciones: a) transpeptidación, en la que la parte γ -

glutamilo se transfiere a un aceptor, que puede ser el mismo GSH; b) hidrólisis, en la que se hidroliza el enlace γ -glutamilo. Los substratos son GSH, GSSG, GSH S-sustituido y otros compuestos del γ -glutamilo (Meister y Anderson, 1983).

La actividad GGT se localiza en la superficie externa de las células (Meister y Anderson, 1983). Cuando el GSH interacciona con la membrana, la GGT forma el γ -glutamil aminoácido, que entra al interior de la célula. La γ -glutamil ciclotransferasa (ver Figura 7, reacción 4) hidroliza el γ -glutamil aminoácido, liberando el aminoácido y 5-oxo-L-prolina (Meister y Anderson, 1983). La oxoprolinasa (ver Figura 7, reacción 7) cataliza la hidrólisis dependiente de ATP de la oxoprolina, liberando glutamato. Una dipeptidasa (ver figura 7, reacción 6) hidroliza la cisteinilglicina formada por la GGT (Meister y Anderson, 1983).

Figura 12. Ciclo del γ -glutamilo.



3.2.1.4. Funciones fisiológicas del GSH

El GSH participa en gran cantidad de procesos fisiológicos:

1. Papel en la síntesis del ADN. En este proceso se requiere la reducción de ribonucleótidos para formar deoxirribonucleótidos, reacción catalizada por la ribonucleótido reductasa. En esta reacción debe intervenir un donante de hidrógeno que puede ser la tiorredoxina, o la glutarredoxina (Holmgren, 1979) dependiente de GSH.

2. Papel protector frente al estrés oxidativo. Dado que el GSH es uno de los antioxidantes principales de la célula, constituye una importante barrera de protección frente al estrés oxidativo (Sies, 1986). El GSH protege a la membrana celular contra el daño oxidativo ya que mantiene el estatus tiólico de la misma (Kosower y Kosower, 1983). El GSH puede excretarse también de las células y actuar como mecanismo de emergencia frente al daño que un exceso de GSSG puede causar, puesto que el GSSG reacciona con los grupos tioles de proteínas formando disulfuros mixtos (Ishikawa y cols., 1989).

3. Papel en la regulación de la síntesis de proteínas. Cuando el GSH se oxida los procesos de iniciación y elongación de la traducción se inhiben (Ochoa, 1983). Cuando el GSSG se reduce la elongación se reanuda y parece que es un aumento en la concentración de GSSG lo que hace que la síntesis proteica se inhiba.

4. Colabora en la detoxificación de xenobióticos (Orrenius y Moldeus, 1984)

5. Contribuye a la captación de aminoácidos en algunos tejidos (Viña y cols., 1989)

6. Constituye un reservorio de cisteína (Tateishi y cols., 1974)

7. Modula actividades enzimáticas (Pajares y cols., 1992a; 1992b)

8. Juega un papel en la homeostasis del calcio (Bellomo y cols., 1982)

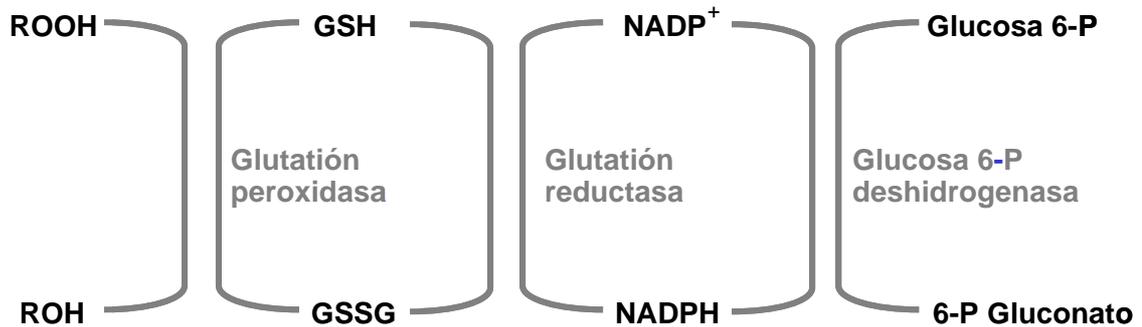
9. Participa en la regulación de la proliferación celular (Terrádez y cols., 1993).

3.2.1.5. Papel antioxidante del glutatión: ciclo redox

El GSH puede reaccionar directamente con los radicales libres, sin intervención enzimática alguna y detoxificarlos, o bien puede reducir los peróxidos formados por medio de la glutatión peroxidasa.

Cuando se da una agresión oxidativa, el GSH se oxida a GSSG por medio de la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa. El GSSG formado es inmediatamente reducido a GSH por medio del enzima glutatión reductasa. La glutatión reductasa requiere NADPH como cofactor, que será suministrado por la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa. Tanto la glutatión peroxidasa como la glutatión reductasa se hallan predominantemente en el citosol, existiendo también cierta actividad en la mitocondria (Orrenius y Sies, 1982).

Figura 13. Ciclo redox del glutatión.



3.2.2. Vitamina C

Se considera uno de los más poderosos y quizá el menos tóxico de los antioxidantes naturales (Bendich y cols., 1986). Es soluble en agua y se encuentra en concentraciones elevadas en muchos tejidos, el plasma contiene alrededor de 60 $\mu\text{mol/L}$. Las plantas y la mayoría de los animales pueden sintetizarla a partir de la glucosa, pero los humanos, otros primates superiores y los cobayas no poseen uno de los enzimas imprescindibles para su síntesis, teniendo que ser incorporada con la dieta.

Cuando reacciona con ERO se oxida a dihidroascorbato que será reciclado a ácido ascórbico por el enzima dihidroascorbato reductasa. Por ello, el dihidroascorbato se encuentra en concentraciones mucho más bajas que el ascorbato.

Esta vitamina es efectiva contra el radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno singlete. En solución acuosa también puede reaccionar con especies de nitrógeno reactivas, previniendo la nitración de moléculas diana.

La vitamina C es una molécula que posee tanto propiedades antioxidantes como prooxidantes, dependiendo de la concentración de hierro tisular (Frei, 1994), aunque no ha podido demostrarse su efecto prooxidante *in vivo*. Cuando la cantidad es baja, ejerce un efecto antioxidante, uniéndose al radical superóxido o hidroxilo y formando radical semihidroascorbato, que posteriormente es reducido por el glutatión. Sin embargo, en condiciones de alta concentración tisular de hierro, el ácido ascórbico es capaz de catalizar la reacción de Fenton y por lo tanto,

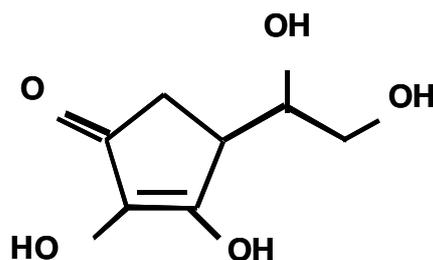
generar ion ferroso, que a su vez facilita la producción de radical hidroxilo mediante la reacción de Haber-Weiss.

Las mayores fuentes de ascorbato en la dieta son las frutas, especialmente los cítricos, el kiwi, las cerezas y el melón. También forma parte de la composición de algunos vegetales como tomates, coliflor, coles de Bruselas, col, brócoli. El contenido de estos vegetales, puede exceder los 100 mg ascorbato / 100 g peso fresco. La eficacia de absorción decrece cuando aumentan estos niveles (Levine y cols., 1996). Se ha demostrado que la biodisponibilidad de la vitamina C es similar tanto en los alimentos naturales, como en los artificiales (Mangels y cols., 1993).

Tras diversos estudios, parece claro que las dosis de vitamina C altas (más de 600 mg/día) son seguras y libres de efectos secundarios (Bendich, 1997). Un hito fundamental para el impulso de la investigación de las funciones de la vitamina C, aparte de prevenir el escorbuto, fue la publicación por Linus Pauling del libro "Vitamin C, the common cold and the flu" (Pauling, 1970). El prestigio universal del autor hizo que se iniciara una nueva era en el estudio del papel de la vitamina C, y de las vitaminas en general. Bendich ha acuñado para esta era el nombre de "más allá de la deficiencia", haciendo hincapié en el hecho de que las vitaminas sirven para algo más que prevenir deficiencias.

Dosis muy superiores a 2 gramos por día, riesgo de diarrea, hinchazón intestinal (Sestili, 1983).

Figura 14. Estructura de la Vitamina C.



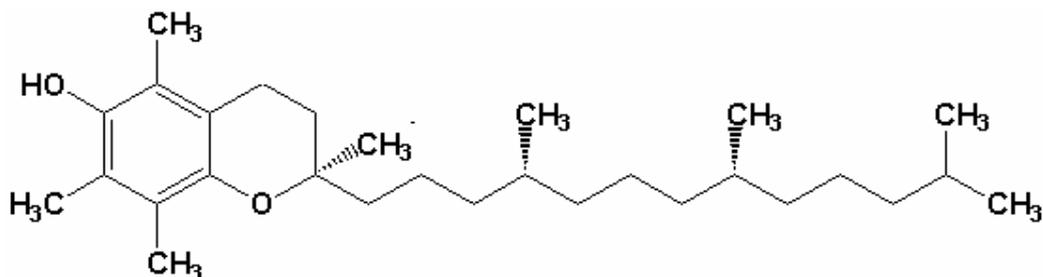
3.2.3. Vitamina E

Bajo esta denominación se incluye una familia de compuestos fenólicos llamados tocoferoles y tocotrienoles. En el organismo existen 4 tipos principales de tocoferoles: alfa, beta, gamma y delta tocoferol. Estos grupos de compuestos

altamente lipofílicos, tienden a concentrarse en las membranas biológicas y en lipoproteínas plasmáticas.

Es probablemente el antioxidante más potente del organismo, en cuanto a su capacidad como bloqueador de la cadena de lipoperoxidación.

Figura 15. Estructura de la Vitamina E.



La vitamina E secuestra radicales peroxil lipídicos dando hidroperóxidos lipídicos y radical tocoperoxilo. Este último puede ser reducido por el ascorbato y el glutatión oxidado a la respectiva quinona.

El alfa-tocoferol es el antioxidante más eficiente de la fase lipídica (Niki, 1987). Contiene grupos metilo adyacentes a los grupos hidroxilo fenólicos y están óptimamente posicionados en las membranas. Los tocoferoles además tienen capacidad de captar energía del oxígeno singlete y de interactuar con peroxinitritos.

Los niveles de vitamina E en plasma en humanos son de alrededor de 22 μ moles/L; se encuentra en tejidos como el hígado, el riñón, tejido adiposo o adrenal.

La dieta humana está compuesta por multitud de alimentos que contienen vitamina E. Las fuentes ricas de vitamina E son los aceites vegetales (girasol, maíz, de soja y de semilla de algodón), y productos hechos a partir de estos aceites como la margarina o la mayonesa. Contribuyen considerablemente a los suplementos en vitamina E el germen de trigo, las nueces y algunos vegetales de hojas verdes (Parker, 1989).

Con respecto a la seguridad toxicológica de la toma oral de vitamina E, ha habido mucha controversia a lo largo de los años. Existen 5 revisiones destacables: Bendich y Machlin, 1987, 1993; Diplock, 1995; Kappus y Diplock, 1992 y Viña y

cols., 1992). El problema en los estudios comparados surge con la confusión en la literatura entre las diferentes formas de vitamina E. Estudios de aspectos convencionales de la toxicidad de la vitamina E en animales han sido realizados por muchos investigadores durante un largo período de tiempo (Levander y cols., 1973; Krasavage y Terharr, 1977; Abdo y cols., 1986). Sin embargo, en humanos son pocos los trabajos realizados con rigor (grupo con un número significativo de pacientes para evaluación estadística, inclusión de grupos placebo, etc.). De las revisiones efectuadas podemos concluir los siguientes puntos:

1. La toxicidad de la vitamina E es muy baja
2. Estudios en animales muestran que la vitamina E no es mutagénica, carcinogénica o teratogénica.
3. En estudios hechos a doble ciego, las dosis orales tienen pocos efectos colaterales, incluso a dosis tan elevadas como 3.2 g/día.
4. Dosis de hasta 1000 mg por día son consideradas enteramente seguras y sin efectos secundarios.
5. En personas con defecto de coagulación sanguínea por deficiencia en vitamina K puede estar contraindicado las altas dosis de vitamina E vía oral.

3.2.4. Carotenoides

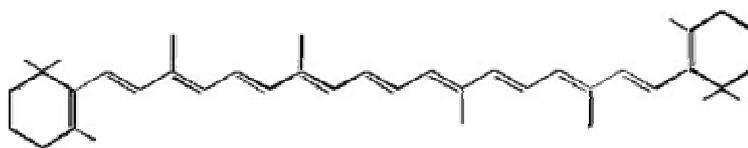
Son colorantes naturales con pronunciada actividad antioxidante (Olson y Krinsky, 1995; Sthal y Sies, 1993). La propiedad química que les da este carácter antioxidante se basa en un extendido sistema de dobles enlaces conjugados. Los principales ERO sobre los que actúan los carotenoides son el oxígeno singlete y los radicales peroxilos (Palozza y Krinsky, 1992). La desactivación del $^1\text{O}_2$ puede ser física o química. La física consiste en una transferencia de energía de activación desde las especies de oxígeno excitadas al carotenoide dando lugar a un carotenoide excitado triplete. La energía de excitación del carotenoide es disipada a través de interacciones vibracionales con el solvente, para recobrar su estado anterior. Así, el carotenoide acaba intacto y listo para otro ciclo de activación. La desactivación química contribuye en un 0.05% del total de los mecanismos de inactivación de los $^1\text{O}_2$ por carotenoides, pero es responsable de la eventual destrucción de la molécula. También se ha descrito su papel en el secuestro de radicales peroxilos por interacción química (Kennedy y Liebler, 1992). Se ha sugerido la formación de un radical caroteno intermediario en este proceso que finalmente da lugar a la destrucción de la molécula.

Al igual que la vitamina E, los carotenoides pertenecen a un conjunto de antioxidantes lipofílicos presentes en lipoproteínas como la LDL o HDL. Su contribución al sistema de defensa antioxidante de las LDL no está todavía clara.

Los carotenoides se pueden encontrar en una gran variedad de frutas y vegetales. Las mayores fuentes son las zanahorias (α -carotenos y β -carotenos), los tomates (licopenos), los cítricos (β -criptoxantina), las espinacas (luteína), o el maíz (ceaxantina) (Mangels y *cols.*, 1993). Los procesos de absorción y transporte de los carotenoides son bastante complejos. Influyen muchos factores como la coingestión con fibra o grasas o el cocinado de los alimentos entre otros (Erdman y *cols.*, 1993).

El suplemento en la dieta de cantidades moderadas de β -carotenos en individuos sanos parece seguro. Esta práctica en grandes fumadores, sin embargo, ha sido puesta en cuestión, debido a que parece que el riesgo de cáncer de pulmón aumenta (Omenn y *cols.*, 1996).

Figura 16. Estructura del β -caroteno.



3.2.5. Flavonoides

Son un gran grupo de antioxidantes polifenólicos que se hallan en muchas frutas, vegetales y bebidas como el te, el vino y la cerveza principalmente como O-glicósidos. Son eficientes antioxidantes capaces de reaccionar con radicales como los radicales peroxilos, el radical hidroxilo, $O_2^{\cdot -}$, formando el radical fenoxi (Rice-Evans y *cols.*, 1995-1996).

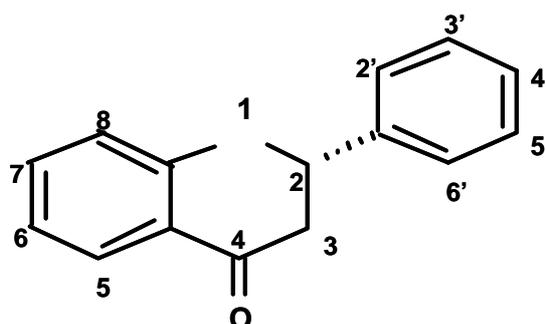
En este grupo se incluyen distintos subgrupos como los flavanoles (catequinas, epicatequinas), flavonoles (quercetina, miricetina, caemferol), flavanonas (naringenina, taxifolina), flavonas (apigenina, hesperetina), isoflavonas (genisteína), o antocianidinas (cianidina, malvidina).

Son muchas las propiedades que se les atribuye a los flavonoides a la hora de interactuar con radicales libres. Estas incluyen la presencia de una estructura

3',4'-hidroxi en el anillo B, la presencia de un doble enlace 2,3 conjugado a un grupo 4-oxo en el anillo C, y la presencia de un grupo 5-hidroxilo en el anillo A con un grupo 3-hidroxilo y una función 4-oxo en el anillo C. Las propiedades antioxidantes de los flavonoides han sido investigadas tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*. Podría mencionarse que, sin embargo, la biodisponibilidad de estos compuestos es bastante pobre. Se conjuga rápidamente en las reacciones de detoxificación de fase II y los niveles de flavonoides libres en plasma humano son bastante bajos. Muchos compuestos fenólicos con actividad antioxidante son derivados del ácido cinámico, como por ejemplo el ácido cafeínico, el ácido clorogénico o el ácido ferúlico (Rice-Evans y Miller., 1996).

Como en el caso de los flavonoides, es poco conocida la absorción en humanos y la distribución por los tejidos de estos compuestos.

Figura 17. Estructura básica de los flavonoides.



3.3. Otras sustancias antioxidantes.

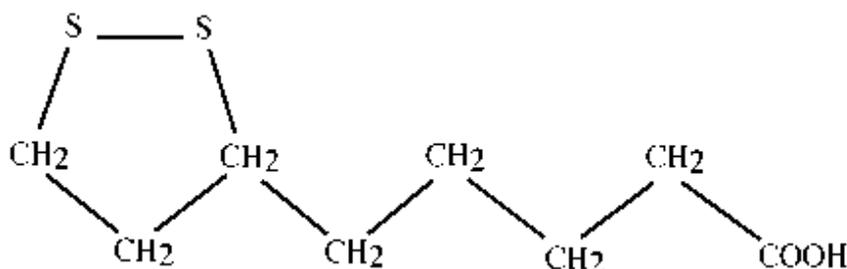
3.3.1. Ácido lipoico.

Es un tiol endógeno que sirve como cofactor de los complejos α -deshidrogenasa. Normalmente el ácido lipoico (AL) está presente en pequeñas cantidades (5-25 nmol/g) en los tejidos animales. El AL puede ser consumido en la dieta y no tiene efectos secundarios conocidos. Tras la suplementación dietética éste se reduce a ácido dihidrolipoico (DHLLA) al que se le reconoce su papel en la regeneración de antioxidantes fisiológicos tales como la vitamina E, ascorbato y GSH (Packer y cols., 1995). La homeostasis del GSH juega un papel central en la defensa frente al estrés oxidativo en los distintos tejidos. Por ello es importante entender como los niveles tisulares de este tiol pueden ser afectados por el AL. Se

ha demostrado que la suplementación con GSH per se no es efectiva en el aumento en los niveles de GSH en tejidos como el hígado y el músculo, los cuales son conocidos por su alta actividad en la síntesis de GSH (Deneke y Fanburg, 1989). La disponibilidad de cisteína, un precursor de la síntesis de glutatión en el interior de la célula, es determinante en los niveles celulares de glutatión (Sen y cols.,1997). Los niveles intracelulares de GSH en la mayoría de las células están determinados por el sistema x_c^- , que modula el importe celular de cistina, y el sistema ASC, un transportador de aminoácidos neutral que media el importe celular de cisteína (Bannai, 1986). La cisteína se autooxida a cistina con mucha rapidez, prácticamente toda la cisteína presente en los sistemas biológicos se oxida a cistina. El ratio cisteína-cistina en plasma es aproximadamente 1:10 en favor de la forma oxidada (Droge y cols.,1992). Distintos compuestos han sido probados para comprobar su eficacia como agentes liberadores de cisteína a las células. Dos agentes clínicamente relevantes pro-GSH han sido especialmente estudiados: N-acetilcisteína (NAC) y AL. El ácido lipoico presenta claras ventajas sobre la NAC ya que el primero puede ser reducido en tejidos humanos a su forma DHLA por enzimas tales como la lipoamida deshidrogenasa, tioredoxin reductasa y glutatión reductasa (Sen y cols., 1997). Sin embargo la cisteína originada por la NAC es oxidada a cistina y no parece que exista un mecanismo por el cual la NAC o la cistina generada por ella pueda ser reciclada de nuevo a su forma reducida. Por esto la NAC sirve como donador de cisteína una única vez, mientras que el AL tiene la habilidad de servir como donador continuo de cisteína. El DHLA, generado dentro de las células por la reducción de AL, suple de cisteína reduciendo la cistina que es muy abundante en el compartimento extracelular. En la reducción de cistina a cisteína el DHLA se oxida a AL. El AL generado como resultado es recogido por la célula en la cual éste es enzimáticamente reducido de nuevo a DHLA. La reducción de AL a DHLA requiere de NADH o NADPH que son suministrados por el metabolismo de la glucosa. El AL, por tanto, utiliza el metabolismo más poderoso de la célula para regenerar de forma continua su forma DHLA.

Por todo ello podemos considerar que el ácido lipoico mantiene de forma continua el aporte de cisteína tanto tiempo como éste es reducido a DHLA por enzimas intracelulares. (Han y cols., 1997)

Figura 18. Estructura química del ácido lipoico.



3.3.2. Alopurinol.

El alopurinol [1H-pirazolo (3,4-d)pirimidina-4-ol] es un análogo estructural de la base púrica natural hipoxantina (peso molecular 136.11) y actúa como un inhibidor de la xantina-oxidasa, la enzima responsable de la conversión de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico el producto final de catabolismo de las purinas. Por tanto se puede considerar que actúa sobre el catabolismo de las purinas sin modificar su biosíntesis. La inhibición de la enzima xantina oxidasa por este fármaco es efectiva tanto *in vivo* como *in vitro* (Elion y cols., 1966). El alopurinol inhibe la xantina oxidasa formando un complejo reversible con el molibdeno e interfiriendo así la interacción de la purinas con la enzima, de forma que no puede realizarse la oxidación de éstas (Massey y cols., 1970).

El paso previo a la inhibición es la metabolización del alopurinol a oxipurinol (aloxantina) para la posterior unión de ésta al sitio activo de la xantina oxidasa (Massey y cols., 1970). Como resultado de la inhibición de la enzima, las concentraciones séricas de hipoxantina y xantina en pacientes que reciben alopurinol para el tratamiento de la hiperuricemia están en el rango de 0,3 a 0,4 mg/dl, cuando los niveles normales de aproximadamente 0,15 mg/dl. Cuando los niveles de urato descienden por debajo de 2 mg/dl por altas dosis de alopurinol, se han descrito niveles de purinas máximos de 0,9 mg/dl. La eliminación renal de la hipoxantina y xantina es, al menos, 10 veces mayor que la del ácido úrico. Es muy poco frecuente la cristaluria por xantinas.

La acción del alopurinol difiere de otros agentes uricosúricos que disminuyen los niveles de ácido úrico en suero aumentando su excreción urinaria. Éste reduce ambos, el ácido úrico en suero y en orina, inhibiendo su formación.

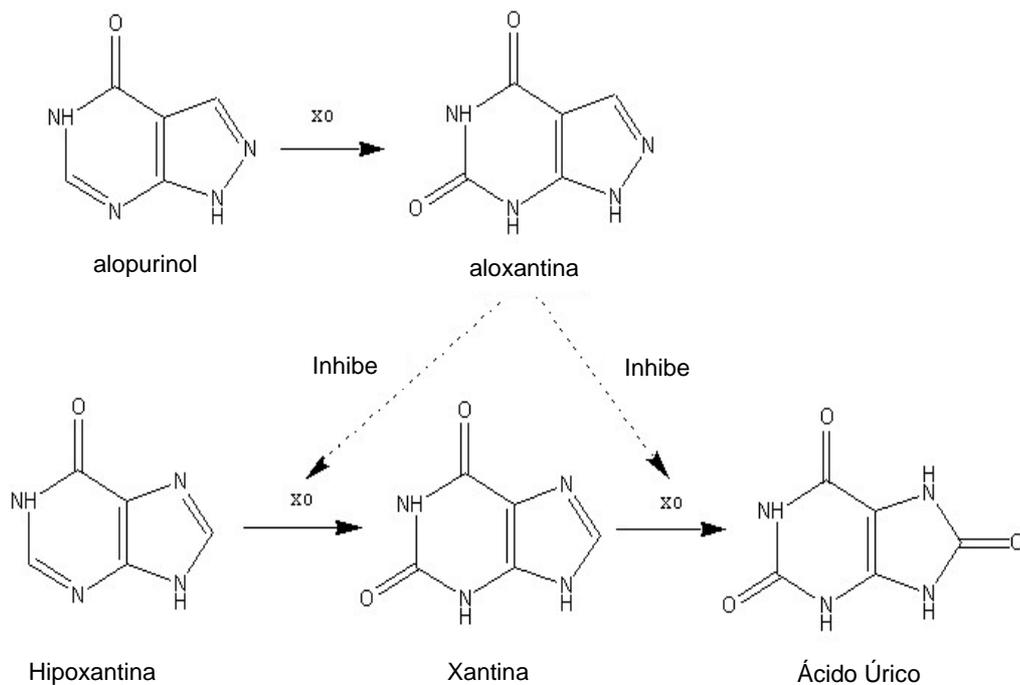
El alopurinol es absorbido por el tracto intestinal en un 90% aproximadamente. Los niveles plasmáticos del alopurinol y oxipurinol presentan un pico a la hora y a las 3 horas, respectivamente. Mientras que la vida media del

alopurinol y oxipurinol, tras la administración oral, es de > 1 y ~ 20 h, respectivamente. Aproximadamente un 20% del alopurinol ingerido se elimina por las heces. La inhibición de la xantina oxidasa tras una sola dosis diaria es eficaz durante un periodo de unas 24 horas (Murrel y Rapeport, 1986)

Las reacciones adversas más frecuentes con el tratamiento con alopurinol son las erupciones en la piel, aunque su incidencia es menor al 1%. También se han observado algunos casos de hepatotoxicidad reversible en los pacientes que tomaban alopurinol.

El alopurinol y su oxipurinol son eliminados por los riñones; por lo tanto, los cambios en la función renal tienen un efecto profundo en la dosificación.

Figura 19. Inhibición de la xantina oxidasa por el alopurinol.



3.3.3. N-acetilcisteína.

La N-acetilcisteína (NAC) no es un antioxidante propiamente dicho. Participa en la síntesis de glutatión (Prescott y cols., 1977) que, como hemos comentado anteriormente, tiene como principal función la protección de los tejidos frente al daño oxidativo (Kosover y Kosover, 1978; Meister y Anderson, 1983; Viña y cols., 1986).

Los niveles de GSH en las células pueden encontrarse disminuidos por una serie de circunstancias tales como el ayuno (Tateishi y cols., 1974), sobredosis de paracetamol (van Bree y cols., 1989) o procesos de envejecimientos (Hazelton y Lang, 1980). La disponibilidad del aminoácido L-cisteína es el factor limitante para la síntesis de GSH (Tateishi y cols., 1974), por tanto, es esencial para restablecer los niveles fisiológicos de GSH suplementar este aminoácido esencial. Sin embargo, la administración directa de L-cisteína puede resultar tóxica debido a su rápida autooxidación durante la cual se generan radicales libres (Viña y cols., 1983). La administración oral de NAC, un precursor del aminoácido, es mucho menos tóxica que la administración directa de L-cisteína, ya que su grado de autooxidación es mucho menor. Esto es debido a que el pH ácido del estómago mantiene la NAC en estado reducido, ésta se absorbe y llega lentamente a la vena porta aumentando la síntesis de GSH en hígado (Estrela y cols., 1983).

La administración de NAC ha demostrado ser efectiva en varios modelos. Su administración por vía oral previene la depleción de GSH inducida por una sobredosis de paracetamol (Estrela y cols., 1983; Smilkstein y cols. 1988), a su vez se ha observado que su administración es efectiva en la prevención del cambio en el estatus redox del glutatión después del ejercicio físico intenso, tanto en ratas como en seres humanos, aumentando de forma eficaz el nivel de GSH en las células (Sastre y cols., 1992). Por otra parte en un estudio realizado en 1994 se observó que la administración de NAC mejoraba las funciones contráctiles del músculo (Reid, 1994). La suplementación, por tanto, con fuentes exógenas tiólicas, se puede considerar que reduce el estrés oxidativo asociado a la práctica de ejercicio físico (Ji y Leewenburg, 1996).

3.3.4. Ácido úrico.

El ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas en el ser humano y otros primates, ya que carecen de la enzima uricasa, la cual hace que continúe la degradación hasta alantoína y urea. Como consecuencia de lo anterior, el ser humano presenta una concentración plasmática de ácido úrico más de 10 veces superior a la encontrada en la mayoría de los mamíferos (Cutler, 1984).

Como comentamos en el apartado 1.3.2.3.2. de la presente tesis, en un artículo reciente de Hellsten y cols. (2001), los autores encontraron un marcado incremento en los niveles de alantoína en músculo tras un ejercicio físico intenso submáximo.

Esta observación sugiere, en primer lugar, que el urato es utilizado como antioxidante en músculo y, en segundo lugar, que se generan radicales libres

durante el ejercicio submáximo ya que, en ausencia de uricasa, son las ERO las responsables de la oxidación del urato a alantoína.

La dieta puede ser una importante fuente de ácido úrico, ya que la ingestión de purinas hace que éstas sean transformadas en ácido úrico por la xantina óxidoreductasa presente en la mucosa intestinal, de forma que las purinas ingeridas no aparecen en la sangre, sino su derivado el ácido úrico (Stone y cols. 1991).

Además, el ácido úrico y el urato se filtran y secretan en la nefrona, pero el 90% normalmente es reabsorbido (Ames y cols., 1981). El ácido úrico, por tanto, no parece ser simplemente un producto de desecho de una vía metabólico, de hecho, se ha correlacionado positivamente su concentración en el plasma de distintas especies con la esperanza de vida (Cutler, 1984).

Desde 1960 se sabe que el ácido úrico es un antioxidante. La concentración plasmática de ácido úrico varía considerablemente de un individuo a otro, pero en promedio es mayor en los hombres que en las mujeres (Gresser y cols. 1991). En relación con otros antioxidantes no enzimáticos, como la vitamina C, la vitamina E y el glutatión, la concentración plasmática de ácido úrico se puede considerar alta (Cutler, 1984).

Algunos autores han estimado que el 30-65 % de la capacidad del plasma para neutralizar radicales peroxilo es debida al ácido úrico (Wayner y cols. 1987), y en cuanto a la capacidad de neutralizar al radical hidroxilo en plasma, se ha estimado que el ácido úrico es responsable del 10 al 15 % (Thomas, 1992).

La mayor concentración de ácido úrico es el interior de la célula endotelial siendo éstas el sitio de mayor producción de ácido úrico en el sistema cardiovascular (Jarasch y cols., 1981). Desde este lugar de producción, el ácido úrico se libera tanto a la sangre como a otros compartimentos extracelulares. Esta es una característica importante que diferencia al ácido úrico del resto de antioxidantes enzimáticos, y es su presencia en todos los compartimentos del líquido extracelular, habiéndose demostrado su presencia, además de en el plasma, en la linfa, el líquido sinovial, el líquido intersticial, fluidos intraoculares, líquido amniótico y secreciones nasales (Peden y cols., 1990).

Además, algunas células son capaces de incorporar a su interior el ácido úrico formado por otras células, por ejemplo, son capaces de hacerlo los eritrocitos (Greger y cols., 1976), los hepatocitos (Giesecke y cols., 1984), y probablemente las células musculares cardíacas (Kolassa y cols., 1970).

El ácido úrico se ha demostrado *in vivo* como un agente antioxidante, aunque en algunos casos sólo en presencia de otros antioxidantes, habiéndose

demostrado su interacción con la vitamina C (Aruoma y Halliwell, 1989), y también habiéndose propuesto que con la oxidación de la vitamina C se previene la oxidación del ácido úrico, efecto análogo al que ocurre con la vitamina C y E respectivamente.

Pero además de todas estas propiedades neutralizadoras de radicales hidroxilo, del oxígeno singlete, de oxidantes oxohemoglobínicos, de radicales hidroperóxidos y del ácido hipocloroso, citados también por Becker (Becker 1993), el ácido úrico es capaz de formar complejos estables en proporción 2:1 con iones férricos, actuando como protector contra las oxidaciones catalizadas por el hierro (Davies y cols. 1986).

Por último, el ácido úrico es capaz de prevenir, por sí solo y a concentraciones fisiológicas, la inactivación de algunas enzimas importantes situadas en el endotelio vascular entre otras localizaciones, las cuales disminuyen su actividad por la oxidación de la propia enzima, como es el caso de la ciclooxigenasa (Deby y cols., 1981), o de la ECA (enzima convertidora de la angiotensina), la cual presenta varios grupos funcionales sensibles a la oxidación en su centro activo, y por tanto inhibiendo la conversión de angiotensina I en angiotensina II, un potente vasoconstrictor (Leipert y cols., 1992).

3.3.5. Glucosa.

La glucosa se comporta como captador de radicales hidroxilo y del radical superóxido, reteniendo a este último e impidiendo de esta forma su acción tóxica sobre otras moléculas (Sagone y cols., 1983). Sin embargo se ha implicado a la hiperglucemia en la producción de radicales libres, tales como el anión superóxido y el radical hidroxilo (Boveris, 1977; Wolff y Dean 1987). La glucosa y otros monosacáridos tienen propiedades reductoras, por lo que la glucosa puede enlazar y reducir el oxígeno molecular, produciendo H_2O_2 y otros radicales libres (Wolff y Dean, 1987). Estos hechos indican la posibilidad de que los radicales libres que se están produciendo continuamente en la mitocondria, en condiciones normales, se produzcan en mayores cantidades, tanto por defectos en el metabolismo de la glucosa, o anomalías en la eliminación de radicales libres en presencia de hiperglucemia (Kashiwagi y cols., 1994). Estos radicales libres directamente pueden causar mutaciones en el ADN mitocondrial, siendo estas mutaciones una consecuencia del estrés oxidativo y no una causa de la intolerancia a la glucosa (Liang y cols., 1997).

3.3.6. Elementos traza.

Se sabe desde hace algún tiempo que las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa requieren elementos traza (Cu, Zn, Mn, Fe, Se, etc.) para su biosíntesis, y que la glutatión reductasa requiere flavín-adenin nucleótido como grupo prostético. Por tanto, la regulación de estas enzimas antioxidantes en respuesta al ejercicio físico intenso o prolongado no es únicamente función de los niveles de estrés oxidativo, sino también de la disponibilidad de estos elementos traza (Harris, 1992). Aunque estos metales y cofactores no se consideren antioxidantes “per se”, se ha observado que tienen un importante papel en la defensa antioxidante celular (Ji, 1993). Se han realizado muchos estudios para observar la adaptación de las enzimas antioxidantes al ejercicio físico en ratas alimentadas con dietas deficientes en selenio (Lang y cols., 1987; Ji y cols., 1988, Ji y Fu, 1992).

Los resultados obtenidos indican que los niveles adecuados de elementos traza son esenciales para la correcta función antioxidante celular y para proteger al organismo frente al aumento del estrés oxidativo que produce el ejercicio físico.

4.- Ejercicio Físico.

4.1. Concepto

Los conceptos de actividad, ejercicio y deporte, aunque relacionados entre sí, describen conceptos diferentes. La actividad física se define como cualquier movimiento corporal producido por los músculos esqueléticos que origine un consumo de energía. En todos los momentos de la vida se efectúa una actividad física.

El ejercicio físico (EF) es una subcategoría de la actividad física, que al ser planificada, estructurada y repetida mantiene o mejora las funciones del organismo. El deporte es el ejercicio físico realizado bajo unas reglas y de forma competitiva.

El EF es aceptado mayoritariamente como factor preventivo para ciertas enfermedades y como potenciador de una mejor calidad y mayor expectativa de vida. La práctica regular de EF se asocia con una disminución de la mortalidad global ajustada por la edad y a un aumento de la esperanza de vida en más de 2 años sobre la media poblacional (Ortega, 1999). Puede aumentar la vida media en roedores en un 9% pero no tiene ningún efecto sobre la vida máxima de los animales (Holloszy, 1998). Reduce el riesgo de desarrollar enfermedad coronaria o

la muerte por ésta (Pate y cols., 1995), de diabetes mellitus tipo 2 (Beaulieu M, 2000), obesidad, hipertensión arterial (Serratosa y Fernández, 1997) y distintos tipos de cáncer (Hoffman-Goetz, 1998; Friedenreich y cols. 1998; McTiernan y cols., 1999), disminuye los síntomas de ansiedad y depresión (Di Lorenzo y cols., 1999) y contribuye a evitar la osteoporosis y a mantener la funcionalidad de las articulaciones (Berard y cols., 1997). Ciertas formas de ejercicio mejoran la función del músculo esquelético (Hayes y Williams, 1996; Dupont-Versteegden y cols., 1994) y sus propiedades tales como las adaptaciones vasculares y el mantenimiento de la masa muscular (Ishihara y cols., 1994; Sexton WL, 1995).

Todos estos beneficios del EF aparecen desde un nivel moderado de actividad (150 Kcal/día o 1.000 Kcal/semana) y se relacionan directamente con la cantidad de ejercicio realizado, lo que permite hacer un balance entre duración e intensidad del ejercicio (Notice to readers publications of surgeon general's report on physical activity and health. MMWR 1996;45:591-592). En principio, se obtiene igual beneficio con intensidades altas durante poco tiempo, que a la inversa. Sin embargo, las actividades de intensidad elevada están asociadas a un mayor riesgo cardiovascular, de lesión músculo-esquelética y de estrés oxidativo.

4.2. Ejercicio físico agotador y fatiga.

Desde un punto de vista fisiológico podemos definir la fatiga como la incapacidad de un organismo para mantener la producción de energía (MacLaren y cols., 1989; Booth, 1991) o como la incapacidad del músculo para mantener una potencia determinada (Edwards, 1981).

Es importante encuadrar la fatiga como un mecanismo de defensa que se activa ante el deterioro de determinadas funciones orgánicas y celulares (hipoxia, alteraciones electrolíticas, alteraciones térmicas, depleción de sustratos metabólicos, etc.) previniendo la aparición de lesiones celulares irreversibles y numerosas lesiones deportivas.

En el campo del entrenamiento deportivo, una incorrecta planificación de las situaciones de fatiga, lleva a graves errores, y a disminuciones grandes del rendimiento. Desde Selye, en los años 50, hasta los metodistas del entrenamiento, se postuló que un estímulo produce un reacción de fatiga y posteriormente una adaptación denominada supercompensación. Esta adaptación al entrenamiento puede demostrarse fisiológicamente, en forma de cambios en distintos parámetros orgánicos, como por ejemplo: el aumento del volumen cardíaco, el aumento de las enzimas aeróbicas y/o anaeróbicas, el aumento de los depósitos de glucógeno

muscular etc. El grado de estas adaptaciones depende de la magnitud del estímulo, del grado de desequilibrio en la homeostasis y de la capacidad de ese organismo para recuperar o incrementar determinadas condiciones orgánicas que permitan una posterior mejora del rendimiento (Selye, 1965).

4.2.1. Clasificación de la fatiga.

Desde el punto de vista del tiempo de aparición existen 4 tipos de fatiga:

1.- Aguda. Aparece durante una sesión de ejercicio, produciendo una disminución del rendimiento o una parada de la actividad.

2.- Subaguda. También llamada sobrecarga. Ocurriría después de uno o varios microciclos relativamente intensos y con pocas sesiones de regeneración. Objetivo supercompensación.

3.- Crónica. Aparecería después de varios microciclos en los que la relación entrenamiento y recuperación se ha desequilibrado ocasionando un cuadro sistémico de fatiga. El Síndrome de sobreentrenamiento puede tener dos expresiones clínicas, una de ellas con una sintomatología ocasionada por un predominio de la actividad del Sistema Nervioso Parasimpático y otra con un predominio del Sistema Nervioso Simpático.

4.- Aguda muscular post-esfuerzo. Generalmente ocurre después de una sesión de entrenamiento que excede el nivel de tolerancia al esfuerzo en el músculo. Está acompañada de una lesión del tejido muscular, afectando únicamente a los músculos implicados en el ejercicio. Este tipo de fatiga puede acompañar a cualquiera de la anteriores.

Desde el punto de vista de su origen existen dos tipos de fatiga (Green, 1997):

1.- Fatiga central. Se habla de este tipo de fatiga cuando la causa está por encima de la placa motora afectando a uno a varias de las estructuras nerviosas involucradas en la producción, mantenimiento y control de la contracción muscular. Así pues, dentro del término de fatiga central se incluyen, todas las situaciones que afecten y puedan comprometer el normal funcionamiento de las neuronas corticales, motoneuronas, ramificaciones nerviosas y botón presináptico de la placa motora y liberación del neurotransmisor.

2.- Fatiga periférica. Se habla de este tipo de fatiga cuando la causa de ésta se sitúa en las estructuras que se encuentran por debajo de la placa motora y que intervienen en la contracción muscular. Por tanto en este tipo de fatiga se puede ver afectada: la membrana presináptica de la placa motora, el sarcolema y los

tubos T, el acople entre los tubos T y el retículo endoplasmático, la afinidad del calcio y la troponina y/o los puentes actina-miosina.

4.2.2. Mecanismos de producción de la fatiga.

Entre los mecanismos responsables de la aparición de la fatiga se encuentran:

4.2.2.1.- Depleción de sustratos.

4.2.2.1.1. ATP y Fosfocreatina (PC)

Los procesos metabólicos energéticos pretenden, en última instancia, la disponibilidad de energía en forma de ATP que permita el trabajo muscular. Esta energía se obtiene de distintos sustratos. La mayor o menor cantidad de depósitos de estos sustratos van a ser factores que condicionarán la aparición de la fatiga, debido a que va a afectar a todos los mecanismos dependientes de energía como son las bombas Na^+/K^+ y Ca^{+2} y los puentes actina y miosina. Dentro del metabolismo energético en primer lugar tenemos los depósitos de PC que van a intentar restaurar los niveles de ATP, lo que ocasiona una disminución de PC muscular. En biopsias musculares se ha demostrado que, durante la ejecución de contracciones máximas repetidas, la fatiga coincide con el agotamiento de la fosfocreatina (Hultman y cols., 1986). Ejercicios intensos muestran una disminución relativamente pequeña de ATP entre un 20 y un 40%. Mientras que pequeños aumentos en el ADP conllevan una activación de la enzima creatinquinasa. La poca relación entre el ATP y la disminución de la actividad de los mecanismos que consumen ATP es debido a que las medidas representan medias celulares y no reflejan puntos concretos en los que las ATPasa consumen el ATP. Posiblemente exista un gran aumento del cociente ADP/ATP en lugares próximos donde se une el ATP. La dificultad para medir concentraciones locales de nucleótidos, permite esta hipótesis de microambientes (Korge y Campbell, 1995). La existencia de estos microambientes donde existen cambios en los nucleótidos pueden condicionar el correcto funcionamiento de las enzimas ATPasa: adenilatokinasa, Ca^{+2} ATPasa, Na/k ATP asa, hexokinasa, creatinquinasa, miosina-ATPasa, glicerolquinasa.

Para retrasar la aparición de la fatiga, el deportista debe controlar la intensidad del esfuerzo mediante un ritmo adecuado que asegure que la PC y el ATP no se agoten prematuramente.

4.2.2.1.2. Glucógeno.

Al igual que con la PC, el ritmo de agotamiento del glucógeno muscular es controlado por la intensidad de la actividad (Costill y cols., 1971). Una actividad prolongada a una intensidad aproximada de un 75% del VO_2 máx. (Consumo máximo O_2) de se asocia con una depleción del glucógeno que culmina con el agotamiento. Los atletas que dependen del metabolismo aeróbico deben oxidar tanto carbohidratos como ácidos grasos con el objetivo de obtener energía a una velocidad suficiente para satisfacer los requerimientos del músculo. El agotamiento aparecerá cuando las reservas de carbohidratos se hayan agotado, siendo el glucógeno muscular, probablemente, la última fuente que se utilice.

Es muy importante conocer el balance entre la utilización de carbohidratos y grasas en los corredores de largas distancias, y no agotar todas las reservas de glucógeno, ya que tener una elevada dependencia de la oxidación de ácidos grasos puede causar problemas al deportista por dos motivos:

1.- La oxidación de ácidos grasos requiere más oxígeno que la del glucógeno para generar una molécula de ATP. Si el oxígeno aportado es limitante, como ocurre en muchas ocasiones, una elevada oxidación de las grasas conduce a una disminución de la actividad. Esta reducción de potencia puede ser la causante del agotamiento (Nwesholme y cols., 1991)

2.- Cuando la velocidad de movilización de los ácidos grasos del tejido adiposo es muy alta se produce un aumento considerable de los niveles plasmáticos de ácidos grasos. Este incremento provoca un desplazamiento del triptófano unido a la albúmina, apareciendo triptófano libre en concentraciones importantes, que influye en los niveles de neurotransmisores en el cerebro (agotamiento central) (Blomstrand y cols., 1988).

Podemos concluir que el agotamiento puede retrasarse aumentando la reserva corporal de glucógeno, especialmente en músculo, mediante una dieta rica en carbohidratos, o aumentando la capacidad de oxidar ácidos grasos, mediante el entrenamiento, ya que éste aumenta la capacidad de la β -oxidación.

4.2.2.1.3. Glucosa.

Durante cortas, pero intensas series de ejercicio, las concentraciones sanguíneas de glucosa aumentan por encima de los niveles pre-ejercicio debido a la estimulación por parte del sistema nervioso autónomo, de la glucogenolisis hepática. La habilidad del hígado para mantener elevados niveles de liberación de

glucosa en el tiempo está limitada por la cantidad de glucógeno almacenado y por las actividades de las enzimas glucogenolíticas y gluconeogénicas. Durante los ejercicios prolongados, la producción de glucosa está limitada por la depleción del glucógeno hepático. Esta es la causa de que la producción de glucosa caiga por debajo de los requerimientos del músculo y otros tejidos importantes como el cerebro. En esta situación, el ejercicio se vuelve subjetivamente más difícil debido a las carencias del sistema nervioso central. Esto supone una dependencia completa de los ácidos grasos como carburantes. La oxidación de los ácidos grasos provoca la formación de acetil-CoA, oxidado en el ciclo de Krebs. La velocidad de este ciclo es controlada en la mitocondria por los niveles de oxalacetato, siendo independiente de la utilización de glucosa o glucógeno por el músculo.

Manteniendo los niveles de glucosa, la movilización de los ácidos grasos es mínima, la producción de oxalacetato se mantiene dentro de unos márgenes, y el rendimiento del ciclo de Krebs es óptimo (Sahlin y cols., 1990). Por otra parte, la presencia de ácidos grasos en plasma supone un aumento del triptófano libre, ya que disminuye la cantidad unida a la albúmina (Blomstrand y cols., 1988). Esto provoca un agotamiento central. El mantenimiento de los niveles de glucosa por encima de los niveles críticos ayuda a prevenir la excesiva movilización de ácidos grasos y de esta manera impide el aumento del triptófano libre.

4.2.2.1.4 Acumulación de hidrogeniones.

Durante los ejercicios de corta duración y alta intensidad el lactato se acumula como resultado del mayor aumento en la producción de ácido láctico con respecto a su aclaramiento (Newsholme, 1979). Existen varios factores responsables del aumento en la concentración de lactato en ejercicios incrementales: la aceleración mediada por hormonas de la glucogenolisis y glucolisis, el reclutamiento de fibras musculares tipo II y la redistribución del flujo sanguíneo desde los tejidos gluconeogénicos encargados del aclaramiento del lactato (hígado, riñón y músculos inactivos) hacia los tejidos glucolíticos encargados de su producción.

Tanto el pH intramuscular como el sanguíneo disminuyen. Estos cambios de pH ocurren a pesar de que parte de los protones producidos se neutralizan intra y extracelularmente por tampones tales como las proteínas intracelulares y el sistema ácido carbónico/bicarbonato. Se piensa que el ión lactato es el responsable del agotamiento, pero no es así; de hecho, el músculo puede seguir contrayéndose potentemente en presencia de una concentración alta de lactato, asumiendo que el

pH se mantiene próximo a 7.0. La acumulación intracelular de protones es la responsable del agotamiento (Hermansen, 1979). Sin embargo no está claro cómo el aumento en la concentración de protones provoca el agotamiento.

Se ha observado que el descenso del pH provoca un aumento de la capacidad del retículo sarcoplasmático para unir Ca^{+2} , por lo que se liberaría menor cantidad del catión en el sarcoplasma, reduciéndose la estimulación del proceso contráctil (Nakamaru y Schwatz, 1972). Parece ser que existe un efecto directo sobre el aparato contráctil, de modo que una caída del pH podría interferir en la interacción de la miosina y la actina (Donaldson y cols., 1978).

Se ha propuesto también que la caída del pH *in vivo* da lugar a una inhibición de la 6 fosfofructoquinasa (se inactiva a pH 6.5) que determina una disminución severa del flujo glucolítico. También limita la liberación de ácidos grasos desde el tejido adiposo y activa la creatinquinasa hacia la producción de ATP. En consecuencia se ha sugerido que la fatiga se debe al agotamiento del ATP muscular, que impide que la ATPasa miofibrilar actúe debido a la falta de sustrato (Newsholme, 1981). Cuando un músculo se depleciona completamente de ATP no puede volver a contraerse. La concentración de ATP nunca baja por debajo del 20% incluso en músculos muy fatigados (Westerblad y Allen, 2002)

Por otra parte la liberación de hidrogeniones a la sangre puede ser responsable de diversos efectos secundarios incluyendo dolor (el descenso del pH estimula receptores de dolor), náuseas y desorientación (Brooks, 1986).

Sin embargo existen distintos tipos de fatiga en los que el ácido láctico no se acumula. De hecho en artículos muy recientes en los que se ha examinado el efecto de la acidosis a temperatura corporal y no a temperatura ambiente, los efectos de inhibición de la fuerza muscular por el lactato fueron mínimos. Por tanto esta teoría empieza a perder fuerza (Nielsen y cols., 2001; Westerblad y Allen, 2002).

4.2.2.1.5. Acumulación de fósforo inorgánico.

El fósforo procedente de la hidrólisis de PC limita la producción de fuerza por unirse a la cabeza de la miosina y por un efecto inhibitorio sobre la Ca^{+2} -ATPasa (Mc Cully y cols., 1988).

4.2.2.1.6. Acumulación de amoníaco.

El ejercicio intenso genera una alta producción de adenosín monofosfato (AMP) que se deamina a inosina monofosfato (IMP) y por medio del ciclo de las purinas se obtiene como producto de deshecho NH_3 . Los efectos de este metabolito van a producirse a distintos niveles (Banister y Cameron, 1990):

- 1.- Reduce el número de fibras activas por limitar la función de la membrana.
- 2.- Aumenta la función de la fosfofructokinasa.
- 3.- Inhibe el ciclo de Krebs.
- 4.- Inhibe la gluconeogénesis.
- 5.- Inhibe la oxidación mitocondrial.
- 6.- Tiene un efecto depresor central a nivel neuronal. Se ha sugerido que el pH declina secundariamente a la producción de NH_3 .

4.2.2.1.7. Alteración en la captación de aminoácidos ramificados.

Se ha sugerido que la alteración en aminoácidos (AA) específicos, inducida por el ejercicio, está asociada a la fatiga crónica e inmunosupresión. Los aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina, valina), aromáticos (tirosina, fenilalanina y triptófano) y glutamina desempeñan un rol importante en las respuestas metabólicas, fisiológicas y psicológicas al ejercicio (Gibala, 2001).

Durante el ejercicio prolongado, los AAR (leucina, isoleucina, valina) y la glutamina son captados en mayor medida por el músculo que por el hígado con el objeto de contribuir al metabolismo oxidativo. La fuente de estos AA para el metabolismo oxidativo muscular en el ejercicio es el pool de AA del plasma, que es restituido a través del catabolismo de las proteínas globales del cuerpo. Sin embargo, dado que la oxidación de AAR y de glutamina en el músculo puede exceder la disponibilidad de los mismos, estos AA pueden declinar durante ejercicios prolongados. En los esfuerzos de ejercicios, ya sean de aceleración a alta intensidad o prolongados de resistencia, los niveles plasmáticos de AAR y glutamina se reducen, mientras se incrementan los niveles de triptófano.

Dichas alteraciones son la base de la hipótesis de la fatiga central. Esto se explica debido a que el triptófano libre y los AAR compiten por entrar al cerebro por la vía del mismo transportador de AA. Entonces una disminución en el nivel de AAR o un aumento del triptófano incrementa el cociente $L_{\text{trip}}/\text{AAR}$, facilitando la entrada del primero, que promueve la formación del neurotransmisor 5-hidroxitriptamina (5-

HT) o serotonina. La síntesis incrementada de este neurotransmisor deprime la excitabilidad de la neurona, altera la función autonómica y endocrina y suprime el apetito. Los incrementos de serotonina inducidos por el ejercicio, afectan al cansancio, percepción psicológica de la fatiga, producción de potencia muscular y la regulación hormonal durante el ejercicio (Weicker y Struder, 2001). Esto puede explicar muchos de los signos y síntomas del síndrome del sobreentrenamiento, como la hipotensión postural, taquicardia, anemia, amenorrea, inmunosupresión, supresión del apetito, depresión, pérdida de peso. A medida que disminuye la disponibilidad de carbohidratos durante el ejercicio prolongado, o si el ejercicio fue iniciado con baja disponibilidad de glucógeno, la tasa de oxidación de AAR se incrementa, lo que resulta en una declinación gradual de los nivel de dichos AA en plasma, con el consecuente incremento del cociente Ltrip/AAR resultante en una síntesis aumentada de serotonina en el cerebro, asociada a la fatiga. (Newsholme y cols., 1991; Pedersen y cols., 1997).

4.2.2.1.8. Alteraciones hidroelectrolíticas.

En pruebas de larga duración o en condiciones climáticas de alta temperatura y/o húmeda, el organismo se puede ver comprometido debido a la pérdida de agua ocasionando una disminución del volumen plasmático y la pérdida de iones que alterará el potencial de membrana y la transmisión del impulso nervioso, con lo que se afectará negativamente la producción o el mantenimiento del trabajo físico y por tanto, será un factor que acelerará la fatiga (Dennis y cols., 1997).

4.2.2.1.9. Temperatura.

En situaciones de calor, la capacidad de trabajo, en ejercicios de resistencia, está disminuida por la aparición de fatiga prematura (Nielsen y cols., 2001). El aumento de la temperatura central a 40° C coincide con la imposibilidad de mantener el ejercicio. Todo ello es debido a los efectos que el calor ocasiona tanto a nivel periférico (aumento del flujo sanguíneo cutáneo, reducción en el flujo sanguíneo muscular), como a nivel central (alteración de los centros motores por aumento de la temperatura y disminución de la motivación para el ejercicio). La hipertermia inducida por el ejercicio deteriora el metabolismo muscular. Así, produce un aumento de la acumulación de lactato en el músculo y una depleción de glucógeno rápida. Asimismo mismo, la disminución de la concentración de fosfatos

de alta energía a altas temperaturas ocasiona una menor capacidad de trabajo muscular y una aparición precoz de la fatiga (Kozlowski y cols., 1985).

4.2.2.1.10. Radicales libres.

En la actualidad cada vez son más los trabajos en los que se relaciona la fatiga con el estrés oxidativo muscular. Shindoh y cols. (1990) demostraron que el tratamiento con NAC disminuía la fatiga durante las contracciones isométricas en diafragma de conejos. Un año más tarde, Barclay en 1996 publicó un trabajo en el que mostró una disminución de la fatiga en sóleo de ratón sometido a contracciones isométricas, al tratar a los animales con alopurinol. El grupo de Reid en 1992 consiguió inhibir la fatiga, *in vitro*, en diafragma, al tratarlo con enzimas antioxidantes (SOD y catalasa). Dos años más tarde (Reid y cols., 1994) también publicaron un efecto anti-fatiga de la NAC, en este caso, en humanos.

4.2.2.1.11. Alteración en la homeostasis del Calcio.

La alteración en la homeostasis del Ca^{+2} se considera un paso clave en el proceso degenerativo asociado al daño muscular inducido por el ejercicio físico (McArdle y cols., 1992).

Como podemos observar en la tabla siguiente el Ca^{+2} juega un papel importante en la fatiga muscular en distintos tipos de ejercicio (Allen y Westerblad, 2001)

Tabla 7. Alteración en la homeostasis del calcio y su efecto sobre la fatiga.

PRUEBA	Fatiga	Efecto
100 m sprint	Liberación de iones fosfato por degradación del CP	- Disminuye la sensibilidad al Ca^{+2} - Disminuye la habilidad de las proteínas contráctiles para producir fuerza.
Carrera de 5 Km	Disminución de la liberación de Ca^{+2} por el retículo sarcoplásmico.	Entrada de fosfato en el retículo sarcoplásmico procedente del plasma. Aumenta la concentración de Ca^{+2} y fosfato por encima del límite de solubilidad y este último precipita
Larga distancia	Depleción de los depósitos de glucógeno muscular	Disminución de la liberación de Ca^{+2}
Contracciones musculares mantenidas	Cambios en la distribución de iones alrededor de la membrana celular (acumulación extracelular de potasio)	Disminución de los niveles de Ca^{+2} y de la activación de la contracción (Westerblad y cols., 1990)

4.3. Radicales libres y ejercicio.

El ejercicio físico regular tiene una gran cantidad de efectos beneficiosos, comentados en el apartado anterior. Por otra parte, el ejercicio físico agotador en sujetos no entrenados, puede generar estrés oxidativo. En 1954, Commoner y cols. utilizando la resonancia paramagnética de electrones detectaron radicales libres en músculo esquelético (Commoner y cols., 1954). Desde entonces se ha despertado un gran interés en el papel que las ERO y ERN juegan en la regulación de la función muscular y del daño asociado al ejercicio físico.

4.3.1. Radicales libres y ejercicio físico agotador.

El ejercicio físico puede participar en el desequilibrio entre agentes prooxidantes y antioxidantes.

A principios de los años 50, Commoner y cols. (1954) fueron los primeros en detectar radicales libres en el músculo esquelético. En 1978 Dillard y cols., estudiaron el efecto del ejercicio físico sobre el daño oxidativo tisular. Este grupo comprobó que en humanos el ejercicio físico intenso aumentaba el contenido de pentano (producto de lipoperoxidación) en aire expirado. Cuatro años más tarde el grupo de Kelvin Davies en California detectó una señal RPE en homogenados de músculo gastrocnemio de rata. Ellos observaron que el ejercicio hasta el agotamiento en tapiz rodante doblaba la señal RPE (Davies y cols., 1982). Las medidas fueron también hechas en animales que habían sido ejercitados únicamente durante la mitad del tiempo necesario para llevarlos al agotamiento; la señal RPE obtenida de los músculos fue la intermedia entre el grupo ejercitado hasta el agotamiento y el grupo reposo. En 1985, en la Universidad de Liverpool, el grupo de Jackson midió señales RPE en músculo congelado, de la pierna, de ratones y ratas y en músculo abdominal de humanos. Detectaron un 70% de aumento en la señal RPE en el gastrocnemio de los animales que habían sido estimulados eléctricamente durante 30 minutos con contracciones repetitivas. Este régimen de contracciones indujo daño en la membrana de las células musculares medido por la actividad en plasma de la enzima creatinquinasa (Jackson y cols., 1985).

Estas publicaciones promovieron una serie de trabajos que intentaron clarificar si los radicales libres podían ser responsables del daño muscular que se observa después del ejercicio físico intenso. Desde entonces son muchos los artículos en los que se recoge un incremento en la producción de radicales libres

durante el ejercicio. Éste se manifiesta en un daño oxidativo a distintos niveles: músculo esquelético, cardíaco, hígado y sangre (Jenkins, 1988; Sjodin y cols., 1990; McArdle y cols. 1995; McArdle y cols. 1999). Uno de los marcadores de estrés oxidativo más utilizados ha sido el cociente GSSG/GSH, cuyo aumento se ha constatado tanto en músculo esquelético (Sen y cols. 1994) como en sangre y no sólo en animales, sino también en humanos (Duthie y cols., 1990; Sastre y cols., 1992; Sen y cols., 1994).

Con respecto a la peroxidación lipídica, los estudios realizados indican que ésta aumenta en ejercicios tanto aeróbicos como anaeróbicos (Alessio y cols., 1988).

El primer trabajo que demostró que las ratas sometidas a ejercicio físico agotador acumulaban mayores niveles de grupos carbonilo en las proteínas se publicó en 1992 (Reznick y cols., 1992). Otros autores han corroborado dicha afirmación (Radak y cols., 1998). Este efecto disminuía si varias semanas antes de la realización del ejercicio se les alimentaba con altas dosis de vitamina E. Además, se ha demostrado que la actividad del complejo proteasómico aumenta con el entrenamiento, lo cual es interpretado como efecto beneficioso ya que mejora la capacidad del músculo de eliminar las proteínas dañadas por agentes oxidantes producidos por el ejercicio físico (Radak y cols. 1999; Radak y cols., 2000) (Ver apartado 4.3.5.)

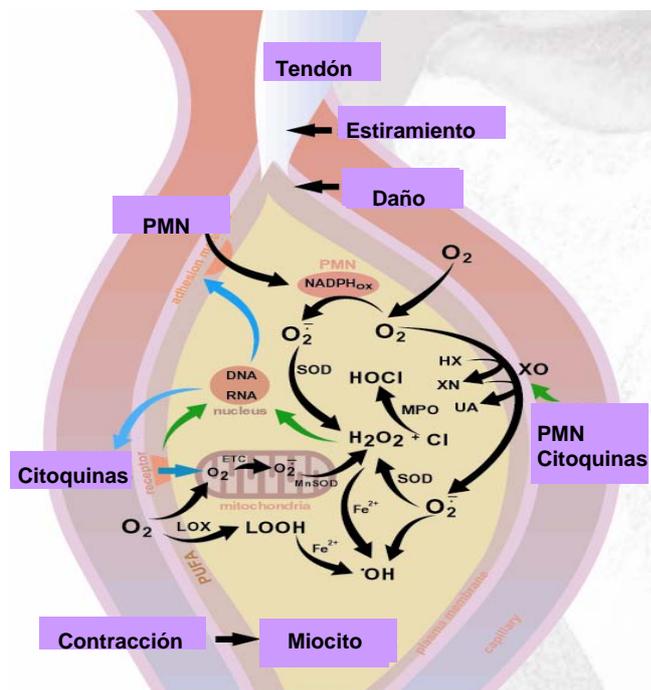
Los radicales libres afectan también al ADN, y el ejercicio físico agudo aumenta el daño al ADN, tal como se evidencia por el aumento de 8oxodG (Radak y cols., 1999; Okamura y cols., 1997). Sin embargo, en seres humanos, el entrenamiento previene dicho aumento (Radak y cols., 2000).

Desde un principio, los autores han manifestado un gran interés por la administración de antioxidantes como intervención terapéutica para contrarrestar el daño causado por los radicales libres producidos durante el ejercicio (Ji y cols., 1988; Reid y cols., 1994). Hay una gran cantidad de datos, a menudo conflictivos, sobre la producción de especies oxidantes durante el ejercicio, sus efectos sobre los sistemas antioxidantes celulares y sobre los componentes celulares, los efectos del entrenamiento sobre los sistemas antioxidantes celulares y los efectos de la manipulación con antioxidantes sobre el desarrollo del ejercicio y el daño inducido por el mismo (Ver apartado 4.3.3.)

4.3.2. Posibles mecanismos de generación de radicales libres durante el ejercicio.

Las divergencias en la regulación y distribución de las ERO han llevado a los investigadores a la conclusión de que no existe una única fuente de generación de RL en el ejercicio físico (Ver Figura 20).

Figura 20. Posibles fuentes de generación de radicales libres en el músculo esquelético.



4.3.2.1. La mitocondria

El 90 % del oxígeno utilizado por la célula se consume en la cadena de transporte electrónico, actuando éste como aceptor de electrones en el proceso de respiración mitocondrial (Chance y cols., 1979; Shigenaga y cols., 1994). De él, un 2-5% sufre una reducción, dando lugar al radical superóxido. Una segunda reducción de este superóxido da lugar a la formación de peróxido de hidrógeno, el cual es liberado por la mitocondria (Boveris y Chance 1973). Para evitar el daño oxidativo, la mitocondria está dotada de una enzima mitocondrial específica, la superóxido dismutasa que previene el daño que podría producir el radical

superóxido. Asimismo, también se ha evidenciado la presencia de radical hidroxilo en la mitocondria de músculo esquelético ejercitado, el cual parece estar relacionado con la tensión desarrollada por el músculo (Barclay y cols., 1991).

Durante el ejercicio físico el consumo de oxígeno por parte del músculo puede aumentar más de 100 veces (Tonkonogi y cols., 2002) y el consumo de oxígeno del organismo entero puede aumentar 20 veces (Meydani y cols., 1993). Este hecho, junto con la observación de que el ejercicio físico se asocia a un aumento de la producción de radicales libres, hizo pensar que éstos provenían de la cadena de transporte electrónico de la mitocondria. Sin embargo, Chance y cols. (1979) demostraron que la formación de radicales libres por la mitocondria cuando ésta está en estado 3, es decir, cuando está consumiendo oxígeno activamente (hay ADP), es insignificante, y más tarde Papa y cols. (1997) dieron una explicación molecular a este hecho. Otros autores no han encontrado evidencia de que el aumento de la producción de radicales libres en ejercicio pliométrico provenga de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (McArdle y cols. 1999).

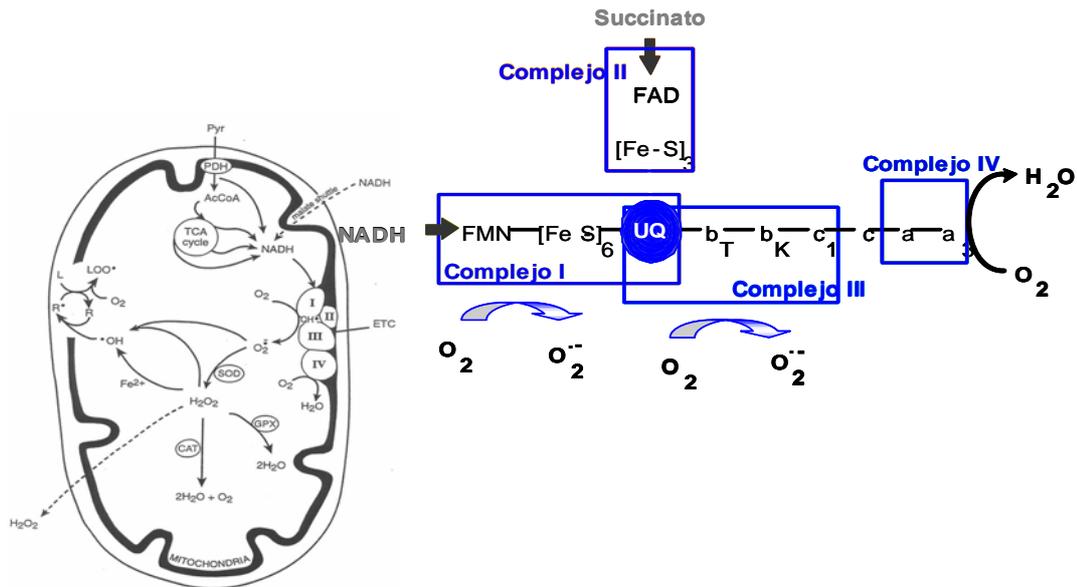
En cuanto al efecto del ejercicio sobre la función mitocondrial, los resultados son controvertidos. En estudios realizados en animales se ha propuesto que la función mitocondrial se ve afectada si el ejercicio realizado es de alta intensidad (Willis y Jackman, 1994). Estudios morfológicos demuestran cambios en la ultraestructura mitocondrial tras realizar ejercicio de alta intensidad (Schmid y cols., 1983). Estos cambios han sido interpretados como adaptaciones normales al aumento de la demanda energética o como un tipo de daño mitocondrial. Otros autores no han encontrado evidencia de que la función mitocondrial se vea afectada por el ejercicio prolongado o de alta intensidad (Madsen y cols., 1996; Tonkonogi y Sahlin, 1999; Viña y cols., 2000; Heunks y cols., 1999), o por el ejercicio excéntrico (Walsh y cols., 2001) y otros han visto que la función mitocondrial aumenta tras ejercicio intermitente (Tonkonogi y Sahlin, 1999) y tras ejercicio prolongado a moderada intensidad (Tonkonogi y cols., 1998).

Por otra parte, recientemente, se ha apuntado hacia la fosfolipasa A₂ (PLA₂) como una de las fuentes adicionales de producción de radical superóxido en el músculo esquelético. Es importante señalar que su localización no es exclusiva de la mitocondria sino que también se encuentra en sarcolema. La PLA₂ se ha relacionado con el aumento de la cantidad de RL intracelular durante contracciones musculares continuas (Nethery y cols., 1999) y depende de la entrada de Ca⁺² extracelular por canales tipo L (Supinski y cols., 1998). Las mitocondrias de animales control liberan peróxido de hidrógeno; esta señal es estimulada por el Ca⁺² y el AMP y disminuida por inhibidores del PLA₂. Estas observaciones señalan

a la mitocondria como una de las fuentes principales de generación de RL en el músculo esquelético e identifican a PLA₂ como regulador de la producción de RL.

Estos resultados coinciden con los publicados por otro grupo que también apuntó a la mitocondria como principal fuente de RL en células musculares estimuladas con TNF- α (Li y cols., 1999).

Figura 21. Producción de radicales libres por la mitocondria en el ejercicio físico.

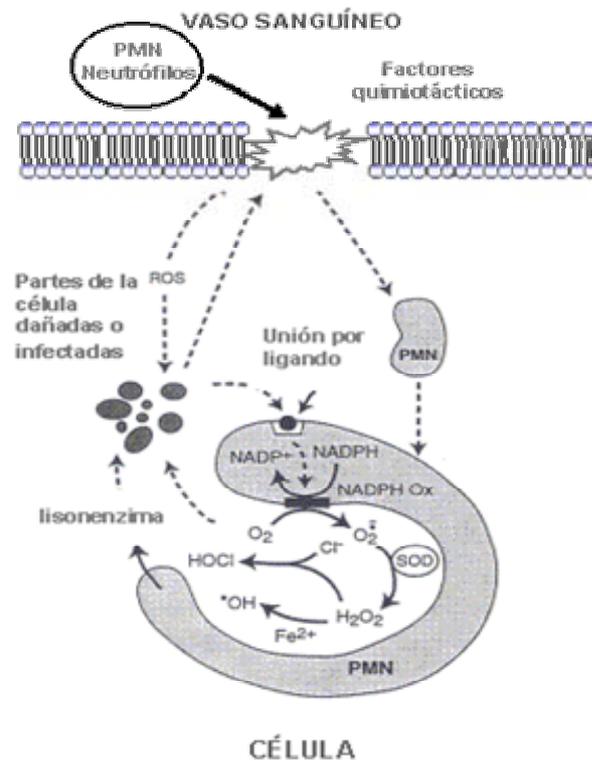


4.3.2.2. Células fagocíticas.

Las células sanguíneas blancas con función fagocítica producen grandes cantidades de oxidantes, generando especies reactivas que eliminan los agentes patógenos. Los neutrófilos pueden infiltrarse en el tejido muscular dañado tras un ejercicio agotador o excéntrico. El daño muscular inducido por el ejercicio físico puede desatar el proceso inflamatorio. Pocas horas después de la realización del ejercicio (1-6h) aumenta la cantidad de neutrófilos en el tejido muscular dañado (Orimo y cols., 1991). Este incremento está facilitado por moléculas de adhesión y citoquinas (TNF α , IL-1, IL-6). Son varios los estudios en los que se aportan evidencias de la implicación de los radicales libres, generados por neutrófilos, en el daño muscular (Crinnion y cols., 1996). Por otra parte, se ha demostrado que el pretratamiento con SOD minimiza el daño muscular asociado al ejercicio físico excéntrico en animales viejos. Este efecto es debido a la atenuación de la señal quimiotáctica para la infiltración neutrofílica del tejido dañado (Zerba y cols., 1990).

Los neutrófilos activados utilizan la NAD(P)H oxidasa asociada a la membrana para generar radical superóxido, el cual puede reaccionar directamente con componentes diana o dismutarse a peróxido de hidrógeno. El peróxido se convierte en ácido hipocloroso (HOCl) por la mieloperoxidasa, una hemoproteína secretada por neutrófilos y monocitos. HOCl es un mediador inflamatorio y un compuesto con gran poder oxidante que genera otros metabolitos reactivos como el cloro nitrilo (NO_2Cl) en presencia de nitrito (Eiserich y cols., 1998). Además los neutrófilos activados pueden utilizar la mioleperoxidasa y el peróxido de hidrógeno para convertir el nitrito en radical dióxido de nitrógeno (NO_2^*) contribuyendo a la formación de compuestos potencialmente dañinos (Eiserich y cols., 1998).

Figura 22. Producción de radicales libres por las células fagocíticas.



4.3.2.3. Xantina oxidasa.

Pese a que varios grupos de investigación, como hemos comentado en el apartado 4.3.2.1., han señalado a la mitocondria como principal fuente generadora de ERO en el ejercicio, en estas observaciones yace un problema conceptual. El radical superóxido producido por los músculos en contracción puede ser detectado en el espacio extracelular (Reid y cols., 1992; Zuo y cols., 2000) y en el

compartimento vascular (Lee y Okabe, 1995; Stofan y cols., 2000). El anión superóxido generado en la mitocondria es muy poco probable que pueda ser medido fuera de la célula. Esto supondría que especies reactivas y cargadas eléctricamente, escapasen a los sistemas antioxidantes en la matriz mitocondrial y difundiesen a través de la membrana mitocondrial interna y externa, citosol y sarcolema sin implicarse en ninguna reacción química. La difusión a través del endotelio capilar en el compartimento vascular todavía parece menos probable (Reid, 2001). La xantina oxidasa representa una fuente alternativa de ERO con soporte experimental. En músculo esquelético, la xantina oxidasa se localiza principalmente en el endotelio vascular (Linder y cols., 1999). La administración de inhibidores de la enzima disminuye la liberación de radical superóxido en el espacio vascular en los músculos en contracción (Stofan y cols., 2000) y parcialmente inhibe la fatiga *in vivo* (Barclay y Hansel, 1991). En oposición a lo que ocurre con la mitocondria que genera RL en un estado basal, las ERO derivadas de la xantina oxidasa cobran importancia en cuatro procesos: en la respuesta inflamatoria al ejercicio físico excéntrico, en el ejercicio físico de alta intensidad, en el ejercicio prolongado (Hellsten y cols., 1997) o en el daño causado por los procesos de isquemia-reperfusión (Kadambi y Skalak, 2000). Se han encontrado niveles más elevados de mRNA para XDH/XO en músculos dañados frente a controles, acompañados con un aumento de la actividad XDH/XO (Hellsten-Westing, resultados no publicados).

La xantina oxidasa fue inicialmente identificada como una fuente potencial de radicales libres en el citosol de la célula muscular (Laughlin y cols., 1990; Apple y cols., 1991). Sin embargo, estudios posteriores utilizando anticuerpos monoclonales para la XDH/XO revelan inmunoreactividad en las células del músculo liso de la pared de los vasos a la vez que en células endoteliales (Hellsten-Westing, 1993) y descartan su presencia en el interior de la célula muscular.

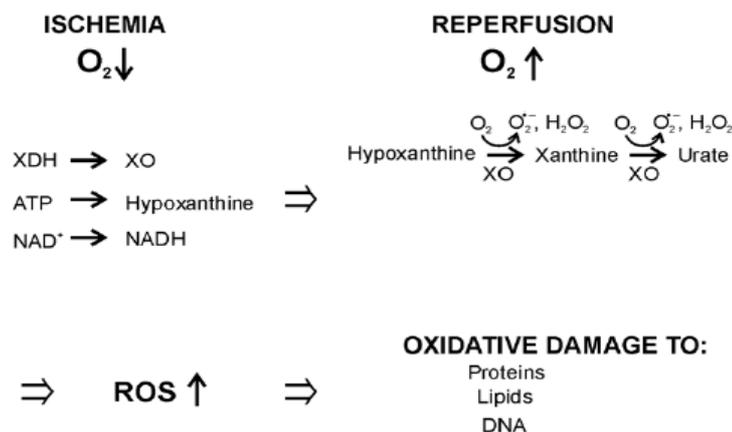
La hipoxantina se forma en el músculo durante el ejercicio físico intenso y existe un incremento marcado de esta purina del músculo a la sangre (Sahlin y cols., 1991; Bangsbo y cols., 1992). La cantidad de hipoxantina que se acumula en sangre depende principalmente de la intensidad del ejercicio. Los niveles más elevados en plasma se han encontrado tras el ejercicio físico agotador (Hellsten-Westing y cols., 1991). La formación de hipoxantina parece estar asociada con la acumulación de IMP en el músculo, lo que a su vez está relacionado con la intensidad del ejercicio y con su duración (Sahlin y cols., 1989). En estos últimos trabajos se sugiere que los nucleótidos son degradados cuando la resíntesis del ATP está limitada debido a los bajos niveles de glucógeno muscular.

La inosina como la hipoxantina son muy permeables y atraviesan las membranas con gran facilidad. Los niveles de hipoxantina del plasma pueden servir de sustrato para la XOR en la pared de los vasos de los distintos órganos. Considerando la localización de la XOR, la formación de xantina y ácido úrico debe suceder tras la salida de la hipoxantina de la célula muscular y cuando ésta alcanza la pared del vaso sanguíneo del mismo músculo o de cualquier otro tejido vía sanguínea.

Con respecto al ácido úrico, las observaciones publicadas sobre la ausencia significativa de liberación del ácido úrico por el músculo (Sahlin y cols., 1991) pueden ser el resultado de una baja sensibilidad en los métodos de detección (Hellsten, 1994). En ratas sí que se ha encontrado acumulación de ácido úrico tras estimulación eléctrica (Arabadjis y cols., 1993). Existe una correlación lineal entre el pico de hipoxantina y el de ácido úrico en plasma tras un ejercicio físico agotador (Hellsten-Westing y cols., 1994). Esta observación indica que la concentración plasmática de hipoxantina es importante en el flujo de la vía XDH/XO, ya que un elevado nivel de hipoxantina en plasma supondría un aumento en la producción de radical superóxido en el caso en el que la conversión a XO hubiese sucedido.

En 1981 Granger y cols. demostraron que el tratamiento del intestino de felino con superóxido dismutasa previo al proceso de isquemia atenuaba el daño durante la subsiguiente reperfusión, lo que apuntaba hacia el radical superóxido como responsable del daño tisular. Estos autores propusieron que la fase de isquemia producía una conversión de las XDH a XO y una degradación de los nucleótidos de adenina a hipoxantina. De esta forma con la re-introducción del oxígeno molecular durante la reperfusión, una considerable cantidad de radical superóxido, podría ser generada en la reacción catalizada por la XO (Ver Figura 24).

Figura 23. XOR en el daño asociado a los procesos de isquemia-reperfusión.



Tras esta observación, se publicaron una gran cantidad de estudios sobre la conversión de la forma deshidrogenasa a la oxidasa. Se ha estudiado una gran variedad de tejidos: pulmón (Waintrub y cols., 1990), hígado y riñón (McKelvey y cols., 1988), corazón y músculo esquelético (Charlat y cols., 1987). Los estudios muestran resultados contradictorios ya que la magnitud de la conversión parece variar dependiendo del tejido y de la especie estudiada (Downey y cols., 1988).

Existen 2 vías por las que la XO puede estar implicada en el daño muscular inducido por el ejercicio físico. La XO podría iniciar el daño oxidando los lípidos de la membrana celular, con la consiguiente salida del contenido citosólico, pérdida de la viabilidad celular y necrosis tisular. Esta hipótesis tendría como requisito que el ejercicio indujese la conversión de la XDH a XO en el músculo y una presencia suficiente de hipoxantina. Por otra parte la XO puede jugar un papel importante una vez el daño se ha producido al activar la generación de ERO por otras vías. En este caso, la formación de radicales libres por la XO mediarían el proceso inflamatorio (Hellsten, 1994).

4.3.2.4. Producción de radicales libres secundariamente a la ruptura de proteínas que contienen hierro.

La capacidad del hierro para catalizar reacciones de producción de radicales libres es bien conocida (Halliwell, 1985). Los deportes de resistencia y aquellos que conllevan un alto impacto mecánico, causan una destrucción de eritrocitos con liberación de hierro y por tanto, una potencial fuente de hierro catalítico. Asimismo, al dañarse la fibra muscular, se liberan a la circulación grandes cantidades de mioglobina, con su hierro correspondiente. La interacción de la metamioglobina y la metahemoglobina con peróxidos son responsables del estrés oxidativo producido durante el ejercicio físico (Cooper y cols. 2002).

4.3.2.5. Prostaglandinas.

Parece que diversos tipos de estrés, incluida una excesiva contracción, produce la liberación de prostaglandinas del músculo esquelético. Muchos de intermediarios en el metabolismo de las prostaglandinas son ERO (Halliwell y Gutteridge, 1989). La conversión del ácido araquidónico a prostaglandinas, por acción de la lipooxigenasa, implica una serie de reacciones que llevan implícita la producción de radicales libres como productos intermedios. Sin embargo, no existen evidencias de la presencia de lipooxigenasa en músculo esquelético. Por

otra parte, en distintas publicaciones, se ha apuntado hacia ciertos productos del metabolismo de la lipooxigenasa como mediadores de daño muscular (Jackson y cols., 1987). Hasta la fecha, sin embargo, no existe una evidencia clara de que las prostaglandinas jueguen un papel en la producción de radicales libres inducida por la contracción muscular.

4.3.2.6. NAD(P)H oxidasa.

La producción de ERO por isoformas no fagocíticas de la NAD(P)H oxidasa juega un papel en la regulación de la cascada de señalización intracelular de varios tipos celulares entre los que se incluyen: fibroblastos, células endoteliales, miocitos cardíacos y musculatura lisa vascular (Griendling y cols., 1994). Las células musculares y los fibroblastos son el objetivo de la mayor parte del radical superóxido producido en la pared de los vasos. Inicialmente se consideró que la enzima estaba situada únicamente en la membrana plasmática pero, en la actualidad, se ha encontrado en varios componentes celulares entre los que se incluye la mitocondria (Ji, 1999).

4.3.2.7. Catecolaminas.

La liberación de catecolaminas está aumentada durante el ejercicio. Las catecolaminas pueden autooxidarse formando radicales libres (Jewett y cols., 1989). La oxidación de la epinefrina está asociada con la formación de radical superóxido, y se considera como una posible fuente de radicales libres en el daño inducido por el proceso de isquemia-reperfusión (Ji, 1999). El uso β -bloqueantes en humanos que realizan un ejercicio de alta intensidad, ha dado como resultado una disminución de los marcadores de estrés oxidativo en plasma (Pincemail y cols., 1990). Sin embargo, el papel de las catecolaminas como fuente de ERO durante el ejercicio no ha sido estudiado de forma exhaustiva (Ji, 1999).

4.3.2.8. Pérdida de la homeostasis del Ca^{+2} .

La alteración en la homeostasis del Ca^{+2} se considera un paso clave en el proceso degenerativo asociado al daño muscular inducido por el ejercicio físico (McArdle y cols., 1992). Este fallo en la homeostasis del Ca^{+2} parece ser secundario al aumento en la generación de radicales libres en varios tejidos pero,

diversos grupos de investigación, no consideran que esto ocurra en el músculo esquelético (McArdle y cols., 1994).

Existen diferentes vías por las que los radicales libres podrían alterar la homeostasis del Ca^{+2} pues, como hemos visto en apartados anteriores, son capaces de dañar todo tipo de biomoléculas. Nicotera y cols. en 1985 publicaron un trabajo en el observaron cómo las ERO eran responsables de la inactivación de las bombas de la membrana plasmática responsables de eliminar el Ca^{+2} . Este mismo daño puede hacerse extensivo a organelas intracelulares responsables de secuestrar el exceso de calcio citosólico (Bellomo y cols., 1985).

Si se considera que el fallo en la homeostasis del calcio es el evento inicial en el daño muscular asociado al ejercicio físico, éste puede llevar a un aumento en la generación de radicales libres. El incremento de los niveles de Ca^{+2} intracelulares puede activar enzimas proteolíticas y la fosfolipasa lo que supone una liberación de los ácidos grasos y una alteración de las estructuras de la membrana interna. Además, en un intento de tamponar el aumento en los niveles de Ca^{+2} , la mitocondria puede acumular cantidades significativas. Este Ca^{+2} puede ir acompañado por el fosfato y al formar fosfato cálcico, precipitar en la mitocondria.

Por otra parte los aumentos en el contenido de Ca^{+2} se ha visto que inhiben la respiración mitocondrial (Wrogemann y Pena, 1976). La alteración en la producción de ATP puede inducir aumento en la producción de radical superóxido. La situación de estrés oxidativo secundaria al aumento en la concentración de Ca^{+2} intracelular debe estar causada por un ejercicio físico agotador.

4.3.2.9. Los peroxisomas.

Los peroxisomas son organelas celulares relacionadas con la oxidación de ácidos grasos y aminoácidos. En condiciones fisiológicas, los peroxisomas contribuyen a la producción de H_2O_2 pero no del $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Chance y cols., 1979). El ayuno prolongado se ha demostrado que supone un aumento en la generación de H_2O_2 debido, principalmente, al aumento en la oxidación de los ácidos grasos por esta organela (Godin y Wohaieb, 1988). Como los ácidos grasos son la fuente principal de energía para el miocardio y el músculo esquelético durante el ejercicio físico prolongado, los peroxisomas pueden ser sitios potenciales de producción de radicales libres. El incremento, en músculo, en la actividad de la catalasa tras un ejercicio físico agotador, parece apoyar esta hipótesis (Ji y cols., 1992). Sin embargo, no existen evidencias directas de que el ejercicio aumente la producción de ERO por el peroxisoma.

4.3.3. Prevención de los efectos de los radicales libres formados durante el ejercicio físico mediante la administración de antioxidantes.

En muchos laboratorios se ha demostrado que existe la posibilidad de minimizar los efectos de los radicales libres de oxígeno mediante la administración de antioxidantes tales como los comentados en el apartado anterior. Así, en este grupo hemos visto que la administración de Vitamina C, de vitamina E o de glutatión, protege contra el efecto dañino de los radicales libres en el ejercicio físico en ratas y en seres humanos (Sastre y cols., 1992). Tanto el grupo de Packer y Quintanilha (Davies y cols., 1982) como el de M.J. Jackson (Jackson y cols., 1985), han mostrado el papel protector de la vitamina E contra los daños causados por el ejercicio físico. Además se ha observado que el nivel de ácido úrico, que es un potente antioxidante plasmático, aumenta en el ejercicio físico, lo cual apunta hacia un interesante papel protector del mismo. En la última década se ha demostrado que el Coenzima Q también puede proteger contra el estrés oxidativo causado por los radicales libres (Shimomura y cols., 1991). Más recientemente se ha observado que la suplementación con ácido lipoico (150 mg/kg durante 8 semanas) aumenta los niveles de este antioxidante en músculo gastrocnemio y aumenta los niveles de glutatión total en hígado y sangre. La disminución de la actividad glutatión transferasa en corazón inducida por el ejercicio y la lipoperoxidación en corazón, hígado y músculo fueron prevenidas por la suplementación con esta cantidad. Por tanto, el ácido lipoico influye favorablemente en la defensa antioxidante tisular y previene la lipoperoxidación en reposo y como respuesta a un ejercicio (Khanna, 1999).

El alopurinol es otra de las sustancias estudiadas en nuestro laboratorio. Tiene una acción inhibitoria sobre la enzima xantina oxidasa, considerada como una posible fuente generadora de radicales libres durante el ejercicio físico agotador por fenómenos similares a la isquemia-reperfusión cardíaca (Heunks y cols., 1999). Con su administración se busca prevenir el daño producido por el estrés oxidativo asociado a dicho ejercicio.

En la figura 8 se muestra la acción del alopurinol como inhibidor de la xantina oxidasa.

4.3.3.1. Suplementación con Vitamina E.

Se ha realizado una gran cantidad de estudios sobre suplementación con un antioxidante único o con una combinación de antioxidantes en el ejercicio físico.

Los objetivos de estos estudios han sido demostrar la mayor protección frente al daño oxidativo con el uso de antioxidantes e incluso sus posibles efectos beneficiosos. La mayoría de los estudios en esta línea hacen referencia a los efectos beneficiosos de la suplementación con vitamina E. En la Tabla 8 se recogen una selección de artículos en los que se estudió el efecto de la suplementación con vitamina E.

Tabla 8. Efecto de la suplementación con vitamina E en el ejercicio físico.

Suplementación	Modelo	Variable	Efecto	Referencia
900 UI 6 meses	Nadadores	Resistencia	Sin efecto	Lawrence y cols., 1975
50 UI/Kg dieta 4 semanas	Ratas 80 machos	Natación hasta el agotamiento	Disminución TBARS (hígado)	Brady y cols., 1979
400 UI/kg dieta 8 semanas	Ratas 40 hembras	Carrera	Disminución MDA (hígado)	Quintanilla y cols., 1983
Vitamina E	Humanos	Ejercicio físico exhaustivo	Disminución de MDA y enzimas citosólicas en suero	Sumida y cols., 1989
400 UI/kg dieta 48 días	Humanos 22-29 años (n=9) 55-74 años (n=12)	Carrera en descenso	Rápida recuperación Disminución TBARS en orina	Cannon, 1990
Inyección intramuscular vitamina E	Ratones	Natación	Mejora la resistencia	Novelli y cols., 1990
10.000 UI/kg dieta 4 semanas	Ratas hembra	Carrera	Disminución niveles proteínas oxidadas	Reznick y cols., 1992
800 mg 48 días	Humanos	Carrera en descenso 75%VO ₂ max	Disminución de TBARS en orina y músculo	Meydani y cols., 1993
250 UI/Kg dieta 5 semanas	Ratas 4 machos	60 minutos de carrera	Disminución TBARS (músculo y sangre)	Goldfarb y cols., 1993
250 UI/kg dieta 5 semanas	Ratas 64 machos	60 minutos de carrera	Disminución AST y ALT (hígado)	Mcintosh y cols., 1993
Vitamina E 5 meses	Ciclistas profesionales	Entrenamiento	Disminución de los niveles de CK y MDA en suero	Rokitzi y cols., 1994
1200 UI/día 5 semanas	Corredores	6 días de carrera	Disminuye: TBARS, CK y	Itoh y cols., 2000

			LDH en plasma	
1000 UI 12 semanas	Humanos	45' carrera en descenso 75%VO ₂ max	Disminuye niveles CK en plasma	Sacheck y cols., 2003
Vitamina E	Ratas	30 min/día natación 5 días semana durante 6 días	Aumento actividad enzimas antioxidantes Disminuye MDA	Asha Devi y cols., 2003

4.3.3.2. Suplementación con Vitamina C.

Los estudios en los que se ha utilizado la suplementación con vitamina C son menos abundantes (Ver Tabla 9)

Tabla 9. Efecto de la suplementación con vitamina C en el ejercicio físico.

Suplementación	Modelo	Variable	Efecto	Referencia
3 g/Kg dieta	Ratas deficientes vitamina E	Carrera hasta el agotamiento	Sin efecto	Gohil y cols., 1986
1g/day 1 día	Humanos	Carrera 80% VO ₂ max., 30 minutos	Mejora levemente la capacidad antioxidante total del plasma	Alessio, 1993
2 semanas suplementación vitamina C	Humanos	90 minutos carrera hasta agotamiento	Leve disminución del dolor muscular y niveles de MDA	Thompson y cols., 2001

4.3.3.3. Suplementación con Selenio y β-caroteno.

Otros nutrientes cuya suplementación ha sido considerada beneficiosa por sus propiedades antioxidantes son el selenio y el β-caroteno. En la mayoría de estudios se han administrado de forma conjunta o en combinación con otros antioxidantes (Ver Tabla10)

Tabla 10. Efecto de la suplementación con Selenio y β -caroteno el ejercicio físico.

Suplementación	Modelo	Variable	Efecto	Referencia
Se (0,5 ppm dieta) Vitamina E (50 UI/kg)	Ratas	Natación	Aumentan los niveles de GPx en hígado y músculo	Brady y cols.,1979
Se (0,15ppm dieta) durante 4 semanas	Caballos	Carrera	Mejora levemente los niveles de MDA en plasma	Brady y cols.,1978
Se	Humanos	10 semanas de entrenamiento	Sin efecto	Tessier y cols.,1995

4.3.3.4. Suplementación con coenzima Q₁₀

Algunos trabajos han examinado los efectos de la suplementación con el coenzima Q₁₀ para determinar si los niveles adicionales de este factor en la cadena de transporte electrónico podrían prevenir el daño asociado a la generación de radicales libres en el ejercicio (Ver Tabla 11).

Tabla 11. Efecto de la suplementación con coenzima Q₁₀

Suplementación	Modelo	Variable	Efecto	Referencia
Coenzima Q ₁₀	Ratas	Carrera en descenso	Disminución de los niveles plasmáticos de CK y LDH	Shimonmura y cols., 1991
Coenzima Q ₁₀	Corredores de maratón	Carrera	Sin efecto	Kaikkonen y cols., 1998

4.3.3.5. Suplementación con alopurinol.

El alopurinol también ha sido utilizado en los estudios de suplementación y ejercicio físico (Ver Tabla 12)

Tabla 12. Efecto de la suplementación con alopurinol en el ejercicio físico.

Suplementación	Modelo	Variable	Efecto	Referencia
Alopurinol	Sóleo de ratón	Contracciones isométricas	Disminuye la fatiga	Barclay y Hansel, 1991
Alopurinol	Ratones	Agotamiento en tapiz rodante	Mejora la recuperación de los niveles de GSH en sóleo Disminuye los niveles de daño muscular observados con microscopía electrónica	Duarte y cols., 1993
Alopurinol	Pacientes con hipouricemia renal que sufren fallo renal agudo inducido por el ejercicio	Test físico	El aumento de la secreción renal de ácido úrico durante el ejercicio es responsable del fallo renal agudo. La administración de alopurinol lo previene	Yeun y Hasbargen, 1995
Alopurinol	Caballos	Ejercicio físico agotador	Disminución de los niveles de TBARS en plasma y de GSSG sanguíneo	Mills y cols., 1997
300 mg alopurinol/día a 3 días	Pacientes EPOC	Agotamiento bicicleta ergométrica	Disminución de los niveles de GSSG en sangre y MDA en plasma	Heunks y cols., 1999
Alopurinol	Ratas	Agotamiento en tapiz rodante	Disminución de niveles de TBARS en hígado	Koyama y cols., 1999
Alopurinol	Ratas	Carrera en tapiz rodante	Disminuyen los niveles de GSSG en sangre. Disminuyen niveles de MDA, CK y GOT en plasma.	Viña y cols., 2000
300 mg alopurinol/día a 3 días	Halterófilos	Programa de entrenamiento de fuerza	Disminución de los niveles en plasma de CK y GOT	Viña y cols., 2000
300 mg alopurinol	Perros	Carrera en tapiz rodante y posterior inducción de fallo cardíaco	Mejora la contractilidad del ventrículo izquierdo Mejora la respuesta a estimulación β -adrenérgica Mejora la respuesta al ejercicio sistólica y diastólica del ventrículo izquierdo	Ukai y cols., 2001
300 mg alopurinol	Ciclistas profesionales	Tour de Francia	Disminución niveles de GOT, CK y MDA en plasma	Gómez-Cabrera y cols., 2003
Vitamina E,A y C, 60 días Alopurinol, 15días NAC, 3 días	Humanos	2 sesiones de 45 minutos bicicleta 70% VO_2 max.	Disminución de los niveles de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en plasma	Vassilakopoulos., 2003

4.3.3.6. Suplementación con GSH y NAC.

El GSH es otro de los antioxidantes cuya suplementación se ha estudiado en modelos de ejercicio físico. Estudios de la década de los 80 y los 90 sugieren que los niveles endógenos de GSH no son suficientes para contrarrestar el aumento en la oxidación que se produce durante el ejercicio físico agotador. (Sastre y cols., 1992). Por esta razón se considera que el aumento en los niveles de GSH podía ser beneficioso para la protección de la célula frente a las ERO. La mayoría de los tejidos no son capaces de sintetizar glutatión *de novo* teniendo que importarlo vía ciclo del gamma-glutamilo (Deneke y Fanburg 1989). El hígado es el órgano primario en la síntesis *de novo* de GSH. El contenido de GSH del hígado se ha demostrado que disminuye tras la realización de un ejercicio físico agudo. (Leeuwenburgh y Ji 1996). Este descenso puede estar influido por diferentes factores:

1.- La liberación de GSH al plasma por el hígado se ve estimulada por el glucagón, la vasopresina y las catecolaminas, los niveles de las cuales se ven elevados durante el ejercicio. (Lu y cols.. 1990).

2.- El GSH es utilizado por la GPx como sustrato y oxidado a GSSG por hidroperóxidos. Éstos se ven elevados durante el ejercicio (Davies y cols., 1982, Ji y Fu 1992).

3.- La síntesis *de novo* de GSH está limitada por la actividad γ -glutamylcistein sintetasa e influenciada por la disponibilidad de cisteína y de ATP (Deneke y Fanburg 1989).

La disminución del flujo sanguíneo hepático y el aumento de las necesidades metabólicas de otros productos durante el ejercicio pueden influir en la disminución de la síntesis de GSH. Al disminuir las reservas de GSH, otros tejidos como el riñón, el corazón y el músculo esquelético pueden sufrir la reducción en la disponibilidad de GSH circulante, lo que podría conllevar una disminución del cociente GSH/GSSG y un déficit de GSH en estos tejidos. Además la γ -glutamyl transpeptidasa, la enzima que controla la catabolización del GSH plasmático como primer paso del ciclo del gamma-glutamilo disminuye su actividad con el ejercicio agudo (Leeuwenburgh y Ji 1998; Sen, 1992). Por todo ello se puede considerar ventajosa la suplementación con GSH.

Inicialmente se pensó que la suplementación con GSH mostraría escasos efectos beneficiosos debido a la inhibición de la GCS por los elevados niveles del tripéptido (Meister, 1991) en hígado y riñón. Sin embargo en varios estudios se ha publicado la mejora en el rendimiento físico con su suplementación, especialmente

en músculo esquelético. El músculo presenta relativamente bajos niveles y turnover de GSH, pero debido a su elevada masa, supone un importante reservorio de GSH durante el ejercicio. (Kretzschmar y Muller, 1993). Aunque el ejercicio está asociado a la generación de ERO, el flujo sanguíneo está aumentado lo que facilita el aporte de GSH vía el ciclo γ -glutamilo (Ji y Fu 1992). El cuádriceps, por ejemplo, muestra una relativamente elevada actividad GGT que puede facilitar la utilización del GSH durante el ejercicio cuando la actividad GCS es la adecuada (Leeuwenburgh y cols., 1997). Además el GSH es importado de forma intacta en determinados tipos celulares (células epiteliales del pulmón, intestino, riñón y ojos) por un transportador dependiente de sodio (Deneke y Fanburg 1989). Ji y Leewenburgh (1998) consideran este mecanismo, independiente de la GGT, como clave en la incorporación del abundante GSH plasmático y apuntan hacia su papel en la protección frente a las ERO generadas durante el ejercicio. En este mismo trabajo, los autores destacan como uno de los beneficios más evidentes de la estabilización en el estatus de GSH en el músculo, el aumento en la resistencia de los animales tratados con GSH. Se debe descartar un efecto energético al suplementar con GSH ya que el músculo esquelético no puede oxidar cisteína o glicina y su habilidad para utilizar glutamato es bastante limitada. La ruta alternativa para el uso de GSH, la gluconeogénesis hepática, no parece ser una vía posible debido a la baja actividad GGT en el hígado. En la actualidad, como hemos comentado en el apartado correspondiente, existen evidencias de que la fatiga puede estar relacionada con el estrés oxidativo. Por esto, es posible que la suplementación con GSH mejore la resistencia por el efecto reductor de la fatiga.

Tabla 13. Efecto de la suplementación con GSH en el ejercicio físico.

Suplementación	Modelo	Variable	Efecto	Referencia
NAC	Diafragma de conejos	Estimulaciones rítmicas	Prevención de la fatiga	Shindoh y cols, 1990
GSH (0,5; 0,75 y 1g/Kg) Intraperitoneal	Ratones	Natación	Aumenta la resistencia en un 102%; 120% y 140% respectivamente	Novelli, 1991
GSH (1g/Kg) Intraperitoneal Durante 3 días	Ratas	2 horas de carrera en tapiz rodante	Aumentan los niveles de glutatión en sangre y riñón No mejora la resistencia	Sen y cols., 1994
NAC	Humanos	Ejercicio	Disminuye la	Sen y

(200mg/ 4/ día) durante 2 días + 800mg día de la prueba		máximo en bicicleta ergonómica	oxidación del glutatión asociada al ejercicio físico Aumenta la capacidad antioxidantes del plasma	cols.,1994
NAC (150 mg/Kg)	Humanos	Estimulaciones eléctricas	Prevención de la fatiga	Reid y cols., 1994
GSH (6 mmol/Kg de peso)	Ratones	Natación	Disminuye los niveles de MDA hepático y muscular Mejora el rendimiento en el agua (2 horas) Aumenta el estrés oxidativo a nivel renal	Leeuwenburgh y Ji, 1998

Los niveles de GSH no aumentan de forma ilimitada debido al control de la GCS (Sen y cols., 1994). Como estrategia alternativa se han utilizado diferentes formas de glutatión con el objetivo de aumentar sus niveles en distintos tejidos. Los ésteres de GSH entran directamente en la célula sin el control enzimático de la GGT y la GCS (Martensson y Meister, 1989) (Ver tabla 14).

Tabla 14. Efecto de la suplementación con ésteres de GSH en el ejercicio físico.

GSH	Ventajas	Inconvenientes	Referencia
GSH monoéster lipofílico	Más efectivo que el GSH para aumentar los niveles del tiol en distintos tejidos	La contaminación con iones metálicos del monoéster disminuye considerablemente sus efectos	Meister, 1991
GSH dimetil éster	Más efectivo que el GSH para aumentar los niveles del tiol en distintos tejidos	Tóxico en ratones	Levy y cols., 1993
GSH dietil éster	Más efectivo que el GSH para aumentar los niveles del tiol en distintos tejidos	Tóxico en ratones y ratas pero no en humanos	Levy y cols., 1993
GSH diéster	No presenta toxicidad en ratones y hamsters	No se ha testado en humanos	Sen y cols.,1994
GSH etil ester	Disminuye los niveles de MDA hepático y muscular Mejora el rendimiento en el agua (2 horas)	Aumenta el estrés oxidativo en el riñón aunque muestra valores más bajos que los observados al tratar con GSH libre.	Leeuwenburgh y Ji, 1998

4.3.3.7. Suplementación con enzimas antioxidantes.

La suplementación con enzimas antioxidantes ha sido menos utilizada pese a los efectos beneficiosos que se le atribuyen (Ver Tabla15)

Tabla 15. Efecto de la suplementación con enzimas antioxidantes en el ejercicio físico.

Suplementación	Modelo	Variable	Efecto	Referencia
SOD y catalasa	<i>In vitro</i> (Diafragma)	Estimulación de alta y baja frecuencia	Inhiben fatiga inducida por estimulación de baja frecuencia	Reid y cols., 1992
Derivado de la SOD (1mg/100 g peso) Intraperitoneal	Ratas	Carrera hasta el agotamiento	Disminuye TBARS y la actividad XO	Radak y cols., 1995

4.3.3.8. Suplementación con combinaciones de antioxidantes.

La suplementación con combinaciones de antioxidantes ha sido también utilizada en diversos estudios (Ver Tabla 16)

Tabla 16. Efecto de la suplementación con combinaciones de antioxidantes.

Suplementación	Modelo	Variable	Efecto	Referencia
37,5 mg β -caroteno 1250 mg Vitamina C 1000 UI Vitamina E 5 semanas	Humanos	Carrera 60-90 % VO_2 max.	Disminución de MDA en plasma y de pentano exalado	Kanter y cols., 1993
500 mg Vitamina E y 400 Vitamina C	Corredores	Carrera 75% VO_2 max.	Ningún efecto en los niveles de citoquinas	Petersen y cols.,2001
Vitamina E,A y C, 60 días Alopurinol, 15días NAC, 3 días	Humanos	2 sesiones de 45 minutos bicicleta 70% VO_2 max.	Disminución de los niveles de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en plasma	Vassilakopoulos., 2003

4.3.4. Suplementación con antioxidantes y su efecto sobre el rendimiento físico.

Como hemos comentado anteriormente el ejercicio físico agotador provoca un daño oxidativo en el músculo esquelético, especialmente en individuos no entrenados. Cada vez, por otra parte, son más los estudios que evidencian que los radicales libres están relacionados con la fatiga muscular y el rendimiento.

Examinando la literatura podemos ver que son varios los trabajos en los que se ha estudiado el efecto de la administración de antioxidantes en el rendimiento físico. Las publicaciones se pueden dividir en dos grupos:

4.3.4.1. Estudios en animales.

Son muchos los estudios con animales que han examinado los efectos de los antioxidantes en el rendimiento muscular. En algunos de estos experimentos se usaban preparaciones *in vitro* en las que se añadían antioxidantes (superóxido dismutasa o catalasa) al medio circundante al músculo. Por lo general estos experimentos *in vitro* indicaban que la adición de antioxidantes al medio provocaba un retraso de la fatiga muscular y mejoraba el rendimiento (Barclay y Hansel, 1991; Novelli y cols., 1990; Reid y cols.,1992). En cada uno de estos estudios, los autores concluyeron que la producción de radicales libres durante el ejercicio contribuía a la fatiga muscular y que la adición de antioxidantes mejoraba el rendimiento muscular reduciendo el estrés oxidativo.

Un estudio realizado en 1990 (Shindoh y cols., 1990) indicaba que el tratamiento de animales con el antioxidante N-acetilcisteína provocaba un aumento de los niveles de glutatión y mejoraba el rendimiento muscular *in situ* del mismo modo que los anteriormente mencionados estudios *in vitro*. En este trabajo los investigadores concluyeron que la adición de antioxidantes mejoraba el rendimiento muscular reduciendo el estrés oxidativo inducido por el ejercicio.

Hasta la fecha pocos estudios han examinado los efectos de la suplementación con antioxidantes en el rendimiento *in vivo*.

La tabla 17 contiene una selección de investigaciones que relacionan los efectos del tratamiento con antioxidantes con el rendimiento. Todos los experimentos muestran que la suplementación con antioxidantes puede mejorar el rendimiento muscular disminuyendo el estrés oxidativo inducido por el ejercicio físico. Sin embargo la mayoría de los tratamientos utilizados con estos animales no

pueden hacerse extensivos a los humanos, por lo que los resultados obtenidos no pueden ser extrapolados.

Tabla 17: Selección de estudios en animales en los que se investiga el efecto de los antioxidantes en el rendimiento físico.

Estudio	Tratamiento	Test	Rendimiento
Novelli y cols., 1990	Inyección de Vitamina E intramuscular	<i>In vivo</i> (natación)	Mejora
Shindoh y cols., 1990	NAC	<i>In vitro</i> (diafragma)	Mejora
Barclay y cols., 1991	Alopurinol	<i>In vitro</i> (sóleo)	Mejora
Novelli y cols., 1991	Inyección intraperitoneal de GSH	<i>In vivo</i> (natación)	Mejora
Reid y cols., 1992	Supeóxido dismutasa, catalasa	<i>In vitro</i> (diafragma)	Mejora
Leeuwenburgh y Ji, 1998	GSH etil ester y GSH	<i>In vivo</i> (natación)	Mejora

4.3.4.2. Estudios en humanos.

La suplementación con antioxidantes y su efecto sobre la resistencia muscular, en humanos, no ha sido un tema muy estudiado. Muchos de los trabajos publicados en este sentido se han centrado en los efectos de un único antioxidante en lugar de estudiar su combinación, por lo que los resultados obtenidos no han sido muy positivos. En este sentido la vitamina antioxidante mas ampliamente utilizada en los trabajos ha sido la vitamina E.

Aunque, como ya hemos comentado, muchos estudios han indicado que la suplementación con vitamina E y vitamina C disminuye el estrés oxidativo asociado al ejercicio físico en humanos, existen muy poca evidencia de que mejoren el rendimiento. Este hecho lo ilustra muy claramente la Tabla 18, en la que también se puede ver, por otra parte, que sólo en un trabajo *in vitro* se muestra la mejora en el rendimiento tras la administración de antioxidantes. En este estudio de Reid y cols. (1994) se administraron 150 mg de NAC a humanos y se midió la fatiga muscular provocada por estimulación eléctrica de baja frecuencia. Los resultados revelaron una mejora en la resistencia muscular tras el tratamiento.

Tabla 18: Selección de estudios con humanos en los que se investiga el efecto de los antioxidantes en el rendimiento físico.

ESTUDIO	TRATAMIENTO	TEST	RENDIMIENTO
Lawrence y cols, 1975	Vitamina E	500 mts. nadando	Sin efecto
Sumida y cols, 1989	Vitamina E	VO ₂ máx.	Sin efecto
Rokitzki y cols, 1994	Vitamina E	Ejercicio progresivo	Sin efecto
Snider y cols, 1992	Combinación de antioxidantes	Tiempo hasta el agotamiento al 70% del VO ₂ máx.	Sin efecto
Reid y cols, 1994	NAC	Estimulación de baja frecuencia del músculo tibial anterior	Mejora
Cannon y cols, 1990	Vitamina E	Carrera en tapiz rodante (excéntrico)	Recuperación más rápida.

4.3.5. Entrenamiento y estrés oxidativo.

Hasta el momento nos hemos centrado en los efectos nocivos de los radicales libres generados durante el ejercicio físico agotador. Sin embargo, el ejercicio físico, sobre todo cuando no es agotador resulta una práctica claramente sana y beneficiosa para la prevención de muchas enfermedades. Los efectos favorables del ejercicio están bien documentados como hemos mostrado en la introducción.

Los efectos indeseables del ejercicio agotador se evitan, al menos en parte, con el entrenamiento. Éste reduce la susceptibilidad del músculo a los radicales libres (Salminen y Vihko, 1983) e induce la aparición de enzimas antioxidantes. Como se puede observar en las Tablas 19 y 20 el entrenamiento, frente al ejercicio físico agudo, aumenta la actividad de la SOD. Únicamente en dos estudios aparece un aumento de actividad SOD tras la realización de un ejercicio físico agudo. En el trabajo de Minami y cols. (1981), el aumento en plasma de actividad SOD no se puede descartar que sea debido a un proceso de hemólisis ya que Cu,Zn-SOD existe en elevadas cantidades en el interior del eritrocito (Ohno y cols., 1985). Por otra parte en el otro estudio en que se muestra un aumento de la actividad SOD en condiciones agudas, el modelo de ejercicio escogido no parece ser el adecuado (2.800 Km en bicicleta durante 20 días) correspondiendo, posiblemente, el

aumento de la actividad enzimática a una adaptación a entrenamiento de resistencia aeróbica (Mena y cols., 1991)

Tabla 19. Ejercicio físico agudo y actividad SOD en humanos.

Referencia	Sujetos	Tejido	Tipo Trabajo	SOD	Cambio
Minami y cols., 1981	Sujetos sanos	Plasma	10 min. bicicleta, 182 W	Total	↓↓
Cooper y cols., 1986	Corredores de maratón	Vasto interno	Maratón	Total	→
Ohno y cols., 1986	Estudiantes no entrenados	Eritrocitos	30 min bicicleta, 75% VO ₂ máx.	Cu,Zn	→
Mena y cols., 1991	Ciclistas profesionales	Eritrocitos	5 h. bicicleta 6 días bicicleta 20 días bicicleta	Cu,Zn	→ → ↑

Tabla 20. Ejercicio físico crónico y actividad SOD en humanos.

Referencia	Sujetos	Tejido	Tipo Trabajo	SOD	Cambio
Jenkins y cols., 1984	Deportistas VO ₂ máx. ≥60 ml/min/Kg	Vasto interno	No descrito	Total	↑
Ohno y cols., 1988	Estudiantes sanos	Eritrocitos	10 semanas carrera	Cu,Zn	→
Lukaski y cols., 1990	Nadadores	Eritrocitos	Natación	Cu,Zn	↑↑
Mena y cols., 1991	Ciclistas amateurs Ciclistas profesionales	Eritrocitos	Ciclismo	Cu,Zn	↑ ↑

El ejercicio físico regular genera una adaptación frente al estrés oxidativo evidenciado por un descenso del daño al ADN, niveles mantenidos de oxidación proteica y un aumento de la resistencia frente a la administración crónica de peróxido de hidrógeno (Radak y cols., 1999; Radak y cols., 2000). Por otra parte tras someter a un grupo de ratas a un entrenamiento de larga duración en el agua, se observó que aumentaba la actividad del proteasoma, la mayor enzima proteolítica para proteínas modificadas oxidativamente (Radak y cols., 1999). En el mismo estudio se midió la actividad de la DT-diaforasa. Esta enzima, también denominada la enzima anticancerígena (Beyer y cols., 1988) cataliza la

transferencia de dos electrones a quinonas para formar hidroquinonas estables, protegiendo a las células del daño generado por la producción de semiquinona y la subsiguiente formación de radical superóxido.

Al igual que el ejercicio físico continuado puede ser responsable del daño al material genético medido por la oxidación de la 8oxodG (Okamura y cols., 1997) el ejercicio físico regular retrasa una gran cantidad de desórdenes. Un entrenamiento de 8 semanas en tapiz rodante atenúa de forma significativa el contenido de 8oxodG en músculo gastrocnemio de rata (Radak y cols., 2001). De la misma forma 9 semanas de entrenamiento en el agua indujo una disminución del contenido en 8oxodG en músculo gastrocnemio y una disminución de los grupos carbonilo en proteínas (Radak y cols., 1999). En humanos, concretamente en linfocitos, también se ha publicado la reducción de los niveles de 8oxodG asociados a la práctica de ejercicio físico regular (Asami y cols., 1998). Los resultados de estos estudios apuntan hacia un aumento de la actividad de la enzima encargada de eliminar la 8oxodG del DNA dañado, en el entrenamiento (Radak y cols., 2002). Esta enzima, en bacterias la Fpg (formamidopirimidina-DNA glicosilasa), tiene como homólogo funcional en mamíferos, la OGG1 (Rosenquist y cols., 1997).

Hellsten y cols. (1993) a este respecto, sugirieron que el entrenamiento podía alterar las actividades de enzimas relacionadas con el metabolismo de las purinas. Ellos encontraron que la actividad de las AMP deaminasas se reducían, mientras que las de la hipoxantina fosforibosiltransferasa (HPRT) y las de la fosfofructoquinasa aumentaban tras 6 semanas de entrenamiento. El aumento en la actividad HPRT se asocia con un aumento en la fosforilación de la hipoxantina intracelular a IMP. Este hecho disminuye la disponibilidad del sustrato para la XO en el músculo entrenado. La acumulación del contenido en plasma de hipoxantina y ácido úrico también se vio disminuído tras el entrenamiento. Estos datos apuntan hacia la reducción en la liberación de purinas por el músculo como una buena adaptación al ejercicio.

En resumen y, a modo de conclusión, podemos considerar que el ejercicio físico moderado practicado con regularidad puede ser responsable de las adaptaciones de los sistemas antioxidantes y de reparación de daño (Radak y cols., 2001). Por todo ello parece que las adaptaciones inducidas por el estrés oxidativo pueden jugar un papel importante en los efectos beneficiosos del ejercicio físico regular. El músculo esquelético es el tejido con mayor masa del cuerpo, lo forman células postmitóticas que muestran una mayor tendencia a acumular estrés oxidativo. Por tanto el entrenamiento puede aumentar la resistencia de este tejido al estrés oxidativo.

4.3.6. Generación de radicales libres durante la contracción muscular, papel en la señalización celular.

En la última década cada vez son más los trabajos en los que se apunta hacia la función fisiológica que las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, desempeñan en el músculo esquelético. Los datos indican que las ERO y ERN son continuamente generadas en el músculo de individuos sanos y que estas moléculas modulan procesos que van desde desarrollo, al metabolismo, pasando por el control del flujo sanguíneo y la contracción muscular.

La producción de radical superóxido en el músculo esquelético en reposo es pequeña, sin embargo ésta se acelera durante la actividad contráctil. Se apunta hacia el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno como las especies reactivas con función en la señalización. El radical hidroxilo, sin embargo, dada su elevada reactividad y su baja vida media, es prácticamente indetectable en el músculo en condiciones basales. Éste aumenta cuando el ejercicio se realiza hasta el agotamiento y está más relacionado con la fatiga muscular (Reid, 2001).

Como las ERO, el NO^* es generado continuamente en el músculo esquelético y su producción aumenta en los períodos de contracción muscular. Esta molécula de bajo peso molecular cataliza una variedad de señales que regulan procesos intracelulares e interacciones entre células. A niveles bajos, el NO^* , puede tener propiedades antioxidantes oponiéndose a los efectos de las ERO.

4.3.6.1. Efecto de las ERO en la contracción muscular.

Las ERO tienen un efecto bifásico en la función contráctil del músculo no fatigado. Los bajos niveles de ERO presentes en condiciones basales son esenciales para la producción de fuerza. Una depleción selectiva de las ERO en músculo no fatigado, utilizando SOD o catalasa provoca una caída en la fuerza de la contracción. Por otra parte, un modesto incremento de las ERO provoca un aumento en la fuerza. Este efecto positivo revierte a concentraciones más elevadas de ERO; la caída en la fuerza es dependiente en este caso de la dosis y del tiempo de aplicación. Estos efectos negativos pueden ser prevenidos pretratando los músculos con antioxidantes o administrando agentes reductores.

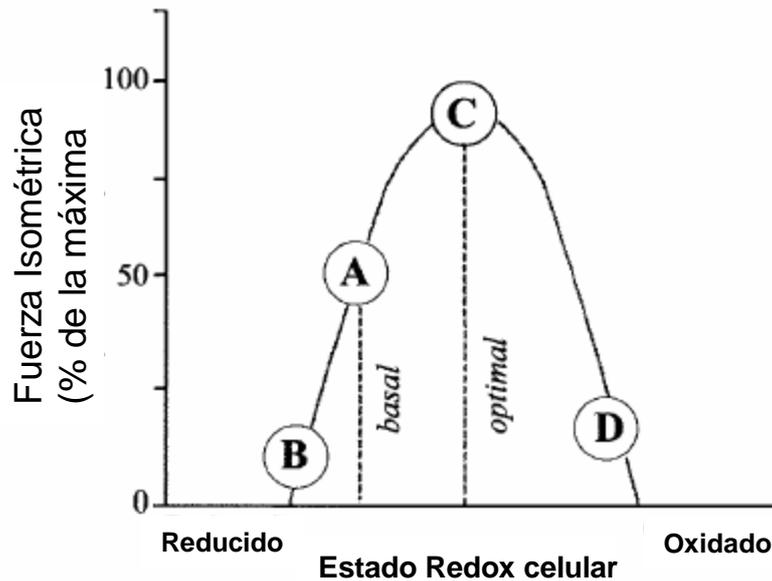
El aumento en la producción de ERO que ocurre durante el ejercicio físico agotador contribuye a la aparición de la fatiga. Los radicales libres en el músculo se generan más rápidamente de lo que pueden ser neutralizados por los antioxidantes endógenos. Cuando las ERO se acumulan en el músculo en contracción, inhiben

su producción de fuerza. El efecto es análogo al descenso en la fuerza que ocurre en los músculos no fatigados cuando se les expone a elevados niveles de ERO. En la misma línea, el efecto de los radicales libres en músculo fatigado puede ser minimizado cuando éste se pretrata con antioxidantes (Reid y cols., 1994).

Otros factores pueden también incrementar la cantidad de ERO en el músculo. La edad parece aumentar la cantidad de oxidantes a los que se ve expuesto el músculo (Cakatay y cols., 2003). El daño muscular producido por la reperusión o el estiramiento también inducen una situación de estrés oxidativo asociada a una pérdida de la función muscular (Grisotto y cols., 2000). Por último los músculos pueden experimentar un estrés oxidativo en procesos inflamatorios entre los que se incluyen: miopatías, sepsis, hipertermia maligna y fallo cardíaco (Vider y cols., 2001)

En la Figura 24 se observan los efectos de las ERO. Este modelo sugiere que el estado redox del citosol es una variable fisiológica regulada, de forma que la fibra muscular equilibra su producción de oxidantes frente a su capacidad antioxidante. El modelo presenta un estado redox intracelular óptimo para la generación de fuerza. Cuando el resto de parámetros permanecen constantes, cualquier desviación con respecto a este punto óptimo, desencadena una pérdida de fuerza. Este tipo de relación se mantiene también en otras variables reguladas homeostáticamente, por ejemplo, pH, temperatura u osmolaridad, y son consistentes con lo que se sabe hasta ahora respecto a los radicales libres. En condiciones basales, los músculos no fatigados parecen mantener bajos niveles de oxidantes, óptimos para la contracción. Los antioxidantes, en estas circunstancias, deplecionan los niveles de oxidantes, disminuyendo la cantidad de fuerza. La adición de ERO tiene un efecto bifásico; a medida que los niveles de oxidantes aumentan de forma progresiva, la fuerza aumenta hasta llegar un punto en el comienza a decaer. El estrés oxidativo causado por el ejercicio físico agotador, el daño muscular o algún tipo de enfermedad desplaza la curva hacia la derecha, provocando una disminución de la fuerza. En estas condiciones los antioxidantes tienden a aumentar la fuerza al devolver el estado redox intracelular a su punto óptimo (Reid, 2001)

Figura 24. Representación de los efectos del estado redox celular sobre la fuerza isométrica. El modelo integra datos de músculos fatigados y no fatigados.



A: Estado basal en músculos no fatigados. B: Músculos no fatigados tratados con antioxidantes o agentes reductores. C: Músculos no fatigados expuestos a bajos niveles de ERO. D: Músculos expuestos a una cantidad excesiva de ERO, debido a elevados niveles de exposición a ERO o a una producción acelerada de ERO en músculo fatigados por el ejercicio (Reid y cols., 1993)

4.3.6.2. Efecto de las ERN en la contracción muscular.

4.3.6.2.1. Óxido nítrico.

El NO^\bullet es generado continuamente por el músculo esquelético. Esta molécula de bajo peso molecular cataliza una variedad de señales que regulan procesos intracelulares e interacciones entre células. A niveles bajos, el NO^\bullet , puede tener propiedades antioxidantes oponiéndose a los efectos de las ERO. Pero el NO^\bullet también interacciona con el radical superóxido para generar peroxinitrito, una especie muy tóxica y cuya reactividad sólo se ve superada por el radical hidroxilo. La formación de peroxinitrito promueve el estrés oxidativo y nitrosativo. El metabolismo del NO^\bullet culmina en la acumulación de nitritos y nitratos, dos derivados relativamente estables y que pueden ser medidos en los sistemas biológicos.

El NO^{*} es sintetizado por las óxido nítrico sintasas (NOS), una familia de enzimas que se expresan en músculo esquelético. Las formas constitutivas NOS son dependientes de las concentraciones del Ca⁺² citoplasmático. La isoforma neuronal (nNOS), se localiza en el sarcolema de las fibras musculares rápidas y está asociada al complejo distrofina. La distrofina es una proteína del citoesqueleto que forma, al unirse con una glicoproteína de membrana, un puente de unión entre el citoesqueleto y la matriz extracelular. El complejo distrofina-glicoproteína, previene el daño al sarcolema durante los ciclos repetitivos de contracción muscular transmitiendo las fuerzas generados por los sarcómeros en el interior de la fibra muscular, al tejido conectivo extracelular (Miyagoe-Suzuki y Takeda, 2001).

La isoforma neuronal de la NOS está estratégicamente situada cerca del complejo distrofina-glicoproteína para la transmisión de información del exterior de la célula al interior y viceversa. El Ca⁺² liberado por el retículo sarcoplásmico en respuesta a los potenciales de acción que alcanzan los túbulos transversales, se considera que puede desempeñar un papel en la activación de la nNOS en la cara citoplasmática del sarcolema (Peters y cols., 1997). Curiosamente se han encontrado niveles más elevados de mRNA y de actividad enzimática nNOS en músculo que en cerebro de humano. La NOS endotelial (eNOS) está asociada a la mitocondria, los niveles de eNOS no se correlacionan con el contenido de miosina del músculo. Las células musculares expresan de forma constitutiva nNOS, eNOS, o ambas. Se ha demostrado que tanto las fibras tipo I como las fibras tipo II expresan ambas isoformas de forma constitutiva. Sin embargo los músculos de fibras rápidas expresan una mayor cantidad de nNOS mientras que los músculos de fibras oxidativas están asociados a la expresión de la isoforma eNOS (Kobzik y cols., 1994).

Las enfermedades inflamatorias pueden estimular la expresión de un tercer tipo de isoforma, la inducible (iNOS). En condiciones normales el músculo esquelético presenta bajos niveles de iNOS. La producción de NO^{*} por iNOS no está regulada por Ca⁺² y depende del sustrato. Como la L-arginina es muy abundante en músculo, sus ratios de producción son mucho más elevados que los de las otras dos isoformas. Este hecho exagera la acción del NO^{*} en las células a las que afecta y puede desembocar en un estrés oxidativo o nitrosativo.

Las tres isoformas están reguladas por citoquinas y por los procesos de hipoxia (Gaston y Stamler, 1999). La expresión de la nNOS aumenta por daño por compresión, la actividad muscular y el envejecimiento, mientras que disminuye tras denervación (Tews y cols., 1997). Las isoformas eNOS, tanto vascular como muscular, y nNOS aumentan con el ejercicio físico crónico (Tidball y cols., 1998).

La isoforma iNOS es inducida también durante el ejercicio, como respuesta a la liberación de citoquinas y otros factores (Husain y Hazelrigg, 2002)

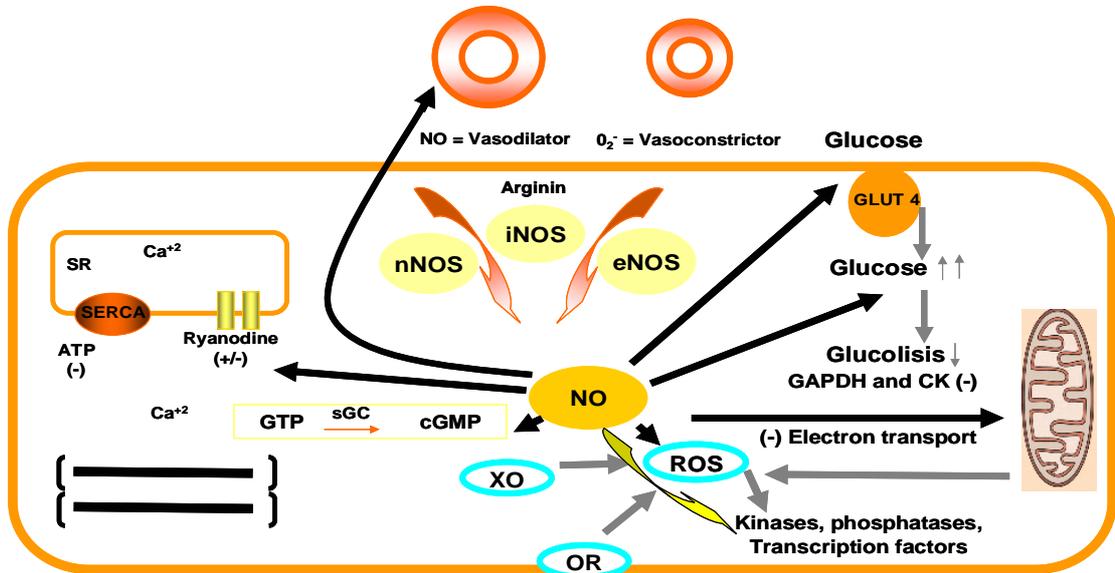
En condiciones normales el NO[•] se genera a bajos niveles durante pequeños períodos de tiempo e interacciona directamente con sustratos biológicos ejerciendo su función como regulador. El NO[•] reacciona principalmente con proteínas y radicales. El NO[•] puede modificar la función de hemo y no hemo-proteínas, como la guanilato ciclasa soluble (sGC), proteínas con clústeres Fe-S, como los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, proteínas con residuos cisteína como el receptor rianodina y la GAPDH; y proteínas que contienen residuos tirosina susceptibles de ser oxidadas y formar radical tiroxilo, como las enzimas de la vía de síntesis de las prostaglandinas (Lorch y cols., 2000). En músculo esquelético, el NO[•] está implicado en la regulación de la contracción, la función mitocondrial, la homeostasis de la glucosa y flujo sanguíneo (Grozdanovic y Baumgarten, 1999).

En la Figura 25 se detalla un esquema de todas estas funciones. Existen evidencias tanto fisiológicas como morfológicas del papel de la guanilato ciclasa soluble como mediadora de, al menos, algunas de estas funciones. En general el NO[•] inhibe la producción de fuerza en músculo esquelético. Otra de sus funciones es la de preservar los depósitos de energía intracelulares promoviendo la captación de glucosa e inhibiendo la glucólisis, la respiración mitocondrial y la degradación del creatinfosfato (Reid, 1998). El mecanismo de acción del NO[•] sobre el transporte de glucosa sigue siendo una incógnita pero parece que el NO[•] puede jugar un papel en la traslocación del GLUT4 del "pool" intracelular al sarcolema en el músculo esquelético (Bradley y cols., 1999). La inhibición de la vía glucolítica por el NO[•] se atribuye, sin lugar a dudas, a la S-nitrosilación del GADPH. Un mecanismo similar es el responsable de la inhibición, por el NO[•] de la CK y de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Boveris y cols., 2000).

Además de con proteínas, el NO[•] reacciona con radicales libres. Por último, otro importante lugar de acción del NO[•] está localizado fuera de la fibra muscular, en los vasos sanguíneos. El NO[•] está implicado en la regulación del flujo sanguíneo en el músculo esquelético durante el ejercicio físico, antagonizando la respuesta vasoconstrictora de la activación simpática (Lau y cols., 1998). El NO[•] se une al grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble e induce un cambio conformacional que activa la enzima. Su producto guanosina monofostato cíclico (GMPc) modula la función de protein kinasas, fosfodiesterasas, canales iónicos y otras dianas fisiológicas importantes. Los ejemplos más importantes incluyen la

regulación del tono muscular liso y la inhibición de la adhesión plaquetaria (Radomski y cols., 1987).

Figura 25. Esquema de las principales dianas del NO* en músculo esquelético.



La isoforma eNOS está relacionada con el desarrollo muscular, el tono vascular y especialmente la función mitocondrial. Esta isoforma se encuentra tanto en la matriz como en la membrana mitocondrial (Bates y cols., 1996). La liberación de NO* por eNOS mejora el flujo sanguíneo y han sido varios los trabajos en los que se han encontrado evidencias de que el NO* regula la respiración mitocondrial por interacciones con la citocromo oxidasa y el complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Clementi y cols., 1999).

4.3.6.2.2. Mecanismos de regulación de la fuerza muscular por las ERO y ERN.

La fuerza muscular puede ser regulada por el estado redox. Las ERO y ERN constituyen señales a las que responden distintas dianas moleculares. La regulación del calcio es una diana importante. Se sabe que las proteínas del retículo sarcoplásmico son sensibles al estado redox. Entre las proteínas del retículo, la rianodina ha sido una de las más estudiadas. Este canal controla los niveles de Ca²⁺ intracelular en el músculo. Varios moduladores endógenos tales

como Mg^{+2} , ATP o la calmodulina afectan la actividad de la rianodina (Meissner, 1994).

Las ERO y otros oxidantes aumentan la aperturas de los canales, promoviendo la salida de calcio del retículo sarcoplásmico. Los antioxidantes y agentes reductores se oponen o revierten la acción de las ERO en el canal. Los efectos del NO^{\bullet} parecen ser dependientes de la concentración. A niveles bajos, los derivados del nitrógeno inhiben la activación oxidativa de los canales. A niveles elevados, el NO^{\bullet} mimetiza la acción de las ERO y estimulan la apertura de los canales. Cada subunidad de esta proteína tetramérica contiene un pequeño número de cisteínas regulatorias. Las ERO y el NO^{\bullet} oxidan los tioles de las cisteínas para formar puentes disulfuro que inducen la apertura de los canales. Estos puentes disulfuro pueden ser revertidos por agentes reductores, proporcionando un mecanismo redox sensible para la modulación de la actividad de los canales. La actividad puede ser también modulada indirectamente, vía redox, por alteraciones en la sensibilidad de los canales a otras proteínas reguladoras como la calmodulina.

Otra diana potencial es la SERCA (ATPasa calcio-dependiente del retículo sarcoplásmico). Esta enzima elimina el calcio del citosol. Un pequeño número de grupos sulfhidrilo cercanos al sitio activo de la SERCA regulan la actividad de la enzima (Daiho y kanazawa, 1994). La ERO inhiben la actividad de la bomba. Por otra parte el estrés oxidativo enlentece la recaptación de calcio al retículo sarcoplásmico (Ishibashi y cols., 1996). La exposición a elevados niveles de NO^{\bullet} también inhibe la actividad de SERCA vía oxidación de tioles y nitración de residuos tirosina (Viner y cols., 1997). En resumen, la oxidación de proteínas del retículo sarcoplásmico inducen un aumento de los niveles de calcio en el citosol. Este efecto puede contribuir a la alteración en la homeostasis del calcio que conduce a la fatiga muscular (Bruton y cols., 1998).

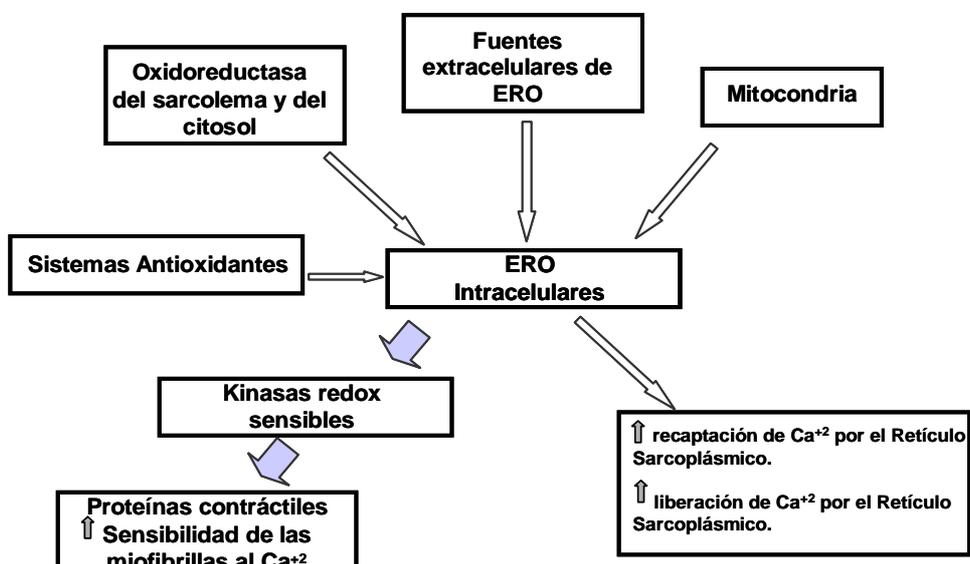
Los miofilamentos musculares también son sensibles a modificaciones redox. Estudios en fibras musculares aisladas indican que la función de los miofilamentos es alterada si se exponen a ERO o a donadores de NO^{\bullet} (Andrade y cols., 1998). Varias proteínas podrían regular esta respuesta. La cadena pesada de la miosina contiene múltiples residuos sulfhidrilo susceptibles. La oxidación de los tioles de la miosina es uno de los mecanismos que media los cambios en las concentraciones de calcio intracelular y de la fuerza. La troponina también muestra sensibilidad al estado redox. La oxidación de residuos sulfhidrilo críticos provoca la activación de la troponina C cardíaca (Chance y cols., 1979). La actina y la

tropomiosina parecen menos sensibles a la modulación por el estado redox (Liu y cols., 1990), mientras que la sensibilidad de la cadena ligera de la miosina ha sido poco estudiada.

Las ERO y el NO^{*} también pueden actuar sobre proteínas reguladoras indirectamente vía segundos mensajeros sensibles al estado redox. El paradigma de esta regulación es la señalización, vía guanosina monofostato cíclico, del NO^{*}. El NO^{*} activa la gualinato ciclasa, aumentando la síntesis de GMPc en el músculo esquelético. En cierta medida, esta vía es la responsable de la disminución de la fuerza provocada por el NO^{*} (Abraham y cols., 1998). Es posible que las ERO también ejerzan efectos indirectos vía modulación reversible de las actividades kinasas y fosfatasas. De esta forma los RL pueden alterar la función de distintas proteínas implicadas en el proceso contráctil.

Las ERO exógenas (Andrade y cols., 1998) y los donadores de NO^{*} (Andrade y cols., 1998) provocan disminución en la fuerza muscular pero sin grandes cambios en los niveles de calcio o de su recaptación por el retículo sarcoplásmico, su efecto en la función de las miofibrillas es más marcado. En los rangos fisiológicos, la función miofibrilar y no el calcio del retículo sarcoplásmico es sensible a los RL. En la Figura 26 presentamos un diagrama del papel de las ERO en el proceso contráctil. Los niveles intra y extracelulares de ERO están en equilibrio con los sistemas antioxidantes. La función de los filamentos contráctiles es más sensible a los cambios en las concentraciones de ERO (flechas gruesas) que las del retículo sarcoplásmico (flechas delgadas). Los cambios mediados por el estado redox en la función miofibrilar puede ser resultado de la activación de protein kinasas u otras vías de señalización sensibles a estrés oxidativo.

Figura 26. Diagrama del papel potencial de las ERO en el proceso contráctil.



El NO[•] disminuye la producción de fuerza en los músculos no fatigados. El efecto del NO[•] puede ser estudiado bloqueando la actividad de la NOS, en cuyo caso, la fuerza de las fibras musculares se ve aumentada. Dadores exógenos de NO[•] tienen un efecto contrario, disminuyen la fuerza de las fibras musculares. La relación del NO[•] en la regulación de la generación de fuerza en músculo esquelético incluye varios mecanismos.

El NO[•] se ha publicado que disminuye la fuerza contráctil por inhibición de la actividad Ca⁺² ATP asa en el retículo sarcoplásmico vía GMP cíclico (Kobzik y cols., 1994). Esta molécula es capaz de interactuar con las cisteínas de la rianodina y disminuir o aumentar la liberación de Ca⁺², dependiendo del estado redox celular (Stamler and Meissner, 2001). Además evoca la hiperpolarización del potencial de membrana, lo que supone una reducción de la generación de fuerza (Parkington y cols., 1993). Por otra parte, la formación de especies oxidantes derivadas del NO[•] como el peroxinitrito pueden provocar nitración de proteínas conduciendo a la degradación de las mismas (Misko y cols., 1998). Por último existen otros mecanismos por los que el NO[•] podría contribuir a la disminución de fuerza en el músculo esquelético. Se sabe que la producción de cierta tasa de radical superóxido es necesaria para la producción de fuerza óptima *in vitro* y para la promoción del acoplamiento excitación-contracción (Reid y cols., 1993). El NO[•] reacciona con el radical superóxido tres veces más rápido que la SOD. Además el NO[•] antagoniza el efecto del superóxido en otros tejidos (Munzel y Harrison, 1999). No está del todo claro, sin embargo, si el descenso en la fuerza mediado por las NOS, deriva directamente de un efecto mediado por el NO[•] o indirectamente de su capacidad para reaccionar con el radical superóxido.

El efecto del NO[•] en músculos fatigados está menos claro. Estudios *in vivo* muestran que la fatiga muscular se acelera por una administración sistémica tanto de donadores de NO[•] como de inhibidores de la NOS. Estos efectos se atribuyen a una disminución del control vascular. Por el contrario, los inhibidores de la NOS muestran muy poco efecto en la fatiga en músculos aislados *in vitro*. Por todo ello no se considera al NO[•] endógeno como uno de los mediadores principales de los eventos intracelulares que disminuyen la fuerza. Los efectos del NO[•] sobre la fatiga muscular, si existen, deben ser indirectos (Reid, 2001).

La fuente del NO[•] en músculo esquelético humano puede estar relacionada con la activación de iNOS en las células musculares o de macrófagos debido al daño (Radak y cols., 1999)

4.3.6.2.3. Papel del NO[•] en las adaptaciones al ejercicio.

Son varios los estudios en los que se ha estudiado la importancia del NO[•] en el ejercicio físico administrando el inhibidor de la NOS, N^ω-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME). En el 2001 Wang y cols. observaron al administrar L-NAME de forma crónica a un grupo de ratas, éstas presentaron una marcada reducción en la velocidad de la marcha en un tapiz rodante, de la sección transversal de sus fibras musculares y de su masa muscular. Con todos estos datos el grupo apuntó hacia un papel del NO[•] en las adaptaciones al ejercicio físico del tejido muscular. Smith y cols. un año más tarde (2002) siguiendo la misma línea, estudiaron el papel del NO[•] en la hipertrofia muscular inducida por la sobrecarga de un grupo muscular al eliminar sus sinergistas. El bloqueo con L-NAME inhibió el efecto de la sobrecarga en la expresión de la de la cadena pesada de la miosina en el músculo plantar. Los resultados de estos trabajos junto con los previos de Tidball y cols. (1998), demuestran el papel de la NOS como transductor de señales que ejerce un control sobre los genes del tejido muscular y confirman el papel del NO[•] en la señalización durante el proceso de hipertrofia.

El inhibidor L-NAME, también ha sido utilizado en humanos. En un estudio de Bradley y cols. (1999) concluyeron la importancia del NO[•] en la regulación de la captación de glucosa por el músculo esquelético, utilizando como modelo humanos durante la realización de un ejercicio físico dinámico. El descubrimiento de que la expresión de las NOS aumentan en músculo tras entrenamiento de resistencia en ratas (Balon y Nadler, 1997) y de que la actividad NOS está reducida en las ratas resistentes a la insulina, sugiere que la actividad física puede tener un papel en la regulación de la actividad NOS y contribuir al metabolismo muscular.

En otros estudios la inhibición se ha centrado en una isoforma concreta de la NOS. Este es el caso del trabajo publicado en el 2002 por Momken y cols. Este grupo estudió el papel de eNOS utilizando como modelo ratones carentes del gen. Los autores observaron que la delección de eNOS modula el perfil energético de los músculos con fibras oxidativas, mientras que los perfiles del músculo cardíaco o con fibras glucolíticas, permanece casi inalterado. La ausencia del gen eNOS induce varias alteraciones anatómicas en los ratones. Los animales presentan una disminución significativa de la longitud de la tibia. Estos resultados coinciden con otros muy recientes que muestran que eNOS está implicada en la regulación local del metabolismo y el crecimiento del hueso al influir en la función de los osteoblastos (Aguirre y cols., 2001). Por otra parte los valores de presión arterial,

en estos animales, muestran un marcado incremento que no se correlaciona con un aumento en el tamaño del corazón (Shesely y cols., 1996). Una interesante aportación de este trabajo es la atrofia muscular, especialmente pronunciada en los músculos con fibras oxidativas y mixtas.

Un resultado muy interesante obtenido de este mismo trabajo es el descenso marcado en la respiración mitocondrial que ocurre en el músculo. Este efecto, unido al descenso en un 40% en la actividad citrato sintasa, sugiere un descenso en la población mitocondrial en los ratones “knockout” de eNOS (Momken y cols., 2002).

Por otra parte la administración crónica de L-NAME en ratas supone un aumento significativo en la presión arterial y la frecuencia cardíaca. Estos cambios fueron acompañados por una disminución de los niveles de NO[•] cardíacos, de la actividad NOS y de las expresiones de iNOS, nNOS y eNOS; lo que indica una inhibición de la síntesis de NO[•] en el corazón. Unos niveles bajos de NO[•] inducen una respuesta contráctil positiva tanto del corazón como de la aorta, lo que supone un aumento de la frecuencia cardíaca y la presión arterial (Iemitsu y cols., 2000). El NO[•] puede regular tanto la adenilato ciclasa como la guanilato ciclasa en corazón y aorta (Vila-Petroff y cols., 1999) y por tanto la presión arterial y la frecuencia cardíaca. Los datos indican además que la administración crónica de L-NAME a las ratas, aumenta de forma significativa los niveles de MDA, grupos carbonilo y actividad xantina oxidasa, lo que indica un aumento de la peroxidación lipídica, oxidación proteica y producción de radical superóxido debido a la inhibición crónica de la NOS.

El estrés oxidativo generado en el sistema cardiovascular por la activación de la xantina oxidasa supone un desbalance en la vía de señalización tanto del NO[•] como de otras vías intracelulares (Lounsbury y cols., 2000) lo que conlleva una respuesta hipertensiva y un aumento en la contracción (Yang y cols., 1998). La administración crónica de L-NAME supuso un descenso significativo del ratio GSH/GSSG, por una depleción de los niveles de GSH y un aumento de los de GSSG en músculo cardíaco. Este mismo efecto a nivel sanguíneo ha mostrado ser un buen marcador de hipertensión (Husain y Hazelrigg, 2002). Es importante destacar el hecho de que la depleción del GSH utilizando butionina sulfoximina (BSO) en ratas supone un aumento de la presión arterial (Vaziri y cols., 2000). La administración crónica de L-NAME también provocó una disminución significativa de las defensas antioxidantes cardíacas y la expresión de proteínas en ratas (Husain y Hazelrigg, 2002)

4.3.6.3. Señalización celular y estrés oxidativo.

La señalización celular es la vía por la que señales extracelulares se convierten en respuestas intracelulares (metabolismo energético, crecimiento, diferenciación, muerte).

Aunque se conocen muchas vías de señalización sensibles al estado redox, ninguna ha sido tan estudiada como la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP Kinasas) y del factor nuclear kappa B (NF-κB). Gran parte de los efectos redox celulares están mediados directa o indirectamente por estas vías que presentan numerosos pasos sensibles a estrés oxidativo.

4.3.6.3.1. La vía de las MAP Kinasas.

La cascada de señalización de las MAP Kinasas está regulada por fosforilaciones y defosforilaciones en residuos serina y/o treonina y responden a la activación de receptores tirosin quinasas, proteínas tirosin quinasas, receptores de citoquinas y de factores de crecimiento.

Cuatro han sido las subfamilias de MAP Kinasas identificadas hasta ahora: JNK/SAP Kinasas (Woodgett y cols., 1996), ERK 1/2, p38 (Han y cols.; 1996) y BMK/ERK5 (Lee y cols., 1995).

Estas vías son estimuladas por una gran variedad de factores de crecimiento y de estrés ambiental y ejercen un papel muy importante en la regulación de la función celular.

La señalización por la vía de las MAP Kinasas implica la fosforilación y activación de las MAP Kinasa Kinasa Kinasa (MAPKKK), las MAP Kinasa Kinasa (MAPKK) y las MAP Kinasa. Las MAP KKKs son reguladas por oligomerización y fosforilación. Las MAPKKs actúan a su vez fosforilando las MAP Kinasas en el ciclo de activación de las quinasas.

La cascada de ERK1/2, fue la primera vía MAP Kinasa de señalización caracterizada en células de mamífero. Es activada principalmente por factores de crecimiento, entre los que se incluye la insulina, factores de crecimiento de la epidermis, factores de crecimiento nervioso y otros factores que promueven la diferenciación celular y el crecimiento (Force y Bonventre, 1998). La cascada de activación de ERK incluye distintas MAPKKKs entre las que se incluye Raf. Raf puede fosforilar y activar MEK1 y/o MEK2 (MAPKKs) que llevan a la fosforilación de ERK1 y /o ERK 2. Las ERKs activadas pueden fosforilar quinasas citoplasmáticas

como p90 ribosomal, RSK2 o MSK1/2. ERK1 y 2 se pueden también traslocar al núcleo donde pueden fosforilar una gran variedad de factores de transcripción (Sakamoto y cols., 2002)

La cascada de señalización de la JNK también puede ser activada por factores de crecimiento; sin embargo, esta cascada está activada de forma más específica por estrés ambiental: luz ultravioleta, citoquinas proinflamatorias, shock osmótico. MAPKK 4 y 7 son las kinasas que fosforilan JNK (Sakamoto y cols., 2002)

La MAPK p38 es activada por un estrés ambiental, como JNK (Han y cols., 1994). La cascada de p38 engloba distintas series de proteínas MAP KKKs, como MKK3 y 6 (Han y cols., 1996).

ERK5 es activada por estrés oxidativo e hiperosmolaridad (Kyriakis y Avruch, 2001) y MEK5 ha sido la kinasa identificada responsable de su activación (Kato y cols., 1997). Sin embargo se conocen pocos detalles sobre la vía de señalización para esta MAP Kinasa (Ver Figura 27)

4.3.6.3.2. Efectos del ejercicio sobre la vía de las MAP Kinasas.

En 1996 se publicó por primera vez que la activación en músculo esquelético de ERK1/ 2, JNK y p38 tras el ejercicio físico (Goodyear y cols., 1996). En los últimos años se ha despertado el interés por el conocimiento de la regulación de estas vías de señalización.

La activación de ERK 1/ 2 en músculo esquelético de rata, ha sido descrita en diferentes modelos de ejercicio: tapiz rodante (Goodyear y cols., 1996; Nader y Esser, 2001), contracciones *in vitro* (Hayashi y cols., 1999; Ryder y cols., 2000), contracciones *in situ* (Sherwood y cols., 1999) y en estiramiento (Boppart y cols., 2001); en músculo de ratón tras ejercicio en tapiz rodante (Dufresne y cols., 2001) y en músculo esquelético en humanos como respuesta a ejercicio físico en cicloergómetro y a una carrera de maratón (Aronson y cols., 1998; Osman y cols., 2000). En cuanto a las kinasas situadas en la vía de activación de ERK1/ 2 por encima de ésta, el ejercicio y la contracción han mostrado incrementos en la actividad tanto de MEK ½ como de Raf 1 (Aronson y cols., 1997). Mientras que por debajo de ERK1/ 2 la activación se ha descrito en RSK2 y MSK1/ 2 (Ryder y cols., 2000).

La activación de ERK 1/ 2 se ha estudiado en miembros individuales (ejercicio en cicloergómetro con una sola pierna). En este modelo se ha observado

que la activación de la vía ocurre en el músculo de la pierna ejercitada. Este dato sugiere que la estimulación de ERK1/ 2 en respuesta al ejercicio en músculo es debido a un efecto local específico del tejido y no a un efecto sistémico (Widegren y cols., 1998).

La activación de la vía de JNK también ha sido descrita en músculo esquelético de rata como respuesta a contracciones *in vitro* (Boppart y cols., 2001), contracciones *in situ* (Aronson y cols., 1997), carrera en tapiz rodante (Goodyear y cols., 1996) y estrés mecánico (Boppart y cols., 2001). En humanos JNK se activa en respuesta a ejercicio en cicloergómetro, contracciones concéntricas y excéntricas de cuádriceps y carrera de maratón (Boppart y cols., 2001). En cuanto a las kinasas situadas en la vía de activación de JNK por encima de ésta, el ejercicio activa MEKK1 y MKK4 en músculo esquelético (Aronson y cols., 1997). Frente a lo que ocurre con ERK 1/ 2 que muestra una activación rápida y pasajera, la activación de JNK se mantiene durante las contracciones musculares *in situ*. Estos resultados sugieren que las proteínas que regulan ambas vías pueden ser diferentes (Aronson y cols., 1997)

Con respecto a p38 se ha visto su activación en músculo de rata tras ejercicio en tapiz rodante (Goodyear y cols., 1996), contracciones *in vitro* (Boppart y cols., 2001), contracciones *in situ* (Nader y Esser, 2001) y estrés mecánico (Boppart y cols., 2001). En humanos se activa tras ejercicio en cicloergómetro y carrera de maratón (Boppart y cols., 2000). La fosforilación de MAPKAPK-2, una proteína situada por debajo de p38 en la cascada, está asociada a cambios en esta MAP Kinasa durante el ejercicio y la contracción (Krook y cols., 2000)

4.3.6.3.3. Consecuencias fisiológicas de la activación de la vía de las MAP Kinasas por el ejercicio.

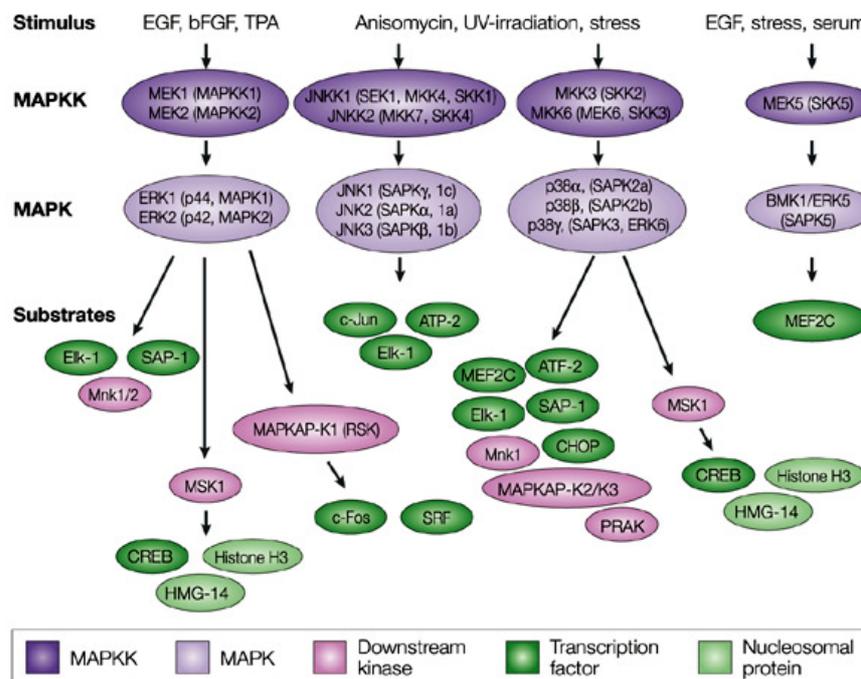
Como hemos visto en el apartado anterior el ejercicio puede activar 3 de las vías de señalización de las MAP Kinasas. La función fisiológica de esta activación ha sido ampliamente estudiada. Se ha relacionado a las MAP Kinasas con el metabolismo de los carbohidratos pero sobre todo con la regulación de la expresión génica.

El control de distintos procesos transcripcionales es una de las funciones más establecidas de su cascada de señalización. Se sabe que las MAP Kinasas pueden traslocarse al núcleo y fosforilar distintos factores de transcripción, tales como: Elk-1, c-Jun, c-Myc, c-Fos, CHOP, ATF2, MEF-2, CREB y SAP-1 (Hazzalin y Mahadevan, 2002)

Pero no sólo pueden regular la transcripción por interacciones directas con factores de transcripción, también pueden activar otros sustratos como RSK2, MAPKAP-2/3, and MSK1/2 que pueden traslocarse al núcleo y fosforilar numerosos factores de transcripción.

El ejercicio físico tiene un elevado impacto en la expresión génica en músculo esquelético pues estimula múltiples vías de señalización relacionadas con las MAP Kinasas que juegan un importante papel en la regulación transcripcional de genes en músculo esquelético (Widegren y cols., 2001)

Figura 27. Vías de activación de las MAP Kinasas.



4.3.6.4. Factor de transcripción redox sensible, NF-κB, en el ejercicio

4.3.6.4.1. Estructura y activación de NF-κB

Muchos factores transcripcionales que actúan en las células aparecen por síntesis *de novo*; en respuesta a procesos de activación génica, que necesitan a su vez la actividad de otros factores transcripcionales preexistentes en la célula, y que

responden a un estímulo dado mediante modificaciones como puede ser unión a ligando, fosforilación, o asociación con subunidades reguladoras. Esta respuesta/activación puede suponer una ganancia en la capacidad de unión a ADN, la modificación de su capacidad como potenciador transcripcional, su desplazamiento al núcleo o una combinación de algunos de estos procesos. Estos factores transcripcionales preexistentes en las células se denominan factores transcripcionales primarios, y son piezas clave en sistemas de respuesta rápida a señales extracelulares, pues las rutas de las que forman parte, suponen generalmente mecanismos de transducción rápida de señales desde el exterior hacia el núcleo celular.

Un factor transcripcional primario muy bien caracterizado es NF- κ B descrito por primera vez como un factor transcripcional de la síntesis de la cadena ligera de la inmunoglobulina Kappa en linfocitos B (Sen y cols., 1986). Se comprobó con el tiempo que en realidad es un factor transcripcional ubicuo, con un mecanismo de activación básicamente único (si se considera al propio factor y a su represor), pero que sin embargo responde a una gran cantidad de señales, y activa también a una importante cantidad de genes, como veremos más adelante. NF- κ B tiene una evidente importancia en el sistema inmune: los tipos celulares de este sistema están constantemente sometidos a la llegada de infinidad de señales de todo tipo, y han de responder con relativa rapidez a ésta señalización para una función adecuada. En este contexto las características de NF- κ B lo hacen un elemento clave. Sin embargo, este factor transcripcional es más conocido por su papel también muy importante en los mecanismos inflamatorios (y con ellos en las patologías con base inflamatoria, entre otras) por ser un elemento pivotal en el inicio y perpetuación de éstos: su respuesta a toda una serie de señalizadores iniciales en estos fenómenos y su capacidad para inducir la síntesis de más mediadores de todo tipo han hecho de este heterodímero y la ruta que lo incluye un foco de atención en la investigación relacionada con todo tipo de enfermedades con base inflamatoria, entre otras.

4.3.6.4.2. Componentes de NF- κ B

La forma activa de NF- κ B en células humanas está formada normalmente por dos subunidades con capacidad de unión a ADN: p50 y p65 (también llamada Rel A). Este heterodímero presenta una elevada afinidad por decámeros de ADN de secuencia consenso 5' GGGRNNYYCC 3', donde R es una purina, Y es una pirimidina y N puede ser cualquier base. Estas secuencias, denominadas sitios κ B,

aparecen una o varias veces en los promotores de genes regulados por este factor transcripcional. Aunque otros factores transcripcionales también forman heterodímeros con miembros de sus familias, sus secuencias de unión suelen ser palindrómicas por tener las diferentes subunidades parecida especificidad de unión.

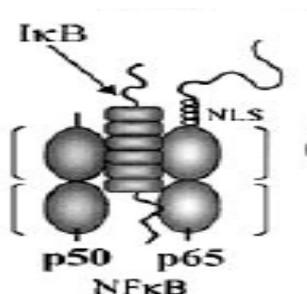
En el caso de NF- κ B esto no ocurre: la evidente asimetría de la secuencia κ B se entiende por las distintas afinidades por el ADN de p50 y p65. Ambas proteínas forman parte de una familia funcional de proteínas (incluyendo las proteínas inhibitoras), por lo que en principio se pueden formar una serie de combinaciones. Sin embargo, las combinaciones p50-p50 o p65-p65 por ejemplo, presentan menor afinidad por el ADN y cinéticas de traslocación al núcleo mucho menores que el heterodímero p50-p65.

Tanto p50 como p65 presentan una región de aproximadamente 300 aminoácidos con la homología mínima necesaria para la unión a ADN y para la dimerización. Como esta región también se observa en el oncogen Rel y en la proteína dorsal de *Drosophila melanogaster*, se denomina a esta región NRD (por NF- κ B/Rel/Dorsal) o RHD (por dominio de homología Rel). La porción N-terminal de esta secuencia es responsable de la capacidad de unión a ADN, y la mitad C-terminal es necesaria para la interacción NRD-NRD, es decir, para mantener el heterodímero. El extremo C-terminal de esta región también está implicado en la interacción con la proteína inhibidora de NF- κ B ($I\kappa$ B) y presenta además la secuencia necesaria para que NF- κ B sea llevado al núcleo cuando se produzca su activación, denominada NLS (por "nuclear location sequence") (Siebenlist y cols., 1994). (Ver Figura 28)

Hasta la fecha se han descrito ocho miembros de la familia de las proteínas NF- κ B/Rel han sido caracterizados. Pueden ser englobados en dos grupos, los encargados de estimular la transcripción: p65/RelA, RelB y c-Rel; y los que tienen como función la unión al ADN: NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100) y las proteínas de *Drosophila* (Dorsal, Dif and Relish) (Liou y Baltimore, 1993).

Las proteínas p105, p100 y Relish contienen múltiples copias de repeticiones ankirina (ANK) que actúan como inhibidores. Los miembros de este grupo dan paso a proteínas de menor peso molecular y más activas que contienen el dominio homólogo Rel (p50 de p105 y p52 de p100) generalmente por un proceso de proteólisis. No funcionan como factores de transcripción excepto cuando forman dímeros con: p65 (RelA), Rel (c-Rel), RelB y *Drosophila* Rel proteínas Dorsal y Dif.

Figura 28. Interacción de NF- κ B con su proteína inhibidora $I\kappa$ B.



La presencia de los principales dominios de interés funcional en los diferentes miembros de las familias Rel e IκB se muestra en la Tabla 21.

En condiciones de reposo, esto es, de no-activación de NF-κB, este factor nuclear está en realidad en forma de heterodímero, pues NF-κB permanece retenido en el citoplasma gracias a la formación de un complejo con su inhibidor, IκB, el otro miembro clave de este sistema de activación transcripcional. IκB presenta a su vez diferentes miembros: IκB-α, β, y (p105), δ (p100), ε y bcl3. De todos ellos, el más importante es sin duda IκB-α por su mayor presencia. Esta proteína inhibidora presenta (en todos los miembros de su familia) secuencias de 33 aminoácidos denominadas dominios de ankirina, normalmente repetidas entre cinco y seis veces, y que son los responsables de la interacción proteína-proteína con las subunidades de NF-κB.

Tabla 21: Componentes y presencia de los principales dominios funcionales de las familias NF-κB/Rel/Dorsal e IκB.

Proteína	Otras denominaciones	Dominios RHD	Dominios NLS	Dominios ANK
P50	NF-κB 1, p105	Sí	No	Sí (p105)
P52	NF-κB 2, p100	Sí	No	Sí (p100)
Rel	c-Rel	Sí	Sí	No

v-Rel	-	Sí	Sí	No
Rel-A	p65	Sí	Sí	No
Rel -B	I-Rel	Sí	Sí	No
Dorsal	-	Sí	Sí	No
Dif, Cif	Dorsal-related inmun. Fact.	Sí	Sí	No
I κ B - α	MAD3, pp40, RL/IFI	No	No	Sí
I κ B - β	-	No	No	Sí
I κ B - γ	p105, pdl, Porción Ct de p105	No	No	Sí
I κ B - δ	p100	No	No	Sí
Bcl-3	-	No	Sí	Sí
Cactus	-	No	No	Sí

Las proteínas de la familia I κ B desempeñan varias funciones. En primer lugar evitan la unión de NF- κ B al ADN. Estas proteínas impiden el desplazamiento de NF- κ B al núcleo, pues al interactuar con éste, mantiene las secuencias de localización nuclear del factor transcripcional ocultas. Se ha demostrado que mutaciones en los dominios NLS de NF- κ B impiden la unión de éste con I κ B, lo que sugiere la existencia de una interacción física en esta misma zona de NF- κ B.

Por otra parte I κ B desestabiliza los complejos NF- κ B-ADN una vez formados éstos (importante capacidad, pues serán moléculas de I κ B sintetizadas *de novo* las responsables de la terminación del efecto de activación génica, en un ejemplo de retroinhibición)

Un miembro de esta familia, bcl3, es también capaz de actuar como un factor transcripcional: actúa como inhibidor uniéndose a dímeros p50p50, pero sin embargo, si se asocia a dímeros p52-p52 les confiere una mayor capacidad como activadores transcripcionales

4.3.6.4.3. Rutas de activación de NF- κ B

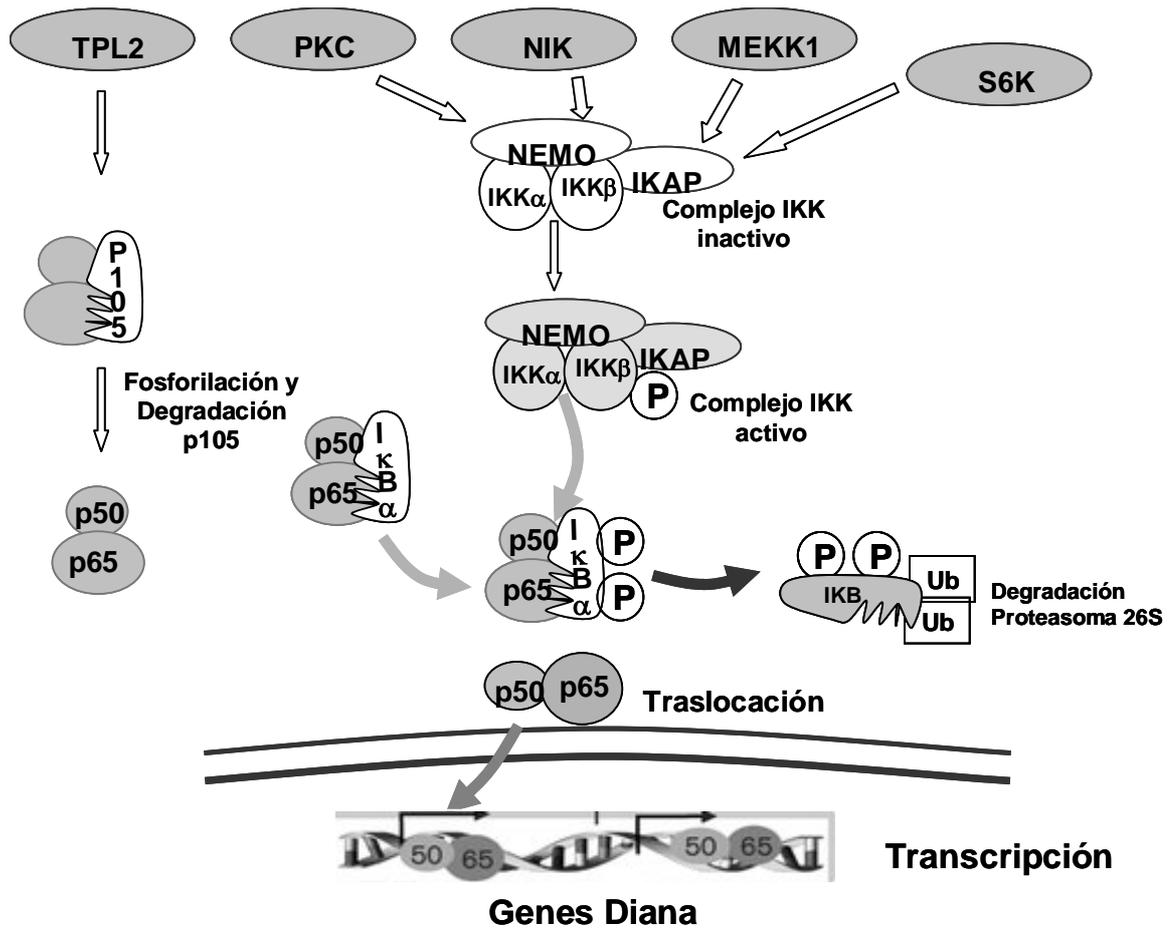
a) Translocación de NF- κ B al núcleo.

Como hemos visto, en condiciones basales, NF- κ B permanece retenido en el citoplasma gracias a la interacción con I κ B. Cuando se produce la señalización, I κ B- α resulta fosforilada en dos residuos de serina (Ser 32 y Ser 36 o Ser 19 y Ser 23 en I κ B - β) cercanos a la porción N-terminal de la secuencia de estas proteínas. Parece que existe el prerrequisito de una fosforilación constitutiva en la porción C-terminal mediada por la casein quinasa II. Una vez fosforilada en estos residuos específicos, I κ B es ubiquitinada en residuos de lisina, cercanos de nuevo a la porción N-terminal (Lys 21 y Lys 22), lo que conlleva el reconocimiento por el proteosoma 26s, que a continuación degrada a estas moléculas de I κ B marcadas. Esta degradación implica el desenmascaramiento de las secuencias de localización nuclear de NF- κ B, con lo que es traslocado al núcleo, donde se unirá a los elementos κ B de los promotores de los genes modulados por este factor transcripcional.

b) Fosforilación específica de I κ Bs.

En los últimos años han aparecido toda una serie de trabajos que han ido elucidando el mecanismo "upstream" en la ruta de NF- κ B, centrándose sobre todo en el papel de las moléculas responsables de la fosforilación específica de las proteínas de la familia I κ B: estas proteínas son las llamadas kinasas de I κ B (IKK's). IKK- α (que fosforila los residuos S32 y S36 de I κ B) e IKK- β (que fosforila los residuos S23 y S19 de I κ B- β) son activados por importantes inductores de NF- κ B como TNF- α IL1- β (Mercurio y cols., 1997), con lo que se asociaron con toda probabilidad a esta ruta de señalización (Stancovski y cols., 1997). Estas IKK se purificaron en principio como una proteína de 700 kDa, dado que en realidad forman parte de un complejo multiproteico denominado IKK signalsoma, que fue resuelto mediante estudios de purificación y ensayos de doble híbrido en levadura buscando proteínas que interaccionan con NIK (kinasa inductora de NF- κ B, modulador "upstream" de esta ruta, uno de los primeros en ser descrito). De este modo se sabe que, además de IKK (cualquiera de las dos subunidades catalíticas: IKK α o IKK β), este complejo contiene una subunidad reguladora llamado NEMO (por "modulador esencial de NF- κ B") o IKK-y y finalmente IKAP (por "proteína asociada al complejo IKK"), que parece actuar como mantenedor físico de la estructura.

Figura 29. Mecanismos de regulación de la activación de NF- κ B.



En condiciones fisiológicas, este complejo estaría formado por las dos subunidades catalíticas (tanto IKK α como IKK β) que mediarán la fosforilación de I κ B- α ó β , dos subunidades NEMO, encargadas al parecer de interactuar específicamente con las proteínas que activan a este complejo, e IKAP (Zandi y cols., 1999). Se representa esquemáticamente los componentes conocidos de esta ruta en la Figura 29.

Estudios llevados a cabo en ratones *knock out* para IKK α o IKK β han mostrado que la activación de todo este complejo implica la fosforilación de las subunidades catalíticas (Li y cols., 1999).

Aunque se han hecho grandes progresos en la resolución de la ruta completa desde el exterior, se conoce hasta hoy poco más que algunas cinasas implicadas, cuyo número va creciendo con el nivel de conocimiento; de ellas la mejor caracterizada es probablemente NIK, que responde a estímulos pro-inflamatorios como TNF α o IL1 (Ver Figura 29), pero también se ha identificado otra serie de cinasas cuya activación media la traslocación de NF- κ B al núcleo a través del complejo IKK: protein kinasa C (PKC), MEKK1 o kinasa S6 son algunos de las más recientes cinasas implicadas de manera putativa en esta ruta.

Finalmente, se ha propuesto un mecanismo alternativo en la activación de NF- κ B que no implica la fosforilación y degradación de I κ B según el cual, una señal mediada por la kinasa TPL2 provocaría la proteólisis de una subunidad p105 (formada en realidad por una molécula de p50 unida en su secuencia a una molécula de I κ B), que formaría parte de un dímero con p65. Esta señal implicaría la separación de p50 y p65 (NF- κ B) del inhibidor, con lo que el primero se desplaza al núcleo (Ver Figura 30).

4.3.6.4.4. Agentes inductores y genes regulados por NF- κ B

NF- κ B es descrito a menudo como un mediador central en la respuesta inmune y en ciertas respuestas a estrés en humanos. Esta denominación se empieza a entender si nos atenemos al número de agentes inductores y al número de genes diana (Ver Tabla 22) de este factor transcripcional: hasta el momento se han descrito aproximadamente 150 agentes inductores de NF- κ B entre moléculas y ciertos agentes físicos. Por otra parte, se conoce más de 800 genes regulados por NF- κ B, bien de manera putativa, porque al ser secuenciados se ha encontrado en sus promotores motivos de unión de este factor transcripcional, o bien porque se ha demostrado directamente su activación al observar su transcripción o traducción en combinación con ensayos de la presencia de NF- κ B en núcleo (Ver Tabla 23). La mayoría de las proteínas codificadas por estas secuencias participan de una manera u otra en la defensa inmune, crecimiento, regulación del metabolismo y sistemas de protección contra diferentes condiciones de estrés.

Tabla 22. Selección de agentes inductores de la activación de NF- κ B.

BACTERIAS	ESTRÉS FISIOLÓGICO	MEDIADORES FISIOLÓGICOS
Helicobacter pilori Micobacteria Gardnerella vaginalis Lactobacilli Micobacteria tuberculosis	Adhesión Hemorragia Hiperoxia Proteinuria Reoxigenación Regeneración hepática	Bradiquinina Leucotrieno B4 PAF
PRODUCTOS BACTERIANOS	ESTRÉS FÍSICO	PROTEÍNAS MODIFICADAS
Lipopolisacárido Endotoxina estafilocócica Lipoproteínas de membrana	Ejercicio Radiación Ultravioleta Radiación Gamma	LDL oxidadas Fragmento de Proteína amiloide (bA4) Componente No-beta amiloide de la enfermedad de Alzheimer
VIRUS	ESTRÉS OXIDATIVO	SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS
Adenovirus Hepatitis B HIV-1 Influenza Virus Rhinovirus Herpes Simplex Virus -1	Peroxido de hidrogeno Ceruleína Butil Peroxido Ozono Peroxinitrito Pervanadato Reoxigenación	Receptor de eritropoyetina Ig cadena pesada
PRODUCTOS VIRALES	AGENTES AMBIENTALES	RECEPTORES DE LIGANDO
ARN de doble cadena Adenovirus 5: E1A HIV-1: Nef HIV-1: Tat HBV: HBx	Humo de tabaco Níquel Manganeseo Hierro Cobalto	Antígeno (IgM-Ligand) CD2-Ligand CD3-Ligand
CITOQUINAS INFLAMATORIAS	DROGAS DE USO TERAPÉUTICO	MEDIADORES APOPTÓTICOS
CD30 THANK IL-1 TNF α IL-2 TNF β IL-12 LIF IL-15 IL-18 IL-17	Tamoxifeno Aloperidol Bleomicina Azidotimidina (AZT)	Anti-Fas/Apo-1 Trail
AGENTES QUÍMICOS	MEDIADORES FISIOLÓGICOS	MITÓGENOS, FACTORES DE CRECIMIENTO Y HORMONAS
Etanol Ácido linoleico Nicotina	Adenosine Albumina Angiotensina II L-Glutamato Heat shock protein 60 Heat shock protein 25	Insulina Hormona de crecimiento Suero Esteroides

Tabla 23 : Selección de genes regulados por NF- κ B.

I. Introducción

GEN	FUNCIÓN	GEN	FUNCIÓN
Citoquinas/Quimiocinas		Inmunoreceptores	
CINC-1	Quimiotaxis neutrófilos	BRL-1	iB-cell homing receptor
*CXCL 11	Chemo. ligand para CXCR3	CCR5	Chemokine receptor
Eotaxina	Beta Chemo, eosinfil-especifico	CCR7	Chemokine receptor
Gro a-g	Melanoma estim actividad	CD137	TNF-like receptor
IFN-g	Interferon	CD154	CD40 ligand
IL-1a	Interleu-1a	CD40	TNF-receptor family member
IL-1b	Interleu-1b	CD40 ligand	Ligand for CD40
IL-1 receptor antagonist	Inhibitor of IL-1 activity	CD48	Antigen of stimulated lymphocytes
IL-2	Interleu-2	CD83	T-cell development molecule
IL-6	Interleu-6, inflam citoq	Fc epsilon receptor II (CD23)	Receptor for IgE
IL-8	Interleu-8	IL-2 receptor a-chain	IL-2 receptor subunit
*IL-9	Interleu-9	Immunog Cgamma1	IgG heavy chain
IL-10	Interleu-10	Immunog gamma4	IgG heavy chain
IL-11	Interleu-11	Immunog e heavy chain	IgE heavy chain
IL-12 (p40)	Interleu-12	Immunoglobulin k light chain	Antibody light ch
IL-13	Interleu-13	Invariant Chain I _l	
*IL-15	Interleu-15		
TNF-α	Tumor Necrosis Factor.		
Virus		Factores de crecimiento	
Adenovirus (E3 region)	Adenovirus	G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
Avian Leucosis Virus	Causa avian leucosis	GM-CSF	Granulocyte Macrophag Colony Stimulating Factor
Bovine Leucema Virus	Causa bovine leucemia	EPO	Erythropoietin
CMV	Citomegalovirus	*IGFBP-1	Insulin-like growth factor binding protein-1
EBV (Wp promoter)	Epsterin-Barr virus	IGFBP-2	Insulin-like growth factor binding protein-2
HBV (pregenomic promoter)	Hepatitis B virus	M-CSF (CSF-1)	Macrophag Colony Stimulating Factor
HIV-1	Human inmunodeficiencia virus	NK-1R	Neurokinin-1 Receptor
HSV	Herpes simpl virus	PDGF B cadena	Platelet-Derived Growth Factor
JC Virus	Polioma virus	Proenkephalin	Hormone
HPV type 16	Human Papillomavirus	*Thrombospondin-2	Matrix glycoprotein t
SIV	Simian inmunodeficiencia virus	VEGF C	Vascular Endothelial Growth Factor
SV-40	Simian virus 40		
Moléculas de adhesión		Factores de transcripción	
DC-SIGN	Dendritic cell surface C-type lectin	A20	TNF-inducible zinc finger
ELAM-1 (CD62E, E-selectin)	E-selectin, endothelial cell leukocyte adhesion molecule	c-myb	Proto-oncogene
Endoglin	Endothelial cell membrane glycoprotein	c-myc	Proto-oncogene
Fibronectin	Extracellular attachment	c-rel	Proto-oncogene
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1	IRF	Interferon regulatory factor
MadCAM-1	Mucosal addressin cell adhesion molecule	IκB -α	Inhibitor of Rel/ NF-κB
P-selectin	Platelet adhesion receptor	junB	Proto-oncogene
Tenascin-C	ECM protein controls cell attachment and migration, cell growth	Mail	IκB -like protein
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule	nfbk2	NF-κB p100 precursor
		nfbk1	NF-κB p105 precursor
		NURR1	Nuclear orphan receptor
		p53	Tumor suppressor
		relb	Transcription factor
		Stat5a	Transcription factor
		WT1C	Zinc finger transcription factor
			Rat homologue of IEX
			Non-proteasome multi-ubiquitin cadena binding protein

GEN	FUNCION	GEN	FUNCION
Proteínas en fase aguda		Reguladores apoptosis	
Angiotensinógeno	Precursor del a angiotensina	Bfl1/A1	Homólogo de Bcl-2
beta-defensin-2	regula presión arterial	Bcl-xL	Pro-survival Bcl-2
Proteína de union	Péptico Anti-microbial	Bcl-2	homologue
Proteína de Unión C4b	Proteína de Unión del Complemento	Caspase-11	Pro-survival factor Caspase
Factor B Complemento	Factor del Complemento	Nr13	Pro-survival Bcl-2
Factor C4Complemento	Activa vías extrínsecas de la vía del complemento	c-FLIP	homologue
C-reactive protein	Pentraxin	CD95 (Fas)	Pro-survival factor
Lipopolysaccharide binding protein	Une al receptor LPS (CD14) con LPS	*Fas-associated phosphatase-1	Pro-apoptotic receptor
Pentraxin PTX3	Pentraxina	Fas-Ligand	Protein phosphatase
Proteínas A amiloides del suero	Componentes del suero	IAPs	Inducer of apoptosis
Factor-1 del tejido	Activa vías extrínsecas del complemento	IEX-1L	Inhibitors of Apoptosis
Activador plasminógenos tipo Urokinasa	Activa fibrinógeno	TRAF-1	Immediate early gene
		TRAF-2	TNF-receptor associated factor
			TNF-receptor associated factor
Genes de respuesta a estrés		Genes de respuesta temprana	
Angiotensin II	Peptide hormone	*B94	Early response gene
CYP2C11	Cytochrome p450	*Egr-1	Mitogen-induced early response gene; zinc finger
COX-2	Cyclooxygenase, prostaglandin endoperoxide synthase	p22/PRG1	Rat homologue of IEX
Ferritin H cadena	Iron storage protein	*p62	Non-proteasomal multi-ubiquitin chain binding protein
*5-Lipoxygenase	Arachidonic acid metabolic enzyme, leukotriene synthesis	*TIEG	TGF-b early response gene; zinc finger protein
12-Lipoxygenase	Arachidonic acid metabolic enzyme		
Inducible NO-Synthase	NO synthesis		
*MAP4K1	Activator of stress-induced protein kinase pathway		
Mn SOD	Superoxide dismutase		
NAD(P)H oxidoreductase (DT-diaphorase)	quinone Bioreductive enzyme (DT-)		
Phospholipase A2	Fatty acid metabolism		
Receptores de superficie Celular			
A1 adenosine receptor	Pleiotropic physiological effects		
Amiloride-sensitive sodium channel	Sodium channel		
*CD23	Celul-surface molecule		
CD69	Lectin mainly on activated T celuls		

I. Introducción

GEN	FUNCION	GEN	FUNCION
Enzimas		Miscelánea	
ADH	Liver alcohol dehydrogenase	alfa-1 acid glycoprotein	Serum protein
ARF-related protein-1	GTPase	AMH	Anti-Mullerian hormone
*Ceramide glycosyltransferase	Glycosphingolipid	Apolipoprotein C III	Apoprotein of HDL
*cis-retinoid/androgen dehydrogenase type 1	Short cadena dehydrogenase	*Biglycan	Connective tissue proteoglycan
*cis-retinoid/androgen dehydrogenase type 2 (CRAD2)	Short cadena dehydrogenase	*Caveolin-1	Lipid raft protein
Collagenase 1	Matrix metalloproteinase	Cyclin D1	Celul-cycle regulation
*Dihydrodiol dehydrogenase	Oxidoreductase, oxidation of trans-hydodiols	*Cyclin D3	Celul-cycle regulation
*ENO2	Enolase 2 gamma	Factor VIII	Hemostasis
*GAD67	Glutamic acid decarboxylase	Gadd45beta	ADN repair/celul cycle
GD3-synthase	Sialyltransferase	Galectin 3	b-galactosidase-binding lectin
Gelatinase B	Matrix metalloproteinase	epsilon-Globin	Globin protein
GSTP1-1	Glutathione S-transferase	*GS3686	Homology to microtubule aggregating protein
*Glucosel-6-phosphate dehydrogenase	Hexose monophosphate	HMG14	High mobility group 14
*HO-1	Hemeoxygenase	K3 Keratin	Intermediate filament protein
Hyaluronan synthase	Synthesizes hyaluronic acid	Laminin B2 Cadena	Basement membrane protein
H+-K+ATPase alfa2	Role in potassium homeostasis	Mts1	Multiple tumor suppressor
Lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS)	Prostaglandin D2 synthase in brain	Mucin (MUC-2)	Airway defense glycoprotein
Lysozyme	Hydrolyzes bacterial cel walls	*Pax8	Paired box gene
Mmp-9, metalloproteinaase-9	matrixSecreted gelatinase involved in metastasis	*PCBD	6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	Perparain	Pore-paraming effector molecule
PIM-1	Ser/Thr kinase	*PGK1	Phosphoblycerate kinase
*PTGIS, prostaglandin synthase	Prostaglandin synthase	Pregnancy-specific glycoprotein rncGM3	Placental expression
Serpin 2A	Serine protease	Prostate-specific antigeno	Serum protein in prostate cancer
TERT (mouse)	Telomerase catalytic subunidad	*UBE2M	Ubiquitin conjugating enzyme E2M
Transglutaminase	Params isopeptide bonds	*UCP-2	Uncoupling protein-2
*Xanthine Oxidase	Oxidative metabolism of purines	Vimentin	Intermediate filament protein
		Wilm's Tumor Suppressor Gene	Tumor suppressor

* Indica genes que contienen secuencia/s KB en su promotor, pero que todavía necesitan la comprobación funcional de su activación por NF-κB)

4.3.6.4.5. NF- κ B como mediador central de las respuestas a estrés

NF- κ B no solamente responde a bacterias, virus o sus productos. Como se puede ver en la Tabla 22, existen otros muchos agentes inductores: diferentes factores desencadenantes de estrés como situaciones de isquemia/reperfusión, shock hemorrágico, radiaciones UV, o agentes que provocan situaciones de estrés oxidativo (que veremos en detalle en el próximo punto de esta Introducción). De este modo, se puede concluir que además de un importante mediador en la respuesta inmune, NF- κ B también está implicado de una importante manera en la mediación de las respuestas a diferentes tipos de estrés.

Por otra parte, si observamos los genes inducidos por NF- κ B (Ver Tabla 23), encontramos un gran número de ellos implicados también en la respuesta a diferentes situaciones de estrés, como proteínas de respuesta aguda, o enzimas como la iNOS o COX-2. En este contexto parece beneficioso que toda una serie de genes implicados en la respuesta a estos episodios de estrés respondan a un factor nuclear, de modo que de una manera rápida y eficiente se induce la aparición de moléculas implicadas en aliviar esas condiciones de estrés. (Pahl y cols., 1999).

4.3.6.4.5.1. Evidencias de la modulación de NF- κ B por mecanismos redox.

Conforme los mecanismos moleculares necesarios para la traslocación al núcleo de NF- κ B (por ejemplo, la fosforilación en sitios específicos de I κ B) fueron siendo descritos, surgió la evidencia de que en muchos casos, las situaciones de estrés oxidativo estaban implicadas de alguna manera entre los mecanismos moduladores de la activación de este factor transcripcional. Con ello, a lo largo de estos últimos años, se ha producido una interesante polémica con la cuestión de fondo de si NF- κ B es activado por agentes oxidantes de un modo universal, o si es más bien un mecanismo específico de cada tipo celular y/o de cada tipo/agente de inducción.

De este modo, se propuso inicialmente un modelo según el cual, diferentes agentes causantes de desequilibrio oxidativo serían capaces de activar a NF- κ B. Esta hipótesis se basó en varias evidencias:

1. Activación de NF- κ B por H₂O₂

Scherck y colaboradores (Scherck y cols., 1991) junto con el grupo de Herzenberg (Roederer y cols., 1990) fueron los primeros en proponer a las especies reactivas oxidantes como segundos mensajeros en diferentes rutas activadoras de NF- κ B, basándose en el hecho de que la adición de H₂O₂, agente oxidante por sí mismo, activaba a NF- κ B en cultivos de células Jurkat. Esta activación era bloqueada si al medio también se añadían agentes antioxidantes directos (NAC o PDTC), tanto si la inducción era provocada por H₂O₂ como por otros tipos de moléculas, como por ejemplo el TNF- α .

Sin embargo, con el tiempo ha ido surgiendo una importante discrepancia en el sentido de no considerar a H₂O₂ como un activador o mediador universal de NF- κ B, pues ya hay un elevado número de trabajos que muestran la insensibilidad de diferentes tipos celulares a la activación de NF- κ B por H₂O₂ (Bowie y cols., 2000), dando mayor importancia en este aspecto a otros tipos de agentes oxidantes, como por ejemplo peróxidos lipídicos. Otros autores proponen un mecanismo indirecto por el que H₂O₂ sí tendría un papel más o menos activo, según el cual, cierta concentración de GSSG sería necesaria para sensibilizar a algunos tipos celulares en la ruta de señalización de NF- κ B, de modo que H₂O₂ permitiría la existencia de estos niveles umbral de GSSG (Galter y cols., 1994).

En cualquier caso, el daño oxidativo inducido por H₂O₂ (o GSSG) bien por modificación de proteínas o por daño sobre el ADN es probablemente un importante agente desencadenante de activación de NF- κ B. Existen evidencias de que compuestos que inician daños oxidativos en el ADN, como la daunorubicina, inician procesos de señalización distintos de los iniciados por citocinas en la activación de NF- κ B.

2. Producción de especies oxidantes en respuesta a activación de NF- κ B

Para que un modelo de activación de NF- κ B por estrés oxidativo sea verificable, agentes estimuladores de este factor transcripcional deben también mostrar un incremento intracelular de especies oxidantes. Este fenómeno ya ha sido descrito en diferentes casos, ya que IL-1 y TNF- α se han mostrado capaces de provocar un incremento de agentes oxidantes en cultivos de fibroblastos humanos.

De un modo similar, el LPS (lipopolisacárido) provoca la producción de H_2O_2 en linfocitos B. En estos casos, se deduce que existe liberación de moléculas oxidantes en respuesta a agentes proinflamatorios. Sin embargo, de nuevo aquí existe controversia. De acuerdo con otros trabajos (Bowie y cols., 2000), esta producción de ERO no sería un fenómeno común a todos los tipos celulares, sino algo concreto, dependiente del estímulo y del tipo celular.

3. Inhibición de NF- κ B por agentes antioxidantes.

Una de las principales evidencias a favor de la modulación redox de NF- κ B ha sido la inhibición de su activación por compuestos de reconocida actividad antioxidante *per se*, especialmente dos casos: NAC y Pirrolidin ditiocarbamato (PTDC). La NAC es un antioxidante que actúa incrementando los niveles intracelulares de GSH al funcionar como dador de cisteína, pero que además, funciona como neutralizador directo de especies oxidantes como los ya mencionados H_2O_2 , HO^\cdot , o HOCl. Más adelante, en este mismo apartado veremos el mecanismo molecular postulado para la actividad inhibitoria de la NAC sobre NF- κ B (Schreck y cols., 1992).

El PDTC pareció en un principio ser un inhibidor general de NF- κ B. Como ditiocarbamato, el PTDC presenta propiedades tanto antioxidantes como quelante de metales. Este carbamato es capaz de penetrar en las células, por lo que ha sido ampliamente utilizado en modelos celulares en cultivo. De nuevo el grupo de Scherck (Schreck y cols., 1992) mostró una actividad inhibitoria de la activación de NF- κ B frente a todo un abanico de diferentes agentes (IL-1, TNF- α , LPS o H_2O_2). De esta forma se mostraban más evidencias del papel central de los oxidantes en la modulación de la actividad de NF- κ B.

Como en el caso de la NAC, se han ido mostrando evidencias de la dependencia del tipo celular y del agente activador en la inhibición por PDTC.

Existen otros compuestos de actividad antioxidante implicados de manera putativa en la modulación de las rutas de activación de NF- κ B. Estos compuestos se representan esquemáticamente en la Tabla 24.

Tabla 24: Compuestos implicados en la modulación de la activación de NF- κ B.

MOLÉCULAS	MOLÉCULAS
Acido lipoico	Gamma-GCS
α -tocoferol	Glutación
Curcumin (Diferulolilmetano)	IRFI 042 (Análogo de la Vitamina E)
Zumo de manzana	L-cisteina
Manganese superoxide dismutase (Mn-SOD)	Melatonina
Porrolinditiocarbamato (PDTC)	N-acetil-L-cisteina (NAC)
Dietilditiocarbamato (DDC)	Vino tinto
Dimetilsulfoxido (DMSO)	Vitamina C

4. Efecto de enzimas moduladores del estado redox sobre NF- κ B.

Otra línea de evidencia en la regulación de la actividad de NF- κ B por estrés oxidativo se obtiene a través del estudio de la influencia de las alteraciones en diferentes actividades enzimáticas moduladoras del status redox celular sobre la activación de NF- κ B. Schreck y colaboradores (Schreck y cols., 1991) mostraron que la sobreexpresión de la SOD, potenciaba el efecto activador de NF- κ B por parte de TNF- α en cultivos de células MCF-7. Esta observación fue tomada como una prueba más de la implicación de H₂O₂ como segundo mensajero oxidativo en la activación de este factor transcripcional, puesto que el producto de la reacción de la SOD es precisamente H₂O₂.

Otro trabajo ha aportado más pruebas en este sentido, pero mediante la acción contraria: la sobreexpresión de la enzima catalasa, consumidora de H₂O₂. Ésta inhibe el efecto de TNF- α . De nuevo estos resultados parecen dependientes del tipo celular utilizado, pues existen evidencias de la falta de influencia de estas mismas condiciones sobre otras líneas celulares (Suzuki y cols., 1995).

Recientemente, se ha conocido el papel de la glutatión peroxidasa de hidroperóxidos fosfolipídicos, en la atenuación de ciertas rutas de activación de NF- κ B (Flohé y cols., 1997). Este papel estaría de acuerdo con la noción de que los peróxidos lipídicos tendrían una importancia mayor que el H₂O₂ como especies

oxidantes implicadas en la modulación de la actividad de NF- κ B, pues este tipo de peroxidasas reducen hidroperóxidos lipídicos. Además de la eliminación de su producto, la actividad de estas peroxidasas también podría inhibir la actividad de lipoxigenasas, que requieren una concentración umbral de estos hidroperóxidos lipídicos. Flohé y colaboradores (Flohe y cols., 1997) especulan que, dado que existe una relación evidente entre NF- κ B y los sistemas consumidores y generadores de H₂O₂, a la vez que existen cada vez más pruebas en contra del papel de esta última molécula como segundo mensajero, se debería considerar a los peróxidos lipídicos como el intermediario oxidante clave en estos procesos de activación.

Sea como fuere, lo que parece evidente es que en ningún caso la activación de ninguno de los enzimas moduladores del “status redox” celular es capaz de activar a NF- κ B por sí solo. En todas las circunstancias necesitan la presencia de estimuladores fisiológicos de NF- κ B, como TNF- α , o IL-1.

4.3.6.4.5.2. Modelos moleculares de activación de NF- κ B por agentes oxidantes.

En este punto contiene una revisión de los modelos propuestos hasta la fecha para explicar la relación molecular entre especies oxidantes y la activación de NF- κ B. Hasta el momento se han propuesto una serie de modelos basados en la acción de diferentes moléculas implicadas en los fenómenos de estrés oxidativo:

1. Modulación en las kinasas de I κ B (IKKs)

En los últimos años han aparecido una serie de trabajos que podrían explicar una activación de NF- κ B en ciertos modelos de estrés oxidativo mediante radiación ionizante. Se ha observado que la exposición a radiaciones ionizantes, pero no a luz ultravioleta, provoca la activación de NF- κ B vía activación de IKKs (las kinasas responsables de la fosforilación de I κ B), con lo que esta radiación ionizante provoca la degradación de I κ B (Li y Karin, 1998). Ambos tipos de estrés provocan la activación de NF- κ B, pero sólo en el primer caso se observa fosforilación y degradación de la proteína inhibidora. En el caso de la luz UV, se ha comprobado que puede inducir la traslocación de NF- κ B por mecanismos dependientes y por mecanismos independientes de IKKs.

Otros autores proponen un modelo adicional de regulación de la actividad de IKKs por otro mediador oxidativo, típicamente implicado además en procesos inflamatorios, el NO[•]. Se ha propuesto que concentraciones elevadas de NO[•] inhiben a NF-κB mediante nitrosilación directa en la cisteína 62 de la subunidad p50 de NF-κB, que en este caso evitaría la unión del factor nuclear al ADN, bloqueando por tanto su actividad aun estando éste en el núcleo (Matthews y cols., 1996).

Sin embargo, no sólo se ha propuesto una actividad nitrosilante directa sobre p50 responsable de cierta modulación de la activación de NF-κB. En este sentido se ha propuesto que NO[•] también podría nitrosilar residuos de cisteína en IKKs: análisis de secuencia han mostrado múltiples residuos de cisteína en los dominios kinasa de IKKs. La nitrosilación en respuesta a bajas concentraciones de NO[•] de estas cisteínas parece aumentar la capacidad fosforiladora de las kinasas de IκB, con lo que en este caso estaríamos ante un efecto contrario de NO[•], la activación de NF-κB (Regnier y cols., 1997).

Este modelo propone pues, que bajas concentraciones de NO[•] sintetizado suponen una señal de amplificación de la respuesta inflamatoria, que se ve bloqueada cuando la concentración de NO[•] termina por inhibir la activación de NF-κB independientemente del agente activador.

El complejo IKK también podría ser sensible a las variaciones en los niveles de GSH o GSSG intracelulares, aunque permanece sin aclarar si serían elevados niveles de GSSG los que activarían a IKK, o por el contrario, elevados niveles de GSH mantendrían inhibida la actividad IKK (Rahman y MacNee, 2000)

2. Modulación en la señalización y degradación de IκB.

Otro punto propuesto para la modulación de la activación de NF-κB es el de la ubiquitinación/degradación de IκB, en este caso en respuesta a alteraciones en la concentración intracelular de glutatión o de su forma oxidada, GSSG.

Es un hecho contrastado que situaciones de estrés oxidativo que implican la aparición de productos de peroxidación lipídica, o desaparición de GSH (con la consecuente aparición de GSSG), provocan la rápida fosforilación, ubiquitinación, y finalmente degradación de IκB. Es precisamente uno de estos puntos, el de la ubiquitinación y/o degradación de la proteína inhibidora el que podría ser sensible al status redox mediante el sistema glutatión.

La formación de conjugados ubiquitin-proteína (una forma de señalización celular normalmente incluida en procesos de degradación específica de proteínas en contextos de señalización o por recambio) requiere la acción de tres componentes para participar en la serie de reacciones de transferencia de ubiquitina. Estos tres componentes son el enzima activador de ubiquitina (E1), el encargado de la transferencia (E2) y finalmente una ubiquitina ligasa (E3). Es este último el que confiere especificidad de sustrato proteico a estas reacciones de ubiquitinación. En el caso que nos interesa, es una ubiquitina ligasa denominada E3RS¹ I κ B la que interacciona específicamente con proteínas de la familia I κ B sólo cuando éstas se presentan fosforiladas en los residuos de Ser-32 y Ser-36 (es decir, cuando la ruta de activación de NF- κ B está en funcionamiento).

Este proceso es el que parece sensible al status redox celular mediante los niveles de GSH, aunque permanece sin aclarar si es el ensamblaje del complejo E3, su interacción con I κ B fosforilada, o el proceso de poliubiquitinación y degradación proteolítica entero lo que es redox-sensible, así como el mecanismo molecular último que media este proceso (Li y cols., 1999).

Finalmente, se ha propuesto otro mecanismo de modulación sobre I κ B, en este caso de nuevo por parte de NO^{*}, de tal modo que ésta molécula generada actuaría estabilizando a I κ B, con lo que se mantiene el complejo p50/p65/I κ B intacto, evitando la translocación al núcleo de NF- κ B (Peng y cols., 1995)

En cualquier caso, cuando se evalúa la relación entre estrés oxidativo y NF- κ B, es importante considerar el sitio de generación del intermediario oxidante, el tipo de oxidante (o de la cascada de reacciones redox que puede acabar provocando) y el curso temporal en el que la respuesta del factor nuclear ocurre. Por ejemplo, los agentes oxidantes que actúan a nivel de la membrana celular pueden activar receptores de superficie, o directamente a Ras, desencadenando la activación de rutas de señalización a través de MAP kinasas, que terminan por activar a NF- κ B (Allen y Tresini, 2000). Sin embargo, si el agente oxidante proviene de la mitocondria, o se trata de oxidantes capaces de difundir a través de la membrana celular, sus proteínas diana, que funcionan en la activación de NF- κ B, probablemente se sitúen en este caso más adelante en la ruta de señalización respecto a los oxidantes mencionados antes.

Aunque numerosos laboratorios han demostrado una activación directa de NF- κ B en respuesta a agentes oxidantes, otros trabajos proponen una menor relevancia de éstos como activadores fisiológicos del factor nuclear. Esta

controversia es en parte debida al uso de diferentes tipos celulares, (o diferentes organismos), agonistas, tiempos considerados y agentes inductores.

4.3.6.4.6. Regulación de los mecanismos de transcripción de NF- κ B

Como se ha indicado, NF- κ B participa en la inducción de unos 800 genes diferentes. Es obvio que cuando este factor nuclear es translocado al núcleo no se activa la transcripción de todos estos genes. ¿Cómo se consigue la especificidad necesaria para que en determinadas células se induzcan sólo una serie de genes de entre tan elevado número?

Esto se consigue posiblemente gracias a dos circunstancias:

a) La combinación de diferentes sitios de unión a factores transcripcionales en los promotores de cada uno de estos genes.

Los promotores de la mayoría de los genes contienen más de un elemento de respuesta a factores transcripcionales, de modo que su activación génica responde en realidad a la unión de más de un factor transcripcional. En determinados casos, para una transcripción correcta de una secuencia dada, no basta únicamente con la unión de NF- κ B; hace falta la presencia de otro/s factores transcripcionales que actuarían de manera sinérgica (esto ocurre con cierta frecuencia entre NF- κ B y AP-1, por ejemplo). Es la combinación de NF- κ B con otros factores transcripcionales lo que confiere esta especificidad: un gen dado será efectivamente transcrito sólo si su combinación de factores (esto es, la presencia de sus factores requeridos) se produce, frente a otro que necesitaría, por ejemplo, sólo a NF- κ B, de modo que un mismo estímulo no produce necesariamente la misma respuesta en los dos genes. La presencia de estas combinaciones de factores transcripcionales es función del tipo celular o del contexto en el que se encuentre la célula, entendiendo por contexto la señalización que recibe (Pahl y cols., 1996)

b) El otro mecanismo de especificidad se debe a las diferentes combinaciones de las subunidades que forman el dímero NF- κ B.

Hemos comentado con anterioridad que la combinación más efectiva en la activación de los genes diana es la que incluye a p65 y p50, pero eso no significa que no existan otra serie de combinaciones posibles tanto en homo como en

heterodímeros. Al ser el sitio κ B asimétrico (es decir, no palindrómico), la secuencia κ B exacta de un gen determinado será más o menos potente en función del dímero que exista mayoritariamente en el tipo celular en el que se encuentre.

De este modo, genes con el mismo número de repeticiones del sitio κ B (sin que éstos sean exactamente iguales) se diferenciarán en su tasa de transcripción dependiendo del tipo de dímero que la célula en cuestión presente (Pahl y cols., 1996)

II. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis consiste en el estudio del estrés oxidativo asociado al ejercicio físico agotador, tanto en seres humanos como en animales, y su papel en la señalización celular.

Objetivos específicos:

Los objetivos específicos son:

- 1.-** Estudiar el papel de la xantina oxidasa en la generación de radicales libres en el ejercicio físico agotador.

- 2.-** Estudiar el papel de los radicales libres, generados en el ejercicio físico agotador, en la activación de la vía de las MAPKinasas.

- 3.-** Estudiar el papel de los radicales libres, generados en el ejercicio físico agotador, en la cascada de señalización que conduce a la activación del factor nuclear sensible a estrés oxidativo NF- κ B.

- 4.-** Estudiar el papel de los radicales libres, generados en el ejercicio físico agotador, en la expresión de genes involucrados en las adaptaciones al ejercicio físico.

5.- Estudiar el efecto de la administración del alopurinol en la señalización celular y en las adaptaciones al ejercicio físico, y la conveniencia del uso de antioxidantes por los deportistas.

Estos objetivos son los que fundamentalmente perseguimos en el desarrollo de la presente tesis, y cuyas observaciones mostramos en los siguientes apartados de la misma.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Animales de experimentación

1.1.1 Ratas Wistar macho.

Dos de los estudios fueron realizado con animales de edades comprendidas entre 3-4 meses. Las ratas se mantuvieron en el animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina, bajo condiciones constantes de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa (60%) y ciclos de luz y oscuridad de 12-12 h. El acceso a agua y comida fue siempre libre, siendo la dieta pienso estándar comercializado por PANLAB S.L. cuyo valor calórico es de 3100 Kcal/Kg. La composición es la siguiente:

Tabla 1. Composición de la dieta administrada a las ratas incluidas en el estudio.

Proteínas	17.9%
Grasas	3.1%
Fibra	3.8%
Glúcidos	58.5%
Minerales	5.2%

1.1.1.1. Estudios sobre el efecto del agotamiento en ratas Wistar macho.

Los animales fueron divididos en 3 grupos de experimentación (Ver Tabla 2)

- Grupo reposo.
- Grupo ejercitado hasta el agotamiento utilizando una adaptación del protocolo en tapiz rodante de Davies (Davies y cols., 1981).

- Grupo ejercitado hasta el agotamiento, pretratado con alopurinol. El alopurinol fue suministrado por vía intraperitoneal 2 horas antes de iniciar el protocolo de agotamiento, en una dosis de 32 mg/kg de peso. Con esta dosis está garantizada la inhibición de la enzima xantina oxidasa pero es insuficiente para que el alopurinol desarrolle su función como antioxidante (Zimmerman y cols., 1988). El alopurinol se disolvió en 200µL de DMSO y 800 µL de aceite de oliva.

Los animales ejercitados corrieron una media de 55 ± 10 minutos. El agotamiento se determinó por la incapacidad del animal para enderezarse al colocarlo sobre su costado (Sen y cols., 1994).

Tabla 2. Diseño del estudio sobre el efecto del agotamiento en ratas Wistar. Número de animales por grupo.

<u>Tiempo tras ejercicio (0 horas)</u>	
Reposo	6
Ejercicio	6
Ejercicio+Alopurinol	6

Tabla 3. Adaptación del protocolo de Davies (Davies y cols., 1981) en tapiz rodante para animales.

Tiempo minutos	Velocidad m/min	Inclinación del tapiz	Metros recorridos	Sumatorio de metros recorridos
5	10,9		54,7	54,7
10	12,4		61,8	116,5
15	14,4		72,0	188,5
20	16,4		82,2	270,7
25	18,5		92,7	363,4

30	14,5	5%	72,6	436,0
35	16,4	5%	82,2	518,2
40	18,5	5%	2,7	610,9
45	21,1	5%	105,2	716,1
50	23,7	5%	118,6	834,7
55	26,7	5%	133,6	968,3
60	29,3	5%	146,4	1114,7

1.1.1.2. Estudios sobre el efecto de la hipoxia y la reoxigenación en ratas Wistar macho.

Los animales fueron divididos en 5 grupos de experimentación (Ver Tabla 4)

- Grupo control
- Grupo sometido a hipoxia (8% O₂) en un cámara hipobárica durante 3 días.
- Grupo sometido a hipoxia (8% O₂) en un cámara hipobárica durante 3 días y reoxigenado (normoxia) durante 1 hora.
- Grupo sometido a hipoxia (8% O₂) en un cámara hipobárica durante 3 días y reoxigenado (normoxia) durante 6 horas.
- Grupo sometido a hipoxia (8% O₂) en un cámara hipobárica durante 3 días y reoxigenado (normoxia) durante 24 horas.

Tabla 4. Diseño del estudio sobre el efecto de la hipoxia y la reoxigenación en ratas Wistar. Número de animales por grupo.

	Control	Hipoxia 3 días (O ₂ 8%)	Reox. 1 hora (Normoxia)	Reox. 6 horas (Normoxia)	Reox. 24 horas (Normoxia)
Número de animales	7	6	8	7	7

1.1.2 Ratas Sprague-Dawley hembra.

1.1.2.1. Estudios sobre el efecto del agotamiento en ratas Sprague-Dawley hembra.

El segundo estudio fue realizado con animales de 3 meses. Las ratas se mantuvieron en el animalario Harlan de la Universidad de Wisconsin-Madison., bajo condiciones constantes de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa (60%) y ciclos de luz y oscuridad de 12-12 h. El acceso a agua y comida fue siempre libre, siendo la dieta pienso AIN-93. Para el cuidado de los animales se siguieron los principios del Council Directive 86/609/ECC: “ On the Approximation of Laws, Regulation and Administrative Provision of the Member States regarding the Protections of Animal used or Experimental and other Scientific Purposes”. El protocolo de ejercicio físico fue aprobado por la University of Wisconsin-Madison Research Animals and Resource Center Review Committee antes de que el estudio se iniciase.

Los animales fueron divididos en dos grupos de experimentación:

- Grupo reposo.
- Grupo ejercitado hasta la agotamiento. El protocolo consistió en 1h de carrera, o ejercicio hasta el agotamiento, a una velocidad de 25 m/minuto con una pendiente del 5% (~ 75% VO_2 máx) (Brooks y White, 1978; Lawler y cols., 1993; Bejma y Ji, 1999).

Una vez alcanzado el agotamiento los animales fueron sacrificados, al igual que sus respectivos controles, a distintos tiempos.

El agotamiento se determinó por la incapacidad del animal para enderezarse al colocarlo sobre su costado.

Tabla 5. Diseño del estudio con ratas Sprague-Dawley. Tiempos de sacrificio tras el agotamiento y número de animales por grupo.

	Tiempo tras ejercicio (horas)						
	0	1	2	4	8	24	48
Reposo	4	4	4	4	4	4	4
Ejercicio	6	6	6	6	6	6	6

1.1.3. Sacrificio de los animales

Inmediatamente después del ejercicio los animales fueron anestesiados con Pentotal Sódico (50 mg/Kg de peso). Posteriormente se abrió la cavidad abdominal y se accedió a la vena cava inferior con una jeringa de 5 mL para obtener la sangre.

Parte de la sangre (1 mL) se colocó en un tubo seco. Transcurrido un tiempo de aproximadamente 30 minutos (necesario para que se active la formación de un coágulo) se centrifugó a 2000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El suero es recogido en una alícuota y almacenado a -20°C para posteriormente realizar la medición espectrofotométrica de la actividad enzimática CK, GOT, con el baño a temperatura a 37°C.

En un tubo, en este caso heparinizado, se recoge 0.5 mL de sangre. Las muestras se conservaron a -80 °C para la posterior medición de la XOR.

1 mL de sangre fue recogido en un tubo de ensayo con EDTA para la determinación de MDA y se centrifugó a 2000 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se congeló a -20 °C para la posterior determinación de MDA.

Se añadieron 0,5 mL de sangre, a un eppendorf que contenía 500 µL de PCA 6%, EDTA 1mM. Se agitó vigorosamente y con rapidez. Seguidamente centrifugamos la muestra a 15000 xg, a 4° C, durante 10 minutos. El sobrenadante se neutralizó con KOH 20% y se mantuvo congelado a -20° C hasta el momento de la determinación de L-lactato.

0,5 mL de sangre se depositaron en una alícuota con 0,5 mL de ácido perclórico al 12 %, BPDS 2 mM., NEM 40 mM. en un tubo Eppendorff. La mezcla

se agitó en vórtex y seguidamente se centrifugó a 15000 xg durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se recogió y se congeló a -20 °C. Este sobrenadante se utilizó para la determinación de GSSG en sangre.

0,2 mL de sangre se depositaron en una alícuota con 0,8 mL. de ácido perclórico al 7.25 %, BPDS 1,25 mM. La mezcla se agitó y posteriormente se centrifugó a 15000 xg durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se recogió y se congeló a -20 °C. Este sobrenadante se utilizó para la determinación de la concentración de GSH en sangre.

La extracción del músculo gastrocnemio y vasto interno se realizó inmediatamente después de la extracción de sangre. Los músculos se congelaron mediante “freeze-clamping” en nitrógeno líquido para la posterior conservación a -80°C. Posteriormente esta muestra se utilizó para la realización de los correspondientes homogenados que permitirían medir las concentración de GSH y GSSG en el tejido, los ensayos de retardo, western blotting, northern blotting y las extracciones de RNA para PCR.

1.2. Seres humanos.

1.2.1. Alpinistas.

Un grupo de 10 alpinista (8 hombres y 2 mujeres) pertenecientes al Centro Excursionista de Cataluña participaron en este estudio. Eran los participantes de la primera expedición Zambón al pico GII (Gasherbrum II, Himalaya. 8034 m).

El grupo abordó el ascenso sin hacer uso de máscaras de oxígeno. Previamente habían sido informados de los objetivos y propósito del estudio, y aceptaron voluntariamente formar parte del mismo.

Las extracciones de sangre se realizaron a distintas alturas: a nivel del mar (antes de la salida de la expedición), a 1500 m, a 4500 m, a 5200 m, a 6000 m y de nuevo a nivel del mar (al finalizar la expedición).

Pese a que consiguieron alcanzar la cima, las dificultades de la recogida de muestras a alturas superiores a los 6000 m, imposibilitó las extracciones a partir de este punto.

Tabla 6. Diseño del estudio con alpinistas. Diferentes alturas en las que se realizaron las extracciones de sangre.

Altura (m) en la que se realizaron extracciones						
	Nivel del mar	1500	4500	5200	6000	Nivel del mar
Nº Extracción	1	2	3	4	5	6

La muestra fue obtenida por punción en el dedo pulgar. Una vez extraída la sangre fue inmediatamente desproteinizada para la posterior determinación del glutatión total y de glutatión oxidado.

Tanto la sangre desproteinizada como los plasmas fueron almacenados a – 80° C hasta el momento del análisis.

Las extracciones de las muestras, una vez alcanzada la altura de 4500 metros (campamento base) siempre fueron realizadas a este nivel. El grupo de alpinistas tras el ascenso a 5200 y 6000 metros descendieron a campamento base para realizar la extracción. Este hecho asemeja el proceso al de la isquemia-reperusión.

1.2.2. Ciclistas.

Los 9 miembros del US Postal Team durante su participación en el Tour de Francia 2001. Los ciclistas fueron divididos, de forma randomizada, en dos grupos. A uno de los grupos (4 participantes) se les dio una dosis oral diaria de 300 mg. de alopurinol (un inhibidor de la xantina oxidasa) 1 hora antes de cada etapa y durante toda la competición. Al otro grupo (5 participantes se le administró un placebo).

Las extracciones de sangre se realizaron 15 horas después de cada etapa (cuando la actividad de las enzimas citosólicas en plasma se espera que sea máxima). Se obtuvieron 6 muestras de sangre tras distintas etapas de la carrera (Ver Tabla 5).

La actividad creatinkinasa y aspartato amino transferasa fueron medidas en plasma como índices de daño muscular. Los niveles plasmáticos de peróxidos lipídicos fueron determinados midiendo malondialdehído por H.P.L.C. (cromatografía líquida de alto rendimiento).

Tabla 7. Diseño del estudio con ciclistas. Distintas etapas en las que se realizaron las extracciones de sangre.

Etapa	Muestra reposo	Etapa llana	Contrarreloj equipos	Etapa de montaña	Etapa de alta montaña	Etapa de alta montaña
Km		194	70	203	205	149
Nº Extracción	1	2	3	4	5	6

Una vez extraída la sangre, ésta fue inmediatamente desproteïnizada para la posterior determinación del glutatión total y de glutatión oxidado.

También se extrajo plasma para la determinación del malondialdehido (MDA) como índice de peroxidación lipídica. Tanto la sangre desproteïnizada como los plasmas fueron almacenados a -20° C hasta el momento del análisis.

1.3. Aparatos

- **Centrífugas**

Para las centrifugaciones a baja velocidad se utilizó una centrífuga de la firma SORVALL, modelo GLC-1.

Las centrifugaciones a alta velocidad se realizaron en una centrífuga refrigerada marca HERAEUS, modelo Sepatech Biofuge 17RS.

Para desecar las muestras para el posterior análisis de glutatión oxidado, se utilizó una centrífuga, Speed Vac, modelo SC 110 Savant, con una bomba acoplada Telstar para realizar el vacío.

- **Espectrofotómetro**

Se utilizó un espectrofotómetro de la marca KONTRON modelo Uvikon 810 termostatzado.

- **Autoclave**

Marca SELECTA, model Autester-G.

- **Agitador magnético**

Marca Selecta, modelo Agimatic-S

- **pHmetro**

El pHmetro empleado es de la marca CRISON, modelo Microph 2001, con un electrodo incorporado INGLOD.

- **Baño termostatzado**

Se utilizó un baño provisto de agitación automática regulable, marca SBS modelo BT.

- **Fluorímetro**

Marca Perkin Elmer, modelo LS 50B.

- **Balanzas**

Se utilizaron 2 balanzas: una de precisión marca SALTER, modelo HA-120M y una balanza SARTORIUS, modelo PT 1200.

- **Sistema de purificación de agua**

Marca MILLIPORE, modelos Milli-Q y Milli-RO.

- **Tapiz rodante.**

Para someter a las ratas al protocolo de ejercicio físico se utilizó un tapiz rodante Treadmill Li 8706 y el modelo de tapiz Quinton para roedores.

- **Cubetas de electroforesis**

Marca BIORAD, modelo Mini-PROTEAN 3 Cell

- **Cubetas de electrotransferencia**

Marca BIORAD, modelo Mini Trans-Blot Cell.

- **Fuentes de alimentación para la electroforesis**

Marca SIGMA, modelo PS 250-2, y marca BIORAD, modelo 200/2.0 Power Supply.

- **Cubetas de electrotransferencia en semiseco.**

Marca NOVEX System (Xcell Blot Module No. EI 9051)

- **Sistema de Análisis de Imágenes.**

Marca FUJIFILM, modelo LAS-1000 plus.

- **Transiluminador ultravioleta**

Marca Vilverlourmat, modelo TFX-35M.

- **Dispositivo fotográfico**

Sistema fotográfico marca Polaroid, modelo MP 4+.

- **Campana de flujo laminar vertical**

Marca CULTAIR modelo B100

- **Termociclador**

Marca BIORAD, modelo iCycler iQTM Multi-Color, Real-Time PCR Detection System.

- **Cromatógrafo líquido de alta eficacia para la determinación de glutatión**

El cromatógrafo está compuesto por los siguientes elementos:

- 2 bombas marca WATERS modelo 510.
- Un inyector PHARMACIA LKB, modelo 2157.
- Detector UV WATERS, modelo 441, a longitud de onda constante de 365 nm.
- Ordenador IBM XT modelo 286 con integrador y que controla el equipo.
- Columna cromatográfica WATERS modelo Spherisorb aminada, de dimensiones 20 X 0.46 cm y 5 μ m de diámetro de partícula.

- **Cromatógrafo líquido de alta eficacia para la determinación de MDA.**

El cromatógrafo está compuesto por los siguientes elementos:

- Bomba marca SHIMADZU modelo LC-10 AD.
- Autoinyector SHIMADZU, modelo SIL-10AD vp.
- Detector UV SHIMADZU, modelo SPD-10 AV.
- Controlador del equipo CBM-10 A.
- Ordenador IBM XT modelo 486 con el programa de integración CLASS-LC10.
- Columna TEKNOKROMA de fase reversa, modelo Spherisorb C18 cuyas dimensiones son 15 x 0,46 cm y de un tamaño de partícula de 5 μ m.

1.4. Reactivos

- **Determinación de proteínas**

En los extractos citosólicos se utilizó el "Protein ASSAY Kit" de la firma Sigma-Aldrich Química. Este kit contiene el reactivo de Lowry y el reactivo de Folin (Lowry y cols., 1951). En condiciones alcalinas el cobre se une a las proteínas. Cuando el reactivo fenólico de Folin se añade éste también se une a ellas. El reactivo unido es lentamente reducido y cambia su color de amarillo a azul.

En los extractos nucleares se utilizó el "Bradford Reagent" de la firma BIORAD (Bradford, 1976). Este método depende del cambio en la absorbancia del Azul Comassie G-250 al unirse a proteínas.

- **Aislamiento de RNA total.**

Se utilizó el kit “QuickPrep Total RNA extraction kit” de Amersham Pharmacia Biotech.

- **Retrotranscripción y amplificación.**

Para la realización de la PCR en tiempo real se empleó el kit TTh DNA polymerase de los laboratorios Boehringer Mannheim

- **Northern Blot**

Para la realización de los northern blot fue utilizando el kit de marcaje randomizado Rediprime™II DNA labelling system de Amersham Pharmacia Biotech.

- **Revelado de las membranas de Western Blottings.**

Para revelar las membranas de nitrocelulosa de los westerns blottings se empleó el kit “ Protoblot Western Blot AP System” de la firma Promega. Está basado en la utilización de anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa

- **Revelado de las membranas de los ensayos de retardo (EMSA assay).**

Para revelar las membranas de Nylon de los ensayos de retardo se empleó el kit “ DIG Gel Shift Kit 2nd Generation” de la firma Roche. Está basado en la utilización de anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina.

- **Enzimas**

Lactato Deshidrogenasa, Creatinkinasa, Aspartato amino transferasa, Glutación reductasa, Glutación-S-transferasa (Boehringer Manheim). Xantina oxidasa (SIGMA) Peroxidasa de rábano, Taq Polimerasa, AMV Reverse Transcriptase de Boehringer Manheim, TTh DNA polymerase. Glutación-S- transferasa, RNAasa I de SIGMA.

- **Otros reactivos**

Ácido perclórico 60%, acetato sódico, BPDS, NEM, KOH, CHES, ácido iodoacético, púrpura de m-cresol, FDNB, GSH, GSSG, γ -Glu-Glu, MDA, H₂O₂, fosfato potásico, CDNB, cloruro sódico, EDTA, EGTA, MOPS, HEPES, tris, glicina, acrilamida, bisacrilamida, ácido acético, sacarosa, ácido clorhídrico, SDS, azul de bromofenol, azul comassie, alopurinol, DMSO, mercaptoetanol, TEMED, BSA, CSPD, APS, DTT, PMSF, aprotinina, leupeptina, pepstatina, metanol, ácido bórico, ácido maleico, Tween 20.

Los reactivos se obtuvieron de las firmas: Sigma-Aldrich Química (España), Boehringer Manheim S.A. (Alemania), Panreac, Merck Biochemica (Alemania),

Fisher Scientific Company (USA), Pharmacia Biotech (USA), Intergen Company (USA), Cell Signallin Technology (USA) .

2. Métodos

2.1. Determinación de los valores de glutatión total.

2.1.1. Fundamento

El glutatión total se determina por H.P.L.C., siguiendo el método descrito por Reed y colaboradores. (Reed y cols., 1980). La cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen en dos fases: la fase móvil y la fase estacionaria. La separación se obtiene porque los componentes de la mezcla a estudiar son retenidos de distinta manera por la fase estacionaria. La cromatografía líquida se basa en el hecho de que durante el desarrollo de un cromatograma la fase móvil arrastra las moléculas de la muestra hacia el lecho estacionario, durante el trayecto las distintas moléculas de la muestra son retardadas en mayor o menor grado por la fase estacionaria en función de la interacción entre los componentes de la muestra y las fases estacionaria y móvil. En definitiva, sino existiera interacción las moléculas de un soluto se desplazarían a lo largo de la columna a la misma velocidad que la fase móvil y por lo tanto el tiempo de retención sería bajo, sin embargo, un soluto que interaccione con la fase estacionaria tardará más en salir del lecho estacionario y su tiempo de retención será muy superior al de la fase móvil.

El método descrito por Reed y colaboradores se basa en la separación de los S-carboximetildinitro derivados por cromatografía y posterior cuantificación a 365 nm. A todas las muestras se les añade una concentración conocida de γ -glutamil glutamato, como patrón interno, el cual nos va a permitir calcular la concentración de la sustancia problema de un modo más exacto.

Con esta técnica cromatográfica, se pueden determinar las concentraciones tanto de GSH como de GSSG de una misma muestra. Sin embargo, el método de Reed y cols., no debe utilizarse para determinar el estatus de glutatión, ya que la muestra sufre una autooxidación del GSH importante en el proceso de derivatización (Asensi y cols., 1994). De este modo, parte del GSH se oxida a

GSSG dando falsos positivos en los resultados. Sin embargo, sí que es un buen método para la determinación del glutatión total (GSH + (2XGSSG)).

2.1.2. Obtención de las muestras y conservación

Se realiza una extracción sanguínea en la que inmediatamente se pipetea 200 μL de sangre y se mezclan con 800 μL de PCA 7.25% BPDS 1.25 mM. A continuación, se centrifuga a 15000g durante 10 minutos a 4° C. De esta manera acidificamos la sangre y conseguimos un sobrenadante ácido, libre de proteínas. Las muestras pueden ser conservadas a -20° C hasta el momento de su análisis.

2.1.3. Derivatización de la muestra

1.- Se toman 200 μL de sobrenadante ácido y se le añade 20 μL de patrón interno (γ -glutamil-glutamato 1 mM en PCA al 0.3%). Seguidamente añadimos 20 μL de ácido iodoacético 1 M disuelto en púrpura de m-cresol 0.2 mM, que es un indicador de pH que vira a color púrpura entre 8.5 y 9.

2.- La mezcla se lleva a pH 8.5 – 9 usando un tampón KOH 3 M CHES 0.3 M y una vez alcanzado el pH adecuado, se incuba la muestra durante 10 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.

3.- Al acabar la incubación se añaden 400 μL de 1-fluor dinitrobenceno al 1% en etanol absoluto y se mantiene a 4°C y en oscuridad durante 24 horas como mínimo. Llegado a este punto las muestras son estables a 4° C durante varias semanas.

4.- Antes de preparar la dilución que será inyectada en el cromatógrafo, las muestras se centrifugan a 15000g durante 5 minutos a 4° C. De ahí se toman 50 μL de sobrenadante a los que añadimos 270 μL de una mezcla metanol - agua en proporción 800:200.

2.1.4. Técnica cromatográfica.

Se inyectan 80 μL de la solución que contiene la muestra. La fase móvil está constituida por 2 solventes:

- Eluyente A: es una solución de metanol al 80% en agua bidestilada.
- Eluyente B: es una solución tampón acético/acetato 0.5 M en metanol al 64%.

Todo el proceso se realiza a un flujo constante de 1 mL/minuto. La elución de las sustancias que nos interesan se realiza aplicando un gradiente:

- La fase móvil se mantiene durante 5 minutos a un 20% del eluyente B y un 80% del eluyente A.
- Tras este tiempo, comienza a aumentar la cantidad de eluyente B de manera lineal, hasta que a los 15 minutos del cromatograma se alcanza un 99% de B y un 1% de A.
- Se mantienen estas concentraciones de cada solvente de 5 a 10 minutos, dependiendo del tiempo de elución del último compuesto.
- Una vez eluido el último compuesto de interés, se procede al reequilibrado de la columna. Para ello, se alcanzan las condiciones iniciales (20% de B y 80% de A) manteniéndose así durante 15 minutos.

2.1.5. Cálculos

Las concentraciones de GSH y GSSG se calculan en el cromatograma basándose en una concentración conocida de patrón interno, que es añadida a cada muestra en el proceso de derivatización. El patrón interno utilizado es γ -glutamil-glutamato, que previamente ha sido calibrado frente a patrones de concentraciones conocidas de GSH y GSSG. Tanto los patrones de GSH como los de GSSG se calibran previamente enzimáticamente, para conocer su concentración exacta. El GSH se calibra por medio de la reacción de la glutatión transferasa y el GSSG por medio de la reacción de la glutatión reductasa.

El glutatión total lo expresamos como equivalentes de GSH, sumándole a la concentración de GSH 2 veces la de GSSG.

$$[\text{GSH}] = \text{Glutation total} - (2 \times \text{GSSG})$$

2.1.5.1. Cálculo de la concentración de los patrones de glutatión reducido por medio de la reacción de la glutatión transferasa.

2.1.5.1.1. Fundamento.

Hemos utilizado el método descrito por Brigelius (Brigelius, y cols., 1983). Se basa en la determinación espectrofotométrica de la conjugación del GSH con el cloro-2,4-dinitrobenzenu. Esta reacción está catalizada por la glutatión-S-

transferasa. El aducto formado, 2,4-dinitrofenil-S-glutación, presenta un máximo de absorción a 340 nm.



2.1.5.1.2. Procedimiento.

En una microcubeta se añaden los siguientes reactivos:

- 825 μL de fosfato potásico 0,1 M, EDTA 1mM, pH 7,0.
- 25-100 μL del patrón de GSH disuelto en PCA 6% BPDS 1 mM.
- 10 μL de la solución de 1-cloro-2,4-dinitrobenzono 10 mM en etanol al 100%.

Se realiza un autocero (ha de tenerse en cuenta que la absorbancia de la línea de base debe ser estable)(E1) y la reacción comienza añadiendo 10 μL de una solución de glutación-S-transferasa 500 U/mL en tampón fosfato sódico 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 7,4. Esta solución se dializa previamente durante 6 horas en tampón fosfato cambiando el tampón de diálisis cada dos horas.

Se registra la variación de la absorbancia a 340 nm hasta el final de la reacción (E2). La diferencia E2-E1 es proporcional a la cantidad de GSH existente.

2.1.5.1.3. Cálculos.

Para calcular la concentración de GSH se utiliza el coeficiente de absorción molar del 2,4-dinitrofenil-S-glutación a 340 nm ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Una vez hallada la concentración del patrón, se realiza una curva con distintas concentraciones de GSH y con la misma de patrón interno, con el fin de hallar el factor de respuesta o relación entre el γ -glutamyl-glutamato (PI) y el GSH mediante la siguiente relación:

$$[\text{PATRÓN GSH}] = \frac{A_{\text{PATRÓN GSH}}}{A_{\text{PI}}} [\text{PI}] \times \text{Factor respuesta}$$

Por medio de esta relación podremos calcular posteriormente las concentraciones de nuestras muestras problema:

$$[\text{GSH PROBLEMA}] = \frac{A_{\text{GSH PROBLEMA}}}{A_{\text{PI}}} [\text{PI}] \times \text{Factor respuesta}$$

2.1.5.2. Cálculo de la concentración de los patrones de glutatión oxidado por medio de la reacción de la glutatión reductasa.

2.1.5.2.1. Fundamento:

Se sigue la reducción dependiente de NADPH (340 nm) del GSSG a GSH.



2.1.5.2.2. Procedimiento

En una microcubeta se añaden:

- 500 μl de tampón fosfato 0,2 M con EDTA 2 mM a pH 7,00.
- 50 μl de NADPH 3 mM disuelto en Tris-HCl 10 mM, pH 7,00.
- 50 μl de GSSG 20 mM disuelto en agua.
- 350 μl de agua (hasta un volumen de 950 μl)

Se registra la disminución de absorbancia a 340 nm.

2.1.5.2.3. Cálculos

Calculamos la concentración de GSSG por medio de la siguiente fórmula:

Una vez hallada la concentración de patrón de GSSG, se determina el factor de respuesta o relación entre el GSSG y el patrón interno, por medio de una curva realizada con distintas concentraciones de GSSG y la misma de patrón interno. Con

este dato podremos calcular posteriormente las concentraciones del metabolito en nuestras muestras.

$$[\text{PATRÓN GSSG}] = \frac{A_{\text{PATRÓN GSSG}}}{A_{\text{PI}}} [\text{PI}] \times \text{Factor respuesta}$$

$$[\text{GSSG PROBLEMA}] = \frac{A_{\text{GSSG PROBLEMA}}}{A_{\text{PI}}} [\text{PI}] \times \text{Factor respuesta}$$

2.2. Determinación del glutatión oxidado (GSSG)

2.2.1. Fundamento

Para la determinación del GSSG se siguió el método cromatográfico descrito por Asensi y colaboradores. (Asensi y cols., 1994). Se basa en la separación cromatográfica de los dinitrobenceno derivados y posterior detección a 365 nm. Para que el GSH no sufra una autooxidación en el proceso, se bloquea el grupo tiol con N-etilmaleimida (NEM). Este bloqueo hace que este método sea idóneo para evitar el aumento de concentración de GSSG por oxidación del GSH durante el procesado de la muestra.

2.2.2. Obtención de las muestras

Tras la extracción sanguínea se pipetea inmediatamente 500 μL de sangre y se mezclan con 500 μL de PCA 12% BPDS 2 mM NEM 40 mM. Después de agitar vigorosamente, se centrifuga a 15000g durante 10 minutos a 4^o C. El sobrenadante ácido libre de proteínas se usará posteriormente para la determinación del GSSG. Las muestras pueden ser conservadas a -20^o C hasta el momento de su análisis.

2.2.3. Derivatización

1. Se toman 200 μL de sobrenadante ácido y se mezclan con 20 μL de patrón interno (γ -glutamil-glutamato 1 mM en PCA 0.3%) y 20 μL de púrpura de m-cresol 0.2 mM como indicador de pH.

2. Se lleva la muestra a pH 8.5 – 9 añadiendo KOH 3M CHES 0.3M. El indicador de pH vira a color púrpura cuando lo alcanza.

3. Se centrifuga a 13000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C.

4. Se toman 25 μL de sobrenadante y se mezclan con 50 μL de 1-fluor dinitrobenzeno al 1% en etanol absoluto.

5. Se incuba la muestra 45 minutos en oscuridad y se deseca la disolución a vacío hasta 70 miliTorr.

6. Las muestras desecadas pueden conservarse durante meses a -20°C hasta el momento de su inyección en el HPLC.

7. Justo antes de la inyección en el cromatógrafo, las muestras se resuspenden en 200 μL del eluyente A.

2.2.4. Técnica cromatográfica.

Las muestras se procesan en el mismo aparato cromatográfico que el glutatión total (apartado anterior). Las condiciones aplicadas en el ensayo son las mismas, siendo el gradiente de eluyentes, fase estacionaria, fase móvil y detección, idénticas que en el caso anterior.

2.2.5. Cálculos

El cálculo de la concentración de glutatión oxidado en la muestra biológica, se realiza en función de la calibración de soluciones patrón de concentraciones conocidas de GSSG respecto al patrón interno.

2.3. Determinación de lipoperóxidos en forma de malondialdehído.

2.3.1. Fundamento.

Se ha seguido el método descrito por Young y colaboradores (Young y cols.,1987). Este método se basa en la hidrólisis de los lipoperóxidos presentes en

la muestra y posterior formación de un aducto entre el ácido 2-tiobarbitúrico y el malondialdehído liberado (TBA-MDA₂). Puesto que el ácido 2-tiobarbitúrico reacciona con distintos grupos carbonilos presentes en la muestra, además, de con el malondialdehído, se realiza una separación por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa del aducto ácido 2-tiobarbitúrico-malondialdehído del resto de las sustancias reaccionantes presentes en las muestras.

Debido a que el malondialdehído proviene de los lipoperóxidos presentes en el medio y, éstos se cuantifican según el aducto TBA-MDA₂, es conveniente hablar de niveles de lipoperóxidos cuantificados como TBA-MDA₂ en lugar de niveles de MDA.

2.3.2. Procedimiento.

1. A 50 µL de muestra se le añaden 75 µL de H₃PO₄ 0,44 M y 25 µL de la solución de ácido 2-tiobarbitúrico; se agita y se mantiene 60 minutos en un baño a 95 °C.

2. Una vez transcurrido el tiempo se añade 150 µL de la solución neutralizante.

3. Se centrifuga a 10000 g durante 5 minutos a 4 °C y se inyectan 50 µL del sobrenadante obtenido en el H.P.L.C.

Debe tenerse en cuenta que el aducto ácido 2-tiobarbitúrico-malondialdehído es estable a pH neutro-básico un máximo de 20 minutos, por lo que se debe operar con rapidez.

2.3.3. Técnica cromatográfica

Todo el proceso se realiza a un flujo constante de 1 mL/minuto. La elución del aducto TBA-MDA₂ se realiza en condiciones isocráticas, siendo la fase móvil una mezcla de KH₂PO₄ 50 mM pH=6,8 y acetonitrilo (70:30). El tiempo de retención del aducto TBA-MDA₂ es aproximadamente de 5 minutos, y el tiempo del cromatograma fue de 10 minutos.

La detección del aducto TBA-MDA₂ se realizó con un detector ultravioleta visible a una longitud de onda de 532 nm.

2.3.4. Cálculos.

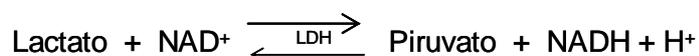
El área del pico correspondiente al aducto TBA-MDA₂ se valora frente a una recta patrón construida con MDA-bis. En la construcción de la recta patrón debe incluirse un blanco. La recta patrón se hace a partir de las siguientes soluciones de MDA-bis: blanco; 0,6 μM; 1,5 μM; 6,0 μM; 15 μM y 60 μM.

2.4. Determinación de L-Lactato

2.4.1. Fundamento

El método seguido para la determinación de lactato fue descrito por Gutmann y Wahlefeld (1974). Está basado en la oxidación de lactato a piruvato, por la Lactato Deshidrogenasa, según la siguiente reacción:

La reacción se lleva a cabo en medio alcalino que atrapa los protones, con un exceso de LDH y un tampón que contiene hidrazina, que atrapa el piruvato, formando su hidrazona. De esta forma la reacción se desplaza hacia la formación de piruvato.



2.4.2. Preparación de la muestra

Se añadieron 500 μL de sangre, a un eppendorf que contenía 500 μL de PCA 6%, EDTA 1mM. Se agitó vigorosamente y con rapidez. Seguidamente centrifugamos la muestra a 15000 xg, a 4° C, durante 10 minutos. El sobrenadante se neutralizó con KOH 20% y se mantuvo congelado a -20° C hasta el momento de la determinación.

2.4.3. Procedimiento y cálculos

La mezcla de reacción, en un volumen final de 2 mL, contiene: Tampón Tris-Hidrazina 0.45 M, pH 9; NAD⁺ 1.5 mM y 50 μL de muestra neutralizada.

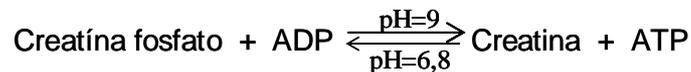
Se mezcla bien y se lee la absorbancia a 340 nm de longitud de onda (E₁). Después se añaden 40 UI de LDH y se dejan transcurrir 30-45 minutos hasta que se completa la reacción. A continuación se mide de nuevo la absorbancia (E₂) a 340 nm.

El aumento de absorbancia medido por la diferencia entre las dos lecturas ($E_2 - E_1$) es proporcional a la cantidad de lactato presente en la muestra.

2.5. Determinación de Creatinkinasa total (CK)

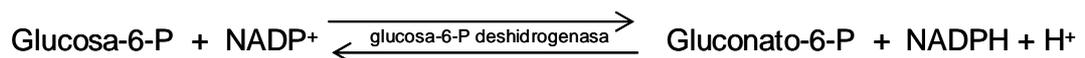
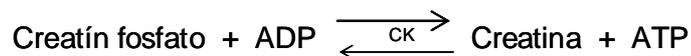
2.5.1. Fundamento.

La CK es una enzima intracelular ampliamente distribuida en los tejidos del organismo. Su función fisiológica está asociada con la generación de adenosíntrifosfato (ATP). La CK cataliza la fosforilación reversible de la creatina, reacción en la cual el ATP actúa como dador del grupo fosfato. La reacción es la siguiente:



Tal como se puede observar, la reacción es dependiente del pH, y si éste es neutro, se favorece la formación de ATP.

Se sigue un método espectrofotométrico, descrito por Szasz y cols. (Szasz y cols. (1976) que detecta la interconversión NADPH-NADP⁺, siendo un método estándar optimizado de la "Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie", basado en las siguientes reacciones:



2.5.2. Preparación de la muestra.

Se recogieron muestras de sangre en un tubo seco. Transcurrido un tiempo de aproximadamente 30 minutos (necesario para que se active la formación del

coágulo) se se centrifuga a 2000 xg durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido es el suero que utilizaremos para la determinación.

2.5.3. Procedimiento

La solución reactiva utilizada está compuesta por: Tampón Imidazol-Acético 100 mM, pH 6.7; Glucosa 20 mmol/L; Fosfocreatina 30 mmol/L; Mg^{+2} 10 mmol/L; EDTA 2 mmol/L; $NADP^{+}$ 2 mmol/L; ADP 2 mmol/L; AMP 5 mmol/L; NAC 20 mmol/L; diadenosinpentofosfato 10 μ mol/L, Hexoquinasa \geq 2.5 U/mL; glucosa-6-fosfato deshidrogenasa \geq 1.5 U/mL. La medición se realiza con el espectro atemperado a 37 °C., a una longitud de onda de 340 nanometros.

En una microcubeta se añadieron 1150 μ L de esta solución reactiva y se incubó a 37°C, durante 2-3 minutos. A continuación disparamos la reacción añadiendo 23 μ L de muestra, dejamos incubar durante 1 minuto y se determinaron las extinciones a intervalos de un minuto durante los 4 minutos siguiente. La longitud de onda utilizada fue 340 nm.

2.5.4. Cálculos

Los cálculos se realizan a partir de la variación de absorbancia por minuto en cada lectura y se calcula el valor de la actividad en U/l a partir de la siguiente ecuación:

$$U/l = (\text{variación de la absorbancia} / \text{minuto}) \times 8095$$

El factor 8095 tiene en cuenta el coeficiente de extinción molar del NADH, el volumen final de la cubeta , así como el volumen de muestra empleado.

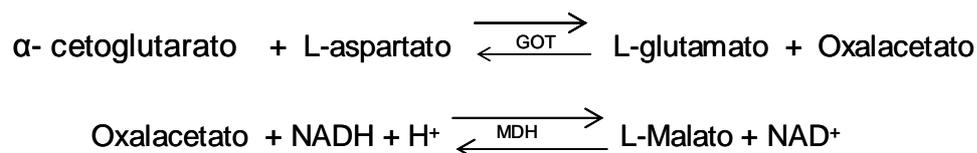
2.6. Determinación de Aspartato-aminotransferasa (GOT)

2.6.1. Fundamento.

La GOT cataliza la transferencia de un grupo amino de aminoácidos específicos (L-glutámico o L-aspartico) a cetoácidos específicos (α -cetoglutárico u

oxalacético). Si bien a pH fisiológico la reacción está energéticamente favorecida hacia la formación de L-aspartato y α -cetoglutarico, la reacción *in vivo* procede hacia la derecha a fin de proveer una fuente de nitrógeno al ciclo de la urea. El glutamato así producido es desaminado por la glutamato deshidrogenasa con formación de amoníaco y regeneración de α -cetoglutarico.

El método de determinación que hemos utilizado fue descrito por Bergmeyer y cols. (1986) y se basa en las siguientes reacciones acopladas.



La cantidad de GOT en la muestra se determina por la disminución de absorbancia a 340 nm.

2.6.2. Preparación de la muestra.

Se recogieron muestras de sangre en tubo seco. Transcurrido un tiempo aproximado de 30 minutos, se centrifuga la sangre a 2000 xg durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido es el suero donde realizaremos la determinación.

2.6.3. Procedimiento y cálculos

La solución reactiva utilizada está compuesta por: Tampón Tris 88 mM, pH 7.8; L-aspartato 264 mmol/L; NADH 0.198 mmol/L, α -cetoglutarato 13.2 mmol/L; MDH ≥ 0.46 U/mL; LDH ≥ 0.66 U/mL.

Se incubó 1 mL de esta solución reactiva durante 2-3 minutos a 37°C. A continuación iniciamos la reacción añadiendo 100 μ L

2.7. Determinación de la actividad xantina oxidasa/xantina deshidrogenasa en plasma.

2.7.1. Fundamento.

Se sigue un método fluorimétrico descrito por Beckman y cols. (1989). Este método está basado en la monitorización fluorimétrica de la formación de isoxantopterina a partir de pterina.

Para la determinación de la forma oxidada se utiliza como aceptor de electrones al oxígeno.

Para la determinación conjunta de la oxidasa y deshidrogenasa se utiliza el azul de metileno como aceptor de electrones.

2.7.2. Preparación de la muestra.

Reactivos:

- Tampón fosfato 50 mM., EDTA 0.1 mM., pH 7,4.
- Pterina (2-amino-4-hidroxipteridina) 1 mM. Se pesan entre 3 y 4 mg. de pterina y se resuspenden inicialmente en 100 μ l. de NaOH 1 M. Una vez disuelta se le añade el agua necesaria para alcanzar una concentración de 1 mM. Esta solución es estable durante 1 ó 2 días a T^a ambiente.
- Isoxantopterina 1 mM. Se pesan entre 3 y 4 mg. de isoxantopterina y se resuspenden inicialmente en 100 μ l. de NaOH 1 M. Una vez disuelta se le añade el agua necesaria para alcanzar una concentración de 1 mM. A partir de esta solución de diluye hasta alcanzar una concentración de 10 μ M. La concentración exacta de isoxantopterina se determina espectrofotométricamente a 336 nm., debiendo estar entre 8 y 13 μ M. Esta solución se ha de preparar y valorar diariamente.
- Azul de metileno 1 mM. en agua. Esta solución se puede conservar congelada.
- Alopurinol 1 mM en agua. Esta solución se realiza directamente a 1 mM. Para conseguir una perfecta disolución se ha de preparar en agitación y calentándose. Una vez disuelta se separan alícuotas que se pueden conservar congeladas.

2.7.3. Procedimiento.

La formación de isoxantopterina se sigue fluorimétricamente a 345 nm. de excitación y 390 nm. de emisión.

Todo el proceso se realiza con el fluorímetro termostatzado a 37 °C.

1.- Añadimos en una cubeta de cuarzo 25 μ L. de muestra y tampón fosfato 50 mM., EDTA 0.1 mM., pH 7,4, hasta un volumen final de 2 mL.

2.- Se sigue la emisión de fluorescencia a 345 nm. de excitación y 390 nm. de emisión durante un minuto.

3.- Posteriormente se añaden 20 µL. de una solución de pterina 1 mM. y se sigue la emisión de fluorescencia durante 2 minutos. Esta pendiente nos indica la actividad xantina oxidasa.

4.- El siguiente paso consiste en añadir 20 µL de una solución de azul de metileno 1 mM. y se sigue la emisión de fluorescencia durante dos minutos. Esta pendiente nos indica la actividad total xantina oxidoreductasa.

5.- Añadimos 20 µL. más de una solución de alopurinol 1 mM. y se sigue la emisión de fluorescencia durante un minuto. No debe variar la fluorescencia, pues el alopurinol inhibe tanto la xantina oxidasa como la deshidrogenasa.

6.- Se realiza una medida puntual que se utilizará como blanco para la calibración de la isoxantopterina.

7.- Se añaden 20 µL de una disolución de isoxantopterina 10 µM. Se realiza otra medida puntual. De esta manera obtendremos el incremento de fluorescencia debido a la isoxantopterina.

La isoxantopterina se utiliza como patrón interno en esta determinación.

2.7.4. Cálculos

Para calcular la actividad, la unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un µmol de isoxantopterina por minuto. En el plasma la expresamos en unidades por litro de plasma.

Para la actividad xantina oxidasa:

$$U = (\Delta F/\text{min.}) \times \frac{[\text{Isoxantopterina}] \times 0.02 \quad V_{\text{final}}}{2.08 \times 1000 \times F_{\text{isoxantopterina}} \quad V_{\text{muestra}}}$$

Siendo:

- ΔF/min: la variación de fluorescencia observada por minuto tras añadir la pterina.
- [Isoxantopterina]: la concentración de isoxantopterina.

- $F_{\text{isoxantopterina}}$: el incremento inmediato de fluorescencia que se produce tras añadir la isoxantoptrina.
- V_{final} : el volumen de la cubeta una vez añadida la disolución de pterina (2,02 mL.).
- V_{muestra} : el volumen de muestra añadido (0,025 mL.).

Para la actividad total xantina oxidoreductasa:

$$U = (\Delta F/\text{min.}) \times \frac{[\text{Isoxantopterina}] \times 0.02 \quad V_{\text{final}}}{2.08 \times 1000 \times F_{\text{isoxantopterina}} \quad V_{\text{muestra}}}$$

Siendo:

- $\Delta F/\text{min}$: la variación de fluorescencia observada por minuto tras añadir el azul de metileno.
- $[\text{Isoxantopterina}]$: la concentración de isoxantopterina.
- $F_{\text{isoxantopterina}}$: el incremento inmediato de fluorescencia que se produce tras añadir la isoxantoptrina.
- V_{final} : el volumen de la cubeta una vez añadida la disolución de pterina (2,04 mL.).
- V_{muestra} : el volumen de muestra añadido (0,025 mL)..

Para la actividad xantina deshidrogenasa:

La actividad xantina deshidrogenasa se calcula restando la actividad xantina oxidasa a la actividad total xantina óxidoreductasa.

2.8. Extracción de proteínas citoplasmáticas a partir de tejido muscular.

2.8.1. Fundamento

Para llevar a cabo la valoración de la expresión y fosforilación de $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ e $\text{IKK-}\alpha$ y de la fosforilación de las MAP Kinasas Erk1/2 (p44/42) y p38 transfiriendo estas proteínas desde geles a membranas (Western Blotting) , es necesaria la obtención de extractos de proteínas citoplasmáticas.

2.8.2. Protocolo

1.- Se parte de fragmentos de músculos esquelético de entre 100 y 200 mg, que son en primer lugar lavados en PBS.

2.- Tras el lavado se cortan en pequeños trozos en tampón de lisis frío (1 mL por cada 100 mg de tejido). El tampón consta de: 1% Nonidet-P40; 50 mM NaCl; Tris 10 mM pH 7.5; 5 mM EDTA; Sucrosa 0,25 M; Pirofosfato Sódico 30 mM; Ortovanadato Sódico 100 μ M; 50 mM NaF; 1mM DTT; 1mM PMSF; 3mM Benzamidina; 10 μ M Leupeptina; 10 μ g/mL Aprotinina; 5 μ M Pepstatina A).

3.- El músculo se tranfiere a un homogeneizador tipo Dounce de vidrio (Afora S.A., España) introducido en hielo.

4.- La suspensión se somete a diez pases de homogeneización con el émbolo.

5- El producto inicial se pasa a tubos de microcentrífuga y se centrifuga durante 15 minutos a 12.000 xg a 4°C.

8.- El sobrenadante que contiene extractos proteicos citoplasmáticos es almacenado a -80°C hasta su valoración y utilización.

2.8.3. Cuantificación.

En los extractos citoplasmáticos los valores de concentración de proteínas fueron obtenidos por el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello se preparan diluciones 1/400 de los extractos para un volumen final de 800 μ L de agua. A este volumen se le añaden 200 μ L de colorante de Bradford (Biorad, USA). Los valores de absorbancia, a una longitud de onda de 595, son interpolados en una curva patrón previamente obtenida mediante dilución seriada de BSA de concentración inicial conocida. Con ello podemos conocer el valor de concentración en proteínas de la muestra original.

2.9. Extracción de proteínas nucleares a partir de tejido muscular.

2.9.1. Fundamento

Para llevar a cabo la valoración de la activación de NF- κ B en músculo mediante Ensayos de Retardo en Gel de Acrilamida, es necesaria la obtención de extractos de proteína nuclear.

2.9.2. Protocolo.

1.- Se parte de fragmentos de músculos esquelético de 100 mg., a los que se le añaden 35 mL de Tampón 1 (10mM Hepes pH 7.5; 10 mM MgCl₂; 5mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1% Triton X-100; 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF; 2 µg/mL Aprotinina; 2 µg/mL Leupeptina (Blough y cols., 1999).

2.- El tejido se desmenuza minuciosamente y se transfiere a un Falcon de 50 mL donde se homogeneiza utilizando un Ultra Turrax T25 Polytron (Janke and Knukel, Germany) a velocidad media durante 45 segundos.

3.- Se centrifuga durante 5 minutos a 3.000 xg y a 4°C.

4.- El pellet se resuspende en 500-1000 µL de Tampón 2 (20mM Hepes pH 7.9; 25% Glicerol; 500mM NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 0,2 mM PMSF; 2 µg/mL Aprotinina; 2 µg/mL Leupeptina)

5.- Incubar en hielo la mezcla durante 30 minutos vorteadando de forma intermitente la suspensión.

6.- Centrifugar durante 10 minutos a 12.000 xg.

7.- Pasar el sobrenadante a una unidad (4mL Ultrafree Filter Unit. Millipore) y añadir un volumen idéntido de Tampón 3 (20mM Hepes pH 7.9; 10% Glicerol; 40mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 0,5 mM DTT; 0,2 mM PMSF; 2 µg/mL Aprotinina; 2 µg/mL Leupeptina)

8.- Centrifugar durante 60 minutos a 12.000 xg y a 4°C (el volumen normalmente desciende en un 30%)

9.- Añadir 500-1000 µL de Tampón 3 y se centrifuga de nuevo durante 60 minutos a 12.000 xg y a 4°C.

10.- El sobrenadante que contiene extractos proteicos nucleares es almacenado a -80°C hasta su valoración y utilización.

2.9.3. Cuantificación.

En los extractos nucleares los valores de concentración de proteínas fueron obtenidos por el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello se preparan diluciones 1/400 de los extractos para un volumen final de 800 µL de agua. A este volumen se le añaden 200 µL de colorante de Bradford (Biorad, USA). Los valores de absorbancia, a una longitud de onda de 595, son interpolados en una curva patrón previamente obtenida mediante dilución seriada de BSA de concentración

inicial conocida. Con ello podemos conocer el valor de concentración en proteínas de la muestra original.

2.10. Ensayo de Retardo en Gel de Acrilamida (EMSA) para el estudio de la activación del factor de transcripción NF- κ B

2.10.1. Fundamento

Este tipo de experimentos permite la detección de la presencia de un activador transcripcional en un extracto problema al ponerlo en contacto *in vitro* con un fragmento artificial de DNA marcado que contiene la secuencia de unión del factor transcripcional estudiado. La diferente movilidad de este DNA en un gel en función de su unión o no al factor de transcripción permite determinar la presencia de este último en el extracto problema.

2.10.2. Marcaje de la secuencia diana con digoxigenina.

Una vez se dispone de los extractos de proteína nuclear a estudiar, se procede a marcar no radiactivamente el oligonucleótido de doble cadena que contiene el motivo de unión de NF- κ B (se muestra la cadena con sentido con el motivo κ B subrayado) (Promega, USA).

5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C -3'

Para el marcaje se utilizaron los reactivos presentes en el kit (DIG Gel Shift Kit , Roche Molecular Biochemicals) así como el protocolo de marcaje aconsejado por el fabricante.

El oligo fue marcado por su extremo 3' con DIG-11ddUTP con terminal transferasa.

1.- En primer lugar se mezclan en hielo:

- 4 μ L de tampón de marcaje
- 4 μ L de CoCl₂ 20 mM
- 3.85 pmol de oligo κ B de doble cadena
- 1 μ L de DIG-ddUTP 25 mM
- 1 μ L de terminal transferasa 0.25 u/ μ L

- H₂O miliQ hasta un volumen final de 20 μ L
- 2.- Incubar 15 minutos a 37° C
- 3.- Volver a colocar en hielo y añadir:
 - 2 μ L de LiCl
 - 60 μ L de Etanol absoluto a 4° C
- 4.- Guardar a -80 ° C durante 30 minutos
- 5.- Centrifugar 15 minutos a 12000 rpm a 4° C para recoger el DNA
- 6.- El pellet se lava 3 veces con etanol 70%
- 7.- Resuspender el pellet en tampón TEN (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl, pH 8) para alcanzar una concentración de 30 fmol/ μ L

2.10.3. Reacción de unión DNA-proteína.

- 1.- En todos los casos ponemos en contacto:
 - 40 μ g de proteína nuclear
 - 30 fmol de oligonucleótido κ B marcado
 - 4 μ L de tampón de unión (100 mM HEPES pH 7.6; 5 mM EDTA; 50 mM (NH₄)₂ SO₄; 5 mM DTT, 1% Tween 20, 150 mM KCl)
 - 1 μ L de DNA sonificado de espermatozoos de salmón
 - 1 μ L de poly L-lysine
 - En presencia o no de un exceso de oligonucleótido κ B no marcado (ensayos de competición en un volumen final de 20 μ L)

2.- El extracto nuclear se equilibra, en primer lugar, durante 15 minutos en el hielo con el tampón de unión. A continuación se añade el oligonucleótido marcado y se deja otros 15 minutos en hielo para que se produzca la posible reacción de unión DNA-proteína. Finalmente, en las muestras de ensayo de competición, se añade un exceso de 100 veces de oligonucleótido no marcado 15 minutos antes de añadir el marcado con digoxigenina.

2.10.4. Condiciones del gel y transferencia.

- 1.- Una vez transcurrido este tiempo, en todos los casos se añaden 5 μ L de tampón de carga (tampón de unión 60%, glicerol 40%)
- 2.- Cargar los 25 μ L resultantes en un gel continuo no desnaturante al 8% de Acrilamida (79:1 acrilamida:bisacrilamida).

3.- Este gel es sometido a un campo eléctrico de 100 V constantes durante 60 minutos en tampón 0.5x TBE (44.5 mM Tris-HCl; 44.5 mM H₃BO₃; 1.25 mM EDTA)

4.- Una vez finalizado este tiempo, el gel es separado de las placas de cristal, y transferido, de nuevo en 0.5x TBE, a una membrana de carga positiva de Nylon (Hybond N+, Amersham Pharmacia, USA) mediante electrotransferencia con Trans Blot SemiDry transfer Cell (Biorad, USA) a un voltaje contante de 40 V durante 30 minutos.

5.- Tras la transferencia, se procede al entrecruzamiento covalente de los oligonucleótidos con la superficie de la membrana mediante la irradiación de ésta con 0,120 Julios de radiación ultravioleta. Utilizamos, para ello, un entrecruzador (Vilver Lourmat)

2.10.5. Visualización.

Una vez se ha transferido, se procede a la visualización del resultado mediante la unión de un anticuerpo anti-DIG marcado con fosfatasa alcalina. Brevemente el protocolo consiste en:

1.- Lavado corto de la membrana con tampón de lavado (0.3% Tween 20 en 0.1 M ácido maleico; 0.15 M NaCl pH 7.5).

2.- Incubar 30 minutos a temperatura ambiente con tampón de bloqueo (gelatina 1% en 0.1 M ácido maleico; 0.15 M NaCl pH 7.5)

3.- Incubar 30 minutos en tampón de bloqueo que contiene anticuerpo anti-DIG en una dilución 1:5000.

4.- El anticuerpo no unido es eliminado mediante dos lavados de 15 minutos cada uno con tampón de lavado.

5.-Equilibrar en tampón 3 (0.1 M Tris-HCl; 0.1 M NaCl; 50 mM MgCl₂ pH 9.5) durante 5 minutos.

6.- Incubar 5 minutos con una solución de CSPD (reactivo quimioluminiscente específico de la fosfatasa alcalina, Enzo Diagnostics, Japón).

7.- Eliminar el exceso de solución de CSPD.

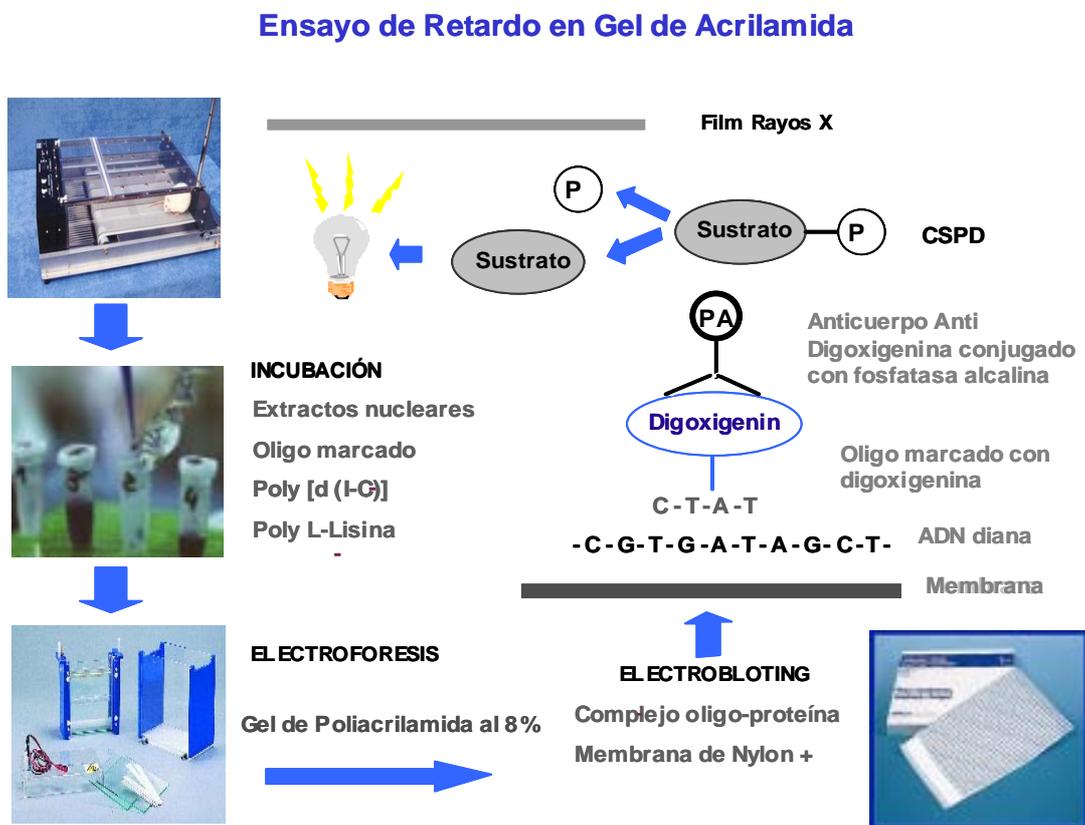
8.- Pre-incubar la membrana durante 15 minutos a 37 ° C.

9.- Exponer un film fotográfico (KODAK X-OMAT) en contacto con la membrana en cassette de autorradiografía con pantallas intensificadoras durante 45 minutos a temperatura ambiente.

2.10.6. Cuantificación de los resultados.

Las imágenes obtenidas fueron escanadas y mediante el programa PrestoPage manager for EPSON, almacenadas en formato digital TIF para poder ser densitometradas utilizando el software "Analysis 3".

Figura 1. Esquema del Ensayo de Retardo en Gel de Acrilamida para NF-κB.



2.11. Estudio de la expresión y fosforilación de I κ B- α , IKK α e IKK β y de la fosforilación de las MAP Kinasas Erk1/2 (p44/42) y p38 mediante Electroforesis en Geles de Poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) y posterior Western Blotting.

2.11.1. Fundamento

La electroforesis es un transporte bajo la acción de un campo eléctrico. La electroforesis en geles con una matriz de poliacrilamida, comunmente denominada electroforesis en poliacrilamida, se utilizan mayoritariamente para la separación de proteínas. Coretamente se utilizó el PAGE en condiciones desnaturalizantes. En presencia de algunos compuestos químicos las proteínas pierden su estructura nativa. Tales compuestos, agentes desnaturalizantes, producen el desplegamiento de la proteína que aparece así sin la organización tridimensional característica de su función biológica. La combinación de un detergente desnaturalizante (SDS) y un agente reductor (β -mercaptoetanol) es la que se utilizó.

Los complejos SDS-proteína se separan estrictamente según su tamaño molecular y, así, es posible estimar su masa molecular. En presencia de una concentración de SDS superior a 8 mM, las proteínas unen 1,4 g de SDS por gramo de proteínas, lo que equivale a la unión de una molécula de SDS por cada 2 aminoácidos. Las cargas propias de las proteínas quedan así enmascaradas o anuladas. Como cada molécula de SDS proporciona una carga negativa (del grupo SO_4^-), los complejos proteína/SDS están cargados negativamente de forma uniforme. La separación, por tanto, depende de un parámetro físico-químico, la masa molecular, que se puede calcular.

Utilizando esta técnica se estudio la expresión y fosforilación de I κ B- α e IKK- α y de la fosforilación de las MAP Kinasas Erk1/2 (p44/42) y p38. Todas ellas se valoraron utilizando como referencia los niveles de α -actina en los extractos citosólicos musculares.

2.11.2. Condiciones del gel y transferencia.

Para detectar el estado de fosforilación de p44/42 p38^{MAPK} se cargaron 30 μg de proteína citoplasmática en geles discontinuos al 12% de Acrilamida (29:1 Acrilamida:Bisacrilamida) con un 0,1% de SDS, sobre los que se aplicó un campo

eléctrico de voltaje constante de 100 Voltios durante al menos 2 horas en tampón Tris-Glicina (25 mM Tris, 200 mM Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3).

Una vez finalizado el desplazamiento electroforético el gel es transferido (Western Blotting) a una membrana de Nitrocelulosa (Schelider & Schuel, USA), mediante electrotransferencia en condiciones húmedas por medio del sistema Mini-protean II (Bio-Rad, USA).

El proceso se desarrolla durante 2 horas, a una temperatura de 4°C, una intensidad constante de 300 mAmperios, en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20% v/v, pH 8,3).

En el caso de los estudios para detectar la expresión y fosforilación de I κ B- α e IKK α se cargaron 40 μ g de proteína citoplasmática en las mismas circunstancias mencionadas con anterioridad para las MAP Kinasas.

2.11.3. Visualización.

1.- Tras la transferencia las membranas se incuban 60 minutos a temperatura ambiente en tampón de bloqueo: 5% p/v de leche desnatada en polvo, 0,1% Tween-20 en 1XTBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6).

2.- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 15 mL de TBS-T.

3.- Las membranas se incuban durante toda la noche a 4°C con agitación orbital en tampón de anticuerpo (5% BSA, 0,1 % Tween-20 en 1XTBS) y con las correspondientes diluciones de anticuerpos primarios (Cell Signaling Technology) (Ver Tabla 8)

4.- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 15 mL de TBS-T.

5.- Las membranas son incubadas 60 minutos con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, anti-IgG de conejo preparado en burro, (Cell Signaling Technology). El anticuerpo se disuelve en tampón de bloqueo (1:2000).

6.- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 15 mL de TBS-T.

7.- La membrana se incuba 1 minuto con reactivo ECL (Amersham Pharmacia, USA) e inmediatamente se expone a autorradiografía con films de fotografía (KODAK X-OMAT)

Tabla 8. Descripción de los anticuerpos utilizados para Western Blotting.

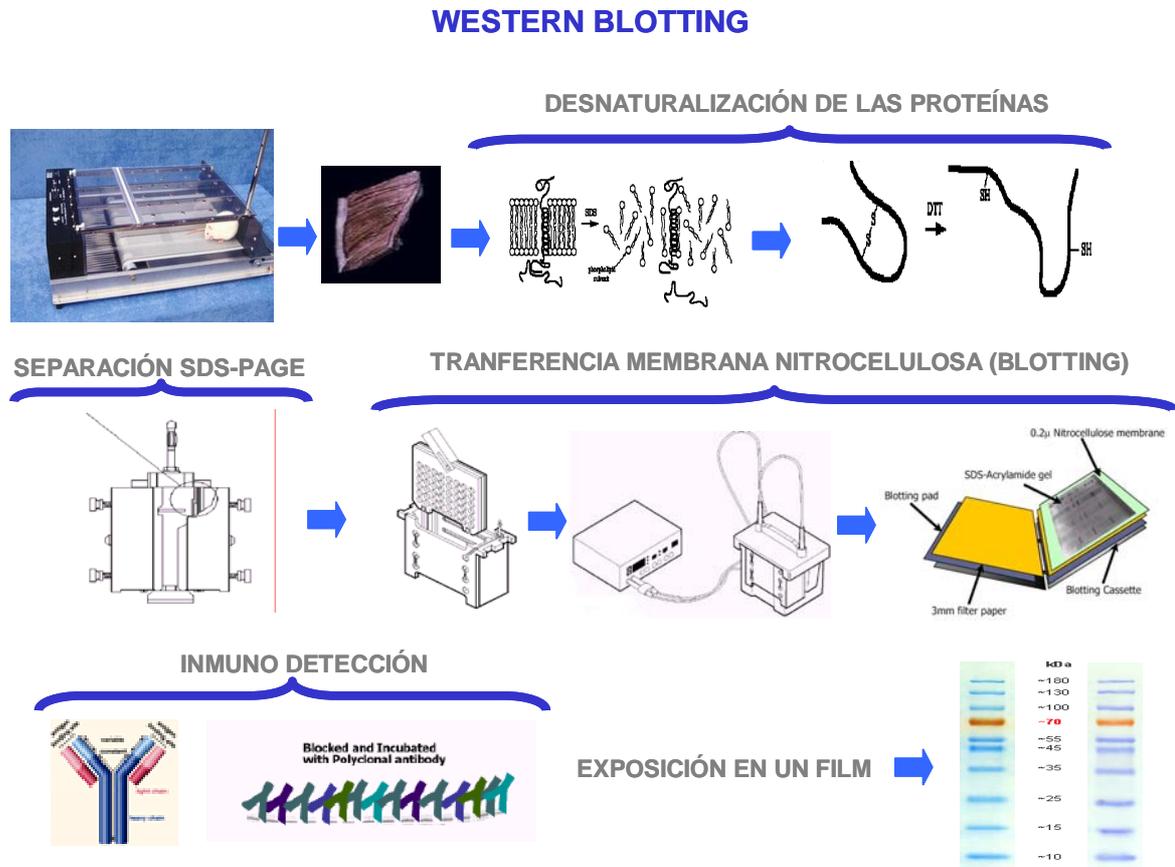
Anticuerpo	Descripción	Peso M	Fuente	Dilución
Anti $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$	Detecta los niveles totales de $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$	41 kD	Conejo	1:1000
Anti $\text{IKK}\alpha$	Detecta los niveles totales de $\text{IKK}\alpha$	85 kD	Conejo	1:1000
Anti $\text{p-I}\kappa\text{B-}\alpha$	Detecta los niveles de $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ fosforilada en Ser32	~41 kD	Conejo	1:1000
Anti $\text{p-IKK}\alpha$	Detecta los niveles de $\text{IKK}\alpha$ fosforilada en Ser180	~85 kD	Conejo	1:500
Anti $\text{p-p38}^{\text{MAPK}}$	Detecta los niveles de p38 fosforilada en Tr180 y Tir182	~38 kD	Conejo	1:1000
Anti $\text{p-p44/42}^{\text{MAPK}}$	Detecta los niveles de p44/42 fosforilada en Tr202 y Tir204	~/42-44kD	Conejo	1:1000
Anti α -actina	Detecta los niveles de la isoforma α -actina sarcomérica	43 kD	Ratón	1:500

2.11.4. Cuantificación de los resultados.

Las imágenes obtenidas fueron escaneadas y mediante el programa PrestoPage manager para EPSON, almacenadas en formato digital TIF para poder ser densitometradas utilizando el software “ Analysis 3”.

Los valores de las proteínas estudiadas se expresaron en función de los valores de expresión de α -actina en los extractos citosólicos musculares.

Figura 2. Esquema de la técnica del Western blotting



2.12. Estudio de la oxidación de proteínas musculares

2.12.1. Fundamento

Las modificaciones oxidativas de las proteínas por acción de los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno como el hidroxinonenal ocurren tanto en procesos fisiológicos como patológicos. Como consecuencia de las modificaciones, los grupos carbonilo son introducidos en el interior de las cadenas de aminoácidos de forma específica.

Los grupos carbonilo son derivatizados a 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP-hidrazona) por su reacción con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Las muestras derivatizadas son separadas mediante electroforesis en gel de acrilamida seguida por un Western Blotting y la inmunodetección.

2.12.2. Preparado del lisado proteico.

1.- Se parte de fragmentos de músculos esquelético de 100 mg, que son en primer lugar lavados en PBS.

2.- Tras el lavado se cortan en pequeños trozos en tampón de lisis frío (1 mL por cada 100 mg de tejido). El tampón consta de: 50 mM NaCl; Tris 10 mM pH 7.5; 5 mM EDTA; Sucrosa 0,25 M; Pirofosfato Sódico 30 mM; Ortovanadato Sódico 100 μ M; 50 mM NaF; 50mM DTT; 1mM PMSF; 3mM Benzamidina; 10 μ M Leupeptina; 10 μ g/mL Aprotinina; 5 μ M Pepstatina A).

3.- El músculo se tranfiere a un homogeneizador tipo Dounce de vidrio (Afora S.A., España) introducido en hielo.

4.- La suspensión se somete a diez pases de homogeneización con el émbolo.

5- El producto inicial se pasa a tubos de microcentrífuga y se centrifuga durante 15 minutos a 12.000 xg y a 4°C.

6.- El sobrenadante es almacenado a -80°C hasta su valoración y utilización

2.12.3. Derivatización de la muestra

Para la derivatización de la muestra se utilizaron los reactivos presentes en el kit (Oxyblot Protein Oxidation Kit, Intergen Company) así como el protocolo aconsejado por el fabricante.

1.- Se parte de entre 15-20 μ g de proteínas que son desnaturalizadas con SDS 12% para alcanzar una concentración final de SDS 6%.

2.- La muestra se derivatiza añadiéndole una solución 1 x DNPH. El volumen añadido es idéntico al que suman la proteína con el SDS.

3.- Los tubos se incuban a temperatura ambiente durante 15 minutos.

4.- La muestra se neutraliza con la Solución de Neutralización del Kit.

2.12.4. Condiciones del gel y transferencia.

Una vez neutralizadas las muestras están preparadas para cargar en el gel de poliacrilamida. Para valorarla oxidación de proteínas en músculo esquelético se cargaron 30 μ g en geles discontinuos al 12% de Acrilamida (29:1 Acrilamida:Bisacrilamida) con un 0,1% de SDS, sobre los que se aplicó un campo eléctrico de voltaje constante de 100 Voltios durante al menos 2 horas en tampón Tris-Glicina (25 mM Tris, 200 mM Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3). Una vez finalizado el desplazamiento electroforético el gel es transferido (Western Blotting) a una

membrana de Nitrocelulosa (Schelider & Schuel, USA), mediante electrotransferencia en condiciones húmedas por medio del sistema Mini-protean II (Bio-Rad, USA). El proceso se desarrolla durante 2 horas, a una temperatura de 4°C, una intensidad constante de 300 mAmperios, en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20% v/v, pH 8,3).

2.12.5. Visualización.

1.- Tras la transferencia las membranas se incuban 60 minutos a temperatura ambiente en tampón de bloqueo: 5% p/v de leche desnatada en polvo, 0,1% Tween-20 en 1XTBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6).

2.- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 15 mL de TBS-T.

3.- Las membranas se incuban 60 minutos a temperatura ambiente, con agitación orbital, en tampón de anticuerpo (5% BSA, 0,1 % Tween-20 en 1XTBS) y con una dilución 1:150 de anticuerpo primario (Anti-DNP de conejo)

4.- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 15 mL de TBS-T.

5.- Las membranas se incuban 60 minutos a temperatura ambiente, con agitación orbital, en tampón de bloqueo y con una dilución 1:300 de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, anti IgG de conejo preparado en cabra.

6.- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 15 mL de TBS-T.

7.- La membrana se incuba 1 minuto con reactivo ECL (Amersham Pharmacia, USA) e inmediatamente se expone a autorradiografía con films de fotografía (KODAK X-OMAT)

2.12.6. Cuantificación de los resultados.

Las imágenes obtenidas fueron escaneadas y mediante el programa PrestoPage manager para EPSON, almacenadas en formato digital TIF para poder ser densitometradas utilizando el software "Analysis 3".

2.13. Aislamiento de RNA a partir de tejido.

2.13.1. Fundamento.

El aislamiento de RNA a partir de tejido hepático se llevó a cabo utilizando el kit de la casa Amersham Pharmacia, "QuickPrep Total RNA Extraction Kit". Éste se basa en un método que combina las propiedades disruptivas y a la vez

protectoras del tiocianato de guanidina (Chirgwin y cols., 1979) con precipitación selectiva y centrifugación isopícnicamente utilizando cloruro de litio y trifluoroacetato de cesio.

Inicialmente la muestra de tejido se extrae por homogeneización en el seno de un tampón altamente concentrado en tiocianato de guanidina. Ello asegura la rápida inactivación de la actividad de las RNAsas endógenas y la completa disociación de los componentes celulares del RNA. Tras una segunda homogeneización en presencia de cloruro de litio, se añade trifluoroacetato de cesio y se centrifuga. Una vez centrifugado, obtenemos un precipitado de RNA, una capa rica en proteínas en la superficie, y una interfase que contiene DNA.

2.13.2. Reactivos.

- Tampón de extracción: solución acuosa tamponada que contiene tiocianato de guanidina y N-lauroil sarcosina.
- Solución de cloruro de litio: solución de LiCl en agua tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC).
- Trifluoroacetato de cesio (CsTFA).
- Etanol 70 %

2.13.3. Procedimiento.

Según las instrucciones del kit, seguimos los siguientes pasos, para cada una de las muestras:

- 1.- Añadir 250 μ L de tampón de extracción y 4.5 μ L de β -mercaptoetanol a un homogeneizador de vidrio
- 2.- Pesar 100 mg de tejido y añadirlos al homogeneizador.
- 3.- Homogeneizar el tejido.
- 4.- Añadir 525 μ L de cloruro de litio (LiCl).
- 5.- Homogeneizar y pasar la muestra a un "ependorf" de 1.5 mL
- 6.- Añadir 750 μ L de trifluoroacetato de cesio (CsTFA), y mezclar con pipeta estéril.
- 7.- Tapar los tubos y agitar con vórtex.
- 8.- Dejar los tubos en hielo durante 10 minutos.
- 9.- Centrifugar durante 15 minutos a velocidad máxima y temperatura ambiente.

10.- El RNA queda en el precipitado.

11.- Retirar la capa de proteínas y el sobrenadante rico en DNA mediante bomba de vacío.

Una vez extraído el RNA, se procede al lavado del mismo, siguiendo los siguientes pasos:

12.- Añadir al precipitado de RNA la mezcla de lavado, que contiene los siguiente reactivos: 113 μL de tampón de extracción, 263 μL de LiCl y 375 μL de CsTFA.

13.- Agitar con vórtex 5 veces a velocidad máxima.

14.- Retirar el sobrenadante con bomba de vacío, y mantener en hielo.

15.- Añadir 1.5 mL de etanol al 70% para precipitar el RNA.

16.- Agitar con vórtex 5 veces a velocidad máxima.

17.- Aspirar el etanol y dejar que se evapore completamente durante 15 minutos a temperatura ambiente.

18.- Disolver el RNA en 100 mL de agua libre de RNAsas (agua tratada con dietilpirocarbonato). Agitar con vórtex para favorecer la disolución.

19.- Dejar el RNA en hielo durante 15-30 minutos para que se disuelva. Agitar con vórtex para favorecer la disolución.

20.- Romper el precipitado vorteando 10 veces.

21.- Calentar a 65°C durante 10 minutos.

22.- Agitar con vórtex para asegurarse de que se ha disuelto, alicuotar y guardar a -80°C para su conservación.

Tras la extracción y lavado del RNA, el siguiente paso es la determinación de la concentración de RNA obtenida.

2.13.4. Cuantificación de la concentración de RNA.

La cuantificación del RNA se realizó mediante medida espectrofotométrica a 260 nm, y la comprobación de la pureza mediante la relación de las medidas 260/280 nm. Para hacer el blanco de la medida de RNA se puso 1 mL de agua libre de RNAsas en la cubeta de cuarzo (Ab) y para la medida se diluyó en esta agua 2 μL del RNA aislado (Am). Con los valores obtenidos se hizo el siguiente cálculo:

$$A \times 40 \times 1000/2 = \text{mg de RNA}$$

Siendo:

$$-A = A_m - A_b$$

$$-40 = \text{abs. de 1 mg de RNA}$$

$$-1000/2 = \text{Dilución del RNA.}$$

La comprobación de la pureza del RNA se llevó a cabo dividiendo el valor de la absorbancia a $\lambda=260$ nm entre el valor de la absorbancia a $\lambda=280$ nm, de forma que valores comprendidos entre 1.8 y 2.0 indican que se obtuvo un RNA de buena calidad.

Además de las medidas de absorbancia, y con el fin de asegurar la integridad del RNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Ver apartado 2.14.2)

2.14. Northern Blotting.

2.14.1 Fundamento.

La transferencia de moléculas desde geles a membranas fue originalmente descrita por E.M. Southern para el caso de DNA. Posteriormente se describió para el caso de RNA (se denominó transferencia tipo Northern). Una de las diferencias de estas dos técnicas con respecto al Western Blotting es el soporte utilizado, la agarosa. El agar se obtiene a partir de algas marianas y está formado por dos tipos de polisacárido, la agarosa y la agarpectina. La agarosa es la más utilizada para la separación de ácidos nucleicos.

2.14.2 Separación del RNA mediante electroforesis.

1.- Para el análisis por Northern blot se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% y en tampón MOPS con bromuro de etidio.

2.- La cantidad de muestra cargada fueron 25 μ g de RNA total de músculo esquelético de las distintas condiciones del estudio.

3.- La electroforesis se realizó a 100mV durante un tiempo aproximado de tres horas. Una vez terminada se iluminó el gel con luz ultravioleta para comprobar la integridad del RNA.

2.14.3 Transferencia a membrana.

- 1.- La transferencia a la membrana se llevó a cabo a temperatura ambiente y utilizando membranas de Nylon cargadas positivamente.
- 2.- El tampón de transferencia utilizado fue el SSC 10X.
- 3.- La membrana se lavó con tampón SSC 2X y se fijó el RNA a la membrana iluminándola con luz UV. de una potencia de 0,120J.

2.14.4 Hibridación con las sondas de interés.

La membrana fue tratada como se describe a continuación como paso previo a la hibridación (prehibridación)

- 1.- La prehibridación se realizó en un horno de hibridación a 42°C, durante cuatro horas y con un tampón compuesto por: 0,47g NaH₂PO₄-H₂O y 0.28g Na₂HPO₄-2H₂O en 13ml H₂O; 25 ml SSC 20x; 2 ml SDS 10%, 10 ml Denhardt's 50x; 50 ml formamida y 100 µl de DNAss (100µg/ml).
- 2.- Tras la prehibridación se incubó la membrana con la sonda marcada. El marcaje se llevó a cabo con [α -³²P]dCTP (3000Ci/mmol) utilizando el kit de marcaje randomizado Rediprime™II DNA labelling system de Amershan Pharmacia Biotech. La hibridación se realizó con el mismo tampón que la prehibridación, en el mismo horno y también a una temperatura de 42°C durante al menos 16h.
- 3.- Pasado este tiempo se procedió a los lavados, que fueron de 30 min. con tampón SSC y SDS 0,1%. La concentración del SSC fue decreciente, y variaba cada dos lavados, así en los primeros dos lavados la concentración fue 2X, en los dos siguientes fue 1X y los dos últimos se hicieron con una concentración 0,1X. Estos lavados son necesarios para eliminar la señal radiactiva inespecífica.
- 4.- La membrana se puso en contacto con un film de fotografía y en oscuridad durante un tiempo dependiente de la marca radiactiva que se había medido previamente con el contador Geiger. La exposición se llevó a cabo a -80C° con el fin de obtener un señal más nítida.
- 5.- Una vez transcurrido el tiempo necesario se reveló el film.

2.14.5. Cuantificación de los resultados.

Las imágenes obtenidas fueron escaneadas y mediante el programa PrestoPage manager para EPSON, almacenadas en formato digital TIF para poder ser densitometradas utilizando el software “ Analysis 3”.

Los valores de mRNA para la MnSOD se expresaron en función de la densidad de sus valores respectivos de 18S.

2.15. Retrotranscripción-Amplificación del RNA (RT-PCR).

2.15.1. Fundamento.

En la actualidad, existen varios métodos de determinación de la expresión del RNA mensajero, como el Northern Blotting, la hibridación *in situ*, los ensayos basados en la protección frente a las RNAsas, cDNA arrays y retrotranscripción-amplificación (RT-PCR) del RNA.

La RT-PCR consiste en dos pasos:

2.15.1.1 Síntesis de cDNA: Retrotranscripción (RT).

Consiste en la obtención de un DNA copia (cDNA) a partir de un RNA mensajero (mRNA), el proceso inverso de la transcripción. Para ello son necesarias unas DNA polimerasas particulares, llamadas transcriptasas inversas o retrotranscriptasas. Las enzimas utilizadas proceden de algunos retrovirus, que son virus que presentan RNA como genoma, en vez de DNA. Para poder expresar sus proteínas, han de pasar la información a DNA. La transcriptasa inversa utilizada para este trabajo es AMV-RT (avian myeloblastosis virus).

Para la síntesis de cDNA a partir de RNA utilizamos cebadores (“primers”) específicos del gen cuya expresión queremos determinar, de modo que la retrotranscripción es específica del cDNA que queremos amplificar.

2.15.1.2 Amplificación del DNAc: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Una vez sintetizado el cDNA, lo amplificamos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método que permite amplificar de forma selectiva secuencias específicas de DNA.

El método de PCR está basado en la síntesis de una hebra complementaria de DNA, utilizando una cadena simple como molde. La PCR utiliza dos fragmentos cortos de DNA (oligonucleótidos) como cebadores de la síntesis. Estos cebadores o “primers” se unen específicamente a secuencias que flanquean la región a amplificar, uno en cada una de las cadenas del DNA.

Los requerimientos de la reacción son simples: deoxinucleótidos (dNTPs) que proporcionan tanto la energía como las unidades de la síntesis, una polimerasa de DNA, cebadores, el DNA molde y un tampón que contenga magnesio.

El proceso básico se desarrolla en tres pasos que se repiten sucesivas veces, según el gen a amplificar:

- Desnaturalización: separación de las cadenas complementarias del DNA.

- Unión o “annealing”: unión de los “primers” específicos a sus secuencias complementarias. La temperatura de unión es característica de cada pareja de “primers”.

- Extensión: síntesis de la hebra complementaria a partir del “primer” respectivo.

La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial de la cantidad de la región diana del DNA, que viene dado por la expresión 2^n (siendo n el nº de ciclos) hasta que se llega a un punto en que disminuye la eficiencia de la enzima, y la reacción deja de ser exponencial.

2.15.2. Sondas.

Los cebadores que se utilizaron para la determinación de los niveles de expresión de los distintos genes fueron diseñados utilizando el programa GCG a partir de las secuencias génicas obtenidas en el “Genebank”.

Para cada uno de los genes a estudiar se seleccionaron las siguientes (todos expresados en dirección 5’- 3’):

Mn SOD:	CGT GCT CCC ACA CAT CAA TC
	TGA ACG TCA CCG AGG AGA AG

iNOS:	TGT GAC ACA CAG CGC TAC AA TGT TGA AGG CGT AGC TGA AC
eNOS:	TGT TGA AGG CGT AGC TGA AC TGT GAC ACA CAG CGC TAC AA

Se tomó como control interno el RNA de la proteína GAPDH dado que este RNA se expresa a un nivel constante en muchos tejidos y líneas celulares cultivadas en diferentes condiciones fisiológicas.

2.15.3. Condiciones de amplificación.

Las condiciones del RT-PCR para cada uno de los genes estudiados son:

Manganeso-superóxido dismutasa (Mn-SOD)

Retrotranscripción: 50°C durante 30'

Desnaturalización previa: 94°C durante 3'

Amplificación: (30 ciclos)

Desnaturalización: 94°C durante 30 segundos

Unión o "annealing": 64°C durante 30 segundos

Extensión: 72°C durante 30 segundos

Extensión final: 72°C durante 7 minutos

Retrotranscripción-Amplificación cuantitativa del RNA (RT-PCR en tiempo real).

Óxido Nítrico sintasa inducible (iNOS)

Retrotranscripción: 50°C durante 30'

Desnaturalización previa: 94°C durante 3'

Amplificación: (30 ciclos)

Desnaturalización: 94°C durante 30 segundos

Unión o "annealing": 63°C durante 30 segundos

Extensión: 72°C durante 30 segundos

Extensión final: 72°C durante 7 minutos

Retrotranscripción-Amplificación cuantitativa del RNA (RT-PCR en tiempo real).

Óxido Nítrico sintasa endotelial (eNOS)

Retrotranscripción: 50°C durante 30'

Desnaturalización previa: 94°C durante 3'

Amplificación: (30 ciclos)

Desnaturalización: 94°C durante 30 segundos

Unión o "annealing": 62,4°C durante 30 segundos

Extensión: 72°C durante 30 segundos

Extensión final: 72°C durante 7 minutos

Retrotranscripción-Amplificación cuantitativa del RNA (RT-PCR en tiempo real).

En la presente tesis utilizamos el método de retrotranscripción-amplificación (RT-PCR) cuantitativo en tiempo real para determinar la expresión del RNA.

2.16. Retrotranscripción-Amplificación cuantitativa del RNA (RT-PCR en tiempo real).

2.16.1. Fundamento.

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) es actualmente el método más sensible y exacto para la detección de niveles de RNA mensajeros (RNAm), tanto en células como en tejidos.

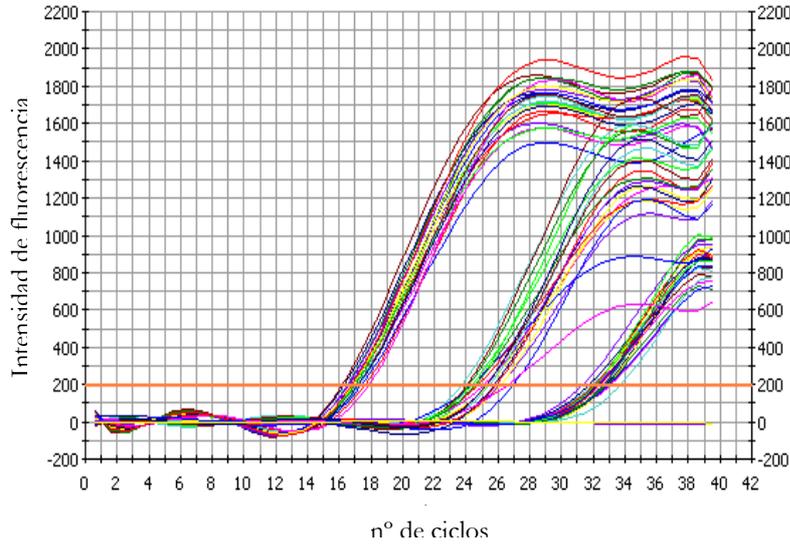
Este método, a diferencia del semicuantitativo, permite la detección directa del producto de amplificación durante la fase exponencial de la reacción, a través del empleo de compuestos con propiedades fluorescentes que sólo emiten fluorescencia cuando el DNA está en forma de doble cadena, de modo que determinando el incremento de fluorescencia se puede determinar la cantidad de producto formado.

La sustancia fluorescente utilizada en nuestros experimentos fue SYBR Green I, el cual se une al DNA y emite fluorescencia sólo en el caso de que las dos hebras complementarias de DNA estén unidas.

Así, este método nos permite seguir la reacción a medida que transcurre a través del incremento de fluorescencia, y nos permite controlar la reacción en todo momento (aumento del nº de ciclos, repetición de ciclos, pausa...).

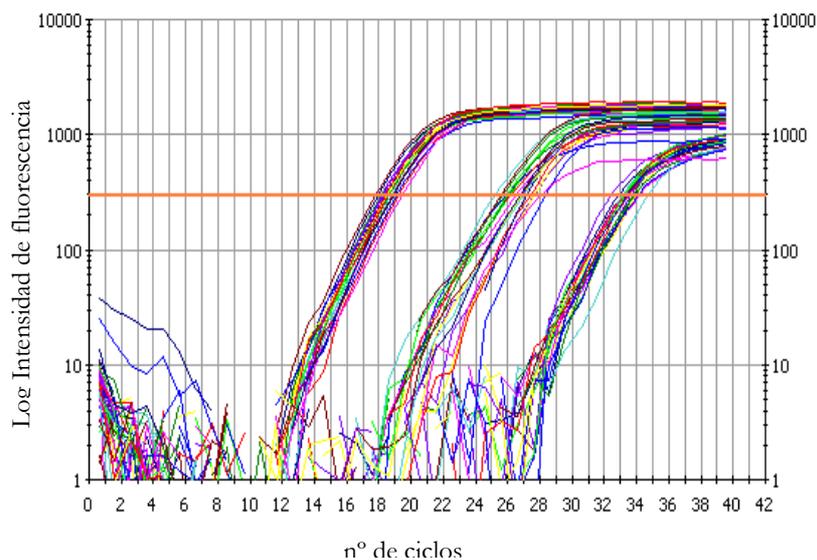
La figura 3 representa las curvas de amplificación que obtenemos mediante este método.

Figura 3. Curvas de amplificación RT-PCR en tiempo real.



El software del ordenador construye estas curvas de amplificación a partir de los datos de emisión de fluorescencia recogidos durante la reacción en tiempo real. Así, al final obtenemos una representación en la que el eje de ordenadas es la fluorescencia y el eje de abscisas es el nº de ciclos transcurridos. Una vez obtenida la representación, el eje de ordenadas se transforma en logarítmico para su mejor interpretación (figura 4).

Figura 4. Curvas de amplificación tras transformar el eje de ordenadas en logarítmico.



En el caso de la PCR cuantitativa, el parámetro de medida de la expresión de un determinado gen no es la fluorescencia, sino el ciclo en el que la amplificación comienza a ser exponencial. Este ciclo se denomina ciclo umbral ("threshold cycle", Ct), pues es a partir del cual la amplificación empieza a ser realmente apreciable. De este modo, los valores de ciclo umbral decrecerán linealmente conforme aumenta la cantidad de cDNA (DNA copia) de partida, puesto que cuanto más copias de RNAm (RNA mensajero) de partida del gen estudiado haya, más cDNA se obtendrá en la retrotranscripción, y antes comenzará la amplificación a ser exponencial.

Así pues, realizando una curva estándar de cantidades de RNAm de partida conocidas, este método permite la cuantificación relativa de la expresión de un gen en función de la expresión de un gen de expresión constitutiva, es decir, que no varía según diferentes condiciones. La cuantificación absoluta supone el conocimiento del número exacto de copias de RNAm de partida empleado para la realización de la curva estándar.

Otro método para determinar la expresión a partir de las curvas de amplificación obtenidas consiste en la comparación de Ct. Como hemos señalado, cuanto más RNAm de partida hay, menor es el Ct obtenido. Este método se asemeja al método de la curva estándar, pero utiliza fórmulas aritméticas cuya resolución conduce a la cuantificación relativa de la expresión de un determinado gen.

2.16.2. Procedimiento.

La reacción de RT-PCR cuantitativa se llevó a cabo utilizando el kit denominado "Tth DNA Polymerase" de la casa Boehringer Mannheim, que permite realizar en un único paso la transcripción inversa y la amplificación del cDNA sintetizado. La Tth DNA polimerasa posee la propiedad de actuar como retrotranscriptasa (en presencia de iones Mn^{2+}) y como polimerasa al mismo tiempo. Además se utilizó el reactivo SYBR Green I para la detección fluorescente del producto formado.

La reacción se realizó según el protocolo proporcionado por el citado kit, y consiste en la preparación de dos mezclas por separado, cada una de las cuales contiene:

Mezcla 1 (por muestra):

Nucleótidos.....	0.3 mM concentración final
“Primers”.....	0.4 μM cada uno, concentración final
Muestra de RNA.....	20 ng de RNA
Agua libre de RNAsas.....	c.s.p. 12.5 μL

Mezcla 2 (por muestra):

Tampón con Mg ²⁺	1.5 mM MgCl ₂ concentración final
Mn(OAc) ₂	2.5 mM concentración final
Tth DNA polimerasa.....	5 U/reacción
SYBR Green I.....	dilución 1/20000
Agua libre de RNAsas.....	c.s.p. 12.5 μL

Una vez preparadas, ambas mezclas se juntan y se introducen en pocillos de placas diseñadas para este fin y se introducen en el termociclador, que ha sido programado previamente según las condiciones de amplificación señaladas en el apartado 2.15.3 de la presente tesis para la manganeso-superóxido dismutasa y la óxido nítrico sintasa inducible y endotelial (genes problema). El gen de referencia empleado fue gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), y su amplificación se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que los genes problema.

2.16.3. Cálculos.

En la presente tesis realizamos una cuantificación relativa del gen problema, utilizando el método de comparación de Ct.

La ecuación que permite la cuantificación por este método viene dada por:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_1 - \Delta Ct_2$

siendo $\Delta Ct_1 = Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia de la muestra 1}$

$\Delta Ct_2 = Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia de la muestra 2}$

Para que la determinación a través de esta fórmula aritmética sea válida, debe cumplirse que la eficiencia de la reacción para el gen problema y para el gen de referencia sea aproximadamente igual. La comprobación de este requisito se realiza comparando curvas estándar de cantidades de RNA conocidas para cada

uno de los genes, el problema y el de referencia. Una vez obtenidas las curvas de amplificación se representa el logaritmo de la concentración frente al Ct, tanto para el gen problema como para el de referencia, y se calcula la pendiente de la recta para cada una de las representaciones obtenidas. Para que las eficiencias sean similares, las pendientes de ambas rectas deben ser similares, puesto que la eficiencia de la reacción de amplificación viene dada por la siguiente ecuación:

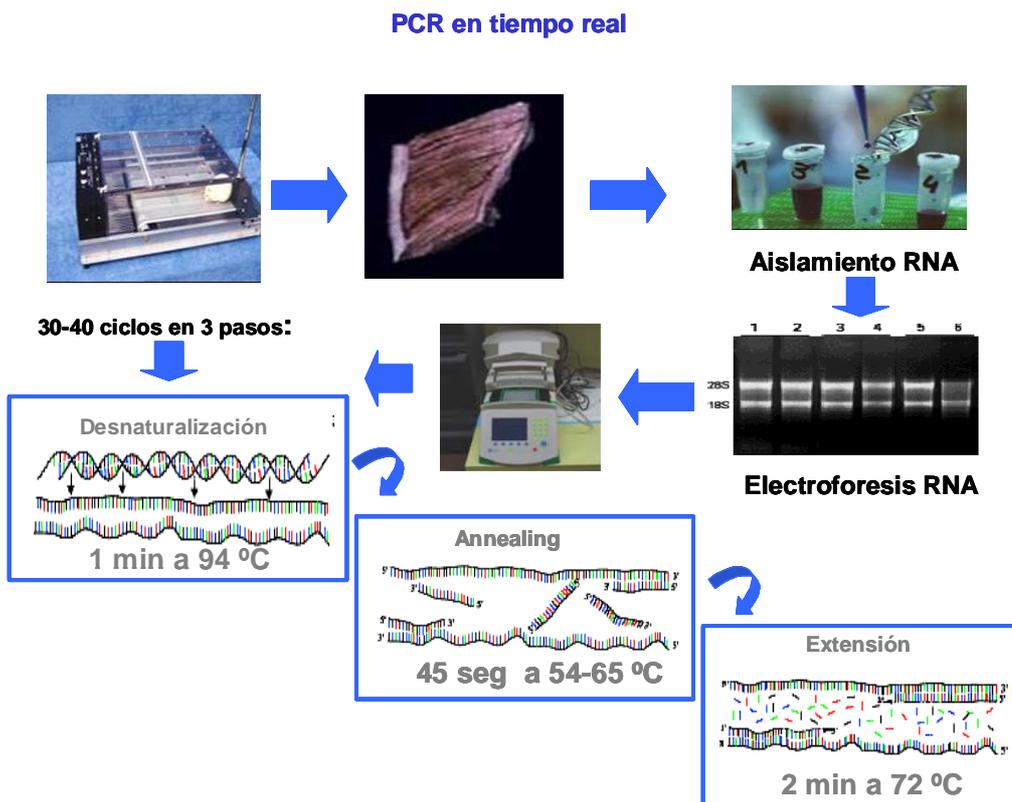
$$\text{Eficiencia} = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1$$

Para una pendiente de -3.322 obtenemos una eficiencia del 100%, lo cual significa que el aumento de un ciclo de amplificación durante la fase exponencial de la reacción supone exactamente la duplicación del material amplificado.

Una reacción de amplificación debe tener una eficiencia lo más cercana a 100% para estar optimizada.

Una vez comprobamos que las eficiencias son comparables, realizamos las reacciones de amplificación conjuntamente para ambos genes (problema y referencia) y para cada muestra: reposo, ejercicio y ejercicio con alopurinol por triplicado y aplicamos la ecuación de comparación de Ct mencionada anteriormente para el cálculo de la diferencia de expresión del gen manganeso-superoxido dismutasa entre los tres grupos.

Figura 5. Esquema de la PCR cuantitativa.



3. Análisis estadístico de los resultados

Para el análisis estadístico de los resultados, primero se realizó un análisis de la varianza. La hipótesis nula fue aceptada para todos los valores de aquellos grupos en los cuales F no fue significativa para un valor $p \leq 0.05$. Luego, el grupo de datos para los que F fue significativa fue analizado por el test de la t de Student. La simbología empleada en la presente tesis es la siguiente: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

En el caso de los ciclistas comparamos las medias utilizando un análisis de varianza de medidas repetidas. El valor de la p se determinó utilizando el test de Scheffe de comparaciones múltiples.

Con respecto a los resultados de expresión obtenidos mediante RT-PCR en tiempo real, en primer lugar se estudió mediante ANOVA si había algún grupo experimental que presentaba diferencias estadísticamente significativas, y en caso de demostrarse diferencia por parte de alguno de los grupos, se utilizó el test de Tukey de múltiples comparaciones.

IV. RESULTADOS

1.- Estudio del estrés oxidativo asociado a los procesos de isquemia-reperfusión. Resultados en animales y en humanos.

Se sabe que durante los procesos de isquemia-reperfusión cardíaca se genera gran cantidad de radicales libres. Así los fenómenos de hipoxia y posterior reoxigenación se asocian con una situación de estrés oxidativo. El ascenso a grandes alturas, la utilización de una cámara hipobárica y el ejercicio físico agotador, son 3 modelos similares al fenómeno de isquemia-reperfusión. El estrés oxidativo asociado a dichos modelos o a su combinación, en ratas y humanos, ha sido el objeto del presente estudio.

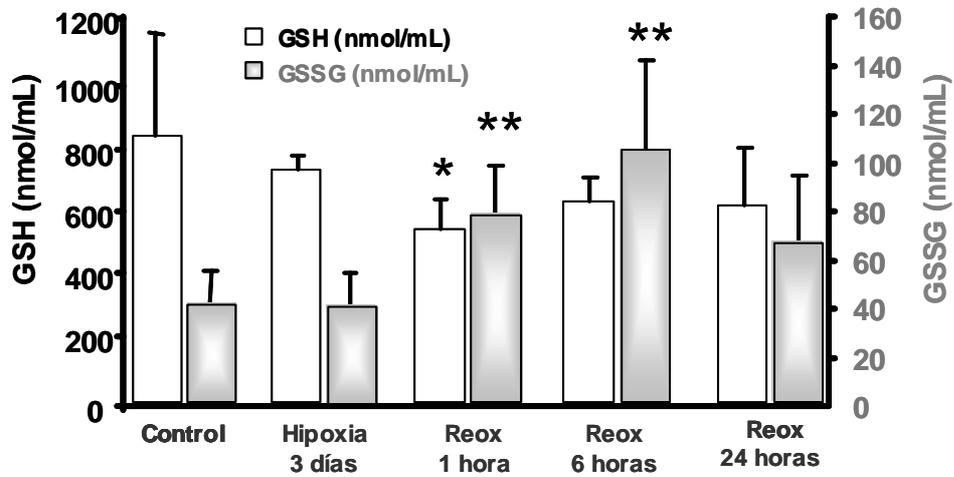
1.1. Efecto de la hipoxia y reoxigenación en el estatus de glutatión sanguíneo en ratas.

Determinamos la concentración de GSH, GSSG y calculamos el cociente $(GSSG/GSH) \times 100$ en sangre venosa de ratas jóvenes sometidas a hipoxia (8% O_2) en un cámara hipobárica durante 3 días y reoxigenadas (normoxia) a distintos tiempos.

Los resultados de la Figura 1 nos permiten confirmar que existen un aumento significativo en los valores de glutatión oxidado en sangre tras 1 y 6 horas de reoxigenación en los animales sometidos a un proceso de hipoxia previo. Los niveles de GSSG fueron un 202% mayores tras la reoxigenación durante 1 hora y 271% mayores tras la reoxigenación durante 6 horas, del grupo sometido a hipoxia. Además los niveles de GSH disminuyeron significativamente tras la reoxigenación de los animales hipóxicos durante 1 hora. Los niveles de glutatión reducido fueron un 125% menores tras la reoxigenación durante 1 hora con respecto al grupo sometido a hipoxia.

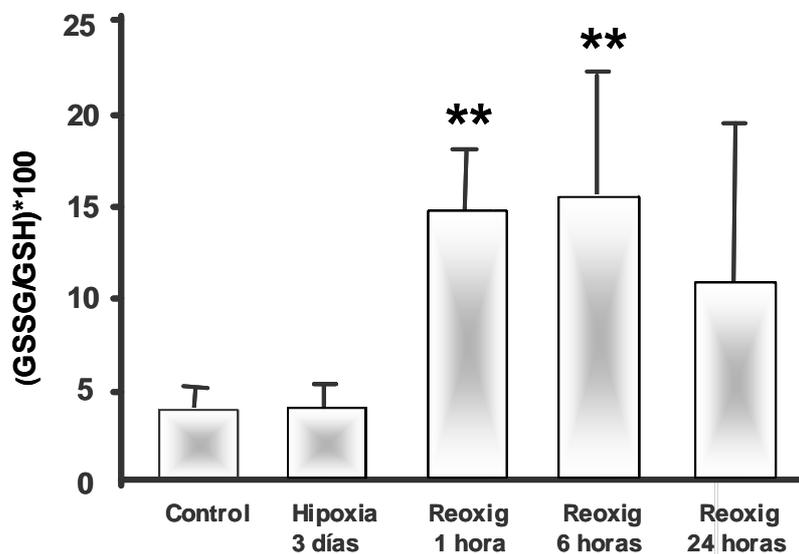
Utilizando los datos de la Figura 1 calculamos el cociente $(GSSG/GSH) \times 100$. Este cociente indica el porcentaje de GSH que se encuentra en forma de GSSG, por lo que se le considera uno de los mejores indicadores de estrés oxidativo. Como mostramos en la Figura 2 el cociente $(GSSG/GSH) \times 100$ aumentó significativamente tras 1 hora y 6 horas de reoxigenación. El cociente aumentó, con respecto al grupo de ratas sometidas a hipoxia durante 3 días, en un 374 % tras la reoxigenación durante 1 hora y en un 400% en el grupo reoxigenado durante 6 horas.

FIGURA 1: Niveles de glutatión sanguíneo en ratas sometidas a un proceso de isquemia-reperfusión.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n=6-8). La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente a grupo sometido a hipoxia durante 3 días y (**) $p < 0.01$ frente a grupo sometido a hipoxia durante 3 días .

FIGURA 2: Cociente (GSSG/GSH) x100 en sangre de ratas sometidas a un proceso de isquemia-reperfusión.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n=6-8). La significación estadística se expresa como (**) $p < 0.01$ frente a grupo sometido a hipoxia durante 3 días.

1.2. Efecto de la hipoxia y reoxigenación en el estatus de glutatión sanguíneo en alpinistas durante su ascenso al Gasherbrum II (GII), pico de 8034 metros, Himalaya.

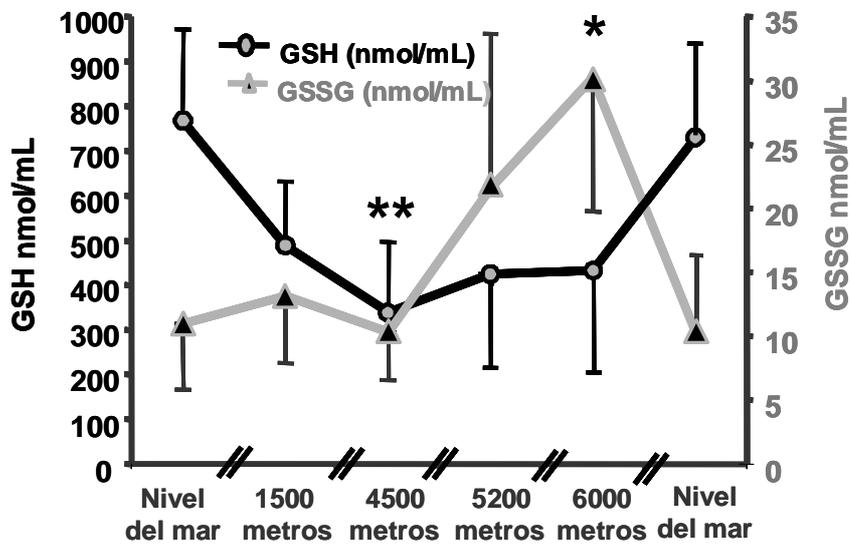
Determinamos la concentración de GSH, GSSG y calculamos el cociente (GSSG/GSH) x100 en sangre venosa de un grupo de 10 alpinistas (8 hombres y 2 mujeres) que participaron en la primera expedición Zambón al GII (8034m, Himalaya) sin la utilización de máscaras de oxígeno.

Los resultados de la Figura 3a muestran como el ejercicio físico realizado a grandes alturas provoca un aumento de los niveles de GSSG y un descenso de los niveles de GSH, que es progresivo a medida que van acercándose a la cima de la montaña. Como se puede observar en esta misma figura el aumento de los niveles de GSSG sanguíneo es significativo en el grupo de alpinistas que alcanzan la altura de 6000 metros. Los valores de GSSG fueron un 276% mayores a esta altura si los comparamos con los obtenidos a nivel del mar. Los valores de GSH disminuyeron de forma significativa (144%) en los alpinistas que alcanzaron la altura de 4500 metros, en relación a los valores obtenidos a nivel del mar.

Utilizando los datos de la Figura 3a calculamos el cociente (GSSG/GSH) x100. Como mostramos en la Figura 3b este valor aumenta a medida que se alcanza una mayor altura. Los valores del cociente son un 488% más altos a 6000 metros si los comparamos con los obtenidos a nivel del mar. Éste incremento es significativo a los 5.200 metros de altura con respecto al nivel del mar.

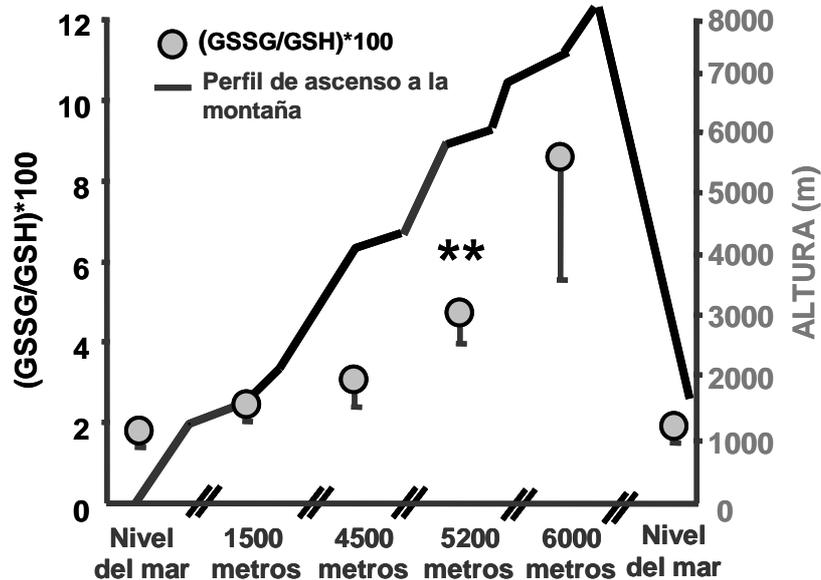
En la gráfica de la Figura 4 presentamos los valores de presión parcial de oxígeno y presión barométrica a distintas alturas (Wilmore y Costill, 1998). Como podemos observar, ambos valores descienden de forma progresiva a medida que la altura va incrementándose. A los 4000 metros de altura, por ejemplo, la presión parcial de oxígeno es un 39% menor (96 mmHg) que a nivel del mar (159 mmHg). La altura máxima a la que conseguimos muestra del grupo de alpinistas fueron los 6000 metros. La presión parcial de oxígeno a ese nivel, según la gráfica, es un 54% (73 mm Hg) menor que a nivel del mar. Esto supone que los alpinistas disponen de menos de la mitad de oxígeno en este punto de la montaña. Como hemos comentado en el apartado de material y métodos las extracciones de las muestras, una vez alcanzada la altura de 4500 metros (campamento base), siempre fueron realizadas a este nivel. Esto significa que el grupo de alpinistas tras el ascenso a 5200 y 6000 metros descendieron a campamento base para realizar la extracción. Este hecho asemeja el proceso al que se vieron sometidos, al de la isquemia-reperfusión.

FIGURA 3a: Niveles de glutatión sanguíneo en alpinistas durante su ascenso al GII.

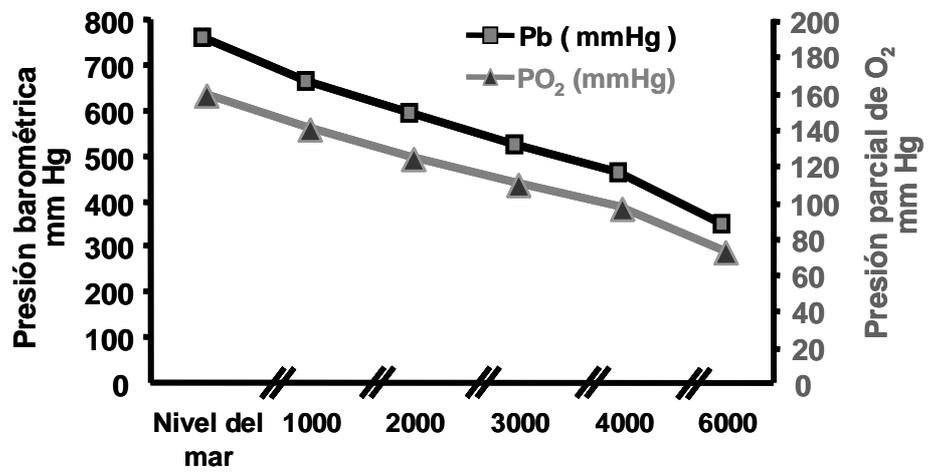


Los valores se expresan como media \pm desviación estándar ($n=2-4$). La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente a nivel del mar y (**) $p < 0.01$ frente a nivel del mar.

FIGURA 3b: Cociente (GSSG/GSH) x100 en sangre de alpinistas durante su ascenso al GII.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar ($n=2-4$). La significación estadística se expresa como (**) $p < 0.01$ frente a nivel del mar.

FIGURA 4: Presión barométrica y Presión parcial de O₂ a distintas alturas.

Valores en mmHg de presión barométrica y presión parcial de Oxígeno a distintas alturas (Willmore y Costill, 1998)

2.- Estudio del efecto de la administración de alopurinol sobre el daño muscular asociado al ciclismo de alta competición. Resultados en humanos.

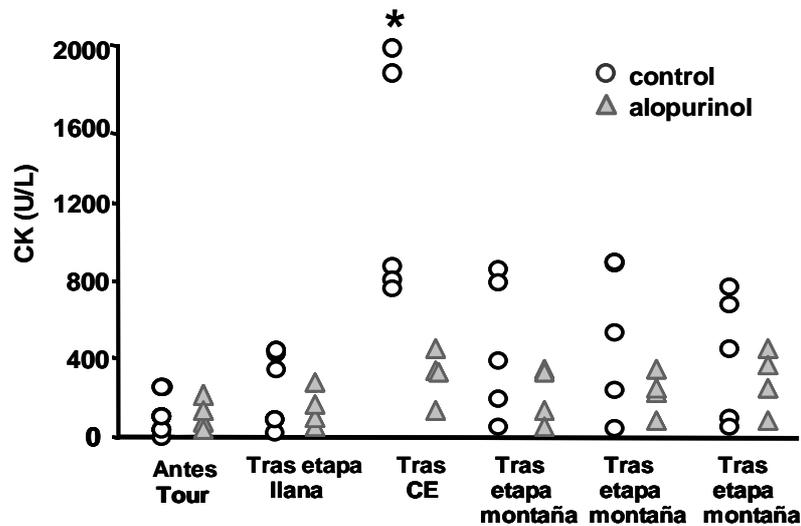
El ejercicio físico, cuando se realiza hasta el agotamiento, puede generar radicales libres (Sastre y cols., 1992). En nuestro laboratorio hemos demostrado que la xantina oxidasa, implicada en el proceso de isquemia-reperfusión, es la enzima responsable del daño asociado al ejercicio físico agotador (Viña y cols., 2000; Viña y cols., 2000). En este apartado de los resultados, nos planteamos el estudio del efecto que la administración de alopurinol podría tener sobre los marcadores de daño muscular en un grupo de ciclistas participantes en el Tour de Francia.

2.1. Efecto de la administración de alopurinol sobre la actividad en plasma de la enzima CK.

Determinamos la actividad total de la enzima CK, como marcador de daño muscular, en muestras de plasma del equipo ciclista US Postal Team durante su participación en el Tour de Francia 2001. La CK es una enzima intracelular, ampliamente distribuida en los tejidos del organismo, especialmente en músculo esquelético. Dado su gran tamaño, su detección en plasma se considera un marcador de daño muscular. Los valores normales son inferiores a 160 U/l en hombres, y menores de 130 U/l en mujeres.

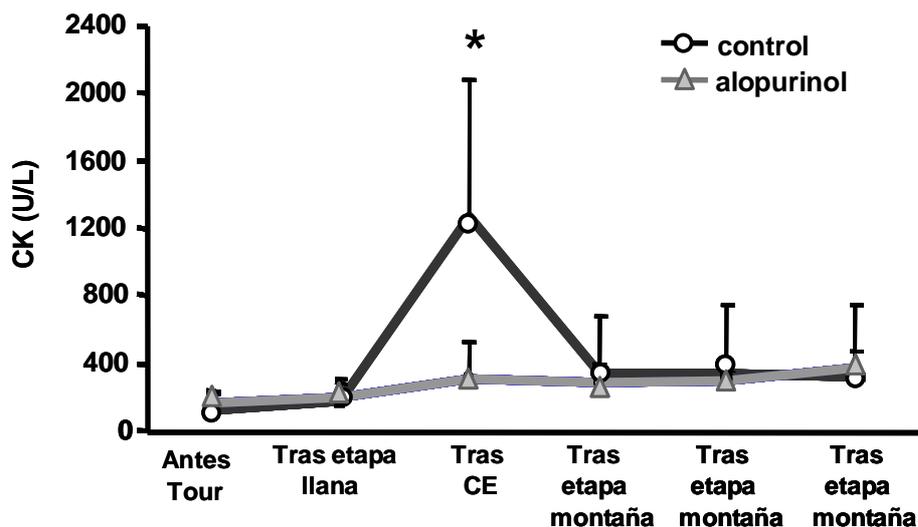
Los resultados de las Figuras 5a y 5b muestran un aumento en la actividad CK en plasma únicamente tras la contrarreloj por equipos. En esta etapa de 70 Km, el tiempo acreditado por el equipo es el del quinto ciclista en atravesar la línea de meta lo que da garantías de que todos los componentes del equipo se ejercitan hasta el agotamiento. Los ciclistas que recibieron alopurinol no mostraron el incremento en plasma de la enzima, que fue significativo en aquellos que recibieron placebo.

FIGURA 5a: Valores individuales de actividad plasmática de la enzima CK en ciclistas durante su participación en el Tour de Francia.



Valores individuales de actividad CK, grupo control (n=5), grupo alopurinol (n=4). La comparación de las medias se realizó utilizando un análisis de varianza de medidas repetidas. El valor de la p se determinó utilizando el test de Scheffe de comparaciones múltiples. La significación estadística se expresa como (*) $p=0.03$ frente a grupo alopurinol. CE: Contrarreloj por equipos.

FIGURA 5b: Valores de las medias de actividad plasmática de la enzima CK en ciclistas durante su participación en el Tour de Francia.



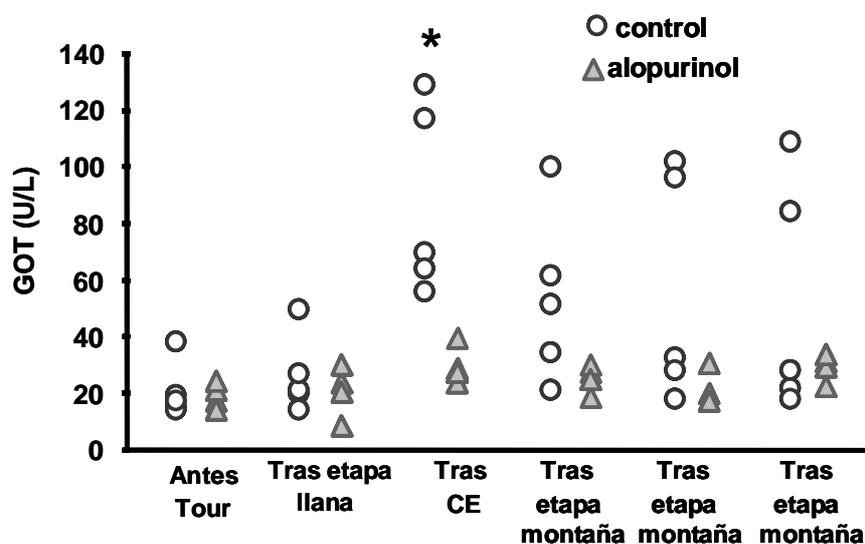
Valores de la media de actividad CK, grupo control (n=5), grupo alopurinol (n=4). La comparación de las medias se realizó utilizando un análisis de varianza de medidas repetidas. El valor de la p se determinó utilizando el test de Scheffe de comparaciones múltiples. La significación estadística se expresa como (*) $p=0.03$ frente a grupo alopurinol. CE: Contrarreloj por equipos.

2.2. Efecto de la administración de alopurinol sobre la actividad en plasma de la enzima GOT.

Determinamos la actividad de la enzima GOT, como marcador de daño muscular, en muestras de plasma del equipo ciclista US Postal Team durante su participación en el Tour de Francia 2001. Esta enzima se encuentra en el citoplasma y las mitocondrias de células del tejido cardíaco, hepático y esquelético, principalmente. Los valores normales en humanos para GOT son 5-40 U/l.

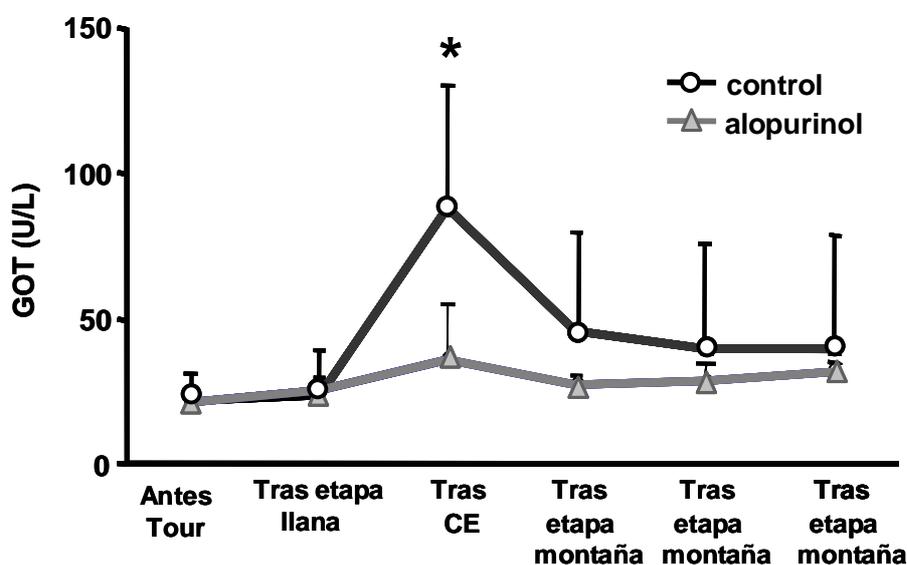
Los resultados de las Figuras 6a y 6b muestran un aumento en la actividad GOT en plasma únicamente tras la contrarreloj por equipos. Los ciclistas que recibieron alopurinol no mostraron dicho aumento, que fue significativo en aquellos que recibieron placebo.

FIGURA 6a: Valores individuales de la actividad plasmática de la enzima GOT en ciclistas durante su participación en el Tour de Francia.



Valores individuales de actividad GOT, grupo control (n=5), grupo alopurinol (n=4). La comparación de las medias se realizó utilizando un análisis de varianza de medidas repetidas. El valor de la p se determinó utilizando el test de Scheffe de comparaciones múltiples. La significación estadística se expresa como (*) $p=0.02$ frente a grupo alopurinol. CE: Contrarreloj por equipos.

FIGURA 6b: Valores de las medias de actividad plasmática de la enzima GOT en ciclistas durante su participación en el Tour de Francia.



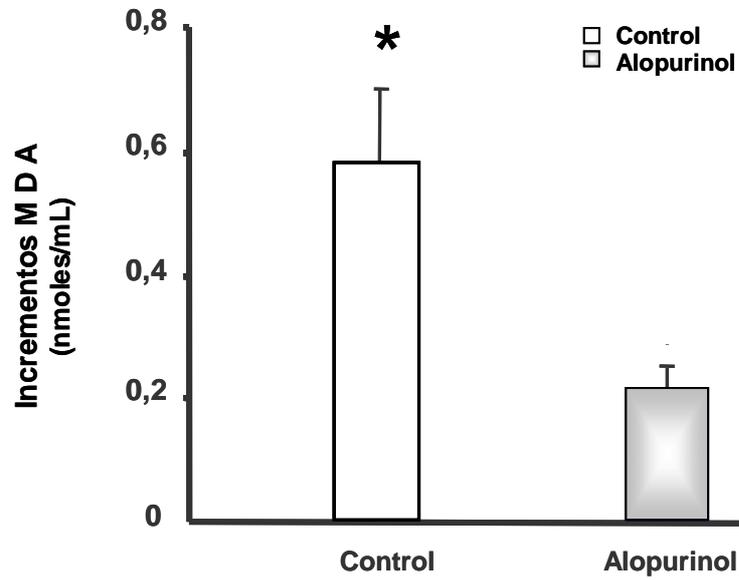
Valores de la media de actividad GOT, grupo control (n=5), grupo alopurinol (n=4). La comparación de las medias se realizó utilizando un análisis de varianza de medidas repetidas. El valor de la p se determinó utilizando el test de Scheffe de comparaciones múltiples. La significación estadística se expresa como () $p=0.02$ frente a grupo alopurinol. CE: Contrarreloj por equipos.*

2.3. Efecto de la administración de alopurinol sobre los niveles de lipoperóxidos en plasma.

Determinamos los niveles plasmáticos de malondialdehído, como índice de peroxidación lipídica, del equipo ciclista US Postal Team durante su participación en el Tour de Francia 2001.

Los resultados de la Figura 7 representan las diferencias entre la primera (antes del inicio de la competición) y la última extracción, en los valores de lipoperóxidos de los ciclistas de ambos grupos. Los resultados muestran un aumento en los niveles de lipoperóxidos al finalizar la carrera tanto en el grupo que recibió alopurinol como en el grupo que recibió placebo. Este aumento, sin embargo, fue significativamente menor en el grupo al que le fue administrado el alopurinol.

FIGURA 7: Incrementos en los niveles de malondialdehído en plasma de ciclistas durante su participación en el Tour de Francia.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar ($n=4-5$). La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente a grupo alopurinol

3.- Estudio del estrés oxidativo asociado a la práctica de ejercicio físico agotador en ratas. Efecto de la administración de alopurinol.

Por razones éticas obvias, tuvimos que volver al modelo en animales para estudiar el efecto de los radicales libres generados por la xantina oxidasa en el estrés oxidativo y la señalización celular durante el ejercicio.

3.1. Efecto de la administración de alopurinol sobre el tiempo de carrera y las concentraciones de ácido láctico de las ratas sometidas a un protocolo de ejercicio físico agotador.

Determinamos el efecto de la administración de alopurinol sobre el tiempo de carrera de los animales sometidos al protocolo de ejercicio físico agotador. En la Tabla 1 se muestra como no existe una diferencia significativa entre el tiempo que los dos grupos experimentales tardaron en llegar al agotamiento. En ambos casos éste fue de aproximadamente 55 minutos. Utilizamos la medida de la concentración de lactato en sangre como parámetro de fatiga (Hermansen, 1979).

Como se puede observar en la Tabla 1 la concentración de lactato aumenta significativamente en los animales sometidos a ejercicio, independientemente del tratamiento.

TABLA 1. Valores de pesos, tiempos de carrera y lactato tras el protocolo de ejercicio físico en tapiz rodante.

Grupos	Peso (gramos)	Tiempo de carrera (minutos)	Lactato en sangre (mmol/L)
Reposo (n=6)	245 ± 9	0	1.3 ± 0.4
Agotado (n=5)	250 ± 12	58 ± 7	7.5 ± 3.1 *
Agotado Alopurinol (n=5)	256 ± 10	55 ± 5	7.9 ± 2.9 *

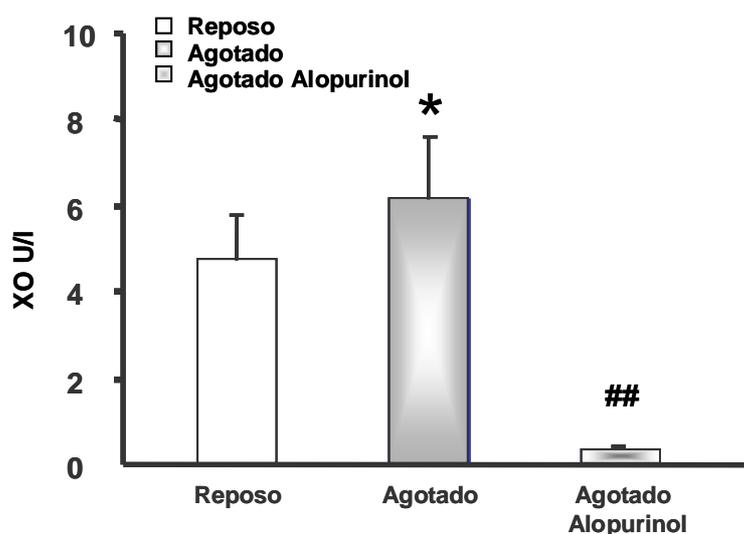
Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n=5-6). La significación estadística se expresa como ()p < 0.05 frente a grupo reposo.*

3.2. Efecto de la administración de alopurinol en la activación de la enzima xantina oxidasa en plasma de ratas sometidas a un protocolo de ejercicio físico agotador.

Determinamos el efecto de la administración de alopurinol sobre la actividad xantina oxidasa en plasma de ratas sometidas a un protocolo de agotamiento en tapiz rodante.

En la Figura 8 podemos observar como inmediatamente después del ejercicio físico se produjo un aumento significativo de la actividad xantina oxidasa en plasma. La administración de alopurinol inhibió completamente la actividad de la enzima en estos animales.

FIGURA 8: Actividad xantina oxidasa en plasma de ratas sometidas a un ejercicio físico agotador.



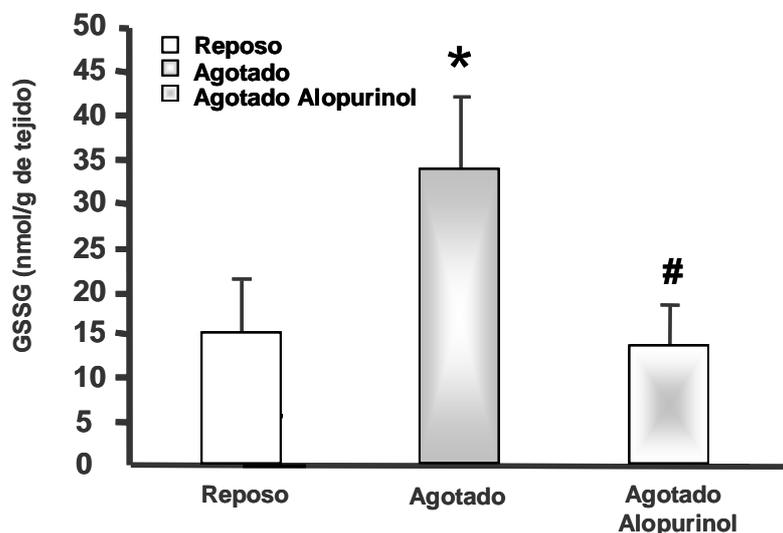
Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n=5-8). La significación estadística se expresa como () $p < 0.05$ frente a grupo reposo y (**) $p < 0.01$ frente a grupo agotado.*

3.3. Efecto de la administración de alopurinol en el estatus de glutatión en músculo gastrocnemio de ratas sometidas a un protocolo de ejercicio físico agotador.

Determinamos la concentración de GSH, GSSG y calculamos el cociente (GSSG/GSH) $\times 100$ en homogenados de músculo gastrocnemio de los animales sometidos al protocolo de ejercicio físico agotador.

En la Figura 9 se puede observar un aumento de un 50% en los niveles de GSSG, en el homogenado, inmediatamente después del ejercicio. Este incremento se previene con la administración de alopurinol. Los valores de GSH prácticamente no se modificaron en el grupo de animales sometidos al protocolo de agotamiento, mientras que en el grupo al que se le administró alopurinol descendieron en un 73% tras el ejercicio. Utilizando estos datos calculamos el cociente (GSSG/GSH) x 100 que no mostró cambios significativos en ninguno de los grupos.

FIGURA 9: Niveles de GSSG en músculo gastrocnemio de ratas tras la realización de un ejercicio físico agotador.



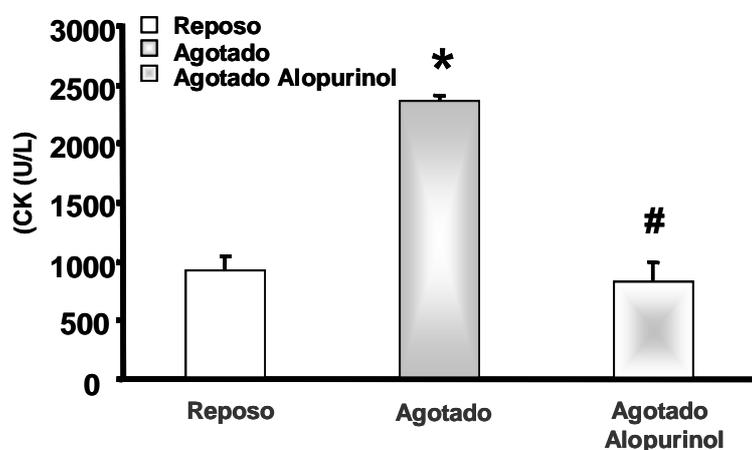
Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n=5). La significación estadística se expresa como () $p < 0.05$ frente a grupo reposo y (#) $p < 0.05$ frente a grupo agotado.*

3.4. Efecto de la administración de alopurinol sobre la actividad en plasma de la enzima CK.

Determinamos la actividad de la enzima CK como marcador de daño muscular en muestras de plasma de los animales sometidos al protocolo de agotamiento en tapiz rodante.

Los resultados de la Figura 10 muestran un aumento en la actividad CK en plasma tras el ejercicio. Los animales que recibieron alopurinol no mostraron dicho aumento, que fue significativo en aquellos que recibieron placebo.

FIGURA 10: Valores de las medias de actividad plasmática de la enzima CK en ratas sometidas a un protocolo de ejercicio físico agotador.



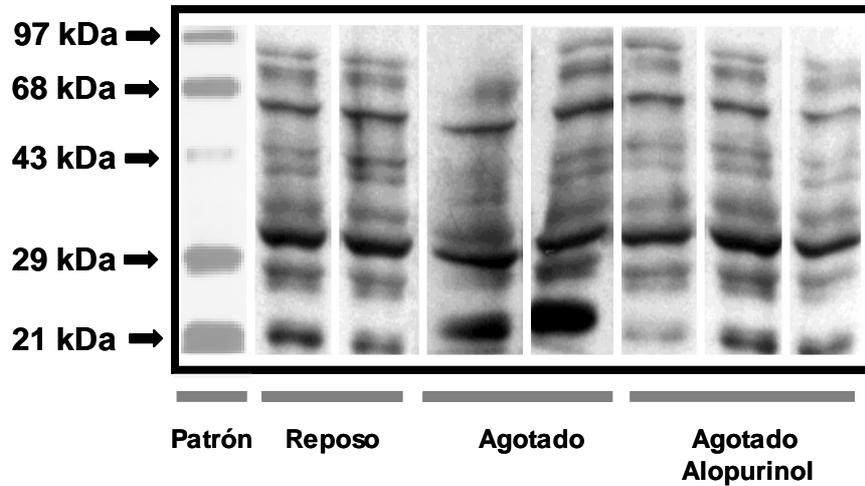
Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n=4). La significación estadística se expresa como () $p < 0.05$ frente a grupo reposo y (#) $p < 0.05$ frente a grupo agotado.*

3.5. Efecto de la administración de alopurinol sobre la oxidación de proteínas en músculo gastrocnemio de ratas tras la realización de un ejercicio físico agotador.

En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como lisina, prolina y arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas (Stadtman y cols., 1992). Éste suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína (Grant y cols., 1993). En nuestro estudio determinamos la oxidación de proteínas en músculo de rata utilizando la técnica del western blot. Con esta técnica detectamos los derivados carbonilo formados durante el ejercicio por su reacción con la 2,4-dinitrofenilhidracina (Nakamura y Goto, 1996).

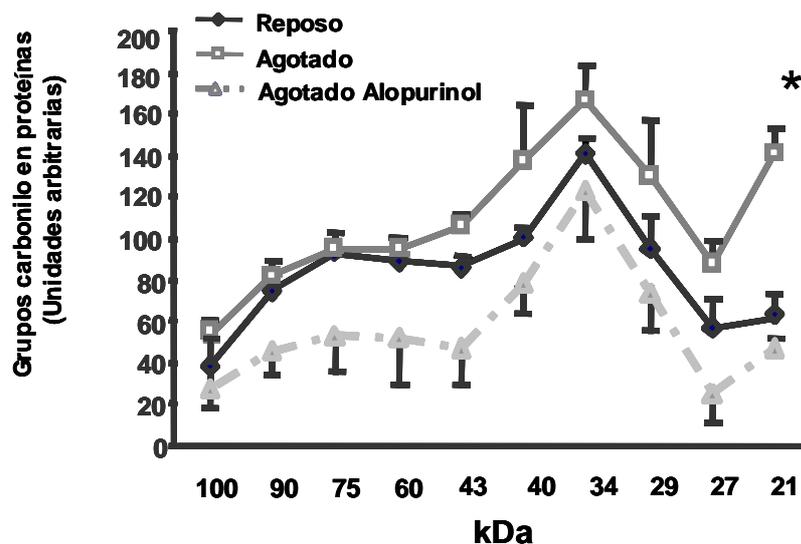
Los resultados de las Figuras 11 y 12 muestran un aumento de la oxidación de proteínas en el grupo agotado, significativo en las de bajo peso molecular (21 kD). Este aumento se previno claramente, en el grupo de animales que recibieron alopurinol.

FIGURA 11: Western Blot de proteínas oxidadas en músculo gastrocnemio de ratas sometidas a un protocolo de ejercicio físico agotador.



Western blot de proteínas oxidadas. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo gastrocnemio de rata en reposo e inmediatamente después de un ejercicio físico agotador en tapiz rodante, previa administración de alopurinol (Agot Alop) o vehículo (Agotado). El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del producto de Intergen Company (Oxyblot™).

FIGURA 12: Densitometría del Western Blot de proteínas oxidadas en músculo gastrocnemio de ratas sometidas a un protocolo de ejercicio físico agotador.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar ($n=3$). La significación estadística se expresa como () $p < 0.05$ frente a grupo reposo.*

4.- Estudio de la activación de NF- κ B tras la realización de un ejercicio físico agotador en músculo de rata.

El ejercicio físico es un complejo estímulo que, por medio de diversos mensajeros, regula múltiples sistemas de transducción de señales dentro de la célula muscular. Evidencias recientes sugieren que la contracción muscular puede activar la vía de las MAPKs en músculo esquelético (Boppart y cols., 2001). Aunque las causas de esta activación no han sido completamente identificadas, el estrés oxidativo es un mecanismo bien establecido y estudiado dado sus efectos sobre distintos factores de transcripción responsables del control en la expresión génica (Meyer y cols., 1994). Uno de los factores de transcripción, sensibles al estado redox y que juega un importante papel en la expresión de genes antioxidantes, es el factor nuclear κ B (Allen y Tresini, 2000). Los radicales libres activan NF- κ B causando la liberación de la subunidad inhibitoria (I κ B) del complejo κ B. En este estudio nos planteamos determinar si la realización de ejercicio físico intenso, hasta el agotamiento, podría activar la expresión de la MnSOD en músculo de rata, y el posible papel de NF- κ B en dicha activación.

4.1. Activación, por ensayo de retardo, frente al tiempo de NF- κ B en músculo vasto interno de rata tras la realización de un ejercicio físico agotador.

Determinamos la activación del factor nuclear κ B en función del tiempo, en extractos nucleares de músculo vasto interno de un grupo de animales sometidos a un protocolo de ejercicio físico agotador.

En la Figura 13 se muestra como el ejercicio físico induce la activación del factor de transcripción inmediatamente después de finalizarlo. Ésta, se mantiene durante la hora posterior y alcanza un pico una vez transcurridas dos horas. Tras 24 y 48 horas de reposo la activación del factor de transcripción disminuye de forma progresiva.

En la Figura 14 se respresenta de forma cuantitativa y, en función del tiempo, la activación de NF- κ B visible en los geles

Previamente hicimos un ensayo de competición para comprobar la especificidad del oligo utilizando NF- κ B y AP-1. Para ello añadimos cantidades crecientes de oligo no marcado (0, 5, 10 y 100 fmoles) en dos condiciones distintas:

[A] Oligo NF- κ B marcado con Digoxigenina con cantidades crecientes de oligo κ B no marcado.

[B] NF- κ B marcado con Digoxigenina con cantidades crecientes de oligo AP-1 no marcado.

En las figuras se observa como concentraciones crecientes de NF- κ B, no marcado, compiten con el oligo κ B marcado; mientras que AP-1 no lo hace. Esto demuestra la especificidad de la unión.

NF- κ B: 5' AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC 3'

3' TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG 5'

AP-1: 5' CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA 3'

3' GCGAACTACTCAGTCGGCCTT 5'

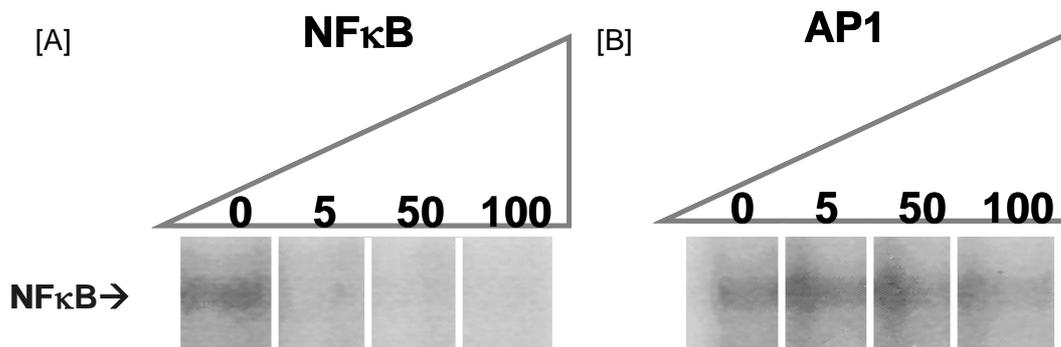
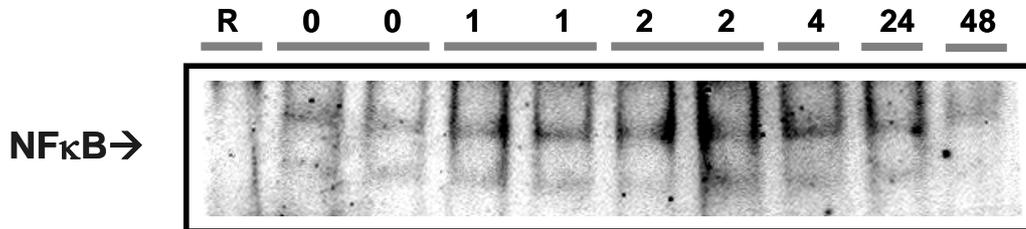
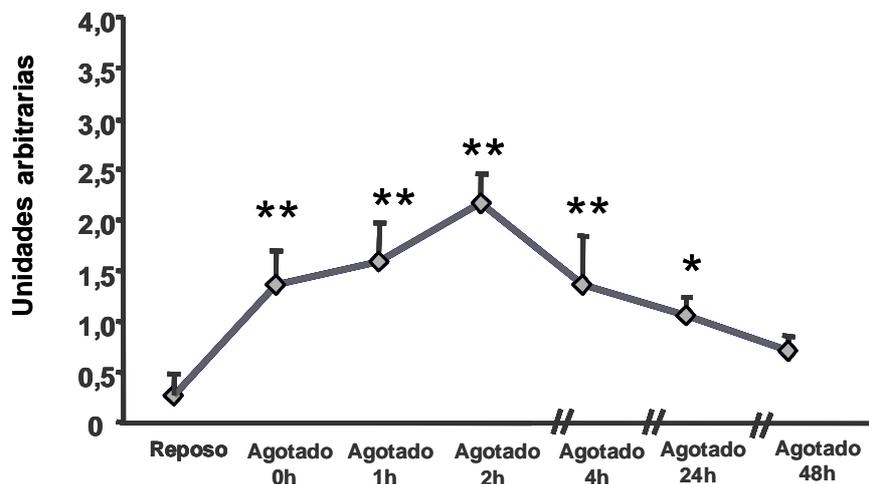


FIGURA 13 : Ensayo de retardo en gel de acrilamida de NF- κ B en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos.



Ensayo de retardo utilizando oligo NF- κ B marcado con digoxigenina-11-ddUTP (Promega, Madison, WI). Los extractos nucleares fueron preparados con músculo vasto interno de rata en reposo (R), o inmediatamente (0), tras 1, 2, 4, 24 y 48 horas después de un ejercicio físico agotador en tapiz rodante (25 m/min, 5% inclinación durante 1 hora). Se utilizaron 40 μ g de proteína nuclear y 30 fmoles de oligonucleótico κ B marcado.

FIGURA 14. Densitometría del ensayo de retardo en gel de acrilamida de NF- κ B en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar ($n=4$). La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente a grupo reposo (**) $p < 0.01$ frente a grupo reposo.

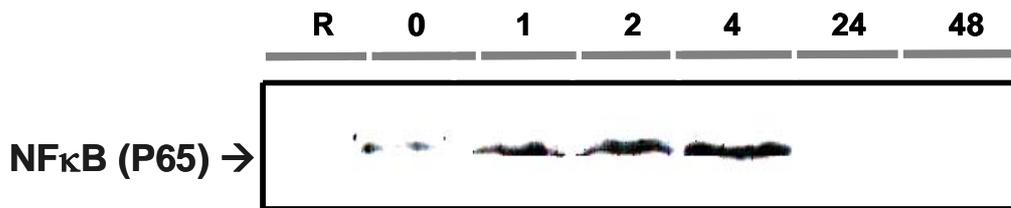
4.2. Activación, por western blot, frente al tiempo de NF- κ B en músculo vasto interno de rata tras la realización de un ejercicio físico agotador.

Estudiamos también la activación del factor nuclear κ B en extractos nucleares de músculo vasto interno con la técnica del western blot. Utilizamos, para ello, un anticuerpo específico de la subunidad p65 del factor de transcripción.

En la Figura 15, se muestra como el ejercicio físico induce, de forma inmediata, la aparición de la subunidad p65 en el interior del núcleo y por tanto la activación de NF- κ B. Ésta, aumenta durante la primera hora y alcanza un pico transcurridas dos horas de su finalización.

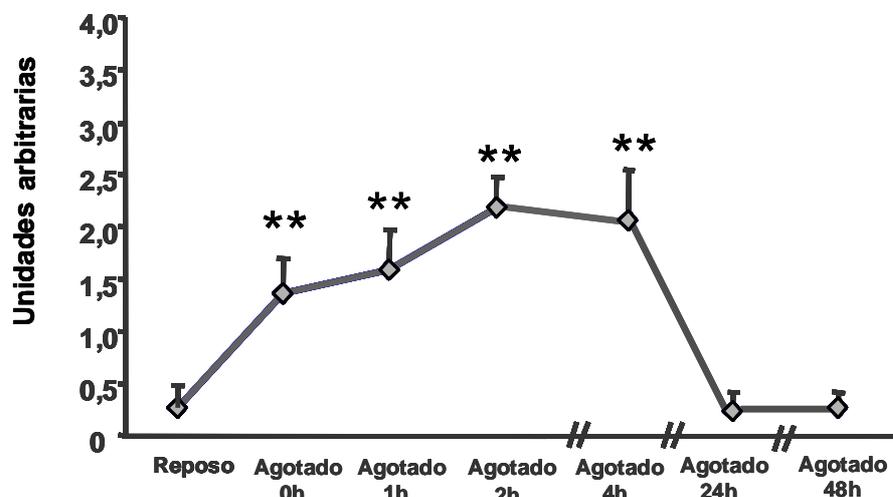
En la Figura 16 se respresenta de forma cuantitativa y, en función del tiempo, la activación de NF- κ B visible en los geles.

FIGURA 15. Western Blot de la subunidad p65 de NF- κ B en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos.



Western blot de la unidad p65 de NF- κ B. Los extractos nucleares fueron preparados con músculo vasto interno de rata en reposo (R), o inmediatamente (0), tras 1 y 2 horas después de un ejercicio físico agotador en tapiz rodante (25 m/min, 5% inclinación durante 1 hora). El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del producto de Cell Signalling Technology Inc. (Bar Harbor, MA).

FIGURA 16. Densitometría del Western Blot de NF- κ B (p65) en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos.



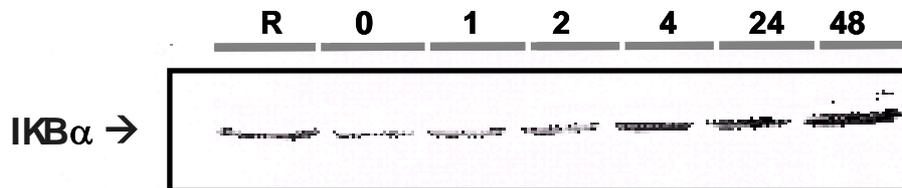
*Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n=4). La significación estadística se expresa como (**) $p < 0.01$ frente a grupo reposo.*

4.3. Expresión de I κ B- α , frente al tiempo, en músculo vasto interno de rata tras la realización de un ejercicio físico agotador.

Una vez comprobada la activación de NF- κ B por el ejercicio físico agotador, nos propusimos un estudio de los posibles mecanismos moleculares que condicionan la traslocación al núcleo de este factor de transcripción. En primer lugar nos centramos en el análisis de la proteína I κ B- α , inhibidor directo de NF- κ B. Determinamos la expresión de I κ B- α , en función del tiempo, en extractos citosólicos de músculo vasto interno en el grupo de animales sometidos a un protocolo de ejercicio físico agotador.

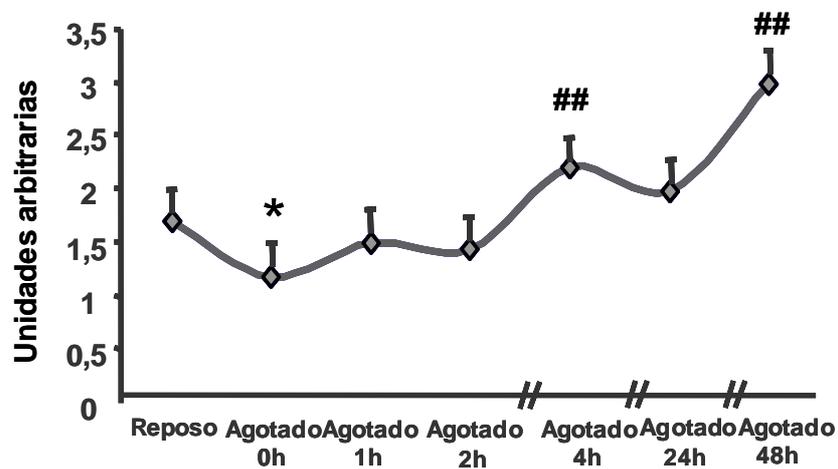
En la Figuras 17 y 18 se muestra como el ejercicio físico provoca una disminución inmediata de la expresión de I κ B- α , con respecto al reposo. La expresión de la proteína inhibidora de NF- κ B se recupera de forma progresiva en las 4 horas posteriores al ejercicio.

FIGURA 17: Western Blot de $I\kappa B\alpha$ en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos.



Western blot de $I\kappa B-\alpha$. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo vasto interno de rata en reposo (R), o inmediatamente (0), tras 1, 2, 4, 24 y 48 horas después de un ejercicio físico agotador en tapiz rodante (25 m/min, 5% inclinación durante 1 hora). El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del producto de Cell Signalling Technology Inc. (Bar Harbor, MA).

FIGURA 18: Densitometría del Western Blot de $I\kappa B\alpha$ en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar ($n=4$). La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente a grupo reposo (##) $p < 0.01$ frente a grupo agotado 0h.

4.4. Fosforilación de I κ B- α , frente al tiempo, en músculo vasto interno de rata tras la realización de un ejercicio físico agotador.

La fosforilación de I κ B- α constituye el paso previo para la degradación de la proteína. Se ha comprobado que la fosforilación de I κ B- α , en las Serinas 32 y 36, estimula la conjugación con la ubiquitina y posterior degradación por el proteasoma de la proteína, lo que supone la activación de NF- κ B. Por este motivo decidimos medir p-I κ B- α en nuestro modelo.

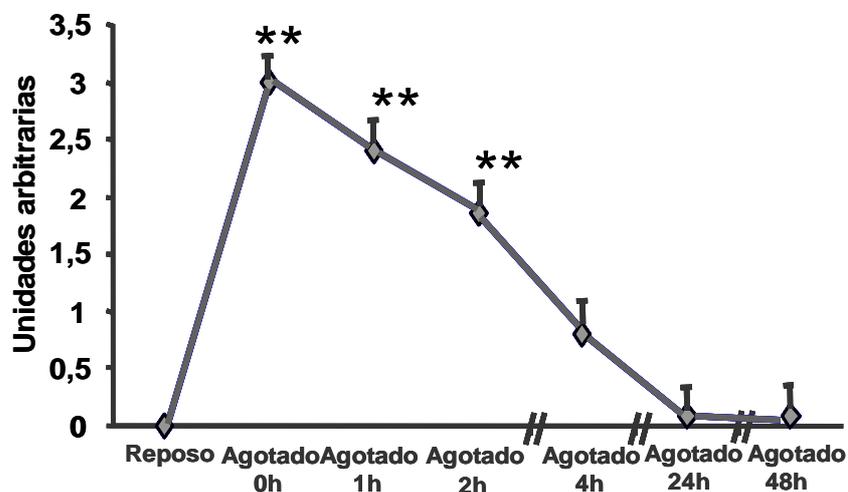
En las Figuras 19 y 20 observamos como la proteína se fosforila inmediatamente después de la realización del ejercicio físico, la fosforilación se mantiene durante las dos horas posteriores, y revierte completamente a las 24 horas.

FIGURA 19: Western Blot de I κ B α fosforilado en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos.



Western blot de I κ B- α fosforilado (Serina 32). Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo vasto interno de rata en reposo (R), o inmediatamente (0), tras 1, 2, 4, 24 y 48 horas después de un ejercicio físico agotador en tapiz rodante (25 m/min, 5% inclinación durante 1 hora). El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del producto de Cell Signalling Technology Inc. (Barn Harbor, MA).

FIGURA 20: Densitometría del Western Blot de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ fosforilado en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos.



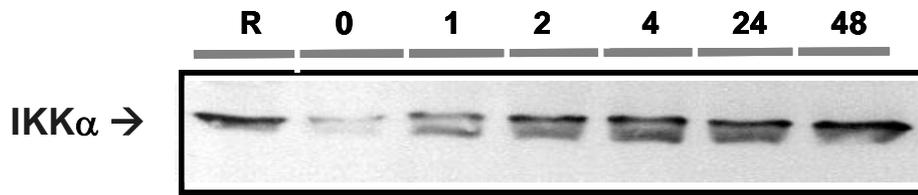
*Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n=4). La significación estadística se expresa como (**) $p < 0.01$ frente a grupo reposo*

4.5. Expresión de $\text{IKK}\alpha$ frente al tiempo en músculo vasto interno de rata tras la realización de un ejercicio físico agotador.

La fosforilación de la proteína inhibidora $\text{I}\kappa\text{B}$ implica la activación de un complejo $\text{I}\kappa\text{B}$ kinasa (IKK) de alto peso molecular. Además de las dos subunidades catalíticas: $\text{IKK}\alpha$ o $\text{IKK}\beta$, este complejo contiene una subunidad reguladora llamada NEMO (Modulador esencial de $\text{NF-}\kappa\text{B}$) o $\text{IKK}\gamma$ y finalmente IKAP (Proteína asociada al complejo IKK). Esta última parece actuar como mantenedor físico de la estructura.

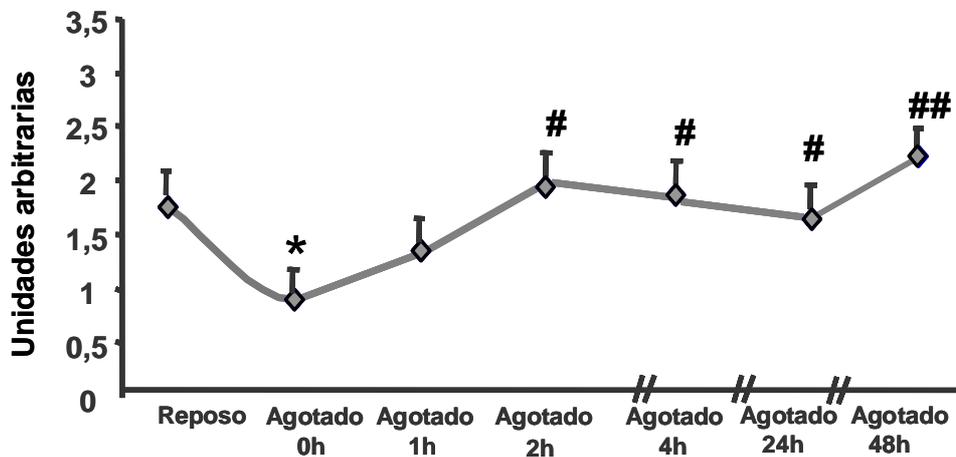
En las Figuras 21 y 22 se muestra como el ejercicio físico induce una disminución de la expresión de $\text{IKK}\alpha$ inmediatamente después de finalizarlo. La expresión de la kinasa de $\text{I}\kappa\text{B}$ se recupera en la hora posterior al ejercicio.

FIGURA 21: Western Blot de IKK α en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos.



Western blot de IKK α . Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo vasto interno de rata en reposo (R), o inmediatamente (0), tras 1, 2, 4, 24 y 48 horas después de un ejercicio físico agotador en tapiz rodante (25 m/min, 5% inclinación durante 1 hora). El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del producto de Cell Signalling Technology Inc. (Bar Harbor, MA).

FIGURA 22: Densitometría del Western Blot de IKK α en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos.



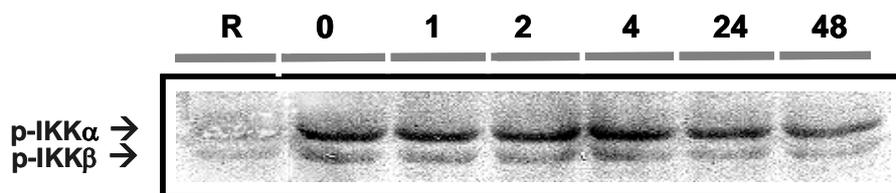
Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n=4). La significación estadística se expresa como () $p < 0.05$ frente a grupo reposo (#) $p < 0.05$ frente a grupo agotado 0h y (##) $p < 0.01$ frente a grupo agotado 0h.*

4.6. Fosforilación IKK α frente al tiempo en músculo vasto interno de rata tras la realización de un ejercicio físico agotador.

La fosforilación de IKK α e IKK β constituye el paso previo para la activación del complejo. Las Serinas 180 y 181 son los sitios específicos cuya fosforilación supone un cambio conformacional de la kinasa. Por este motivo decidimos medir p-IKK α y p-IKK β en nuestro modelo.

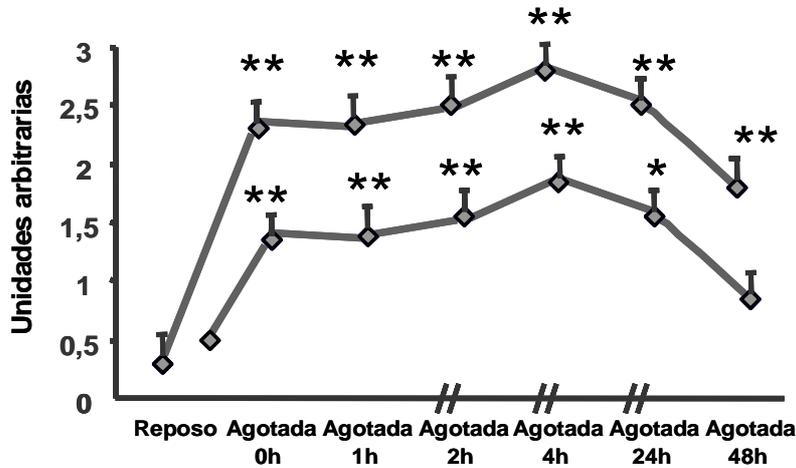
En las Figuras 23 y 24, observamos como la proteína se fosforila inmediatamente después de la realización del ejercicio físico, la fosforilación se mantiene durante las dos horas posteriores y empieza a revertir a las 48 horas.

FIGURA 23: Western Blot de IKK α , IKK β fosforiladas en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos.



Western blot de IKK α , IKK β fosforiladas (Serinas: 180, 181). Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo vasto interno de rata en reposo (R), o inmediatamente (0), tras 1, 2, 4, 24 y 48 horas después de un ejercicio físico agotador en tapiz rodante (25 m/min, 5% inclinación durante 1 hora). El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del producto de Cell Signalling Technology Inc. (Barn Harbor, MA).

FIGURA 24: Densitometría del Western Blot de IKK α fosforilada en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos.

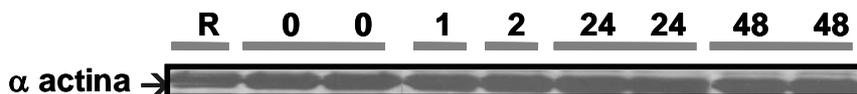


Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n=4). La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente a grupo reposo (**) $p < 0.01$ frente a grupo reposo.

4.7. Expresión de α actina en los extractos citosólicos preparados en músculo vasto interno.

Determinamos la expresión de la proteína α actina como normalizador en los extractos citosólicos de vasto interno. En las Figuras 25 observamos como no existen diferencias en la expresión de esta proteína entre las distintas muestras.

FIGURA 25: Western Blot representativo de α actina en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos.



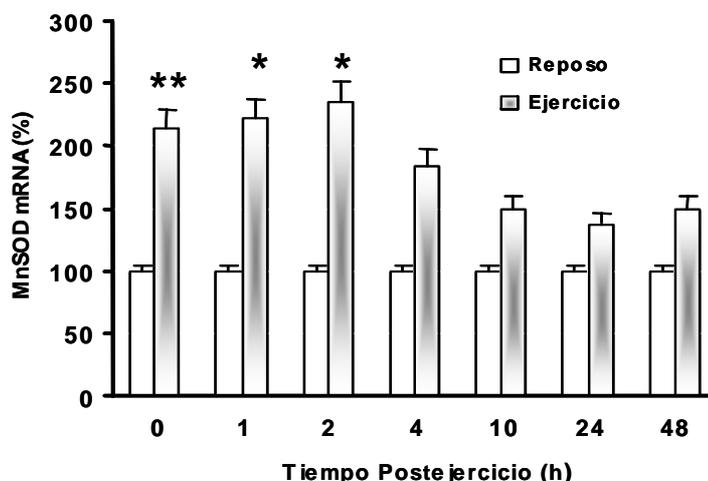
Western blot de α actina. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo vasto interno de rata en reposo (R), o inmediatamente (0), tras 1, 2, 4, 24 y 48 horas después de un ejercicio físico agotador en tapiz rodante (25 m/min, 5% inclinación durante 1 hora). El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del producto de SIGMA ALDRICH.

5.- Estudio de la expresión de la Mn SOD tras la realización de un ejercicio físico agotador en músculo de rata.

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima antioxidante que juega un importante papel en la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno, previniendo de esta forma la reacción de Haber-Weiss y la formación de radical hidroxilo (Fridovich, 1995). En los mamíferos coexisten dos formas de SOD: una enzima mitocondrial, tetramérica, dependiente de manganeso (Mn SOD) y una enzima citosólica, dimérica, dependiente de cobre y zinc (CuZn SOD). En el promotor del gen de la MnSOD, se encuentran diversos sitios de unión para NF- κ B. El estrés oxidativo se ha demostrado que aumenta dicha unión (Warner y cols., 1996). Por este motivo decidimos estudiar si el ejercicio físico agotador podía activar la expresión de la SOD en músculo esquelético de rata.

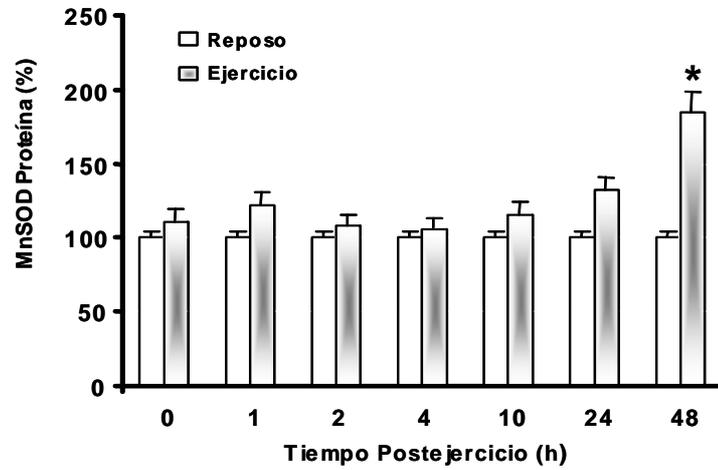
La Figura 26 muestra como la cantidad de ARNm de MnSOD, en músculo vasto interno, aumentan significativamente tras la realización de un ejercicio físico agotador. Este aumento se mantiene en las dos horas posteriores al ejercicio y disminuye progresivamente transcurridas 48 horas. Todos los valores han sido expresados en función de la cantidad de RNA 18S de cada una de las muestras. En la Figura 27 se representa el contenido de la enzima Mn SOD en el mismo grupo muscular. La gráfica muestra como, únicamente, superadas las 48 horas posteriores al ejercicio, se observa un aumento significativo del contenido proteico.

Figura 26. Porcentaje de aumento de RNAm de MnSOD en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos.



Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar ($n=6$). La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente a grupo reposo (**) $p < 0.01$ frente a grupo reposo.

Figura 27. Porcentaje de aumento del contenido proteico de MnSOD en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos.



Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar ($n=6$). La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente a grupo reposo.

6. Estudio de la activación de NF- κ B en músculo gastrocnemio de rata tras la realización de un ejercicio físico agotador. Efecto de la administración de alopurinol.

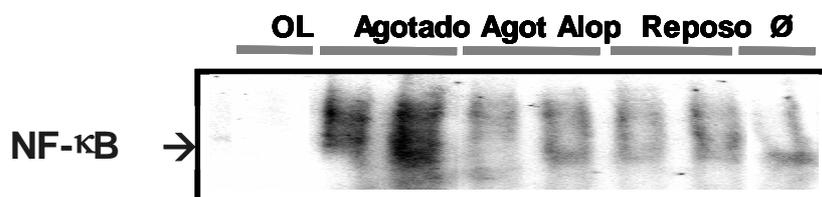
6.1. Activación de NF- κ B en músculo gastrocnemio de rata tras la realización de un ejercicio físico agotador. Prevención con el tratamiento con alopurinol.

Dado que la xantina oxidasa juega un papel importante en la generación de radicales libres durante la realización de un ejercicio físico agotador y dado que el factor de transcripción NF- κ B está regulado por el estado redox celular; nos planteamos estudiar el efecto de la administración de alopurinol sobre la activación del factor nuclear en músculo gastrocnemio de un grupo de animales sometidos a un protocolo de ejercicio físico agotador.

En la Figura 28 se muestra como el ejercicio físico induce la activación del factor de transcripción inmediatamente después de finalizarlo. De la misma forma podemos ver como la administración de alopurinol previene dicha activación devolviendo los niveles de NF- κ B a valores cercanos al reposo. La carrera con la competición permite determinar la especificidad del ensayo y descartar uniones inespecíficas.

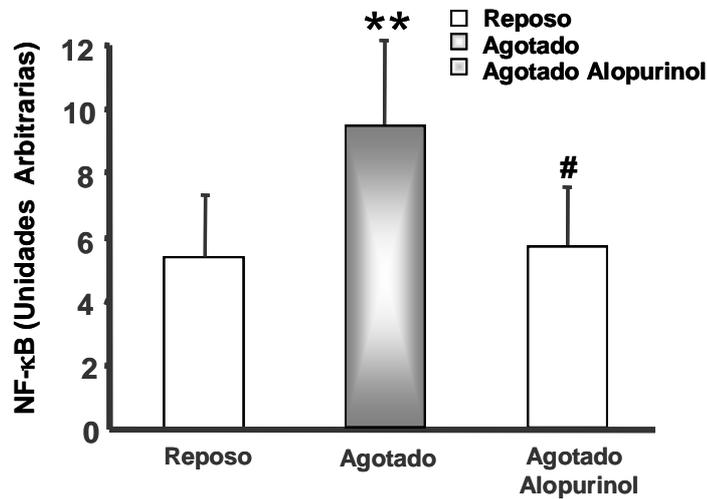
La Figura 29 representa de forma cuantitativa la activación del factor de transcripción tras realizar una densitometría del gel.

FIGURA 28: Ensayo de retardo en gel de acrilamida de NF- κ B en músculo gastrocnemio de ratas ejercitadas hasta el agotamiento.



Ensayo de retardo en gel de acrilamida de NF- κ B. Los extractos nucleares fueron preparados con músculo gastrocnemio de rata en reposo e inmediatamente después de un ejercicio físico agotador en tapiz rodante, previa administración de alopurinol (Agot Alop) o vehículo (Agotado). Se utilizaron 40 μ g de proteína nuclear y 30 fmoles de oligonucleótico κ B marcado. El ensayo de competición (Ø) se realizó añadiendo un exceso (100 veces) de oligo no marcado a una muestra del grupo agotado.

FIGURA 29: Densitometría del ensayo de retardo en gel de acrilamida de NF- κ B en músculo gastrocnemio de ratas ejercitadas hasta el agotamiento.



*Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n=4). La significación estadística se expresa como (**) $p < 0.01$ frente a grupo reposo (#) $p < 0.05$ frente a grupo agotado.*

6.2. Fosforilación de p38^{MAPK} en músculo gastrocnemio de rata tras la realización de un ejercicio físico agotador. Efecto de la administración de alopurinol.

Como ya se explicó en la introducción las proteínas señales son proteínas que se encuentran en el citosol y se encargan de llevar la información desde la superficie de la célula hasta el núcleo. Una proteína señal activa a otra y así sucesivamente hasta llegar a activar proteínas reguladoras de genes en el núcleo.

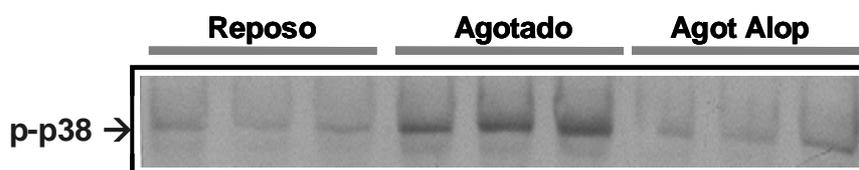
Algunas proteínas señal destacables, relacionadas el ejercicio, son las proteínas Kinasa activadas por mitógenos: Erk1/2 (kinasa regulada por señales extracelulares) y p38. Estas MAP kinasas, son activadas por una gran variedad de señales (insulina, factores de crecimiento, factores de stress ambiental) que transmiten, fosforilando numerosos substratos. Algunos de los efectos biológicos que se obtiene como resultado de esta activación son: inducción de proliferación, diferenciación celular, hipertrofia, inflamación y transcripción de genes.

En este estudio, se determinó la fosforilación de la MAPK p38 (treonina 180, tirosina 182) en músculo gastrocnemio de un grupo de animales sometidos a un protocolo de ejercicio físico agotador.

En la Figura 30 se muestra como el ejercicio físico induce la activación de p38 y el efecto preventivo que supone la administración de alopurinol.

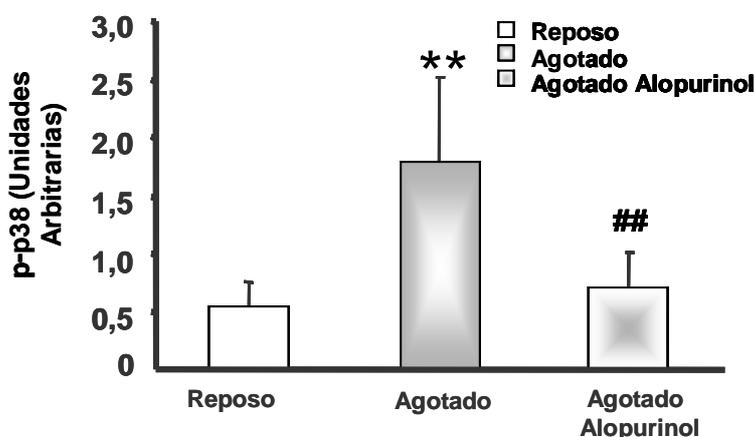
En la Figura 31 se representa de forma cuantitativa la activación de p38 visible en el gel.

FIGURA 30: Western Blot de p38^{MAPK} fosforilada en músculo gastrocnemio de ratas ejercitadas hasta el agotamiento.



Western blot de p38^{MAPK} fosforilada. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo gastrocnemio de rata en reposo, inmediatamente después de un ejercicio físico agotador en tapiz rodante previa administración de alopurinol (Agot Alop) o vehículo (Agotado). El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del producto de Cell Signalling Technology Inc. (Bar Harbor,

FIGURA 31: Densitometría del Western Blot de p38^{MAPK} fosforilada en músculo gastrocnemio de ratas ejercitadas hasta el agotamiento.



*Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n=3). La significación estadística se expresa como (**) $p < 0.01$ frente a grupo reposo (##) $p < 0.01$ frente a grupo agotado.*

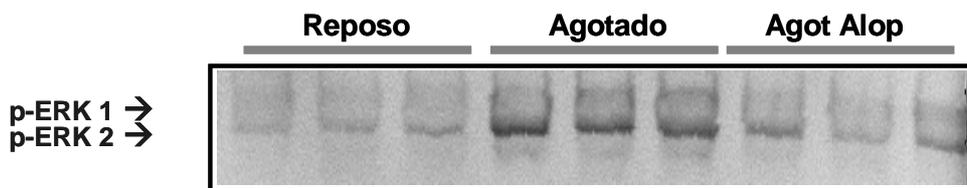
6.3. Fosforilación de Erk1/2^{MAPK} en músculo gastrocnemio de rata tras la realización de un ejercicio físico agotador. Efecto de la administración de alopurinol.

Se determinó la fosforilación de las MAPKs Erk1 (treonina 202, tirosina 204) y Erk 2 (treonina 183, tirosina 185), en músculo gastrocnemio de un grupo de animales sometidos a un protocolo de ejercicio físico agotador.

En la Figura 32 se muestra como el ejercicio físico induce la activación de Erk1/2 y el efecto preventivo que supone la administración de alopurinol.

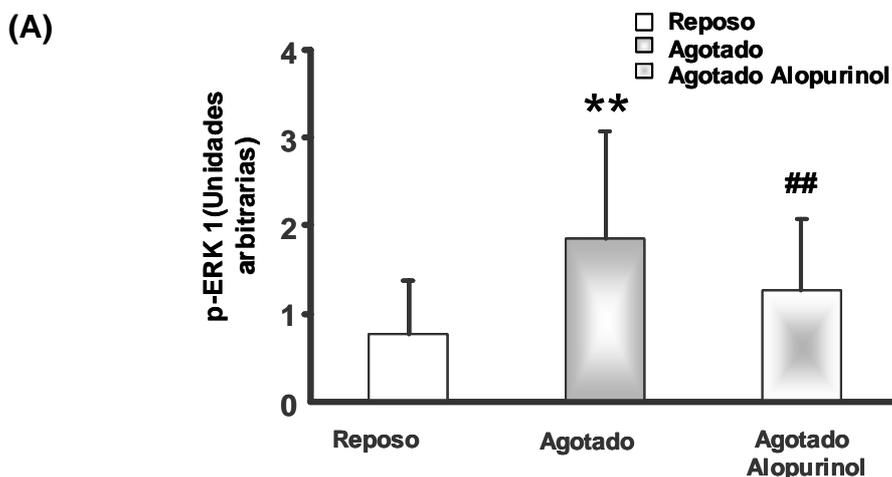
En las Figuras 33 (A y B) se respresenta de forma cuantitativa la activación de Erk1/2 visible en el gel.

FIGURA 32: Western blot de Erk1/2^{MAPK} fosforilada en músculo gastronemio de ratas ejercitadas hasta el agotamiento.

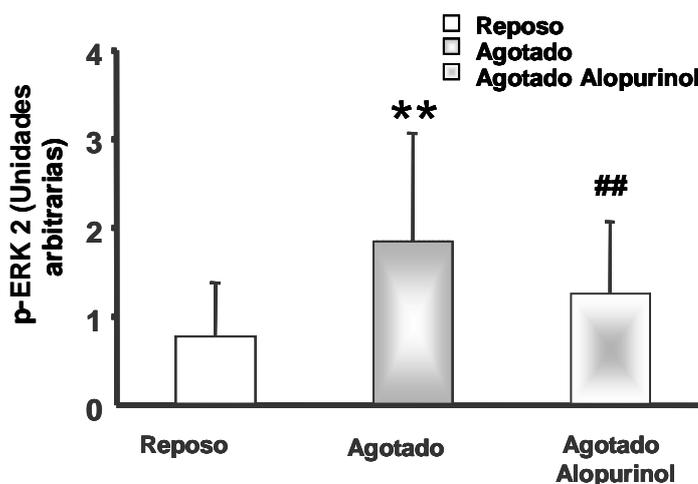


Western blot de Erk 1/2^{MAPK} fosforilada. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo gastrocnemio de rata en reposo e inmediatamente después de un ejercicio físico agotador en tapiz rodante, previa administración de alopurinol (Agot Alop) o vehículo (Agotado). El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del producto de Cell Signalling Technology Inc. (Bar Harbor, MA)

FIGURA 33: Densitometría de Western blot de Erk 1/2^{MAPK} fosforilada en músculo gastronemio de ratas ejercitadas hasta el agotamiento.



(B)



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar ($n=3$). La significación estadística se expresa como (**) $p < 0.01$ frente a grupo reposo (##) $p < 0.01$ frente a grupo agotado.

6.4. Expresión de α actina en los extractos citosólicos preparados en músculo vasto interno.

Determinamos la expresión de la proteína α actina como normalizador en los extractos citosólicos de músculos gastrocnemio.

En la Figura 34 observamos como no existen diferencias en la expresión de esta proteína entre las distintas muestras.

FIGURA 34: Western Blot representativo de α actina en músculo gastrocnemio de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos.



Western blot de α actina. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo gastrocnemio de rata en reposo e inmediatamente después de un ejercicio físico agotador en tapiz rodante, previa administración de alopurinol (Agot Alop) o vehículo (Agotado). El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del producto de SIGMA ALDRICH.

7. Estudio de la expresión de la Mn SOD, iNOS y eNOS tras la realización de un ejercicio físico agotador en músculo de rata.

En los resultados presentados hasta ahora hemos visto como el ejercicio físico puede activar la vía por la que señales extracelulares se convierten en respuestas intracelulares, en definitiva puede influir en la señalización intracelular. La inhibición de esta cascada de señalización con alopurinol apunta hacia el estrés oxidativo, como mecanismo bien establecido de control de dicho proceso, y concede protagonismo a las ERO derivadas de la xantina oxidasa.

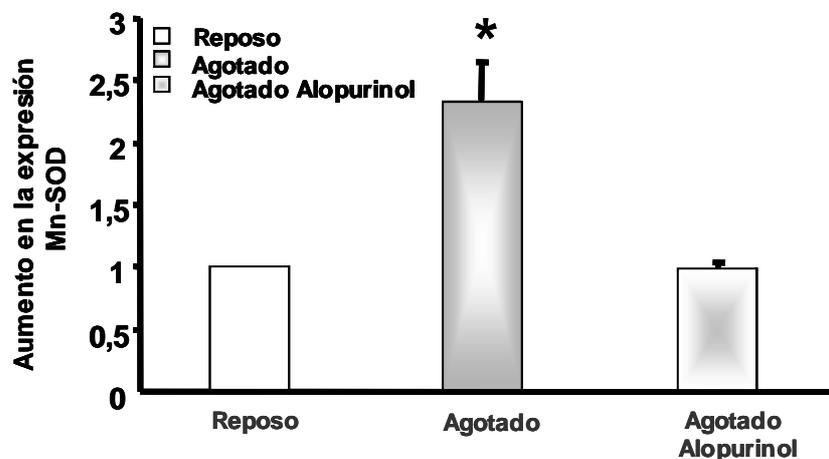
En el apartado 5 de los resultados vimos como la cantidad de ARNm para la Mn SOD (Northern Blot), en músculo vasto interno, aumenta significativamente tras la realización de un ejercicio físico agotador. En este apartado nos planteamos estudiar el efecto del ejercicio físico sobre la expresión de MnSOD, iNOS y eNOS por RT-PCR en tiempo real y el efecto de la administración de alopurinol.

En las tablas 2, 3 y 4 aparecen representados todos los valores comparativos de expresiones que se recogen también en las Figuras 35, 36 y 37.

TABLA 2. Expresión de la MnSOD en músculo gastrocnemio de rata tras la realización de un ejercicio físico agotador por RT-PCR en tiempo real. Efecto de la administración de alopurinol.

Grupos	Aumento en la expresión Nº de veces	Grupos	Aumento en la expresión Nº de veces	Grupos	Aumento en la expresión Nº de veces
Agot 1 vs Rep 1	2,88	Agot 1 vs AA1	2,62	AA1 vs Rep 1	0,91
Agot 1 vs Rep 2	2,21	Agot 1 vs AA2	2,81	AA1 vs Rep 2	0,97
Agot 1 vs Rep 3	2,28	Agot 1 vs AA3	2,52	AA1 vs Rep 3	0,91
Agot 2 vs Rep 1	2,67	Agot 2 vs AA1	2,01	AA2 vs Rep 1	0,98
Agot 2 vs Rep 2	2,04	Agot 2 vs AA2	2,15	AA2 vs Rep 2	1,05
Agot 2 vs Rep 3	2,12	Agot 2 vs AA3	2,11	AA2 vs Rep 3	0,98
Agot 3 vs Rep 1	2,63	Agot 3 vs AA1	2,08	AA3 vs Rep 1	0,99
Agot 3 vs Rep 2	2,01	Agot 3 vs AA2	2,23	AA3 vs Rep 2	1,70
Agot 3 vs Rep 3	2,08	Agot 3 vs AA3	2,25	AA3 vs Rep 3	0,99
X	2,33	X	2,30	X	0,99
SD	0,32	SD	0,31	SD	0,05

FIGURA 35: Representación gráfica de la expresión de la Mn-SOD en músculo gastrocnemio de rata.

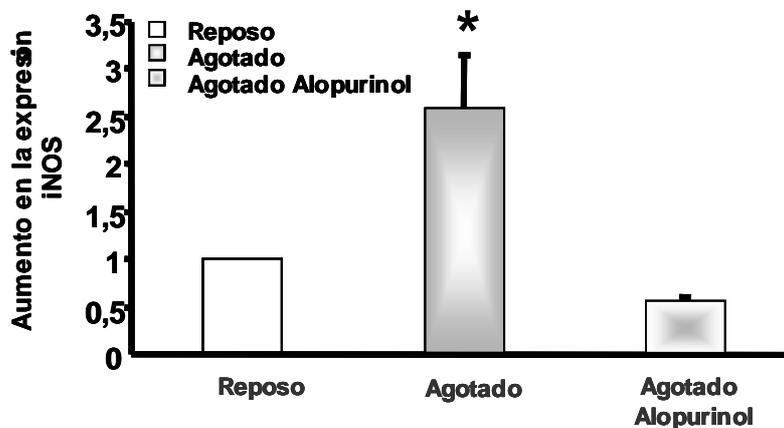


Los valores se expresan como media \pm desviación estándar ($n=3$) relativos al grupo reposo tras normalizar con la expresión de GAPDH. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente a grupo reposo.

TABLA 3. Expresión de la iNOS en músculo gastrocnemio de rata tras la realización de un ejercicio físico agotador por PCR en tiempo real. Efecto de la administración de alopurinol.

Grupos	Aumento en la expresión Nº de veces	Grupos	Aumento en la expresión Nº de veces	Grupos	Aumento en la expresión Nº de veces
Agot 1 vs Rep 1	2,07	Agot 1 vs AA1	1,14	AA1 vs Rep 1	0,55
Agot 1 vs Rep 2	2,22	Agot 1 vs AA2	1,09	AA1 vs Rep 2	0,52
Agot 1 vs Rep 3	3,14	Agot 1 vs AA3	1,30	AA1 vs Rep 3	0,62
Agot 2 vs Rep 1	2,07	Agot 2 vs AA1	1,22	AA2 vs Rep 1	0,55
Agot 2 vs Rep 2	2,21	Agot 2 vs AA2	1,17	AA2 vs Rep 2	0,53
Agot 2 vs Rep 3	3,13	Agot 2 vs AA3	1,39	AA2 vs Rep 3	0,63
Agot 3 vs Rep 1	2,36	Agot 3 vs AA1	1,73	AA3 vs Rep 1	0,48
Agot 3 vs Rep 2	2,53	Agot 3 vs AA2	1,66	AA3 vs Rep 2	0,46
Agot 3 vs Rep 3	3,55	Agot 3 vs AA3	1,99	AA3 vs Rep 3	0,55
X	2,60	X	1,41	X	0,55
SD	0,55	SD	0,33	SD	0,06

FIGURA 36: Representación gráfica de la expresión de la iNOS en músculo gastrocnemio de rata.

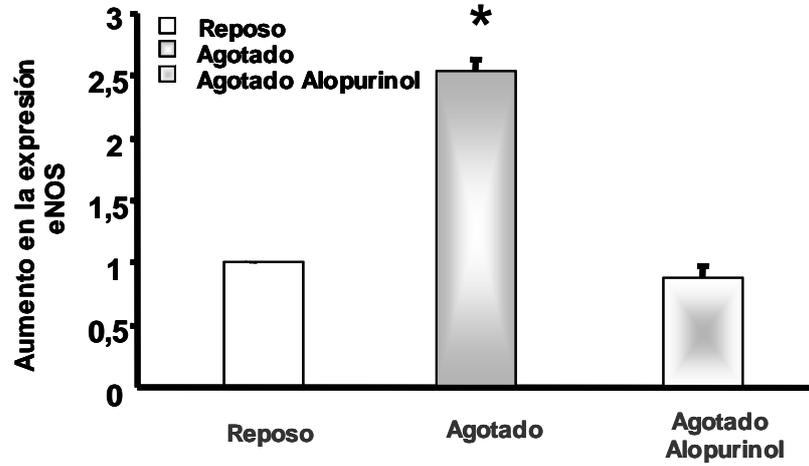


Los valores se expresan como media \pm desviación estándar ($n=3$) relativos al grupo reposo tras normalizar con la expresión de GAPDH. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente a grupo reposo.

TABLA 4. Expresión de la eNOS en músculo gastrocnemio de rata tras la realización de un ejercicio físico agotador por PCR en tiempo real. Efecto de la administración de alopurinol.

Grupos	Aumento en la expresión Nº de veces	Grupos	Aumento en la expresión Nº de veces	Grupos	Aumento en la expresión Nº de veces
Agot 1 vs Rep 1	2,46	Agot 1 vs AA1	2,63	AA1 vs Rep 1	0,77
Agot 1 vs Rep 2	2,43	Agot 1 vs AA2	3,13	AA1 vs Rep 2	0,93
Agot 2 vs Rep 1	2,46	Agot 2 vs AA1	0,79	AA2 vs Rep 1	0,83
Agot 2 vs Rep 2	2,60	Agot 2 vs AA2	2,61	AA2 vs Rep 2	1,00
Agot 3 vs Rep 1	2,63	Agot 3 vs AA1	2,60	AA3 vs Rep 1	0,95
Agot 3 vs Rep 2	2,60	Agot 3 vs AA2	1,04	AA3 vs Rep 2	0,89
X	2,54	X	2,14	X	0,90
SD	0,10	SD	0,97	SD	0,08

FIGURA 37: Representación gráfica de la expresión de la eNOS en músculo gastrocnemio de rata.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar ($n=3$) relativos al grupo reposo tras normalizar con la expresión de GAPDH. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente a grupo reposo.

V. DISCUSIÓN

1.- Los procesos de isquemia-reperfusión provocan un estrés oxidativo en sangre tanto en modelos animales como en modelos humanos.

1.1. Experiencia en modelos con animales: Ratas Wistar.

Son varios los grupos de investigación que han atribuido a la isquemia un papel en el daño celular por la restricción del flujo sanguíneo a los tejidos. Sin embargo, cada vez son más abundantes los datos experimentales que relacionan a las ERO, generadas durante la reperfusión, con dicho daño.

Este mecanismo fue inicialmente identificado y caracterizado en un modelo de oclusión vascular en intestino (McCord, 1985), pero mecanismos similares han sido descritos en corazón (Onodera y Ashraf, 1991; Leichtweiss y cols., 1996); cerebro (Frantseva y cols., 1999); riñón (Toosy y cols., 1999); pulmón (Messent y cols., 1993) y músculo esquelético (Prem y cols., 1999).

La investigación con el objetivo de elucidar el papel de las ERO en el daño asociado a la isquemia-reperfusión se ha llevado a cabo tanto en modelos animales como en modelos humanos. En modelos animales el uso de torniquetes o de pequeños clips sobre los vasos sanguíneos en las extremidades inferiores (Bushell y cols., 1996; McArdle y cols., 1999) han sido las técnicas más extendidas.

En nuestro modelo optamos por el uso de una cámara hipobárica con el objetivo de someter a un proceso de hipoxia durante 3 días (8% O₂) a un grupo de ratas jóvenes que fueron posteriormente reoxigenadas (normoxia) a distintos tiempos.

Para determinar el estrés oxidativo que se produce asociado al proceso de hipoxia-reoxigenación elegimos como indicador el estatus del glutatión. El GSH es un antioxidante endógeno ubicuo. Los radicales libres pueden ser reducidos durante la conversión del GSH a GSSG por la glutatión peroxidasa (Meister y Anderson, 1983). En los experimentos desarrollados en este apartado de la tesis determinamos el GSSG por el método desarrollado en nuestro laboratorio por Asensi y cols. (1994), mientras que la determinación de GSH la hicimos por el método de Reed y cols. (1980).

Los niveles en sangre de GSH y GSSG en reposo de nuestro grupo de animales coinciden con los publicados en otros trabajos (Lew y cols. 1985; Duthie y cols., 1990; Sastre y cols., 1992; Viña y cols., 1995; Viña y cols., 2000). En el presente estudio el fenómeno de hipoxia durante 3 días no supuso ninguna alteración en los niveles sanguíneos ni de GSH, ni de GSSG. Sin embargo los niveles de GSH disminuyeron significativamente (125%) tras la reoxigenación de los animales hipóxicos durante 1 hora. En numerosos trabajos se han recogido disminuciones similares en los niveles de glutatión, inducidas por situaciones de estrés (tales como el ejercicio físico) atribuibles a la inhibición en la síntesis de GSH en dichas circunstancias (Sastre y cols., 1992; Viña y cols.; 1995; Viña y cols., 2000; Viña y cols., 2000). Distintos grupos han estudiado el papel que la estimulación adrenérgica juega en la disminución de la síntesis de glutatión. Estrela y cols. publicaron en 1988 que la estimulación α -adrenérgica provocaba una disminución de la síntesis de GSH en hepatocitos aislados. Este efecto se acompañaba por un aumento de la liberación de glutatión por la células. Dos años más tarde (Lu y cols., 1990) publicaron que la liberación de GSH al plasma por el hígado se ve estimulada por el glucagón, la vasopresina y las catecolaminas, los niveles de las cuales se ven elevados durante el ejercicio. Del mismo modo el GSH es utilizado por la GPx como sustrato y oxidado a GSSG por hidroperóxidos, los niveles de los cuales también aumentan en situaciones de estrés. Además la síntesis hepática de GSH está limitada por la actividad GCS que se ve influenciada por la disponibilidad de cisteína y ATP, ésta última muy comprometida en las situaciones de hipoxia (Tateishi y cols. 1977; Meister y Anderson, 1983; Deneke y Fanburg 1989)

Todos estos trabajos sugieren que el descenso en los niveles celulares de GSH observados bajo condiciones de shock, de estrés o inflamación pueden ser explicados tanto por el aumento de la salida del tripéptido como por la inhibición en su síntesis.

La hipoxia induce un aumento de la estimulación simpática que se refleja en un incremento de los niveles de catecolaminas tanto en plasma como en orina. Este proceso produce una serie de adaptaciones cardiovasculares con el objetivo de contrarrestar la disminución en la disponibilidad de oxígeno (Maher y cols., 1975; Leon-Velarde y cols., 2001). En muchos trabajos se ha relacionado la hipoxia con el estrés oxidativo, Hitka y cols. (2003) demostraron que la exposición del pulmón a 72 horas de hipoxia aumentaba de forma significativa la producción de H_2O_2 que se triplicaba en la transición a la situación de normoxia. Yoshikawa y

cols. (1982) y Nakanishi y cols. (1995) encontraron un aumento en la cantidad de radicales libres en ratas sometidas a distintas condiciones de hipoxia. Morin y cols (2003) observaron que durante la reoxigenación, en cerebro, aumentaba la lipoperoxidación en la membrana mitocondrial y la salida de citocromo c, de forma proporcional al tiempo que el proceso se mantuvo. Además la adición de α -tocoferol revertía todos estos cambios. Este hecho ha sido confirmado también en cultivos de células endoteliales cuya viabilidad tras la reoxigenación depende del contenido de GSH (Samarasinghe y cols., 2000).

La depleción de GSH tras el proceso de hipoxia, al igual que ocurre con el ejercicio podría, por tanto ser debida a la inhibición de la síntesis de GSH como resultado de la estimulación adrenérgica.

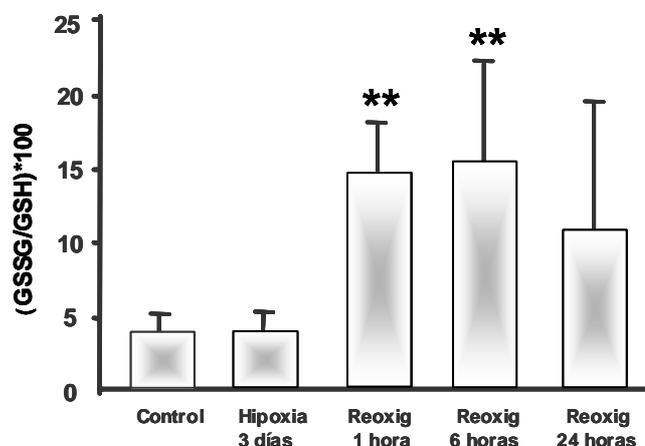
Por otra parte nuestros resultados muestran que los niveles de GSSG, fueron un 202% mayores tras la reoxigenación durante 1 hora y 271% mayores tras la reoxigenación durante 6 horas, del grupo sometido a hipoxia. En el caso de la reoxigenación durante 24 horas pese a que los niveles de GSSG en sangre se mantuvieron aumentados con respecto a los valores del grupo hipóxico y reposo, la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Cuando el GSSG se acumula en el interior de la célula, ésta lo exporta (Sies y Akerboom, 1984), así la sangre refleja el estatus de glutatión de tejidos menos accesibles tales como el músculo esquelético (Reed, 1990). Un aumento de los niveles de GSSG o del cociente GSSG/GSH en sangre, se puede considerar como un marcador de estrés oxidativo (Viña y cols., 1989).

Con respecto a los datos del cociente GSSG/GSH Como mostramos en la Figura V.1., aumentó significativamente tras 1 hora y 6 horas de reoxigenación. Concretamente aumentó, con respecto al grupo de ratas sometidas a hipoxia durante 3 días, un 374 % tras la reoxigenación durante 1 hora y en un 400% en el grupo reoxigenado durante 6 horas.

En músculo cardíaco se han encontrado resultados similares (Park y cols., 1991), la liberación de LDH, disulfuros mixtos, TBARS y los grupos carbonilo en proteínas, aumentaba durante la perfusión con un medio hipóxico en corazón y lo hacían algo más durante la reoxigenación.

Figura V.1. Cociente (GSSG/GSH) x100 en sangre de ratas sometidas a un proceso de isquemia-reperfusión.



*Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n=6-8). La significación estadística se expresa como (**) $p < 0.01$ frente a grupo sometido a hipoxia durante 3 días.*

1.2. Experiencia en seres humanos: alpinistas durante su ascenso al Gasherbrum II (GII), pico de 8034 metros.

En el apartado anterior hemos discutido los resultados obtenidos al estudiar el fenómeno de isquemia-reperfusión utilizando como modelo la cámara hipobárica. En humanos los estudios en este ámbito han sido llevados a cabo durante operaciones o en distintas patologías. Los trabajos se han centrado en los efectos de la duración de los procesos de isquemia y perfusión, valoración del daño y su reversibilidad, medida de la producción de radicales libres y sus vías, prevención y tratamiento. Nosotros hemos optado por el modelo del ascenso a grandes alturas (8034 m).

La PO_2 arterial a nivel del mar es de 94 mmHg y la PO_2 en los tejidos corporales es regularmente de unos 20 mmHg, por lo que la diferencia, el gradiente de presión, es de aproximadamente 74 mmHg. No obstante, cuando se asciende a una altitud de 2.500 m, la PO_2 arterial cae hasta, aproximadamente, 60 mmHg, mientras que la de los tejidos permanece en 20 mmHg. Por lo tanto, el gradiente de presión se reduce desde 74 mmHg hasta 40 mmHg. Esto supone una reducción de casi el 50% en el gradiente de difusión. Puesto que este gradiente es el responsable del empuje del oxígeno desde la sangre hasta los tejidos, este cambio

en la PO_2 arterial en las grandes alturas es un condicionante muy importante. Más, por ejemplo, que la reducción en el 5% que se produce en la saturación de la hemoglobina. El consumo de oxígeno se reduce conforme crece la altitud.

El VO_2 máx. disminuye poco hasta que la PO_2 atmosférica cae por debajo de 125 mmHg. Esto sucede generalmente a una altitud de 1500 m pero progresa de forma exponencial a medida que ésta crece. Cerca de la cima de un 8000 los cambios en el VO_2 máx. son muy marcados. Se han descrito descensos en sus valores de 62 ml/Kg/min a nivel de mar a 15 ml/Kg/min cerca de la cima de estas montañas. Los requisitos normales de oxígeno en situación de reposo son de unos 5 ml/Kg/min, por lo que, sin un suplemento de oxígeno, en estos casos los alpinistas tenían poca capacidad para realizar esfuerzos a esa altitud. Un estudio de Pugh y cols. (1972) mostró que los hombres con valores de VO_2 máx. de 50 ml/min/kg a nivel del mar serían incapaces de hacer ejercicio, o incluso de moverse, cerca de la cima de montes de más de 8000 m, pues los valores de VO_2 máx. a esta altura caerían hasta 5 ml/Kg/min. Este hecho relaciona el fenómeno de la hipoxia y del ejercicio físico agotador, dos factores clave en este apartado de la discusión. El organismo compensa el fenómeno de la hipoxia con distintos mecanismos de adaptación que se conocen con el nombre de aclimatación. Ésta incluye un aumento en el hematocrito y el contenido de hemoglobina, un desplazamiento a la derecha en la curva de disociación de la hemoglobina, aumento en la densidad capilar, en el número de mitocondrias y el contenido de mioglobina muscular (Hannon y cols., 1969). Además el contenido de glucógeno muscular se mantiene y mejora la movilización y el metabolismo de los ácidos grasos libres (Young y cols., 1982). Estos cambios son muy similares a los inducidos por la práctica de ejercicio físico de resistencia.

Se han realizado muy pocos estudios en humanos en relación a los efectos de la hipoxia utilizando una cámara hipobárica y el grado de estrés oxidativo. En algunos de ellos se ha estudiado el efecto de la administración de vitamina E en el rendimiento a distintas alturas (Nagawa y cols., 1968). Se ha comprobado que el consumo de oxígeno, durante un protocolo de ejercicio en bicicleta ergonómica, es más elevado en los grupos suplementados con el antioxidante. Estos resultados fueron corroborados en un estudio posterior planteado con el mismo objetivo. En este caso los montañeros fueron suplementados con 400 mg de vitamina E/día (Simon-Schnass, 1993) durante una expedición al K2 (8611m). Durante el desarrollo del experimento el umbral anaeróbico del grupo tratado aumentó, mientras que el del grupo control aunque empezó creciendo, acabó por decrecer.

La diferencia entre los dos grupos fue significativa a las 4 semanas de iniciar el estudio.

En otro estudio y, con el objetivo de comprobar si existe un estrés oxidativo asociado al ejercicio realizado a grandes alturas, la cantidad de pentano exhalado fue determinado como índice de lipoperoxidación, durante una expedición al K2. Los resultados muestran que tras 4 semanas de suplementación (400 mg/día de vitamina E) y dos semanas de expedición, los niveles de pentano exhalado aumentaron significativamente en el grupo control ($p < 0.01$). En el grupo tratado no se observó este incremento (Simon-Schnass y Pabst; 1988).

El tratamiento con vitamina E también demostró ser efectivo en la prevención del aumento de la fragilidad de los eritrocitos asociado al ascenso a grandes alturas. En un estudio llevado a cabo por Simon-Schnass y Korniszewski (1990) durante el ascenso al Annapurna (8091 m), los autores demostraron que el tratamiento con vitamina E (400mg/día) protegía significativamente frente a la fragilidad de las células rojas que mostraba el grupo control. Con el objetivo de demostrar el papel de los radicales libres en el daño causado a las células rojas se estudió la susceptibilidad de los eritrocitos a la lipoperoxidación, en una expedición al Solo Khumbu (5.545 m), cerca del monte Everest (Simon-Schnass, 1994). Los resultados mostraron un muy marcado incremento en los niveles de TBARS en el grupo control que contrastó con el pequeño descenso de este parámetro de lipoperoxidación en el grupo suplementado con vitamina E.

Todos estos datos destacan el importante papel que el estrés oxidativo juega en el ascenso a grandes alturas y apuntan hacia la conveniencia de la suplementación con antioxidantes en estos modelos.

Se ha apuntado a distintas fuentes generadoras de radicales libres en este tipo de modelos que combinan ejercicio físico agotador con el ascenso a grandes alturas: la cadena de transporte electrónico mitocondrial, la hipoxia, la radiación UV y las bajas temperaturas (Simon-Schnass, 1994). Sin embargo, en el 2001, Joanny y cols. publicaron un trabajo en el que demostraron que la teoría de la hipoxia-reoxigenación podría ser la más convincente. En un modelo en humanos, en condiciones de reposo, durante una simulación en cámara hipobárica de la hipoxia causada por la altura, encontraron un aumento en los niveles en sangre total de TBARS, un descenso en el GSH eritrocitario y del ratio GSH/GSSG. Este modelo elimina la opción que apunta al incremento en el consumo de oxígeno y por tanto a la teoría mitocondrial a la hora de explicar el estrés oxidativo asociado al ascenso a grandes alturas porque todo el estudio se realizó en condiciones de reposo. Del

mismo modo este experimento elimina el factor frío y la radiación UV al realizarse el estudio en cámara hipobárica.

Nuestra teoría apunta hacia la activación de la xantina oxidasa durante la hipoxia como uno de los mecanismos responsables de la generación del daño asociado a los procesos de isquemia-reperusión en nuestro modelo experimental.

En 1981 Granger y cols. demostraron que el tratamiento del intestino de felino con superóxido dismutasa previo al proceso de isquemia atenuaba el daño durante la subsiguiente reperusión, lo que apuntaba hacia el radical superóxido como responsable del daño tisular. Estos autores propusieron que la fase de isquemia producía una conversión de las XDH a XO y una degradación de los nucleótidos de adenina a hipoxantina. De esta forma con la re-introducción del oxígeno molecular durante la reperusión, una considerable cantidad de radical superóxido, es generada en la reacción catalizada por la XO.

La isquemia-reperusión se considera, por tanto, un importante factor en la regulación de la enzima, habiéndose demostrado que ésta provoca un aumento de la actividad de la XOR (Hassoun y cols. 1994; Poss y cols., 1996), así como un aumento en los niveles mRNA (Hassoun y cols. 1994; Terada y cols. 1997) y de la expresión de la proteína *in vivo* (Hassoun y cols. 1998) e *in vitro* (Terada y cols. 1997).

Por otra parte, en el ejercicio físico las contracciones musculares llevan a una compresión de los vasos sanguíneos que en cierta medida puede causar una corta y regional reducción en la circulación con una limitación de la disponibilidad de oxígeno (Simon-Schnass, 1994). Esta deficiencia pasajera en la disponibilidad de oxígeno puede producirse independientemente del elevado recambio de oxígeno (Berg y cols., 1987) y participar en la conversión de la XO a XDH.

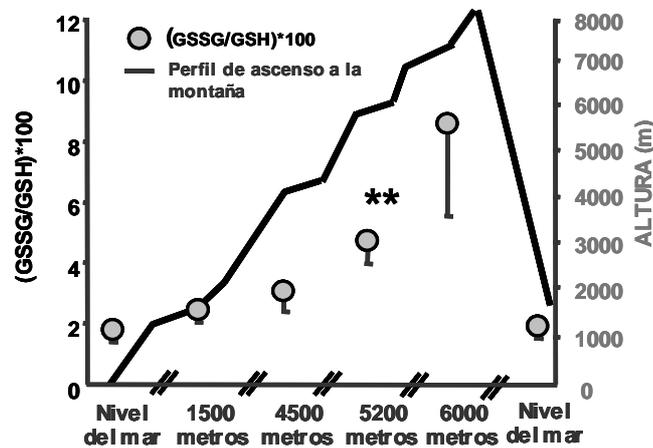
En nuestro estudio nos planteamos el estudio del estrés oxidativo asociado al ejercicio físico realizado durante el ascenso al G2 (8034 m). Como hemos comentado en el apartado de material y métodos las extracciones de sangre una vez alcanzada la altura de 4500 metros (campamento base) siempre fueron realizadas a este nivel. Esto significa que el grupo de alpinistas tras el ascenso a 5200 y 6000 metros descendieron a campamento base para realizar la extracción. La presión parcial de oxígeno a 5200 y 6000 metros desciende entre un 50 y un 54% con respecto a nivel del mar. Este hecho asemeja el proceso al que se vieron sometidos, al de la isquemia-reperusión. Nuestros resultados muestran como el ejercicio físico realizado a grandes alturas provoca un aumento de los niveles de

GSSG, del ratio GSSG/GSH y un descenso de los niveles de GSH, que es progresivo a medida que van acercándose a la cima de la montaña.

Los valores del cociente son un 488% más altos a 6000 metros si los comparamos con los obtenidos a nivel del mar. Siendo éste significativo a los 5.200 metros de altura (Ver Figura V.2.)

Concluimos, por tanto, que el ejercicio físico realizado a grandes alturas produce una oxidación del glutatión sanguíneo, que puede estar relacionado con un aumento de la xantina oxidasa, responsable de la generación de radicales libres en dicho proceso.

Figura V.2. Cociente (GSSG/GSH) x100 en sangre de alpinistas durante su ascenso al GII.



*Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n=2-4). La significación estadística se expresa como (**)p< 0.01 frente a nivel del mar.*

2.- Estudio del efecto de la administración de alopurinol sobre el daño muscular asociado al ciclismo de alta competición.

En este trabajo nos planteamos el estudio del estrés oxidativo asociado al ejercicio físico agotador en un grupo de ciclistas de élite, el U.S. Postal Team, durante su participación en la prueba ciclista más prestigiosa a nivel internacional, el Tour de Francia, en el año 2001.

2.1. El ejercicio físico agotador provoca un aumento de la actividad en plasma de las enzimas CK y GOT, prevención con el tratamiento con alopurinol.

El ejercicio físico, sobretodo el excéntrico, puede llegar a provocar daño muscular (Armstrong y cols.,1983; Kyparos y cols., 2001). Los estudios realizados hasta el momento sugieren que los efectos inmediatos asociados a la lesión muscular son de tipo mecánico, y se originan fundamentalmente por la tensión soportada por el sarcómero de la fibra muscular. Diversos experimentos han demostrado como una excesiva tensión en el sarcómero es la principal causa de la lesión muscular por una disrupción intra y/o extracelular de las membranas que permite la hidrólisis de proteínas estructurales, provocando la desestructuración miofibrilar que se observa habitualmente (Lieber y cols. 1999). Posteriormente aparece el fenómeno de la inflamación que ayuda a degradar y reparar el tejido.

El indicador bioquímico más utilizado para valorar el daño muscular es la medición de la liberación al plasma de la enzima intramuscular creatinquinasa (CK). El tiempo en que se produce la elevación de la actividad CK en plasma tras la realización de un ejercicio agudo varía en función de los autores. Algunos proponen un aumento inmediato tras el ejercicio (Amelink y cols., 1986; Hayward y cols., 1999), mientras que otros llegan a encontrar dos picos de actividad, uno a las 0 horas y otro a las 24-36 horas (Armstrong y cols., 1983; Newham y cols., 1983).

Se ha visto que algunas variables influyen sobre el aumento de la actividad enzimática plasmática postejercicio, como los niveles de estradiol (Bar y cols., 1988; Amelink y cols.,1990), el entrenamiento previo (Balnave y Thompson, 1993), el género (Van Der Meulen y cols., 1991), la edad (Galen y cols. 1979), la masa muscular (Manfredi y cols. 1991), la ingesta de proteínas (Hayward y cols., 1999) o la intensidad y duración del ejercicio (Hortobagyi y cols., 1989; Van der Meulen y cols., 1991)

La relación entre el estrés oxidativo, el ejercicio y el daño muscular ha sido ampliamente estudiada. En el año 2003 Satchell y cols. publicaron un artículo en el que tras suplementar durante 12 semanas a un grupo de jóvenes con 1000 IU/día de vitamina E y tras un protocolo de ejercicio físico excéntrico, el tratamiento disminuía los niveles de CK. Rokitzki y cols. (1994) encontraron una disminución en los niveles de CK y MDA en suero de ciclistas profesionales suplementados con vitamina E tras un entrenamiento. Itoh y cols. (2000) trabajando, en este caso con corredores, publicaron que tras 6 días de carrera los niveles de TBARS, CK y LDH en plasma disminuían con el tratamiento con vitamina E, en este caso, 1200 IU/día. Por último, los cócteles de antioxidantes, también han mostrado, en humanos y durante el ejercicio, pequeñas disminuciones en los niveles de daño muscular y de glutatión oxidado (Dekkers y cols., 1996).

Existen muchas discrepancias con respecto al mecanismo responsable de la producción de radicales libres en el ejercicio, sin embargo la mitocondria ha centrado la mayor parte de la atención.

La idea de que la producción mitocondrial de radicales libres aumenta de forma proporcional al consumo de oxígeno se asume con frecuencia, pero no existe en realidad evidencia de ello. El consumo de oxígeno, como hemos dicho anteriormente, aumenta unas 20 veces cuando se realiza un ejercicio agotador. El mayor aumento se produce en el músculo esquelético, donde puede llegar a ser de hasta 100 veces, y en el corazón. Sin embargo, el músculo cardíaco y esquelético poseen concentraciones de antioxidantes más de una orden de magnitud menores que otros tejidos, altamente aeróbicos, como hígado y riñón (Jenkins y cols., 1984). Por lo tanto, resulta difícil entender como los músculos pueden evitar el estrés oxidativo masivo durante el ejercicio agudo si la producción de radicales libres en la mitocondria aumentara proporcionalmente al aumento del consumo de oxígeno.

Existen evidencias de que el ejercicio puede producir cambios en algunos factores que causan el desacoplamiento de la respiración mitocondrial. Durante el ejercicio, aumenta la expresión de UCP2 y UCP3, dos proteínas desacopladoras de la membrana mitocondrial cuya función consiste en la disipación de la energía en forma de calor y la disminución de la síntesis de ATP (Klingenberg y cols., 1990). Por otra parte el ejercicio prolongado reduce de forma progresiva la actividad de la Ca^{+2} ATPasa del retículo sarcoplásmico (Byrd y cols., 1989) lo que supone un aumento del calcio citoplasmático que induce una acumulación de Ca^{+2} en la mitocondria y lleva a un desacoplamiento de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (McCormack y Osbaldeston, 1990). Por último Brooks y cols. (1971)

publicaron que la actividad física podía elevar la temperatura muscular a 45°, lo que provocaba la pérdida del control respiratorio mitocondrial.

La cadena de transporte electrónico ha sido, por todas estas razones, considerada durante mucho tiempo, como la principal fuente generadora de ERO tanto en reposo como durante el ejercicio. (Boveris y Chance, 1973; Boveris y Cadenas, 1975). La mayor parte del oxígeno consumido por las células eucariotas se reduce en la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Sin embargo, se estima que un 2% del oxígeno total consumido en el tejido se transforma en ion superóxido, que posteriormente por la superóxido dismutasa se transforma en H₂O₂. El lugar principal de generación de estos radicales libres se da a nivel de los complejos I y III (Chance y cols., 1979).

Se sabe que las mayores tasas de producción de O₂⁻ y H₂O₂ por las mitocondrias ocurren durante el Estado 4, cuando los transportadores electrónicos están en mayor proporción reducidos, y no bajo las condiciones del Estado 3, cuando están fundamentalmente oxidados (Chance y cols., 1979). En este último estado, no se detecta liberación de H₂O₂ por las mitocondrias cuando se utiliza succinato como sustrato de la cadena respiratoria (Herrero y Barja, 1997; Papa y cols., 1997)

Las mitocondrias en las células se encuentran normalmente en un estado intermedio entre el estado 3 y el 4 (Brand y Murphy, 1987). Cuando el suministro de sustratos respiratorios excede la demanda de energía y el potencial fosfato ([ATP]/[ADP][Pi]) es elevado se produce una depresión respiratoria (Estado 4), un aumento de la electronegatividad de los transportadores y de la tensión de oxígeno. Esta situación implica una producción aumentada de radicales libres (Skulachev, 1996). Sin embargo, cuando se produce un incremento en la concentración citosólica de ADP se produce un estimulación de la fosforilación oxidativa mitocondrial, produciéndose una transición desde el Estado 4, estado de "reposo", hasta el estado "activo", o Estado 3 (Boveris y cols., 1972). Además, en los tejidos aeróbicos, que trabajan continuamente, como el corazón, las mitocondrias también se encuentran en un estado más cercano al 3 que al 4.

El grado de reducción de los componentes de la cadena respiratoria disminuye de forma muy marcada durante la transición desde el Estado 4 al estado 3, al mismo tiempo que se produce un aumento del flujo de electrones (Chance y Williams, 1956). Esto podría ser lo que ocurre durante el ejercicio físico.

Son varios los grupo de investigación que no han encontrado evidencias de que el aumento de la producción de radicales libres en ejercicio pliométrico

provenza de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (McArdle, y cols., 1999; Viña y cols., 2000; Reid y cols., 2001)

Según Reid (2001) en la consideración de la mitocondria como fuente de radicales libres en el ejercicio yace un problema conceptual. El radical superóxido producido por los músculos en contracción puede ser detectado en el espacio extracelular (Reid y cols., 1992; Zuo y cols., 2000) y en el compartimento vascular (Lee y Okabe, 1995; Stofan y cols., 2000). El anión superóxido generado en la mitocondria es muy poco probable que pueda ser medido fuera de la célula. Esto significaría que especies reactivas y cargadas eléctricamente, podrían escapar a los sistemas antioxidantes en la matriz mitocondrial y difundir a través de la membrana mitocondrial interna y externa, citosol y sarcolema sin implicarse en ninguna reacción química. La difusión a través del endotelio capilar en el compartimento vascular todavía parece menos probable (Reid, 2001).

Por todo esto, nosotros cuestionamos el papel de la cadena de transporte electrónico como fuente de producción importante de radicales libres en el ejercicio físico agotador y nos decantamos por el estudio de un segundo mecanismo, el proceso de isquemia-reperfusión.

Durante el ejercicio físico el flujo de sangre se desvía desde órganos y tejidos como el riñón y la región esplácnica hacia los músculos en contracción, experimentando estos órganos un fenómeno de hipoxia. Además, durante el ejercicio a la máxima intensidad y quizás a intensidades menores, las fibras musculares que trabajan también sufren hipoxia, debido a la mayor demanda de oxígeno. Cuando el ejercicio cesa se produce una reoxigenación de todos los tejidos hipóxicos, momento en el cual se producen los radicales libres (Hellsten 1994).

Con el objetivo de estudiar el papel que la xantina oxidasa juega en el daño muscular causado por el ejercicio físico, administramos 300 mg de alopurinol a 4 ciclistas del equipo US Postal Team durante su participación en el Tour de Francia 2001. Al resto de miembros del equipo (5 ciclistas) les administramos un placebo. Los valores de CK de los deportistas en reposo, antes de empezar el Tour, fueron muy similares a los valores normales en hombres sanos, 150 U/L y 160 U/L, respectivamente. Como se puede observar en la Figura V.3. nuestros resultados muestran un aumento en la actividad CK en plasma en el grupo placebo, significativo únicamente tras la contrarreloj por equipos. Los picos de CK que obtuvimos fueron muy similares a los alcanzados en otros protocolos de ejercicio

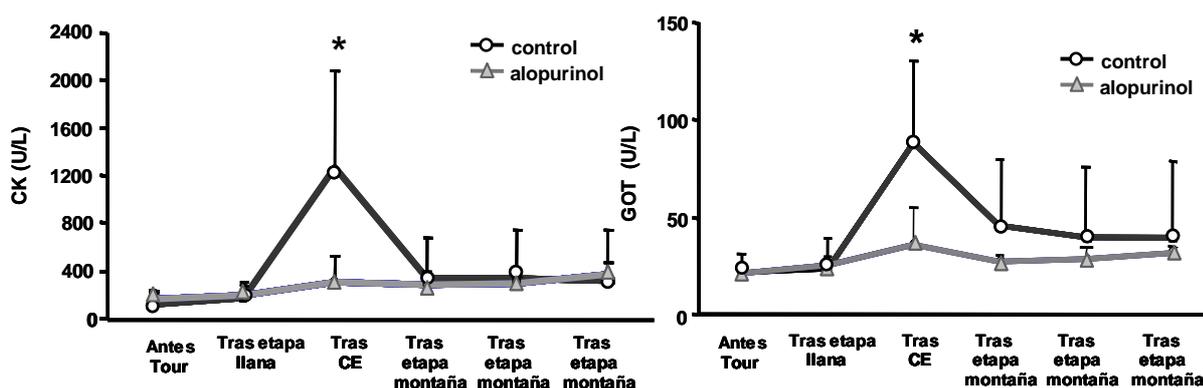
en humanos: 1300 ± 650 U/L, en nuestro caso, frente a los 1620 ± 500 descritos por Lee y cols. (2002).

Aunque menos utilizada que la actividad CK, la actividad GOT (Van der Meulen y cols., 1991, Balnave y Thompson, 1993) también se puede considerar como marcador de daño muscular. Esta enzima se encuentra en el citoplasma y las mitocondrias de células del tejido cardíaco, hepático y esquelético, principalmente. Los valores normales en humanos para GOT son 5-40 U/l y como se puede observar en la Figura V.3., muy similares a los valores reposo de los ciclistas.

Como ocurre con la CK, la GOT en plasma, muestra un incremento muy marcado únicamente tras la contrarreloj por equipos. Los ciclistas que recibieron alopurinol, de nuevo, no mostraron dicho aumento, que fue significativo en aquellos que recibieron placebo.

De nuestros resultados se extrae la conclusión de que la xantina oxidasa, como enzima generadora de radicales libres, está relacionada con el daño muscular que se produce tras la realización de un ejercicio físico agotador.

Figura V.3. Valores individuales de actividad plasmática de la enzima CK y GOT en ciclistas durante su participación en el Tour de Francia.



Valores de las medias de actividad CK y GOT. Grupo control (n=5), grupo alopurinol (n=4). La comparación de las medias se realizó utilizando un análisis de varianza de medidas repetidas. El valor de la p se determinó utilizando el test de Scheffe de comparaciones múltiples. La significación estadística se expresa como (*) $p=0.02$ frente a grupo alopurinol. CE: Contrarreloj por equipos.

Los resultados obtenidos en este estudio confirman y aportan más argumentos a los ya expuestos por otros autores y en los que se cuestiona el papel de la mitocondria en la generación de radicales libres en el ejercicio. En un artículo publicado en 1989 por Saris y cols., estudiaron el consumo energético de los ciclistas participantes en el Tour de Francia durante cada una de las etapas. La media de consumo energético fueron 6500 Kcal diarias, durante el periodo de 3 semanas que dura la carrera, siendo el día de descanso el de menor consumo 3000 Kcal y los días en los que se disputaban etapas de montaña los de mayor consumo, 9000 Kcal.

Según estos datos y si existe una relación entre la generación de radicales libres producidos por la mitocondria y el consumo de oxígeno, en las etapas de montaña los ciclistas deberían haber presentado niveles más altos de daño muscular (CK y GOT) que en las etapas llanas o en la contrarreloj por equipos.

El hecho de que los cambios entre los dos grupos de tratamiento se produjesen de forma exclusiva tras la etapa contrarreloj por equipos nos condujo a un análisis más riguroso de la misma. El Tour de Francia es la única prueba ciclista internacional en la que se incluye una carrera de este estilo. En el 2001 la distancia que se recorrió fue un total de 70 Km en los que el US Postal Team, invirtió menos de una hora de tiempo. Esto supone velocidades medias de pedaleo de más de 60 Km/hora. Otra de las particularidades, de este tipo de etapas, es que el tiempo acreditado por el equipo lo marca el quinto ciclista en atravesar la línea de meta. Este hecho da garantías de que todos los componentes del mismo se ejercitan hasta el agotamiento y confirma los resultados publicados por nuestro grupo en 1992 (Sastre y cols., 1992) de los que se extraía la conclusión de que el ejercicio físico, únicamente cuando es agotador, provoca una situación de estrés oxidativo.

Existen varios estudios en la bibliografía sobre el efecto del tratamiento con alopurinol en el ejercicio físico en humanos. En 1999 Heunks y cols. publicaron que el tratamiento con este fármaco en pacientes con enfermedad pulmonary obstructive crónica (EPOC), que realizaban un ejercicio físico hasta el agotamiento en bicicleta ergonómica, disminuían los niveles de GSSG en sangre y MDA en plasma. Un año más tarde Viña y cols. (2000) encontraron que el tratamiento con alopurinol disminuía los niveles en plasma de CK y GOT en halterófilos tras un entrenamiento de fuerza. En el 2003, Vassilakopoulos y cols. publicaron la disminución en los niveles de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en plasma de un grupo de sujetos

sometidos a dos sesiones de 45 minutos de bicicleta (70% VO₂ max) al pretratarlos con un cóctel de antioxidantes entre los que se encontraba el alopurinol.

El alopurinol es un análogo de las bases púricas xantina e hipoxantina que tras ser metabolizado a oxipurinol se une de forma competitiva a la enzima impidiendo su acción sobre los sustratos hipoxantina y xantina (Hille y Massey, 1981). El efecto del alopurinol en la reducción de la inducción del daño por radicales libres puede, en parte, ser debida a sus propiedades antioxidantes. De hecho existe cierta controversia en relación al papel del alopurinol como antioxidante directo del radical hidroxilo. Moorhouse y cols. (1987) demostraron que el alopurinol y el oxipurinol tenían efectos antioxidantes *in vitro*. Sin embargo en este estudio, la concentración de ambos productos fue >500 μM. En un estudio posterior Zimmerman y cols., (1988) comprobaron que el alopurinol y el oxipurinol a concentraciones en plasma de 12 y 12.9 μM respectivamente (50 mg/Kg durante 2 días), no mostraban ninguna capacidad antioxidante. En nuestro estudio en humanos utilizamos una dosis de alopurinol diaria de 300 mg (Zyloric) 1 hora antes de iniciar el ejercicio. En un estudio muy similar llevado a cabo por nuestro grupo y en el que se utilizó la misma dosis de alopurinol y en un modelo de humanos (Heunks y cols., 1999; Viña y cols., 2000) las concentraciones en plasma de alopurinol fueron muy similares a las publicadas por Zimmerman, mientras que las de oxipurinol fueron algo más altas. Es importante señalar que pese a que el tratamiento con alopurinol durante varios días supone una acumulación gradual del oxipurinol (Murrell y Rapeport, 1986), éste último no es tan efectivo como el alopurinol como antioxidante *in vitro* (Das y cols., 1987; Smith y cols., 1989; Hellsten, 1994). Por todo ello pensamos, que los efectos del tratamiento con alopurinol en nuestro estudio son el resultado de la inhibición de la XO y no una consecuencia de las propiedades antioxidantes del producto.

2.2. Efecto de la administración de alopurinol sobre los niveles de lipoperóxidos en plasma.

Otro marcador de estrés oxidativo utilizado es la determinación de lipoperóxidos en plasma. Determinamos, por tanto, malondialdehído (MDA), un producto formado a partir de la hidrólisis ácida, a 100° C, de los lipoperóxidos. Los lipoperóxidos se forman a partir de una cadena de reacciones de peroxidación de lípidos de membranas plasmáticas, que ocurre en presencia de radicales libres de oxígeno.

En la bibliografía existen muchas controversias respecto a la lipoperoxidación y su incremento con el ejercicio. En primer lugar, no existe un marcador biológico totalmente aceptado para el estudio de la peroxidación lipídica. En el ejercicio físico se han utilizado distintas determinaciones tales como: dienos conjugados (Merry y cols., 1991), hidroperóxidos lipídicos (Alessio y cols., 1988), sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Kanter y cols., 1993), y etano y pentano en aire expirado (Pincemail y cols., 1990). Sin embargo, todas estas medidas muestran inconvenientes y resultados contradictorios.

Kanter y cols. (1993) observaron que el ejercicio de elevada intensidad producía un aumento de la concentración de TBARS tanto en suero como en plasma, en sujetos altamente entrenados que realizaban ejercicio hasta el agotamiento. Davies y cols. (1982) encontraron un incremento similar de MDA tras el ejercicio en ratas no entrenadas. Sin embargo, Viinikka y cols. (1984) no observaron diferencias en los niveles de MDA en suero de humanos como resultado de un ejercicio agudo. Leaf y cols. (1997) tampoco observaron niveles incrementados de MDA, por el contrario encontraron un aumento en los niveles de etano y pentano en aire espirado, como consecuencia del ejercicio físico. La mayor parte de estas controversias se pueden explicar por la variedad de métodos empleados y las diferentes condiciones del ejercicio físico en cuanto a intensidad, duración y entrenamiento previo. Otro aspecto que condiciona directamente los niveles de MDA es el tiempo de recogida de la muestra. Al igual que la oxidación del glutatión podemos considerarla un parámetro de medida de estrés oxidativo agudo (Ver apartado 3.2. de la discusión), el MDA muestra, por el contrario, modificaciones más a largo plazo. Podemos, por tanto, considerarlo un parámetro crónico de medida. Este hecho pensamos que puede ser clave a la hora de explicar la comentada cantidad de resultados contradictorios.

En nuestro trabajo encontramos un aumento de los niveles de MDA en todos los ciclistas al final de la carrera, siendo éste significativo únicamente en el grupo que no tomó alopurinol (0,59 frente a 0,21 nmol/mL, $p=0.09$) (Gómez-Cabrera y cols., 2003). El método por HPLC de medida de MDA es muy específico y sensible y distingue entre la concentración de malondialdehído y otros aldehídos que pueden reaccionar con el TBA (ácido tiobarbitúrico) (Bermejo y cols., 1977). Por este motivo nos decantamos por este parámetro de medida para estudiar la lipoperoxidación en nuestro modelo.

2.3. Modelo de activación de la enzima xantina oxidasa en el ejercicio.

Con los resultados obtenidos de este estudio en humanos, podemos concluir que la enzima xantina oxidasa no sólo está relacionada con la fisiopatología del síndrome de la isquemia-reperfusión, sino que también juega un papel importante en el daño muscular que ocurre durante la realización de ejercicio físico agotador.

En este apartado de la discusión nos planteamos proponer un modelo de activación de la XO en base a la combinación de nuestros resultados con los publicados por otros autores.

El ejercicio físico intenso y el ejercicio físico prolongado someten al músculo en contracción a unos elevados niveles de estrés metabólico que pueden llevar a las dos condiciones requeridas para el aumento en la formación de radicales libres vía XO: la conversión de la XDH a XO y un aumento en la presencia de hipoxantina, el sustrato de la enzima (Heunks y cols., 1999; Viña y cols., 2000; Viña y cols., 2000)

Aunque una proporción de la XDH existe en su forma oxidasa en el músculo esquelético, el proceso de conversión debería ocurrir durante el ejercicio para posibilitar la importante producción de radical superóxido vía XO. Una transformación de la enzima vía proteasas dependientes de calcio requeriría un cambio en la homeostasis del calcio intracelular. Estudios en animales han mostrado alteraciones en el retículo sarcoplásmico que conllevan aumentos en el contenido intracelular de calcio en el músculo (Byrd, 1992). En esta misma línea la alteración en la homeostasis del Ca^{+2} ha sido considerada como un paso clave en el proceso degenerativo asociado al daño muscular inducido por el ejercicio físico (McArdle y cols., 1992). El ejercicio físico intenso puede disminuir la disponibilidad de nucleótidos de adenina lo que supone una disminución en la actividad de las bombas de calcio (Heunks y cols., 1999). Además, la XO activada puede inhibir la recaptación de Ca^{+2} por el retículo sarcoplásmico lo que supone una acumulación de Ca^{+2} que puede desencadenar la formación de más XO (Okabe y cols., 1983).

Para que las proteasas musculares pudiesen actuar en la XOR localizada en la pared de los vasos, la membrana celular debería ser dañada. Aunque también sería posible que la conversión a la forma oxidasa pudiese ser posible vía proteasas vasculares o mediante otros mecanismos como la oxidación de grupos sulfidrilo (Corte y Stirpe, 1972). A este último mecanismos contribuirían las ERO.

El otro requerimiento para la generación de ERO vía XO es una elevada concentración del sustrato, la hipoxantina. La cantidad de hipoxantina formada se relaciona con los niveles de degradación de los nucleótidos de adenina y diversos estudios han demostrado que el ejercicio físico intenso conlleva una elevada acumulación de hipoxantina en plasma. Apoyando el papel de la XO en el daño inducido por el ejercicio físico se han publicado muestras de alteraciones morfológicas del endotelio vascular, el lugar donde se localizan la mayor concentración de la enzima en el músculo, durante el ejercicio de muy larga duración (Duarte y cols., 1993; Crenshaw y cols., 1993). En estos mismos trabajos los autores encontraron cambios morfológicos (hinchazón) en las mitocondrias de las células endoteliales en músculo de animales control tras una hora de ejercicio físico agotador. Estas alteraciones fueron prevenidas al tratar a los animales con alopurinol. En músculo esquelético de humanos tras un protocolo de ejercicio físico agotador (Hellsten y cols., 1996) y músculo de rata sometida a un proceso de isquemia (Jennische y cols., 1987) se han encontrado aumentos en IGF-1 en el endotelio vascular, lo que se relaciona con un proceso de regeneración celular de un tejido que ha sido dañado previamente.

Como comentamos en la introducción, uno de los procesos en los que la xantina oxidasa tiene un papel relevante es el proceso inflamatorio. Existe una gran cantidad de trabajos publicados que relacionan el ejercicio físico con dicho proceso (Petrone y cols., 1980; McCord, 1986; Smith, 1991). Este último autor sugiere dos posibles causas que pueden desencadenar el daño muscular:

- 1.- El estrés metabólico con el descenso de los niveles de nucleótidos de adenina y el aumento en la formación de hipoxantina; y la posible conversión de la XDH a XO por un aumento de los niveles de calcio intracelular. Este proceso ocurriría tanto durante un ejercicio de muy alta intensidad, como en las últimas fases de un ejercicio de muy larga duración cuando la disponibilidad de energía es limitada, debido a los bajos niveles de glucógeno.

- 2.- La ruptura de la fibra muscular debido al estrés físico, que ocurre principalmente en los ejercicios excéntricos (Friden y Liebre, 1991). El residuo tisular resultado de la ruptura de la célula muscular puede activar el sistema del complemento (Jarasch y cols., 1981) e inducir la liberación de histamina. Ambos son capaces de atraer los neutrófilos (McCord y Fridovich, 1969) que pueden, de esta forma, participar en la conversión de la XDH a XO (Phan y cols., 1989)

Sin embargo, el primer caso, en el que el ejercicio provoca un estrés metabólico e inicia la conversión de la XDH a XO, los neutrófilos podrían ser activados por la acción quimiotáctica del radical superóxido (Granger y cols., 1981; McCord, 1986). Esta activación podría llevar a una mayor generación $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 ya que los fagocitos activados poseen distintas enzimas, con capacidad para generar ERO, como uno de los mecanismos para defenderse de los microorganismos (Babior, 1978).

Un estudio de Hellsten y cols., (1996) en el que los niveles de XDH/XO fueron estudiados utilizando anticuerpos monoclonales, muestra que la presencia de XDH/XO aumenta en los vasos sanguíneos en músculo esquelético tras un ejercicio físico agotador. El ejercicio indujo un aumento significativo en los niveles de CK en plasma. El estudio también mostró un aumento en el contenido muscular de hidroxiprolina, proteína de colágeno, y de IGF-1, lo que sugiere el inicio (como hemos comentado en el párrafo anterior) de un proceso regenerativo del tejido (Jennische y cols., 1987; Edwall y cols., 1989; Jennische, 1989). El aumento en los niveles de la enzima podría ser debido a un incremento en la expresión de la XDH en el músculo o a la unión de la enzima a la superficie de la célula endotelial vía proteoglicanos (Adachi y cols., 1993). (Ver Figura V.4.)

3.- Estudio del estrés oxidativo asociado a la práctica de ejercicio físico agotador en ratas. Efecto de la administración de alopurinol.

Por razones éticas obvias, tuvimos que volver al modelo en animales para estudiar el efecto de los radicales libres generados por la xantina oxidasa en el estrés oxidativo y la señalización celular durante el ejercicio.

3.1. Efecto de la administración de alopurinol en la activación de la enzima xantina oxidasa en plasma de ratas sometidas a un protocolo de ejercicio físico agotador.

Como hemos comentado en el apartado anterior, la elevada generación de radicales libres en el ejercicio puede ser atribuída al aumento en la actividad de la xantina oxidasa. De hecho se ha comprobado que la inmunoreactividad de la

enzima en músculo aumenta, más de 8 veces, tras un ejercicio excéntrico (Hellsten y cols., 1997). Su actividad en músculo esquelético de rata es tres veces mayor tras dos horas de isquemia (Jarasch y cols., 1986; Smith y cols., 1989). En principio los autores consideran este aumento consecuencia de la mayor producción de XO por las células endoteliales y por la infiltración de leucocitos conteniendo la enzima. Este resultado coincide con los obtenidos por Duarte y cols., 1993 que al tratar ratones con alopurinol encontraron una disminución del daño muscular inducido por el ejercicio, especialmente en el endotelio.

La importancia de la xantina oxidasa como mediadora del daño inducido por el ejercicio físico en músculo esquelético ha sido cuestionada por la poca actividad de la enzima en este tejido (Roy y McCord, 1983; Smith y cols., 1989). Xia y Zweiver en 1995 hicieron una interesante aportación a este respecto al demostrar que la generación de ERO por la XO no está limitada por la cantidad de enzima disponible sino más bien por la cantidad de sustrato. Por tanto, cuando los productos de degradación del ATP se acumulan, la XO puede ser la responsable en la generación de ERO. En varios trabajos se ha publicado la elevación en los niveles de hipoxantina, xantina y ácido úrico en plasma (procedente de músculo) tras el ejercicio (Heunks y cols., 1999; Hellsten-Westing, 1994) y su prevención con el tratamiento con alopurinol. Estos resultados nos dan información sobre el tipo de ejercicio en el que la generación de radicales libres por la XO puede llevar a una situación de estrés oxidativo. Los aumentos en la actividad XO pueden deberse a un aumento en la glucólisis anaeróbica en los músculos en contracción. Se sabe que la acumulación celular de peróxido de hidrógeno puede conducir a un marcado descenso en la glucólisis aeróbica celular (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Durante el ejercicio físico moderado las concentraciones plasmáticas de hipoxantina y ácido láctico permanecen inalteradas. Sin embargo, cuando se requiere la participación de la respiración anaeróbica, el metabolismo de las purinas se acelera (Yamanaka y cols., 1992) La hipoxantina no se acumula en exceso en el músculo esquelético humano durante el ejercicio físico intenso, sin embargo, como esta purina puede difundir a través de las membranas con facilidad, el plasma es una fuente importante del sustrato para la XO. Podemos considerar, por tanto, que el daño muscular asociado a la generación de radicales libres durante el ejercicio podría ser minimizada en condiciones de trabajo aeróbico (Yamaka y cols., 1992).

En este sentido se ha publicado un trabajo muy interesante de Radak y cols. (1995). Este grupo encontró una correlación entre la actividad en plasma de la XO y

la concentración de lactato en sangre de ratas. Estos resultados son muy similares a los publicados y comentados anteriormente, por Sastre y cols. (1992).

Dada la importancia que el protocolo de ejercicio ha demostrado tener, consideramos importante remarcar que todos nuestros animales corrieron el mismo tiempo, tanto los controles como los tratados con alopurinol (~60 min). Utilizamos como parámetro de agotamiento los valores de lactato en sangre de los animales ya que el protocolo de ejercicio utilizado cumplía las condiciones necesarias para validar esta medida (test progresivo, incremental y con intensidades de trabajo en los últimos estadios de más del 80% del VO_2 máx). Los valores de lactato al finalizar el ejercicio fueron en ambos grupos significativamente superiores a los del grupo control, coincidiendo éstos con los encontrados en la literatura (Radak y cols., 1995).

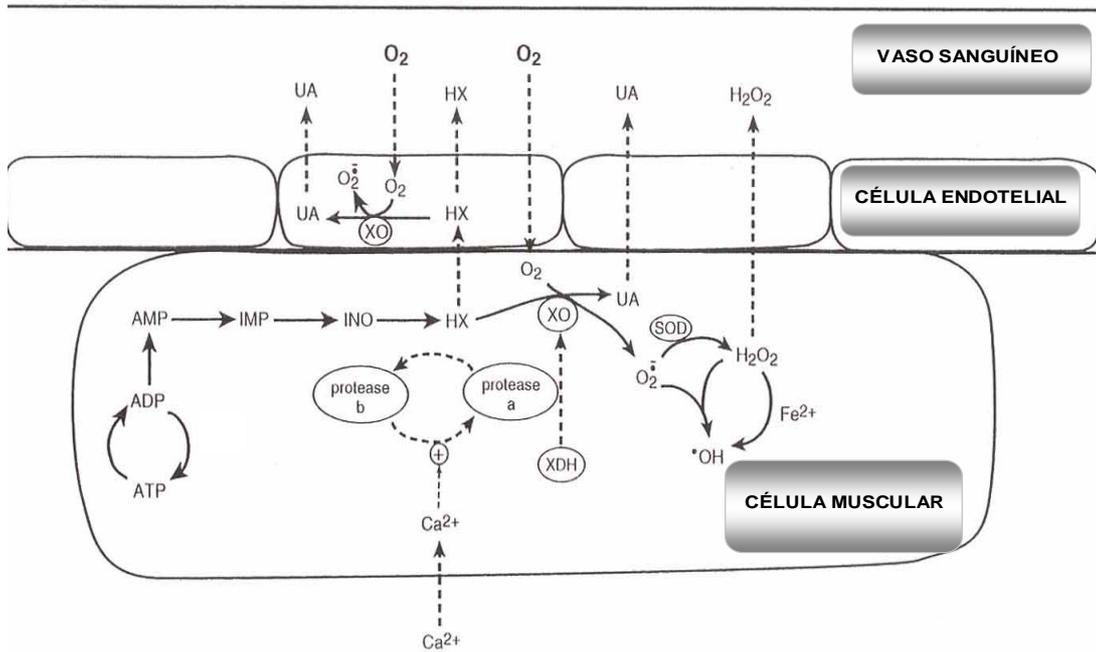
Nuestros resultados muestran un incremento en la actividad xantina oxidasa en plasma en animales sometidos a un protocolo de ejercicio físico agotador. Dicho aumento fue completamente prevenido cuando tratamos a los animales con alopurinol.

En el caso de los animales la dosis de alopurinol utilizada fueron 32 mg/Kg de alopurinol por vía intraperitoneal dos horas antes del ejercicio. Al igual que en el modelo en humanos esta cantidad de alopurinol es insuficiente para alcanzar sus propiedades antioxidantes. Zimmerman y cols., (1988) comprobaron que el alopurinol, 50 mg/Kg durante 2 días, no mostraban ninguna capacidad antioxidante. En 1996, Klain y cols. no encontraron actividad antioxidante a concentraciones menores de 100 mg/Kg.

Varios grupos de investigación han descrito este aumento en la actividad XO en plasma tras el ejercicio (Radak y cols., 1995; Viña y cols., 2000). Parece claro que este incremento en la actividad de la enzima es un reflejo del daño a las células endoteliales. Radak y cols. (1995) consideran el endotelio vascular no solo una fuente de radicales libres, durante el ejercicio físico intenso, sino uno de los tejidos diana más sensible a los mismos. Se ha relacionado un aumento en la producción de radical superóxido en el lecho vascular con el aumento de la actividad xantina oxidasa durante el ejercicio (Hopson y cols., 1995). La enzima interactúa con glicosaminoglicanos en la superficie de las células endoteliales (Roger White y cols. 2000). Adachi y cols. (1993) han demostrado que la XO se une electrostáticamente a los glicosaminoglicanos en la superficie de células endoteliales en cultivo, y que esta unión puede ser revertida por el tratamiento con heparina. Muchos agentes oxidantes, entre los que se incluye la XO, estimulan la síntesis de

glicosaminoglicanos y reducen la expresión de la SOD extracelular, la igual que su capacidad antioxidante (Tanaka y cols., 1993).

Figura V.4. Modelo de activación de la enzima xantina oxidasa en el ejercicio (Modificado de Hellsten, 1994).



AMP: Adenosín-5'-monofosfato
IMP: Inosina monofosfato.
INO: Inosina
HX: Hipoxantina

UA: Ácido úrico
XO: Xantina Oxidasa
XDH: Xantina deshidrogenasa
SOD: Superóxido dismutasa

3.2. Efecto de la administración de alopurinol en el estatus de glutatión en músculo gastrocnemio de ratas sometidas a un protocolo de ejercicio físico agotador.

Existen considerables discrepancias entre los distintos artículos publicados acerca del efecto del ejercicio sobre el estatus del glutatión. Estas diferencias, sin embargo, son sin duda debidas a la diferente metodología utilizada para determinar este índice de estrés oxidativo. Como hemos comentado en el apartado 1 de la presente discusión, la medida del estatus de glutatión es un buen índice, que

determina la producción de un estrés oxidativo tanto en tejidos como en fluidos biológicos (Sies, 1986; Meister, 1989; Viña, 1990). Además cambios en los niveles de GSSG se han considerado como señales intracelulares capaces de modular actividades enzimáticas (Gilbert, 1984). Es muy importante utilizar métodos seguros para determinar GSSG. El mayor problema que aparece para su determinación es la presencia de GSH. El GSH se puede oxidar, bien espontáneamente, o bien por una reacción catalizada enzimáticamente, durante la preparación de la muestra o durante el ensayo, obteniendo así valores de GSSG erróneamente elevados. Asumiendo que la glutatión reductasa está en equilibrio se calcula que la relación entre el GSH y el GSSG debería ser alrededor de 10^5 (Viña y cols, 1978). Incluso si esto no es así, es decir, que la glutatión reductasa no está en equilibrio, y si la relación GSH/GSSG es alrededor de 100, un 2% de oxidación del GSH aumentaría la concentración de GSSG al doble. Por lo tanto la oxidación del GSH debe ser mínima si queremos que el cociente GSH/GSSG tenga significado.

La medida de GSSG en presencia de GSH requiere quelar rápida y efectivamente el GSSG. Para prevenir la oxidación del GSH durante la preparación de la muestra se pueden utilizar varios agentes quelantes como el N-etilmaleimida (NEM), 2- vinilpiridina y ácido iodoacético. El grupo de Asensi y cols. (1994) en nuestro laboratorio ha seleccionado el NEM, por su rápida reacción y porque ésta puede realizarse en hielo y medio ácido (estas condiciones minimizan la oxidación del GSH).

Hemos comentado anteriormente la conveniencia de proceder con rapidez en el experimento. En 1995 nuestro grupo publicó un trabajo en el que se destacaba la importancia de este factor, el factor tiempo, en la determinación de los valores de glutatión en el ejercicio físico. En una de las tablas de este trabajo se muestra como una diferencia en 1 minuto de tiempo en la recogida de una misma muestra supone una oxidación de un 30% del GSH en sangre (Viña y cols., 1995).

La oxidación del glutatión en muestras de sangre puede dar lugar a conclusiones erróneas en lo concerniente a los cambios fisiopatológicos en el estatus del glutatión. Por ejemplo, Gohil y cols. (1988) utilizando el método de determinación de glutatión descrito por Reed y cols. (1980) encontraron un valor en el cociente GSH/GSSG en sangre de alrededor de 1. Los autores no encontraron, por tanto, una relación entre la oxidación del glutatión y el aumento del lactato en sangre. Cuando se repitieron estos experimentos en nuestro laboratorio utilizando el método de determinación de GSSG de Asensi y cols. (1994) se observó una

excelente correlación lineal entre el cociente GSSG/GSH y lactato/piruvato en sangre (Sastre y cols., 1992).

El hecho de que el glutatión se oxida con el ejercicio físico, cuando este es agotador, se ha observado en diversos laboratorios incluyendo el nuestro (Lew y cols., 1985; Pyke y cols., 1986; Gohil y cols., 1988; Ji y Fu, 1992; Sastre y cols., 1992; Viguie y cols., 1993; Sen y cols., 1994; Supinski y cols., 1996).

En los experimentos realizados en la presente tesis determinamos la concentración de GSH, GSSG y calculamos el cociente (GSSG/GSH) x100 en homogenados de músculo gastrocnemio de animales sometidos al protocolo de ejercicio físico agotador. Pudimos observar un aumento de un 50% en los niveles de GSSG en el homogenado inmediatamente después del ejercicio. Este incremento se previene con la administración del alopurinol. Los valores de GSH no descendieron en el grupo de animales sometidos al protocolo de agotamiento por lo que el cociente GSSG/GSH no mostró diferencias estadísticamente significativas. Varios autores postulan que el músculo esquelético importa GSH desde el plasma durante el ejercicio físico, a la vez que se produce su oxidación a GSSG (Pyke y cols., 1986; Ji y cols., 1992; Leeuwenburgh y Ji, 1995). Este aumento en los niveles de GSSG puede ser resultado de la incapacidad de la glutatión reductasa de reducir el disulfuro para generar de nuevo GSH. El hígado es el órgano que sintetiza el 90% del GSH circulatorio, como hemos dicho anteriormente, y lo exporta a la circulación sanguínea, para que éste sea captado por órganos más activos durante el ejercicio como son el corazón y los músculos. Lew y cols. (1985) fueron los primeros en pensar que durante el ejercicio físico el hígado puede exportar grandes cantidad de GSH, que podría ser captado por el músculo esquelético. Este hecho se confirmó por otros investigadores años más tarde (Ji y cols., 1992; Leeuwenburgh y Ji, 1995).

Cuando se realiza un ejercicio físico intenso se produce un estrés oxidativo, por lo tanto, los músculos que trabajan durante el ejercicio necesitan mayor cantidad de GSH para vencer el estrés oxidativo producido. En nuestros experimentos no observamos un incremento de los niveles de GSH muscular después del ejercicio realizado por las ratas. Esto puede ser debido bien a un agotamiento de las reservas hepáticas de glutatión reducido durante el ejercicio, es decir, el consumo de GSH supere su síntesis, o bien, debido a que la utilización de GSH por parte del músculo, oxidándose para neutralizar los radicales libres producidos, exceda la captación desde el plasma (Sen y cols., 1992; Duarte y cols., 1993)

3.3. Efecto de la administración de alopurinol sobre la oxidación de proteínas en músculo gastrocnemio de ratas tras la realización de un ejercicio físico agotador.

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, sobre todo por el radical hidroxilo (Stadtman y cols., 1992). Sin embargo, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los que más procesos oxidativos sufren (Davies, 1987). Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína y, por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica (Climent y cols., 1989), de la afinidad de los factores de transcripción por el DNA (Pognonec y cols., 1992) y de su susceptibilidad para la proteólisis (Stadtman, 1992). En condiciones anaeróbicas, los radicales libres promueven un entrecruzamiento considerable entre proteínas, mientras que en presencia de oxígeno los radicales libres provocan una gran fragmentación de la cadena peptídica (Stadtman, 1992).

La modificación oxidativa de proteínas por ERO ocurre en situaciones tanto fisiológicas como patológicas. Como consecuencia de dicha modificación, se introducen grupos carbonilo en las proteínas por un mecanismo específico. Los aminoácidos lisina, prolina y arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas (Stadtman y cols., 1992). Otros aminoácidos como histidina, cisteína y metionina, también sufren daño oxidativo, pero no forman derivados de tipo carbonilo (Stadtman y cols., 1992). El daño oxidativo suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína (Dean y cols., 1993).

Varios grupos de investigación han utilizado la oxidación de proteínas como marcador de estrés oxidativo en músculo, tanto en entrenamiento como durante la realización de un ejercicio físico agotador (Radak y cols., 1998; Jiankang y cols., 2000; Radak y cols., 2000; Radak y cols., 2002). El músculo esquelético es uno de los tejidos con mayor masa del cuerpo, está formado por células postmitóticas por lo que presenta una mayor tendencia a acumular daño oxidativo (Radak y cols., 2001). El entrenamiento, tiene capacidad de reducir la vulnerabilidad al estrés oxidativo. Este hecho es importante ya que las proteínas modificadas por estrés oxidativo pierden su función fisiológica y presentan una mayor tendencia a la degradación. La acumulación de estas proteínas puede condicionar procesos

fisiológicos vitales. El entrenamiento tiende a aumentar la actividad del proteasoma lo que sugiere que la degradación de las proteínas modificadas oxidativamente es más efectiva en los músculos de ratas entrenadas (Radak y cols., 1999). Esta es una respuesta adaptativa importante ya que la inducción de un mecanismo de reparación, el proteasoma se considera una enzima reparadora (Grune y cols., 1997), puede suponer una disminución en la acumulación de proteínas potencialmente dañinas modificadas postranscripcionalmente (Goto y cols., 2001). Sin embargo como hemos comentado anteriormente, el ejercicio físico agotador induce una modificación oxidativa en las proteínas, acompañada por la generación de derivados carbonilo reactivos que pueden reaccionar con la dinotrofenilhidracina (DNPH) para formar derivados hidrazona (Oliver y cols., 1990; Nakamura y Goto, 1996). El primer estudio en el que se demostró un aumento en músculo esquelético de las concentraciones de derivados carbonilo en proteínas como consecuencia de la realización de contracciones concéntricas se publicó en 1994 (Saxton y cols., 1994).

Una serie de trabajos posteriores señalaron hacia los radicales libres generados durante contracciones musculares intensas, como moduladores de la función contráctil de los músculos respiratorios y destacaron su función en el desarrollo de la fatiga. Los datos que apoyaron estos estudios mostraron: (a) evidencias indirectas de un aumento en la producción de radicales libres por los músculos en contracción (lipoperoxidación, formación de grupos carbonilo en proteínas y oxidación del glutatión), (b) evidencias de que la depleción farmacológica de las defensas antioxidantes aumenta el grado de fatiga muscular tras un periodo de ejercicio físico, y (c) evidencias de que la administración de agentes antioxidantes retardan el desarrollo de la fatiga (Supinski y cols., 1998).

En la presente tesis determinamos la oxidación de proteínas en músculo de rata utilizando la técnica del western blot. Con esta técnica detectamos los derivados carbonilo formados durante el ejercicio por su reacción con 2,4-dinitrofenilhidracina para formar derivados hidrazona (Oliver y cols., 1990; Nakamura y Goto, 1996).

Nuestros resultados sugieren que el ejercicio induce un estrés oxidativo que no puede ser prevenido por las defensas antioxidantes del músculo gastrocnemio (Ver Figura V.5.).

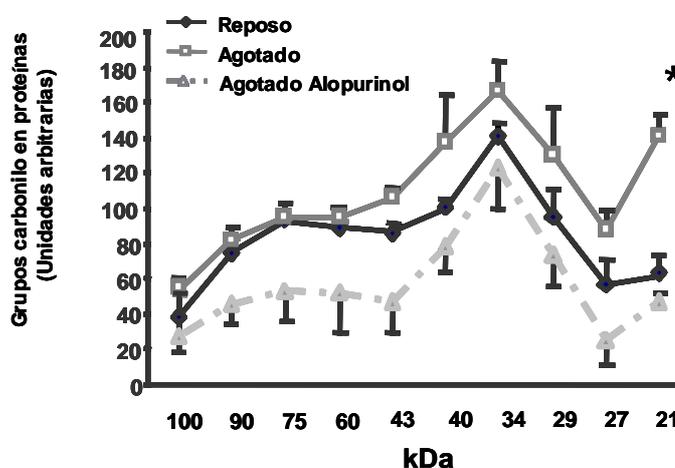
Como hemos explicado en los apartados anteriores de la discusión, bajo nuestras condiciones experimentales, la XO formada por la insuficiente

disponibilidad de oxígeno en los músculos durante el ejercicio consideramos que es la responsable del daño causado y del aumento en la XO circulante.

Las señales de oxidación proteica que encontramos fueron especialmente visibles en proteínas con pesos moleculares de 40 y 34 kDa, aunque la diferencia entre los 3 grupos experimentales se evidenció en las proteínas con un peso molecular de 21 kDa. Esto indica que algunas proteínas son más sensibles a la formación de derivados carbonilo, bajo nuestras condiciones experimentales, que otras. También sugiere que cierta forma de daño oxidativo tiene lugar selectivamente. Este hecho puede tener sus consecuencias fisiológicas, si se considera que el daño oxidativo debe ser el primer paso en la respuesta adaptativa al ejercicio (Davies y cols., 1982; Rajguru y cols., 1994). La identificación de las proteínas oxidadas en músculo requeriría más investigación. Sin embargo, una posible candidata podría ser la anhidrasa carbónica, enzima con un peso molecular de 31 kDa y muy sensible a la formación de derivados carbonilo (Radak y cols., 1998).

Las modificaciones oxidativas de las proteínas pueden activar la proteólisis y acelerar el recambio proteico (Stadtman, 1992). Diversos autores han sugerido que las proteínas renovadas son capaces de mostrar una mayor funcionalidad desde un punto de vista fisiológico (Radak y cols., 2000). Por lo tanto, la modificación oxidativa a la que se ven sometidas las proteínas durante el ejercicio agotador, hasta cierto punto, puede constituir una señal de respuesta adaptativa.

Figura V.5. Densitometría del Western Blot de proteínas oxidadas en músculo gastrocnemio de ratas sometidas a un protocolo de ejercicio físico agotador.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar ($n=3$). La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente a grupo reposo.

4.- Estudio de la activación de NF- κ B y su efecto sobre la expresión de la Mn-SOD, iNOS y eNOS tras la realización de un ejercicio físico agotador en músculo de rata.

Los datos presentados hasta ahora muestran que el ejercicio físico agotador puede aumentar la generación de ERO en distintos tejidos biológicos tanto en humanos como en animales de experimentación. Estos datos coinciden con los publicados por varios grupos de investigación (Davies y cols., 1982; Jackson y cols., 1985; Reid y cols., 1992; Bejma y cols., 2000). Nuestros resultados, además, subrayan el papel de la xantina oxidasa como fuente importante de radicales libres durante el ejercicio físico agotador.

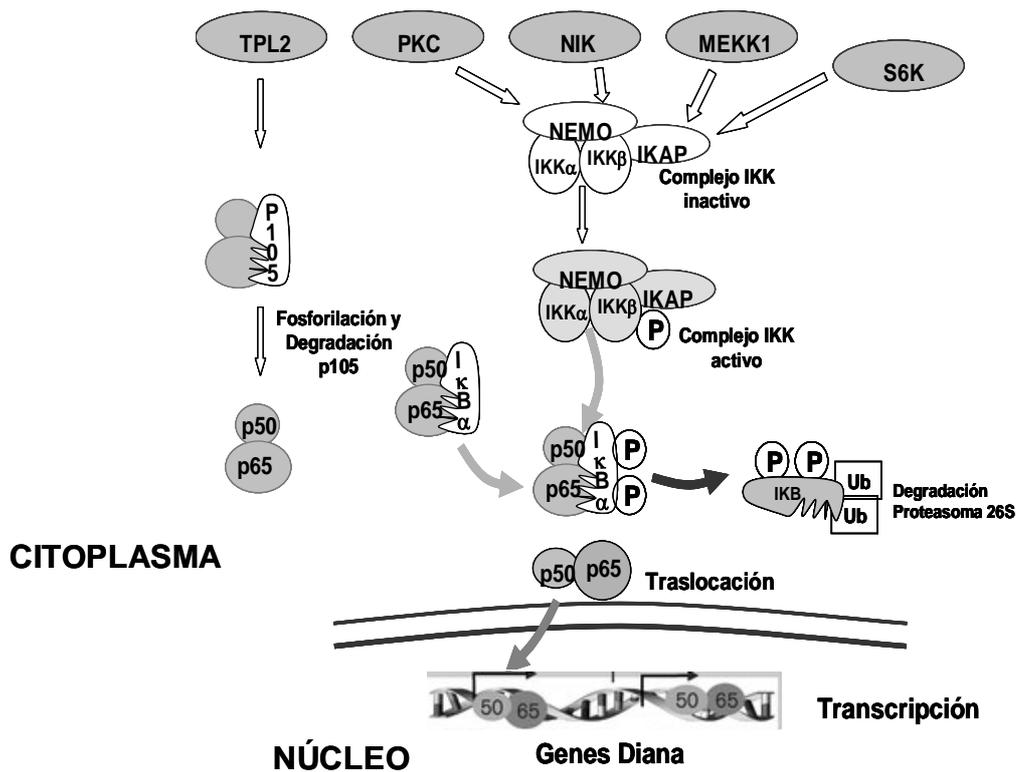
En los mamíferos existen diversas vías de señalización celular sensibles a estrés oxidativo. Éstas vías juegan un papel fundamental en el mantenimiento del balance entre agentes oxidantes y antioxidantes (Finkel y Holbrook, 2000). Entre las vías de señalización más relevantes se encuentran: NF- κ B, MAPK, fosfoinositol 3-quinasa (PI₃K)/Akt, la activación de p53, y la respuesta de las proteínas de choque térmico (HSP). Las dos primeras han sido objeto de estudio en la presente tesis, ya que ambas se pueden considerar dos de las vías de señalización más importantes que pueden ser activadas por ERO (Baeuerle y Baltimore, 1988; Schreck y cols., 1992; Aronson y cols., 1997).

El factor de transcripción NF- κ B está compuesto por miembros de la familia Rel. En mamíferos estas proteínas incluyen: (NF- κ B 1), p65 (RelA), p52 (NF- κ B2), RelB, c-Rel, p105, and p100 (Miyamoto and Verma, 1995; Baldwin, 1996). NF- κ B se encuentra presente en el citoplasma en un estado inactivo, unido a las proteínas inhibitoras I κ B. El factor nuclear se puede activar por una gran cantidad de estímulos tales como: H₂O₂, citoquinas pro-inflamatorias [TNF- α], interleuquinas [IL-1, IL-6 y LPS. En el proceso se produce la fosforilación de I κ B α (en las Ser-32 y Ser-36) e I κ B β (en las Ser-19 y Ser-23) por la I κ B kinasa (IKK). La fosforilación por IKK, dispone a I κ B para la ubiquitinación y posterior degradación proteolítica por el proteasoma 26S (Zamanian-Daryoush y cols., 2000).

Las protein kinasas activas: C (PKC ζ) y PKR se sabe que están involucradas en la activación de IKK (Cheshire y cols., 1999; Flohé y cols., 1997). Recientemente se ha demostrado que la kinasa de ERK (MEKK1) es requerida para la activación de IKK β (Regula y cols., 2002).

La fosforilación de $I\kappa B\alpha$ es el estímulo que facilita la disociación y la traslación al núcleo del complejo activo de NF- κ B (P50/P65), que se une a la secuencia de ADN correspondiente en los distintos genes diana, entre los que se incluye la MnSOD, GCS, GPx e iNOS entre muchos otros (Baeuerle y Henkel, 1994). (Ver Figura V.6.).

Figura V.6. Mecanismos de regulación de la activación de NF- κ B.



Como paso inicial en el proceso descrito, uno de los objetivos de la presente tesis fue demostrar que la realización de un ejercicio físico agotador podía activar la vía de señalización de NF- κ B a la vez que comprobar el papel que la xantina oxidasa desempeña en todo el proceso.

Como se deduce de nuestros resultados, la actividad contráctil activa la vía de señalización de NF- κ B en músculo esquelético de rata. En este trabajo describimos y comprobamos, por primera vez, que la activación de NF- κ B está

acompañada por una cascada de procesos en el músculo ejercitado, entre los que se incluye:

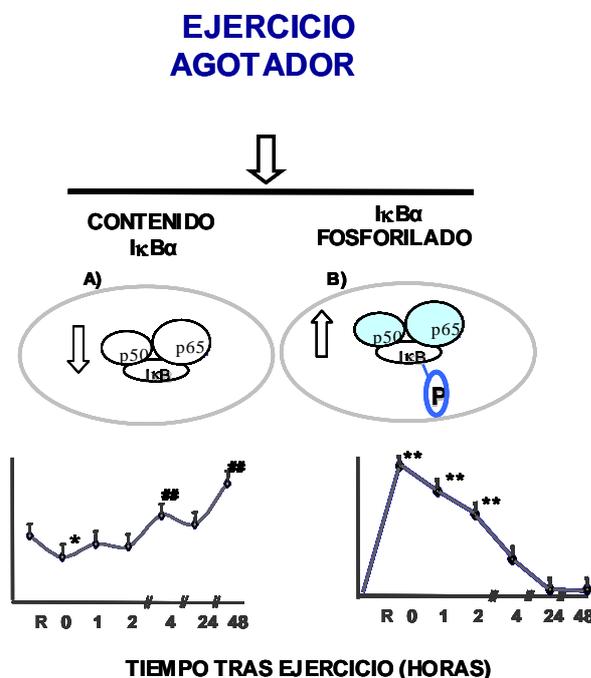
- a) Incremento en la fosforilación de IKK α y β e I κ B α (Ver Figuras V.7. y V.8.)
- b) Descenso en los niveles citosólicos de IKK α e I κ B α (Ver Figuras V.7. y V.8.)
- c) Aumento en el contenido nuclear de NF- κ B y de la subunidad P65 por dos técnicas diferentes: ensayo de retardo, en el primer caso y western blot en el segundo (Ver Figura V.9.).

Además nuestros datos muestran una elevación en los niveles de p-I κ B α y de p-IKK α y β inmediatamente después del ejercicio, mientras que NF- κ B alcanza su pico de activación transcurridas 2 horas desde la finalización del mismo (Ver Figura V.9.).

Estos resultados, en relación a la secuencia de acontecimientos, demuestran que la fosforilación de IKK α e I κ B α tienen lugar durante la contracción muscular, seguidas por una traslocación de P65 y la unión a la secuencia de NF- κ B en el núcleo. Es interesante señalar que el contenido citosólico de I κ B α se eleva inmediatamente después del descenso inicial (0 horas) y muestra unos niveles 3 y 5 veces mayores a los del reposo transcurridas 24 y 48 horas, respectivamente. (Ver Figura V.7.)

Estos cambios reflejan, probablemente, el conocido sistema de feedback negativo de control. I κ B α es un potente secuestrador del dímero P50/P65 a la vez que un gen diana de NF- κ B. Los elevados niveles de I κ B α inhiben la activación de NF- κ B previniendo la sobreexpresión de sus genes diana (Schreck y cols., 1992).

Figura V.7. Esquema de la secuencia temporal de fosforilación de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos.



El ejercicio físico puede activar una gran variedad de fenómenos con potencial para influir sobre la vía de NF- κ B. Durante las contracciones musculares la producción de O_2^{\bullet} y H_2O_2 , como hemos ido demostrando a lo largo de la tesis, se ve incrementada. El H_2O_2 puede activar IKK, lo que explicaría el incremento en la fosforilación de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ en nuestro estudio (Flohé y cols., 1997). Esta hipótesis se confirma con los datos obtenidos en referencia a la activación de $\text{IKK}\alpha$ e $\text{IKK}\beta$ en el músculo agotado (Ver Figura V.8.). Regula y cols. (2002) demostraron que en los miocitos ventriculares $\text{IKK}\beta$ era la proteína primaria que activaba la vía de NF- κ B debido a la fosforilación de la Ser-181 por MEKK-1. Como el ejercicio agotador aumenta la actividad Raf-1/MEKK en músculo humano (Regula y cols., 2002), pensamos que este puede ser el mecanismo activado en nuestro modelo experimental. Sin embargo, IKK puede ser activada por otras quinasas como PKR y $\text{PKC}\zeta$, en función del tipo celular (Cheshire y cols., 1999; Flohé y cols., 1997). La Kinasa Inducible de NF- κ B también se ha demostrado que fosforila y active IKK (Su y cols., 1997). La vía predominante responsable de la inducción, por el ejercicio, de la activación de IKK en músculo esquelético, todavía permanece sin identificar.

Figura V.8. Esquema de la secuencia temporal de fosforilación de IKK α y β en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos.

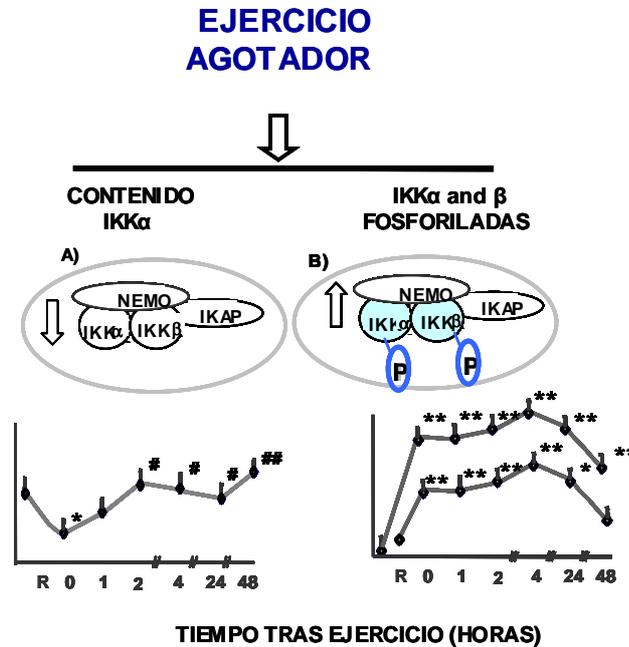
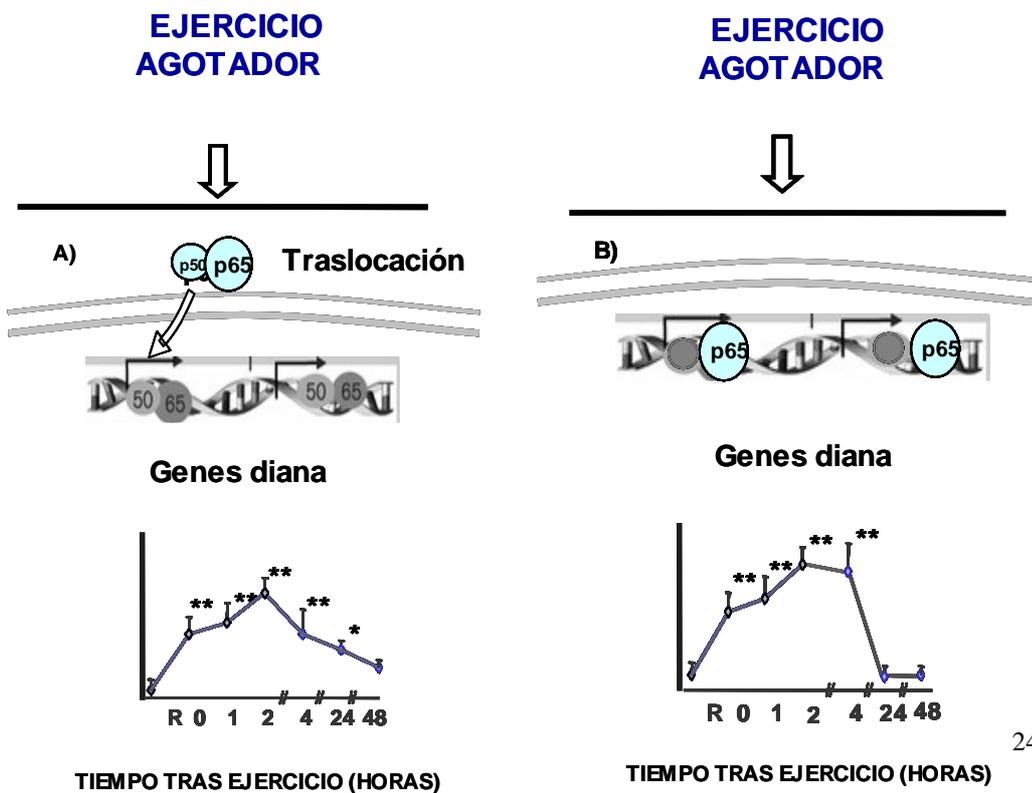
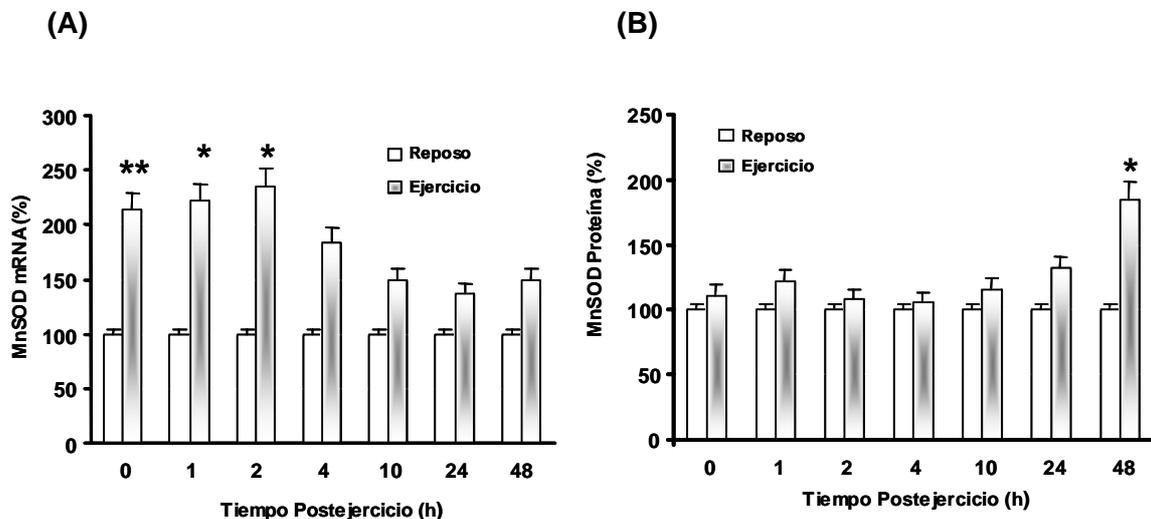


Figura V.9. Esquema de la secuencia temporal de activación de NF- κ B por ensayo de retardo (A) y por Western Blot NF- κ B (p65) (B) en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos.



El papel fisiológico y la importancia de la activación de la vía de NF-κB en el músculo en contracción todavía se desconoce. Nosotros hipotetizamos que la cascada de señalización tiene como objetivo la expresión de genes cuya transcripción puede ser rápidamente activada para frenar el aumento en la producción de ERO, como son: MnSOD, Óxido Nítrico Sintetas y GCS. Todos ellos contienen secuencias de unión en la región del promotor para NF-κB (Allen y Tresini, 2000; Ji, 2002). El estrés oxidativo se ha demostrado que aumenta la expresión del gen de la MnSOD (Ho y cols., 1991; Zhang, 1996). En nuestros resultados observamos un incremento en los niveles de MnSOD mRNA asociados al aumento en la activación de NF-κB, en músculo de rata tras realizar un ejercicio físico agotador en tapiz rodante, seguido de un aumento en la cantidad de proteína MnSOD a las 48 horas (Ver Figura V.10.).

Figura V.10. Porcentaje de aumento de RNAm (A) y contenido proteico de MnSOD en músculo vasto interno de ratas ejercitadas hasta el agotamiento y sacrificadas a distintos tiempos.



Porcentaje de aumento de ARNm Mn SOD en VIFP. Cada valor representa la media \pm desviación estándar (n=6). La abundancia de RNAm fue normalizada con el valor del 18S de la misma muestra como referencia. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente a grupo reposo (**) $p < 0.01$ frente a grupo reposo.

Porcentaje de aumento del contenido proteico de Mn SOD en VIFP. Cada valor representa la media \pm desviación estándar (n=6). La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente a grupo reposo.

VIFP: Vasto Interno Fibras Profundas (Tipo IIa).

Estos datos contradicen los publicados por Oh-ishi y cols. (1997) que no encontraron cambios en los niveles de RNA en sóleo, inmediatamente después de un ejercicio agotador. Sin embargo son coincidentes con los publicados por otros grupos más recientemente (Hollander y cols., 2001). El aumento en el contenido de los niveles de proteína a las 48 horas tras el ejercicio es un resultado que reproduce los referenciados en distintos tipos musculares: gastrocnemio, vasto lateral y sóleo (Oh-ishi y cols. 1997). Este hecho sugiere que la sobreexpresión de la MnSOD requiere una estimulación acumulada y sostenida de las vías redox-sensibles que conducen a su activación, lo que sucede en el proceso de entrenamiento. Oh-ishi y cols. (1997), Gore y cols., (1998) y Hollander y cols., (1999) muestran como el contenido de MnSOD y su actividad en músculo vasto interno profundo aumenta significativamente en respuesta al entrenamiento de resistencia en ratas. Algunos autores consideran que el ambiente intracelular en los músculos entrenados es más protector frente a la degradación rápida del ARN de la MnSOD tras la activación transcripcional, y por tanto, más propicio para la síntesis de proteínas (Hollander y cols., 2001).

Esta enzima antioxidante y su inducción por NF- κ B puede ser especialmente importante en tejidos como el músculo esquelético y el miocardio, por su baja capacidad antioxidante intrínseca. Se requiere una importante actividad de la MnSOD para proteger a la mitocondria de los efectos citotóxicos del \bullet OH formado durante la reacción de Haber-Weiss, responsable del daño oxidativo a lípidos, aminoácidos, ADNmt y enzimas (Williams y cols., 1998).

El hecho de que el ejercicio físico genera señales que son importantes en la fisiología de la célula muscular se ha sospechado desde hace años, pero fue en 1996 cuando Goodyear y cols. mostraron que la contracción muscular aumentaba la fosforilación de ERK 1 y ERK 2. Hayashi y cols. (1999) lo confirmaron y recientemente lo han hecho Yu y cols. (2003). Del mismo modo Reid (2001) demostró que las ERO y el NO son continuamente generados por el músculo de sujetos sanos y que estas moléculas modulan procesos como el desarrollo, metabolismo, flujo sanguíneo y función contráctil.

En la mayoría de los casos los autores han especulado acerca del papel que las ERO pueden tener como señales mediadores de la respuesta adaptativa muscular al ejercicio. (Essig y Nosek, 1997; Jackson, 1999). Sin embargo, se han aportado pocas evidencias experimentales al respecto.

Nosotros demostramos en la presente tesis, a nuestro entender por primera vez, que las ERO formadas durante el ejercicio, tanto en modelos animales como humanos, generan señales que son claves en la fisiología de la célula muscular y en sus adaptaciones. De hecho la inhibición de la formación de ERO, con el tratamiento con alopurinol, previene la activación en músculo de:

- a) La fosforilación de $p38^{MAPK}$ y $ERK\ 1/2^{MAPK}$ inducidos por el ejercicio físico agotador (Ver Figura V.11. y V.12.).
- b) La unión al ADN del Factor Nuclear κB , inducida por el ejercicio físico (Ver Figura V.13.)
- c) La expresión los genes tales como: MnSOD, iNOS y eNOS, inducidos por un ejercicio agotador. (Ver Figura V.14.)

Figura V.11. Fosforilación de $p38^{MAPK}$ inducida por el ejercicio físico en músculo gastrocnemio de rata. Efecto de la administración de alopurinol.

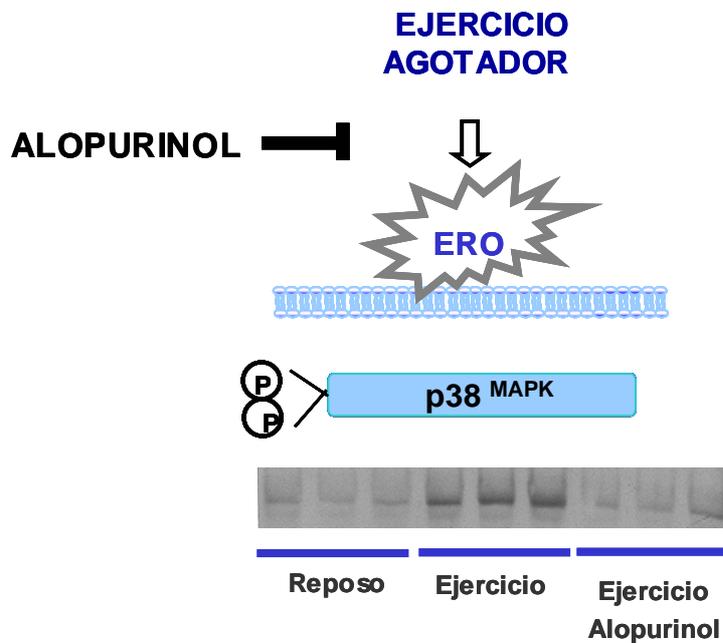


Figura V.12. Fosforilación de ERK 1/ 2^{MAPK} inducida por el ejercicio físico en músculo gastrocnemio de rata. Efecto de la administración de alopurinol.

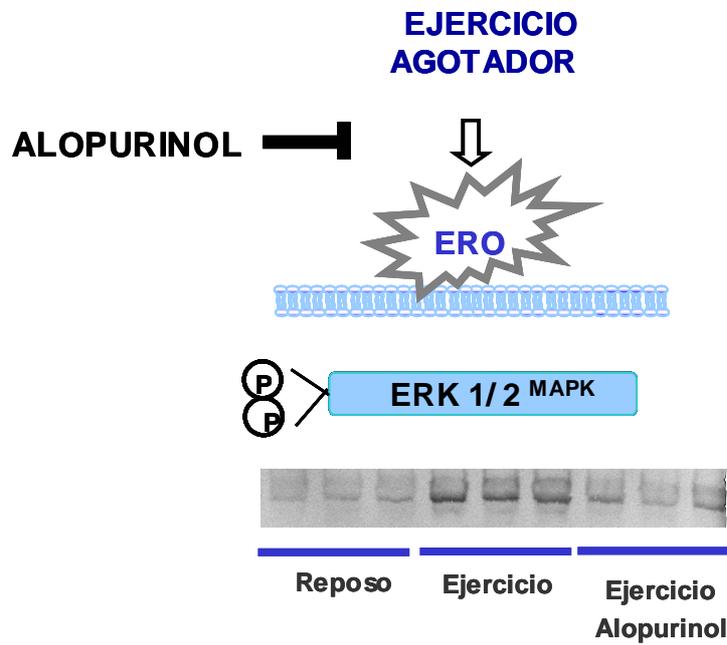


Figura V.13. Activación de NF-κB inducida por el ejercicio físico en músculo gastrocnemio de rata. Efecto de la administración de alopurinol.

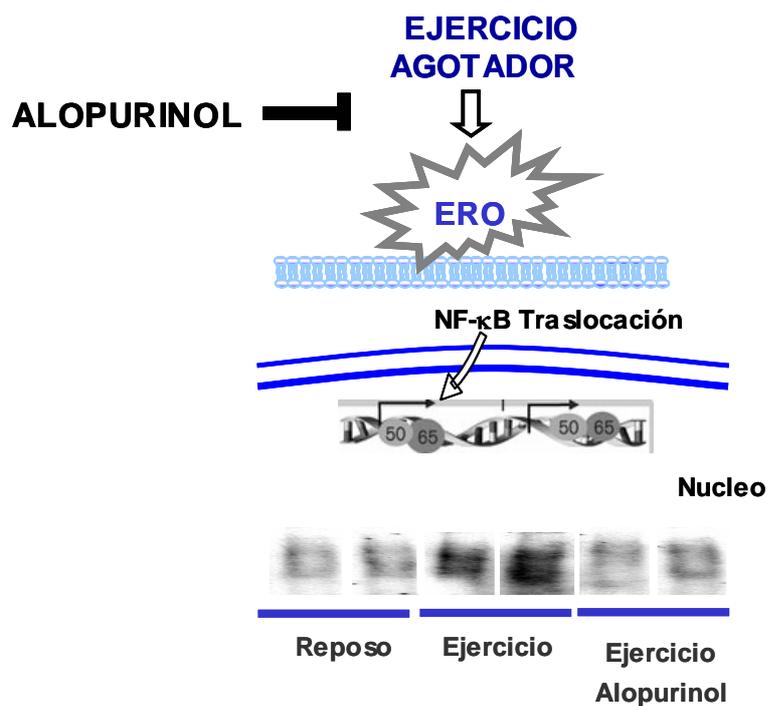
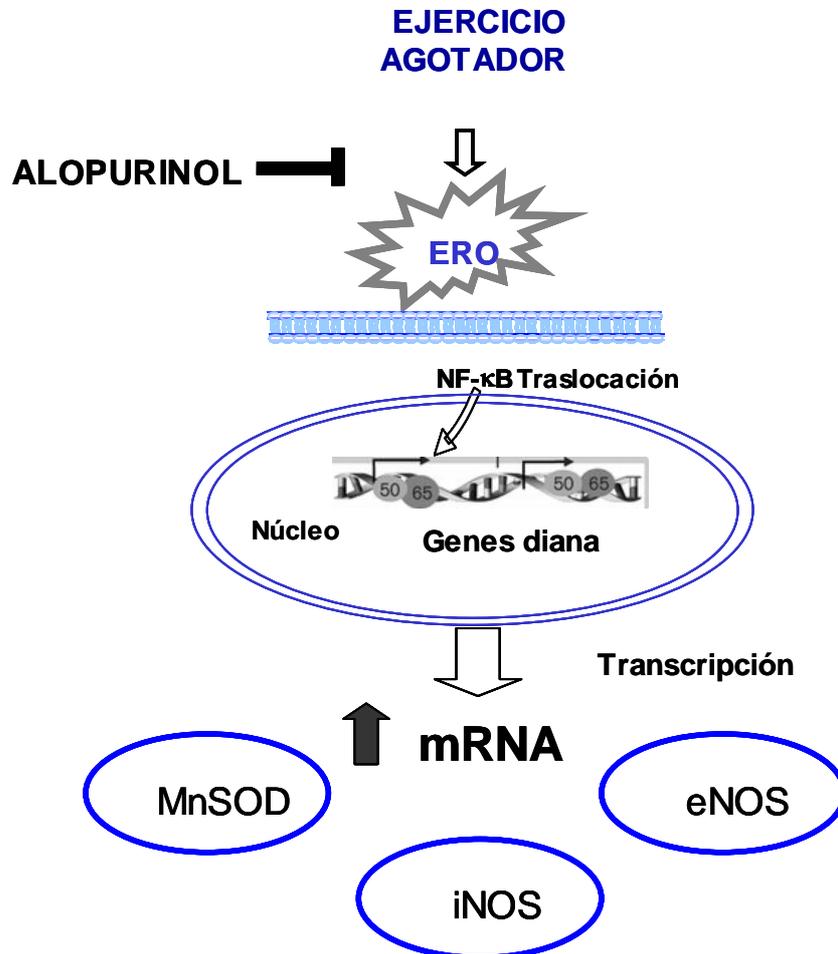


Figura V.14. Expresión de MnSOD, iNOS y eNOS, en músculo gastrocnemio de rata, inducida por el ejercicio agotador. Efecto de la administración de alopurinol.



El papel que juegan las isoformas de la NOS en las adaptaciones al ejercicio ha sido muy estudiado. La isoforma eNOS está relacionada con el desarrollo muscular, el tono vascular y especialmente la función mitocondrial. Esta isoforma se encuentra tanto en la matriz como en la membrana mitocondrial (Bates y cols., 1996). La liberación de NO^{\bullet} por eNOS mejora el flujo sanguíneo y han sido varios los trabajos en los que se han encontrado evidencias de que el NO^{\bullet} regula la respiración mitocondrial por interacciones con la citocromo-c-oxidasa y el complejo I de la cadena de transporte electrónico (Clementi y cols., 1999). Las fibras musculares expresan de forma constitutiva nNOS, eNOS o ambas. En procesos

inflamatorios se puede estimular la tercera isoforma, la iNOS cuya capacidad para producir NO es mucho más elevada que la de las isoformas constitutivas.

La importancia del NO[•] en el ejercicio físico se ha estudiado administrando el inhibidor de la NOS, N^ω-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME). En el 2001 Wang y cols. observaron, al administrar L-NAME de forma crónica a un grupo de ratas, que éstas presentaron una marcada reducción en la velocidad de la marcha en un tapiz rodante, de la sección transversal de sus fibras musculares y de su masa muscular. Con todos estos datos el grupo apuntó hacia un papel del NO[•] en las adaptaciones al ejercicio físico del tejido muscular. Smith y cols. un año más tarde (2002) siguiendo la misma línea, estudiaron el papel del NO[•] en la hipertrofia muscular inducida por la sobrecarga de un grupo muscular al eliminar sus sinergistas. El bloqueo con L-NAME inhibió el efecto de la sobrecarga en la expresión de la cadena pesada de la miosina en el músculo plantar. Los resultados de estos trabajos junto con los previos de Tidball y cols. (1998) demuestran el papel de la NOS como transductor de señales que ejerce un control sobre los genes del tejido muscular y confirman el papel del NO[•] en la señalización durante el proceso de hipertrofia.

El inhibidor L-NAME, también ha sido utilizado en humanos. En un estudio de Bradley y cols. (1999) concluyeron la importancia del NO[•] en la regulación de la captación de glucosa por el músculo esquelético, utilizando como modelo humanos durante la realización de un ejercicio físico dinámico. El descubrimiento de que las expresiones de las NOS aumentan en músculo tras entrenamiento de resistencia en ratas (Balon y Nadler, 1997) y de que la actividad NOS está reducida en las ratas resistentes a la insulina, sugiere que la actividad física puede tener un papel en la regulación de la actividad NOS y contribuir al metabolismo muscular.

En otros estudios la inhibición se ha centrado en una isoforma concreta de la NOS. Este es el caso del trabajo publicado en el 2002 por Momken y cols. Este grupo estudió el papel de eNOS utilizando como modelo ratones carentes del gen. El resultado más interesante, obtenido en este trabajo, es el descenso marcado en la respiración mitocondrial que ocurre en el músculo. La caída en un 40% en la actividad citrato sintasa, sugiere una disminución en la población mitocondrial en los ratones “knockout” de eNOS (Momken y cols., 2002).

Por otra parte los datos indican además que la administración crónica de L-NAME en las ratas, aumenta de forma significativa los niveles de MDA, grupos carbonilo y actividad xantina oxidasa, lo que indica un aumento de la peroxidación

lipídica, oxidación proteica y producción de radical superóxido debido a la inhibición crónica de la NOS (Vila-Petroff y cols., 1999).

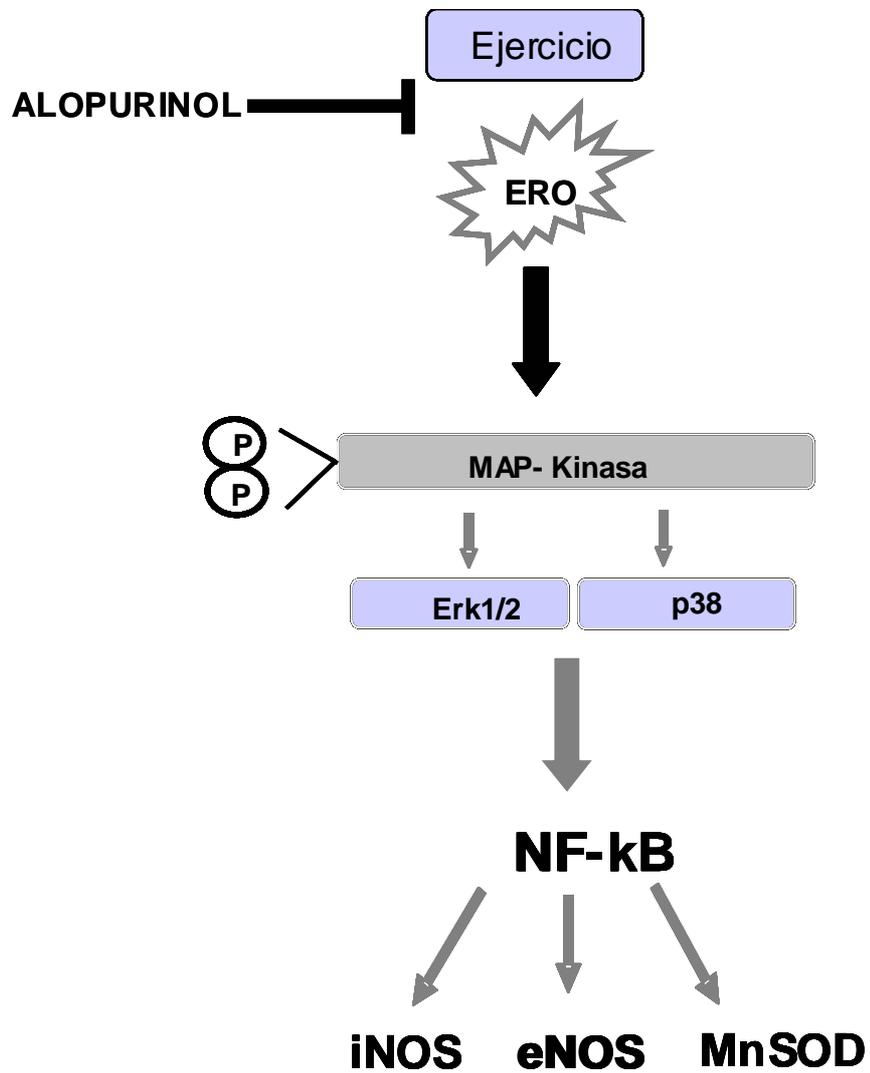
El estrés oxidativo generado en el sistema cardiovascular por la activación de la xantina oxidasa supone un desbalance en la vía de señalización tanto del NO[•] como de otras vías intracelulares (Lounsbury y cols., 2000) lo que conlleva una respuesta hipertensiva y un aumento en la contracción (Yang y cols., 1998). La administración crónica de L-NAME supuso un descenso significativo del ratio GSH/GSSG, por una depleción de los niveles de GSH y un aumento de los de GSSG en músculo cardíaco. Este mismo efecto a nivel sanguíneo ha mostrado ser un buen marcador de hipertensión (Husain y Hazelrigg, 2002). Es importante destacar el hecho de que la depleción del GSH utilizando BSO en ratas supone un aumento de la presión arterial (Vaziri y cols., 2000). La administración crónica de L-NAME también provocó una disminución significativa de las defensas antioxidantes cardíacas y la expresión de proteínas en ratas (Husain y Hazelrigg, 2002)

En resumen, los resultados de la presente tesis muestran que las ERO producidas durante el ejercicio físico actúan como señales que regulan procesos moleculares importantes para las adaptaciones de las células musculares al ejercicio físico. Por tanto la prevención del estrés oxidativo asociado al ejercicio físico, con la administración de antioxidantes orales, consideramos que podría llegar a ser contraproducente al condicionar la respuesta adaptativa al ejercicio.

La tan extendida prescripción del uso de suplementos antioxidantes entre los deportistas, debe ser, por tanto, cuestionada. Los antioxidantes orales, aunque recomendables antes de la competición deportiva, cuando el ejercicio se espera sea realizado hasta el agotamiento, puede no ser tan apropiada durante los periodos de entrenamiento.

En la Figura V.15. representamos de forma esquemática el papel de las ERO en la regulación de la función celular en el ejercicio.

Figura V.15. Regulación de la función celular por el ejercicio físico. Efecto de la administración de alopurinol.



VI. SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

1.- Ischaemia-reperfusion induced blood oxidative stress in human and rat models.

1.1. Results in animal model: Wistar rats.

A conventional view has attributed ischaemia-reperfusion injuries to the lack of blood flow *per se*, but a growing body of experimental data indicates the involvement of free radical-mediated injury caused by oxygen free radicals such as superoxide, hydroxyl radicals and hydrogen peroxide which are generated at the time of reperfusion.

This mechanism was first identified and characterised in a model of vascular occlusion in the cat small intestine (McCord, 1985), but similar mechanisms have been described in heart (Onodera and Ashraf, 1991; Leichtweiss *et al.*, 1996); brain (Frantseva *et al.*, 1999); kidney (Toosy *et al.*, 1999); skeletal muscle (Prem *et al.*, 1999) and lung (Messent *et al.*, 1993).

Research to elucidate the role of oxygen free radicals in ischaemia-reperfusion injury has been carried out in both human and animal models. In animal models tourniquet and microvessel clips to occlude blood flow in lower limbs have been used (Bushell *et al.*, 1996; McArdle *et al.*, 1999)

In our model we used an hypobaric chamber to submit a group of young rats to 3 days of hypoxia (8% O₂) and reoxygenation (normoxia) at different times. To determine the oxidative stress associated to the ischaemia-reperfusion process the glutathione status was studied. GSH is an ubiquitous endogenous antioxidant. Free radicals can be reduced by GSH, mainly through the conversion of GSH into GSSG by the selenium-containing enzyme glutathione peroxidase (Meister and Anderson, 1983). In our experiments we determined GSSG levels using the method of Asensi *et al.* (1994) and GSH using the method of Reed *et al.* (1980).

Our GSH and GSSG blood levels in the rested group of rats are in accordance with the literature (Lew *et al.*, 1985; Duthie *et al.*, 1990; Sastre *et al.*, 1992; Viña *et al.*, 1995; Viña *et al.*, 2000). Hypoxia during 3 days in our model did not cause any change in the blood glutathione levels. However GSH levels

decreased significantly (125%) after reoxygenation during 1 hour of the hypoxic group. In several papers a decrease in the glutathione levels in different situations of oxidative stress (like physical exercise) have been reported (Davies *et al.*, 1982; Ji and Fu 1992; Viña *et al.*, 1995; Viña *et al.*, 2000; Viña *et al.*, 2000).

The decrease in GSH levels may be due to an inhibition of GSH synthesis attributable to stress (Sastre *et al.*, 1992). α -adrenergic stimulation and its role in GSH synthesis have been well studied. Estrela *et al.* (1988) published that adrenergic stimulation plays a role in the decrease of the glutathione synthesis in isolated hepatocytes. Hepatic GSH export to the plasma is stimulated by glucagon, catecholamines and vasopressin, the levels of which are elevated in stress situations (Lu *et al.* 1990). Moreover GSH is used by GSH peroxidase as a substrate and oxidized to glutathione disulfide (GSSG) by hydroperoxides, the levels of which are also increased during stressful conditions. Furthermore, hepatic *de novo* GSH synthesis is limited by GCS activity and influenced by cysteine and ATP availability (Deneke and Fanburg 1989; Meister and Anderson 1983; Tateishi *et al.* 1977)

All of these results consider that the decrease in cellular GSH levels observed under conditions of shock, stress, or peripheral inflammation can be explained by a dual effect, i.e., an increase in glutathione efflux and an inhibition of its synthesis.

Hypoxia induces an overall sympathetic stimulation that is reflected in elevated plasma and urine catecholamine concentrations. This process produces subsequent cardiovascular adaptations to offset a global decrease in tissue oxygen supply (Maher *et al.*, 1975; León-Velarde *et al.*, 2001).

Several papers have been published about the relationship between hypoxia and oxidative stress. Hitka *et al.* (2003) showed that exposure to 72 hours of hypoxia increased, significantly, the H_2O_2 production changed three fold during transition from hypoxia to normoxia. Yoshikawa *et al.* (1982) and Nakanishi *et al.* (1995) found an increase in free oxygen radicals in rats under hypoxic conditions. Morin *et al.* (2003) observed that during reoxygenation, in brain, mitochondrial membrane lipoperoxidation quickly increased and was proportional to the decrease seen in membrane fluidity. Under the same conditions, cytochrome c was released from mitochondria and their rate of release increased with reoxygenation time. Addition of the antioxidant alpha-tocopherol abolished all these reoxygenation-induced changes. The same results have been found in endothelial cells in cultures. Cells undergo significant intracellular oxidative stress following reoxygenation, and their viability is critically dependent on GSH levels (Samarasinghe *et al.*, 2000).

GSH depletion during hypoxia-reoxygenation, like in exercise, might be due to inhibition of GSH synthesis, for instance, as a result of adrenergic stimulation.

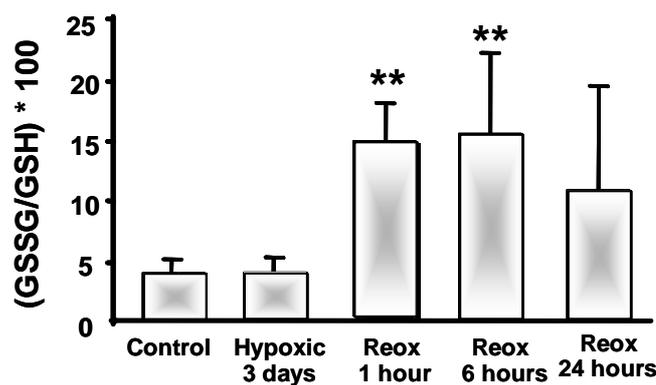
On the other hand our results show that the GSSG levels were 202 % higher after reoxygenation for 1 hour and 271% higher after reoxygenation for 6 hours in the hypoxic group. The difference was not statistically significant in the reoxygenated group for 24 hours although GSSG blood levels remained higher than rested and hypoxic groups.

When GSSG accumulates intracellularly, cells export GSSG (Sies and Akerboom, 1984). Therefore, blood reflects the glutathione status of less-accessible tissues such as skeletal muscle (Reed, 1990). Increased levels of GSSG or increased GSSG-to-GSH ratio in blood can be considered as signs of oxidative stress (Viña *et al.*, 1989).

Blood GSSG-to-GSH ratio in our model, as Figure VI.1. shows, increased 374% 1 hour after the reoxygenation, and 400% 6 hours after reoxygenation of the hypoxic group.

In cardiac muscle similar results have been showed (Park *et al.*, 1991). The release of LDH, mixed disulfides, TBARS and protein carbonyl content increased significantly with hypoxic medium and was slightly enhanced upon reoxygenation after 60 min hypoxia.

Figure VI.1. Blood (GSSG/GSH) x100 ratio in rats after ischaemia-reperfusion process.



Values are means ± SD (n=6-8). Significantly different () p< 0.01 vs hypoxic group.**

1.2. Results in humans: Alpinists who took part in the expedition to the Gasherbrum II (GII), Himalaya, 8034 meters.

In the previous section we have shown the results obtained after using a hypobaric chamber as a model to study the ischaemia-reperfusion process. In humans this type of experiment has been performed during surgery and in disease. The studies have focused on the effects of the duration of ischaemia and reperfusion, assessment of damage and its reversibility, measurement of free radical production and its sources, remote organ injury, prevention and treatment. In our experimental model mountaineers climbed to great heights (8034 m).

The arterial partial oxygen pressure (PO_2) at sea level is 94 mmHg and the tissue PO_2 is around 20 mmHg. The difference, the O_2 gradient is approximately 70 mmHg. However with increasing altitude (2.500 meters), arterial PO_2 decreases to the level of 60 mmHg, while the tissue PO_2 remains at 20 mmHg. The result is that the pressure gradient decreases from 74 mmHg to 40 mmHg, which means a 50% reduction in the diffusion gradient. This gradient is responsible for moving the oxygen from blood to the tissues and is crucial the climb to great heights. This gradient decreases on climbing higher.

Acute exposure to high altitudes result in a decreased amount of oxygen available to the body and thus to decreased arterial blood oxygen saturation. This leads to a reduction in maximal aerobic power of approximately 1% for every 100 m above 1500 m (Buskirk, 1966). VO_2 max. decreases in a linear fashion, being about 12% lower at 2.400 meters, 20% lower at 3.100 meters and 27% lower at about 4.000 meters. At around 8.000 meters VO_2 max. goes down significantly. Values for VO_2 max. of 62 ml/kg/min can decrease to 15 ml/kg/min near the top of some mountains.

Pugh *et al.* (1972) showed that men with VO_2 max. values of 50 ml/min/kg at sea level are not able to do exercise, even to move, near the top of 8.000-meter-peaks. There is a connexion between hypoxic phenomena and exhaustive physical exercise, which are the two central points of this section of the discussion.

Very few studies have been carried out on humans relating the effect of prolonged hypobaric hypoxia on the degree of oxidative stress. The first of them studied the influence of vitamin E on physical performance at varying altitudes (Nagawa *et al.*, 1968). In cycling, the maximum and the final values of oxygen intake and oxygen pulse were higher in the supplemented group. This hypothesis was supported by the results of a later study on the effect of vitamin E on physical performance at high altitudes (Simon-Schnass, 1993). Mountaineers were

supplemented with 400 mg vitamin E per day (test group) or a placebo (control group) during an expedition to K2 (8611 m). In the course of the experiment, the anaerobic threshold of the treatment group increased while in the control group it first increased, but to a smaller degree, and then decreased compared to the initial value. The difference became significant ($p < 0.01$) after 4 weeks.

To test if there was an increased oxidative stress leading to increased lipid peroxidation at a high altitude the amount of exhaled pentane was determined during the expedition to K2. The results showed that there was no significant difference between the initial pentane exhalation of the two groups, but after four weeks of supplementation (400 mg/day vitamin E) and two weeks at high altitude, the exhaled pentane increased significantly ($p < 0.01$) in the control group. In the treated group there was no noticeable change (Simon-Schnass and Pabst; 1988).

The filterability of the red blood cells is considered a measurement of their flexibility. This parameter was tested during two expeditions at a high altitude in an expedition to Annapurna (8091 m) (Simon-Schnass and Korniszewski, 1990). It was shown that red blood cell filterability deteriorates at a high altitude. The fact that no change in erythrocyte filterability was detected in the vitamin E supplemented (400 mg/day) group indicates that protection from oxidation was adequate there. In order to prove that the reason for this is indeed the effect of an increased free radical production, the test was repeated during a research expedition to Solo Khumbu (5545 m), close to Mt. Everest (Simon-Schnass, 1994). The susceptibility of the erythrocytes of the same blood sample against peroxidation was tested by measuring the amount of TBARS. In contrast to the slight decrease in TBARS formation in the test group (supplemented with vitamin E) there was a tremendous increase in the control group. This clearly shows that there is indeed increased oxidative stress at a high altitude.

Together this shows that there is increased oxidative stress at a high altitude and that a supplementation with antioxidants can counteract its negative consequences.

Many sources of free radical generation have been pointed out in this model: mitochondria respiratory chain (Simon-Schnass, 1994), hypoxia, UV radiation and low temperatures (Kindl *et al.*, 1993). However three years ago Joanny *et al.* (2001) published a human study where, in which in resting conditions, during simulated altitude hypoxia an increase in whole blood TBARS, a decrease in erythrocyte GSH levels and GSH/GSSG ratios were revealed. This model, to our understanding, discards the mitochondrial theory and the increase in the oxygen consumption, as a source of free radicals at high altitudes. The reason is because they found oxidative

stress even in resting conditions. At the same time the cold and UV radiation can be discarded because the model used was a hypobaric chamber.

In 1981 Granger and co-workers demonstrated that treatment of feline intestine with superoxide dismutase prior to ischaemia attenuated the extent of membrane leakage during the subsequent reperfusion phase, suggesting a role of the superoxide ion in causing tissue damage. These authors proposed that the ischaemic phase caused a conversion of xanthine deshydrogenase (XDH) to xanthine oxidase (XO) and a degradation of adenine nucleotides to hypoxanthine, hence, with the re-introduction of molecular oxygen during reperfusion, a burst of superoxide radicals would be formed in the XO catalyzed reaction.

Induction of xanthine oxidoreductase (XOR) activity during hypoxia has been proposed as one of the mechanisms leading to the exacerbation of ischaemia-reperfusion injury by XOR. In rat lung XOR activity increased during hypoxic exposure (Hassoun *et al.*, 1998). Accumulation of XOR substrates in hypoxia has been detected in several cell lines (Hassoun *et al.*, 1994; Terada *et al.*, 1997).

During physical exercise, muscular concentration also leads to vascular compression, which in turn causes a regional and short term reduction in circulation with limited hypoxia. This transient oxygen deficiency can occur, despite the high oxygen turnover (Berg *et al.*, 1987; Simon-Schnass, 1994) and induce the conversion of XO to XDH.

The aim of this work was to study the oxidative stress associated to the physical exercise performed during the climb of the G2 (8034 m). We took samples always at the base camp (4500 m) but immediately after climbs to different altitudes (5200 m, 6000 m). This means that the mountaineers descended to the base camp after climbing to 5200 and 6000 meters to have blood extractions taken. The partial oxygen pressure at 5200 and 6000 m decreases between 50% and 54% in relation with sea level values. The situation mimics an ischaemia-reperfusion process .

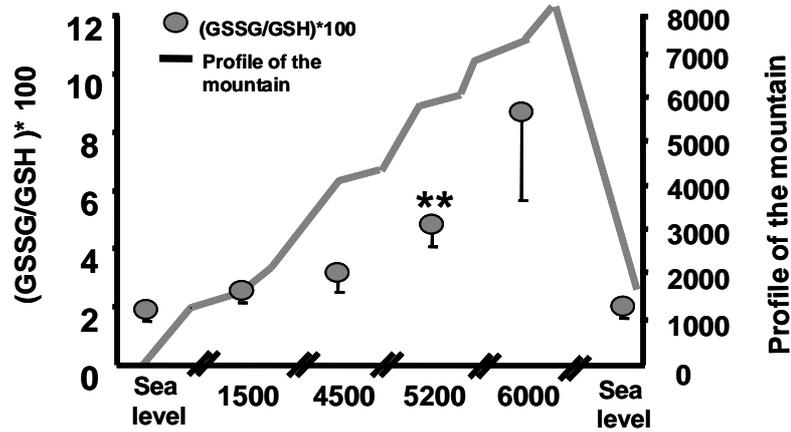
Our results show that physical exercise performed at great heights causes an increase in GSSG blood levels, an increase in the ratio GSSG/GSH and a decrease in the GSH levels, progressively as they are climbing.

Figure VI.2. shows how the ratio was raised after reoxygenation of the mountaineers who had all arrived from different heights for extractions. Values were 488% higher at 6000 m if we compare them with those obtained at sea level. At 5200 m the difference was significant (See Figure VI.2.).

In conclusion physical exercise performed at very high height causes glutathione oxidation in blood, which can be correlated with an increase in xanthine

oxidase activity. Thus, this enzyme is responsible for the generation of free radicals in this process.

Figure VI.2. Blood (GSSG/GSH) x100 in humans during the climb of the G2 (8034 m).



Values are means \pm SD (n=2-4). Significantly different (**) $p < 0.01$ vs sea level.

2.- Allopurinol and markers of muscle damage and oxidative stress among participants in the Tour de France.

The aim of this work was to study oxidative stress associated with exhaustive physical exercise in elite cyclists (US Postal Team) during their participation in the most important international cycling event, the Tour de France 2001.

2.1. Exhaustive exercise induced an increase in plasma Creatine Kinase, Aspartate Amino Transferase activities and malodialdehyde levels. Prevention by allopurinol administration.

It is well known that exhaustion causes muscle damage to persons who perform strenuous physical exercise. Exercise, only when exhaustive, generates free radical. Sastre *et al.* (1992) found a linear correlation between lactate levels and GSSG/GSH ratio in human blood after exercise to exhaustion.

We have shown that XO is involved in the occurrence of oxidative stress in strenuous physical exercise (Viña *et al.*, 2000).

The Tour de France is one of the hardest kinds of exhaustive physical exercise performed by professional sportsmen in the world. It is a three-week race which includes, flat, mountain and team time trial tests. In this last test, all the cyclists of each team do their best, as the time that is recorded for all cyclists is that of the fifth cyclist of the nine who constitute the team to cross the finishing line. We tested the concept that XO is involved in muscle damage in exercise by treating top professional cyclists with allopurinol (an inhibitor of XO widely used in clinical practice).

The professional cycling team "US Postal", which includes the winner of the last four editions of the Tour, was divided into two groups by drawing lots. One group (four cyclists) was given daily an oral dose of 300 mg of allopurinol an hour before each racing stage while the other (five cyclists) received placebo.

Venous blood samples were obtained fifteen hours after each stage studied (i.e. when the activity of cytosolic enzymes in plasma is expected to be maximal if cellular damage occurs). Samples were obtained on different days during the race: One day before the race began, after the second, the fourth (the team time trial), the eighth, the tenth and the thirteenth stages. Creatine kinase (CK) and aspartate amino transferase (AAT) activities were measured in plasma as an index of tissue damage (Sorichter *et al.*, 2001).

VI. Summary of results and discussion

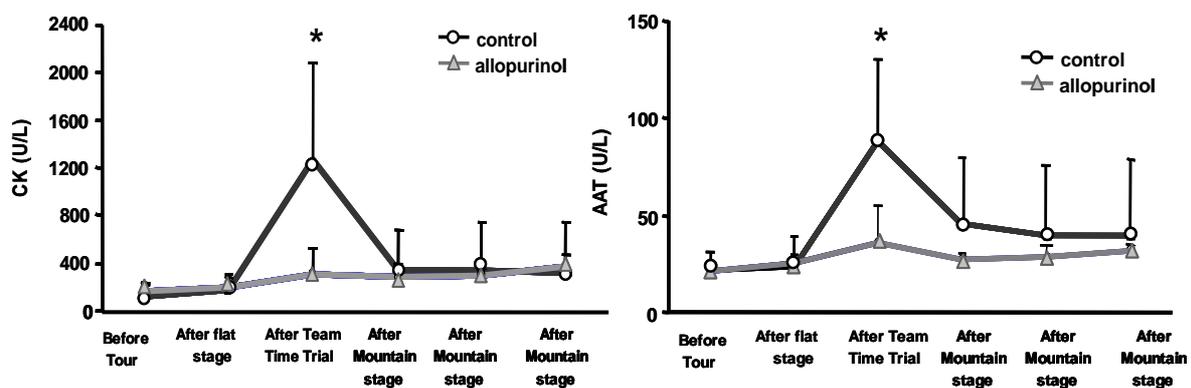
We found an increase in CK and in AAT activity in plasma, only after the team time trial stage, in which all cyclists performed at their peak as explained above. The cyclists who received allopurinol did not show signs of an increase of plasma creatin kinase and aspartate amino transferase activity, which increased significantly in plasma of cyclists who took placebo, particularly after the most strenuous stages of the Tour. We also found evidence of an increase in malondialdehyde in all participants at the end of the race, but the increase was significantly greater in the placebo group (0.59 vs 0.21 nmol/mL $P=0.009$). However, there was no difference in performance between the two groups.

Xanthine oxidase is a free radical generating enzyme which is involved in the pathophysiology of the ischaemia-reperfusion syndrome. Our results show that it is involved in the tissue damage which occurs in exhaustive exercise.

In top level professional cyclists, team time trial stages cause much more tissue damage than other stages, including high mountain ones.

Allopurinol protects against muscle damage which occurs in professional cyclists in top international events such as the Tour de France (See Figure VI.3.)

Figure VI.3. Plasma activity of CK and AAT in US Postal Team Cyclists who received placebo or allopurinol during the 2001 Tour de France.



Compared mean values using repeated-measures analysis of variance, with P values adjusted for multiple comparisons with the Scheffe test. Significantly different (*) $p=0.03$ (for creatine kinase) and (*) $p=0.02$ (for aspartate aminotransferase). TTT: Team Time Trial.

There are many papers in which allopurinol has been used in human studies. Heunks *et al.* (1999) found that treating with allopurinol a group of COPD patients

there was a decrease in blood GSSG levels and plasma MDA levels after the exercise. One year later Viña *et al.* (2000) found a decrease in CK and AAT plasma levels of weight lifters after an strength training. In 2003, Vassilakopoulos *et al.*, found a decrease in plasma levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in a group of cyclists after two bouts of 45 minutes cycling (70% VO₂ max.). Athletes were treated with an antioxidant cocktail which contained allopurinol

Allopurinol is a purine analog that, after being metabolized to oxypurinol, forms a tight binding complex with the enzyme (Hille and Massey,1981). The effect of allopurinol in reducing radical induced tissue injury could in part be due to the scavenging property of the inhibitor. Moorhouse *et al.* (1987) reported that allopurinol and oxypurinol have direct hydroxyl scavenging properties in vitro. However, in this latter study, the concentration of both allopurinol and oxypurinol was >250 μ M. Alternatively, experiments by Zimmerman *et al.* (1988) revealed that allopurinol and oxypurinol, at concentrations of 12.0 and 12.9 μ M, respectively, do not enhance FR scavenging properties of plasma. In our human study we administered a daily dose of 300 mg of allopurinol 1 hour before the exercise. In a similar study we used the same dose of allopurinol as in this one (Heunks y cols., 1999; Viña y cols., 2000; Viña y cols., 2000) and plasma concentration of allopurinol was similar to the study by Zimmerman *et al.* (1988), i.e. insufficient to show any significant direct scavenging properties.

It's is important to remark that treatment during several days with allopurinol results in gradual accumulation of oxypurinol (Murrell y Rapeport, 1986). However oxypurinol is not as effective as allopurinol at scavenging radicals in vitro (Das y cols., 1987; Hellsten, 1994; Smith y cols., 1989). Therefore, we can conclude that the effects of allopurinol treatment in our study are the result of XO inhibition and not the result of its direct antioxidant properties.

2.2. Model of xanthine oxidase activation during physical exercise.

Based on the numerous reports in the area of ischaemia/reperfusion, it is reasonably clear that XO may play a role as a cause of tissue damage, including damage to skeletal muscle.

Our aim is to study whether XO may be one of the sources of radical generation in muscle during exercise.

High intensity exercise, and potentially prolonged exhaustive exercise, subjects the active muscle to a marked level of metabolic stress and may lead to the two main conditions required for a major formation of radicals to occur

via XO: a significant conversion of XDH to the oxidase form, and a greatly enhanced presence of hypoxanthine as substrate for the enzyme (Heunks *et al.*, 1999; Viña *et al.*, 2000; Viña *et al.*, 2000).

Although a proportion of XDH exists in the oxidase form in skeletal muscle it would appear that a conversion of XDH to XO would have to occur in the muscle, during exercise to enable a large burst of superoxide radicals via XO. A transformation of the enzyme via activated calcium dependent proteases would require a change in the intracellular calcium homeostasis. Studies on sprint running horses have shown disturbances of the sarcoplasmic reticulum with consequent abnormal increases in intracellular calcium in the muscle (Byrd, 1992). Some authors have considered the failure of muscle calcium homeostasis a key step in the degenerative process in exercise-induced muscle damage (Jones *et al.*, 1984; Gollnick *et al.*, 1989; McArdle *et al.*, 1992).

Highly intensive exercise may also lead to a reduction in adenine nucleotides that possibly could lower the activity of the calcium pumps. However, in order for activated muscle proteases to act on XDH/XO localized in the vessel walls, the cell membrane would have to already be disrupted. Alternatively, a transformation to the oxidase form could arise via activated proteases within the vascular or through other mechanisms such as oxidation of free sulphhydryl groups (Della Corte and Stirpe, 1972). The latter mechanism could occur via oxygen radicals.

The other requirement for a marked generation of oxygen radicals via XO is a high concentration of the substrate hypoxanthine. The extent of hypoxanthine formation is related to the level of adenine nucleotide degradation and several studies have shown that intensive short-term exercise leads to a pronounced accumulation of hypoxanthine in plasma. Hypoxanthine does not accumulate to any greater extent in human muscle during intense exercise but as the purine can diffuse through membranes plasma is an equally important source of substrate for XO (Hellsten, 1994) (See Figure VI.4.)

In support of a role for XO in exercise induced muscle damage are findings of morphological disturbances of capillary endothelium, one of the primary sites of XO, in muscle after long term endurance exercise (Duarte *et al.*, 1993; Crenshaw *et al.*, 1993). Duarte and co-workers found mitochondrial swelling in endothelial cells of muscle of control animals after one hour of exhaustive running whereas animals treated with allopurinol showed no endothelial alterations. Moreover, human muscle that has been subjected to prolonged strenuous exercise (Hellsten *et al.*, 1996) and rat muscle subjected to

ischaemia (Jennische *et al.*, 1987) show major increases of insulin like growth factor-1 in the capillary endothelium implying regeneration of previously injured cells.

On the other hand, as we pointed out in the introduction, XO may function as a mediator in immunological events (McCord, 1986). There are many reports in the literature that point at this function. It has been proposed that XO is involved in immunological processes through an influence of the enzyme on neutrophil attraction (Petroni *et al.*, 1980). These authors suggested that superoxide radicals generated by XO activated a chemotactic factor that in turn attracted neutrophils. A recent study in which the level of XDH/XO was assessed immunohistochemically with monoclonal antibody, showed that XDH/XO increases in micro vessels of human skeletal muscle after prolonged strenuous exercise (Hellsten *et al.*, 1996). The exercise appeared to have caused some damage to the muscle as the level of creatine kinase in plasma was markedly increased after the exercise. The study also showed an increase in muscle content of hydroxyproline, a major protein of collagen, and of insulin like growth factor-1 suggesting that the tissue had undergone some form of regeneration (Jennische *et al.*, 1987; Edwall *et al.*, 1989; Jennische, 1989). It is, however, unclear if the increased presence reflected an elevated expression of XDH in the muscle. Alternatively, the elevated enzyme level could be due to an attachment of the enzyme to the surface of endothelial cells via a proteoglycan (Adachi *et al.*, 1993).

There is good support in the literature for an inflammatory response subsequent to severe exercise (Smith, 1991). This paper provides two possible initial causes of damage:

1.- Metabolic stress with a decline in adenine nucleotide levels, an increase in hypoxanthine formation, and the possible conversion to XO through an increased level of intracellular calcium. This scheme of events would occur during exercise of very high intensity or towards the end of prolonged exercise where energy regeneration is limited due to low levels of glycogen.

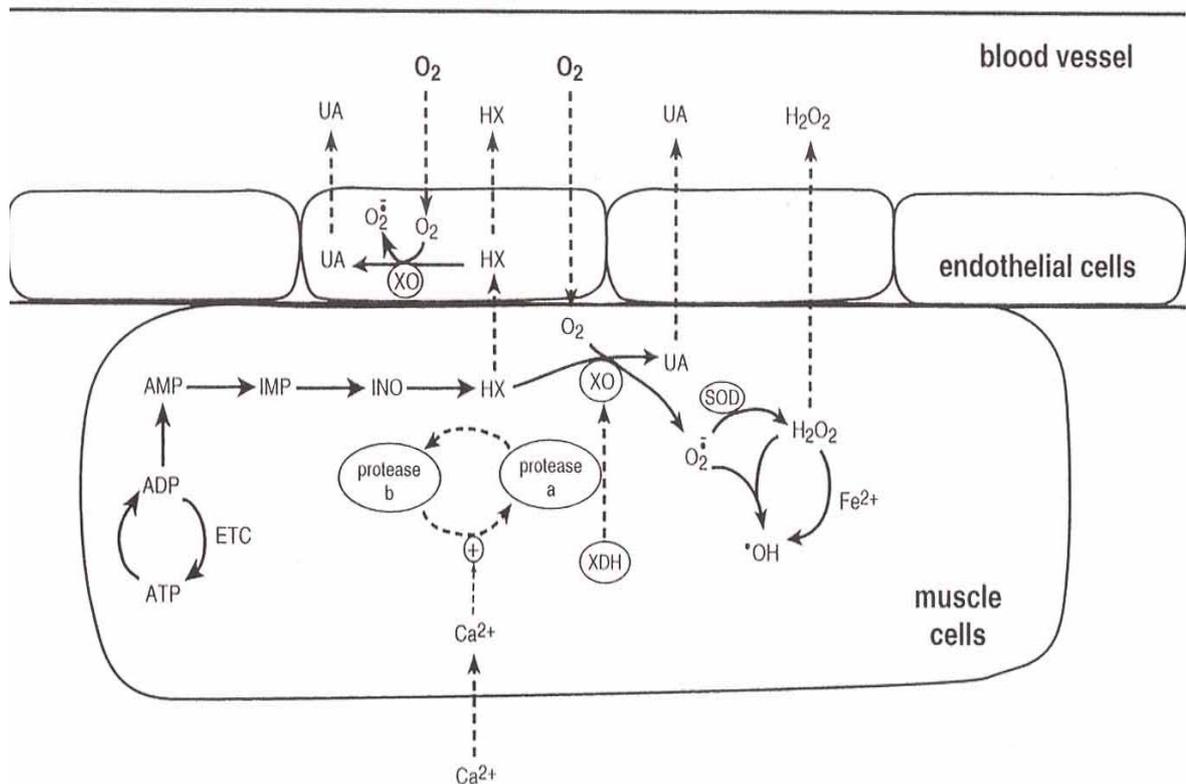
2.- Initiation of immunological events could be through rupture of the muscle fibers due to physical stress, which mainly occurs with eccentric exercise (Friden and Liebre, 1991). Tissue debris from disruption of the fibers could activate the complement system (Jarasch *et al.*, 1981). The complement fragments cause the release of histamine from mast cells, which together with

VI. Summary of results and discussion

the fragments cause the attraction of neutrophils (McCord and Fridovich, 1969). The neutrophils may then, as suggested by Phan *et al.* (1989), cause the conversion of XDH to XO.

The conversion of XDH to XO, may generate reactive oxygen species (ROS) which, may act as a chemoattractant to neutrophils. These when activated may generate more superoxide radicals (Granger *et al.*, 1981; McCord, 1986).

Figure VI.4. Schematic representation of xanthine oxidase activation during the exercise (Modified from Hellsten, 1994).



AMP: Adenosine monophosphate
IMP: Inosine monophosphate
INO: Inosine
HX: Hypoxanthina

UA: Uric acid
XO: Xathine oxidase
XDH: Xanthina dehydrogenase
SOD: Superoxide dismutase

3.- Oxidative stress associated to exhaustive physical exercise in a rat model. Effect of allopurinol administration.

For obvious ethical reasons we had to turn to the exercised rat as a model to check the effect of ROS generated by XO in oxidative stress and cell signalling during exercise.

3.1. Exercise activates XO in animals: prevention by allopurinol administration.

The importance of xanthine oxidase as a mediator of exercised induced muscle damage, has been frequently challenged because of the very low xanthine oxidase activity of skeletal muscle relative to other tissues (Roy y McCord, 1983; Smith *et al.*, 1989). Xia and Zweiver in 1995, interestingly, proposed that generation of FR by XO is not enzyme but rather substrate limited. This implies that when ATP degradation products accumulate, XO may generate FR. This fits well with data from other study demonstrating elevation of ATP degradation products after exercise: hypoxanthine, xanthine and uric acid (Hellsten-Westing, 1994). This was accompanied by elevation of markers of FR, which was inhibited by allopurinol treatment. Release of xanthine and hypoxanthine from skeletal muscles after exercise has been shown previously in healthy subjects (Heunks *et al.*, 1999; Hellsten-Westing, 1994).

Several investigators have published an increase in plasma XO activity after the exercise (Viña *et al.*, 2000; Radak *et al.*, 1995). This increased level of XO in plasma might reflect the extent of endothelial cell injury. The endothelial cells appear to be not only of the sources of free radicals but also one of the most sensitive targets of radicals during an intensive physical exercise. Such an increase may cause a significant increase in superoxide production in the vascular bed (Hopson *et al.*, 1995). Indeed, XO binds to glycosaminoglycans in the vascular endothelial cells (Roger White *et al.*, 2000). Adachi and coworkers (1993) have shown that XO binds electrostatically to GAGs on the surface of cultured endothelial cells, and that this binding phenomenon can be reversed by treatment of cells with heparin. Numerous oxidizing agents, including XO, stimulate the synthesis of glycosaminoglycans and reduce the expression of extracellular SOD and its antioxidant activity (Tanaka *et al.*, 1993).

Plasma concentrations of HX and lactic acid may remain within the normal range under conditions of nonstrenuous exercise. However, when anaerobic

metabolism occurs, the metabolism of purine nucleotides is accelerated (Yamanaka *et al.*, 1992). Hypoxanthine does not accumulate in skeletal muscle during exhaustive physical exercise, however, this purine easily diffuses across cell membranes. It can increase in plasma and be the substrate for XO. Muscle injury due to oxidative stress may be minimized by limiting exercise to aerobic conditions (Yamaka *et al.*, 1992).

Radak *et al.* (1995) found that lactate concentration in blood correlated well with XO activity in plasma after running until exhaustion (Radak *et al.*, 1995). Those results are in accordance with the correlation published by Sastre *et al.* (1992).

The increase in XO activity might be associated with decreases in aerobic glycolysis. Cellular accumulation of H₂O₂ might lead to a marked decrease in aerobic glycolysis in the cell (Halliwell y Gutteridge, 1989). A considerable part of the energy expenditure during running is supplied by oxidative metabolism; however, in the last few minutes anaerobic processes must have occurred, resulting in lactate accumulation.

During the exercise muscle contractions also lead to vascular compression, which in turn causes a regional and short term reduction in circulation with limited hypoxia. This transient oxygen deficiency can occur, despite the high oxygen turnover (Berg *et al.*, 1987; Simon-Schnass, 1994) and induce the conversion of XO to XDH.

Because of the importance of the exercised protocol followed, we think is important to point out in this section that all the rats run the same time. Control rats run 58 ± 7 min and allopurinol treated run 55 ± 5 min (i.e. no difference). Lactate levels also were similar between the two exercised groups: controls 7.5 ± 3.1 mmol/L and allopurinol treated 7.9 ± 2.9 mmol/L. Rest lactate levels were 1.3 ± 0.4 mmol/L.

We found an increase in rat plasma XO activity immediately after the exercise (4.7 ± 1 U-L at rest versus 6.2 ± 1 U-L after exercise $p < 0.05$). Allopurinol completely prevented this effect.

As we pointed out in the human experimental model, allopurinol might act as an antioxidant, apart from its inhibitory action on XO at certain dose (Moorhouse *et al.*, 1987). We have checked that in the animal model, as well as in the human one, the dose of allopurinol needed to see an antioxidant effect is up to 100 mg/kg (Klein *et al.*, 1996) i.e. more than three times the dose used in this study (32 mg/kg).

3.2. Effect of allopurinol administration on the oxidation of rat gastrocnemius muscle after exhaustive physical exercise.

Oxidative modification of proteins by oxygen free radicals and other reactive species such as hydroxynonenal occurs in physiologic and pathologic processes. As a consequence of the modification, carbonyl groups are introduced into protein side chains by a site-specific mechanism. The aminoacids lysine, proline and arginine, are oxidized forming carbonyl groups, that's why the content of carbonyl groups in this proteins can be considered a marker of oxidative stress (Stadtman *et al.*, 1992). Other aminoacids like histidine, cysteine and methionine, can suffer oxidative damage but they do not form carbonyl derivatives (Stadtman *et al.*, 1992). The oxidative modification of proteins can modulate biochemical characteristics of proteins such as enzymatic activity (Climent *et al.*, 1989), DNA binding activities of transcription factors (Pognonec *et al.*, 1992), and the susceptibility to proteolytic degradation (Stadtman, 1992)

Several groups have measured protein oxidation to study oxidative stress in muscle of rats subjected to acute or chronic exercise (Radak *et al.*, 1998; Jiankang *et al.*, 2000; Radak *et al.*, 2000; Radak *et al.*, 2002).

Skeletal muscle is the tissue with the largest mass in the body, and consists of postmitotic cells, which are more prone to accumulate oxidative damage (Radak *et al.*, 2001).

Training has the capability to reduce this vulnerability to oxidative stress. The importance of this observation is that oxidatively modified proteins are losing their physiological activity and are prone to degradation. Thus, the increased accumulation of this useless products could hamper vital physiological processes. Exercise training tends to increase the activity of the proteasome complex, which suggest that the removal of oxidatively modified proteins is more efficient in the muscle of trained rats (Radak *et al.*, 1999). This is an important adaptive response because the induction of a repair mechanism, proteasome complex is regarded as a repair enzyme (Grune *et al.*, 1997), could attenuate the age-associated increase in the half-life of proteins and result in a decrease in the accumulation of potentially harmful posttranslationally modified proteins (Goto *et al.*, 2001)

However exhaustive exercise induces an oxidative modification of proteins that is accompanied by the generation of protein reactive carbonyl derivatives that can react with DNPH to form hydrazone derivatives (Oliver *et al.*, 1990; Nakamura and Goto, 1996). First study where it was reported an increase in protein carbonyl

derivatives in skeletal muscle immediately after concentric leg exercise, was published in 1994 (Saxton *et al.*, 1994).

A series of recent studies examining this issue have, moreover, discovered that oxygen-derived free radicals generated during strenuous contraction may modulate respiratory muscle contractile function and contribute to the development of muscle fatigue. The data supporting this concept include: (a) indirect (evidence of lipid peroxidation, protein carbonyl formation, glutathione oxidation) evidence that there is heightened free radical production in contracting muscle, (b) evidence that pharmacologic depletion of muscle antioxidant stores increases degree of muscle fatigue present after a period of exercise, and (c) evidence that administration of agents that act as free radical scavengers retard the development muscle fatigue (Supinski, 1998)

In this thesis we determined the levels of muscle protein oxidation with the western blotting technique. Using this method we detect carbonyl derivatives formed during exhaustive exercise that can react with DNPH to form hydrazone derivatives (Oliver *et al.*, 1990; Nakamura y Goto, 1996).

Our results suggest that exercise-induced oxidative stress was not be completely curbed by the antioxidant system of the gastrocnemius muscle. The circulating xanthine oxidase formed might result in oxidative damage at a site distant from its formation (Yokoyama *et al.*, 1990) as it reacts readily with molecular oxygen generating oxygen radicals.

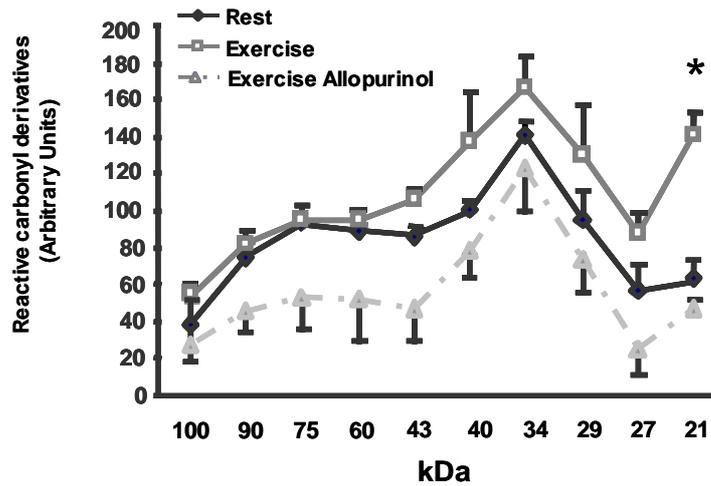
In the present study, the reactive carbonyl derivatives (RCD) signals were visibly stronger in proteins with a molecular mass of 40 and 34 kDa. However we found an statistically significant difference between our 3 experimental groups in those with a molecular weight of 21 kDa (See Figure VI.5.) . This indicates that some proteins are more sensitive to the formation RCDs under the present experimental condition than others and suggests that some forms of oxidative damage take place with selective order.

This order might have physiological consequence, since the oxidative damage might be the first step in an adaptive process (Davies *et al.*, 1982; Rajguru *et al.*, 1994). The identification of the damaged proteins generated in the muscle requires further research. However, one possible candidate is carbonic anhydrase, as it has a molecular weight of 31 kDa, and its residues are very sensitive to formation of RCD (Radak *et al.*, 1998)

The oxidative modifications of proteins might activate proteolysis and faster protein turnover (Stadtman, 1992). It can be suggested that newly made proteins are able to cope with greater physiological challenges than old proteins (Radak *et al.*,

1992). Therefore, oxidative modifications of proteins, to a certain extent, might be a signal for adaptive response.

Figure VI.5. Muscle oxidative stress after exhaustive physical exercise. Densitometry data showing carbonylated proteins in rat gastrocnemius muscle using cytosolic extract.



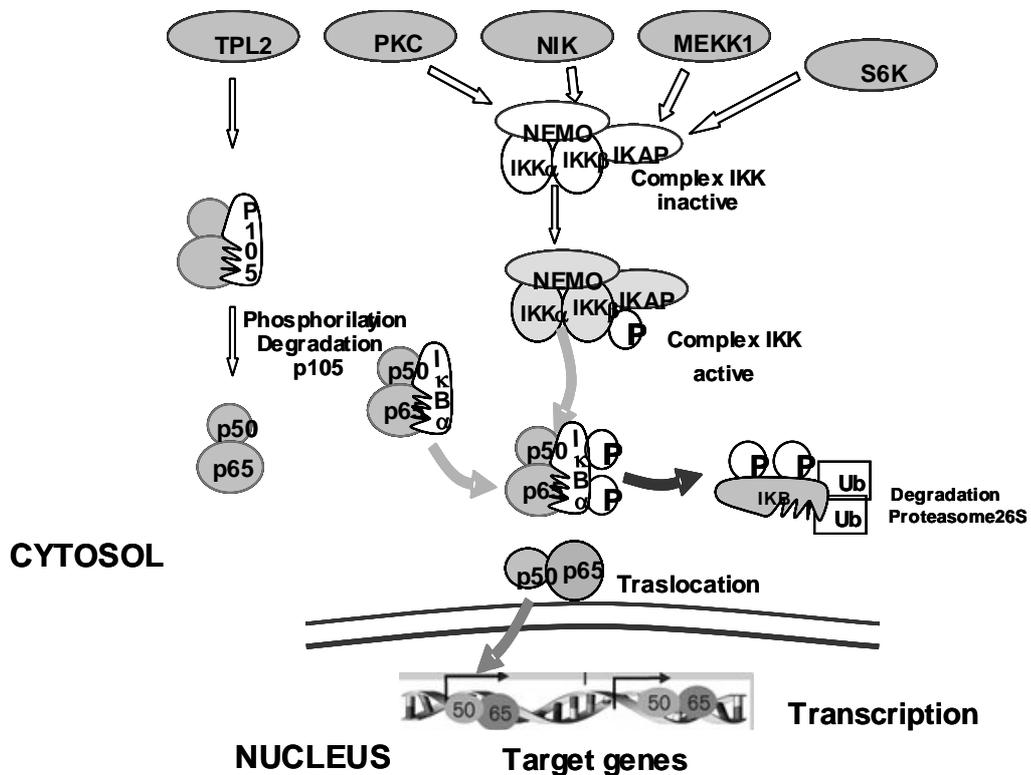
Values are means \pm SD (n=3). The difference was significant (*) $p < 0.05$ vs. rest group.

4.- NF- κ B activation and its effect in MnSOD, iNOS and eNOS gene expression in rat skeletal muscle after exhaustive physical exercise.

Our results show that exhaustive physical exercise can increase free radical generation in different biological tissues both in animals and in humans. These results are coincident with several research groups (Davies *et al.*, 1982; Jackson *et al.*, 1985; Reid *et al.*, 1992; Bejma *et al.*, 2000). ROS production is increased in several cellular sources but the results obtained with the allopurinol treatment underscore the role of XO in free radical generation in exercise.

Oxidative stress-(or redox-) sensitive signaling pathways use ROS to transfer signals from the cytosol to the nucleus to stimulate growth, differentiation, proliferation and apoptosis (Meyer *et al.*, 1994). Among the main pathways are NF- κ B, MAPK signaling cascade, the phosphoinositide 3-kinase (PI₃K)/Akt pathway, p53 activation, and the heat shock response. Although all of these pathways are important in regulating homeostasis of oxidant-antioxidant balance, NF- κ B and MAPK signaling pathways are considered the most critical for the cells to cope with oxidative stress (Allen and Tresini, 2000).

NF- κ B is a polymeric transcription factor composed of members of the Rel family. In mammals, these proteins include p50 (NF- κ B 1), p65 (RelA), p52 (NF- κ B2), RelB, c-Rel, p105, and p100 (Miyamoto and Verma, 1995; Baldwin, 1996). NF- κ B is activated by a variety of external stimulants, including H₂O₂, pro-inflammatory cytokines, LPS, UV irradiation and viral infection. These signals can lead to elevation of intracellular ROS, which may serve as proximal messengers to activate key upstream kinases of the NF- κ B cascade. The double strand-RNA activated protein kinase (PKR) and protein kinase C (PKC ζ) are believed to be involved in the activation of IKK (Cheshire *et al.*, 1999; Flohé *et al.*, 1997). Recently, MAPK/ERK kinase (MEKK1) was shown to be a required for the activation of IKK β (Regula *et al.*, 2002). Phosphorylation of two critical serine residues (Ser-32 and Ser-36 in I κ B α , Ser-19 and Ser-23 in I κ B β) by IKK primes I κ B for ubiquitination and proteolytic degradation by the 26S proteasome (Zamanian-Daryoush y cols., 2000). I κ B dissociation unleashes P50/P65 to translocate into the nucleus and bind DNA motifs (consensus: 5'-GGG-puNNPuPuCC-3') of the target genes (MnSOD, GCS, GPx, iNOS) (See Figure VI.6.).

Figure VI.6. Mechanism of NF- κ B regulation and activation.

In the current study, we demonstrate that contractile activity can activate NF- κ B signaling pathway in rat skeletal muscle. Although Hollander *et al.* (2001) previously reported elevated NF- κ B binding in rat deep vastus lateralis muscle during the post-exercise time course, this study is the first to reveal that increased NF- κ B binding is accompanied by a cascade of events in the exercised muscle, including:

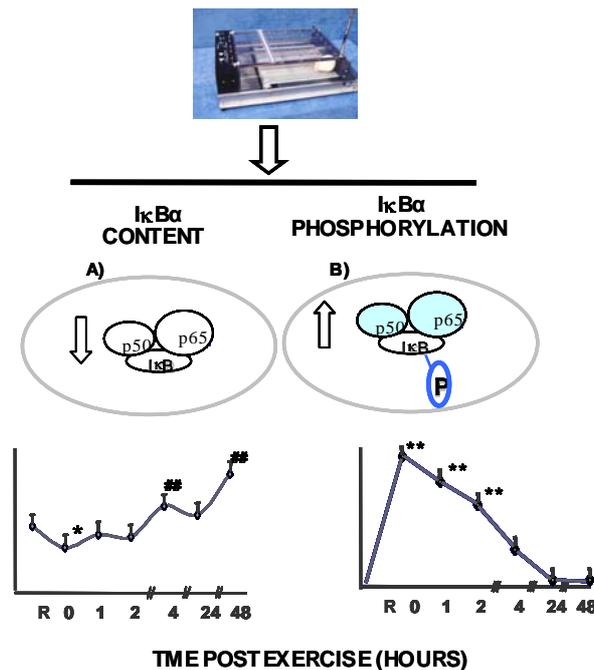
- Enhanced I κ B α and IKK α and β phosphorylation (See Figure VI.7. and VI.8.)
- Decreased I κ B α and IKK α content in the cytosol (See Figure VI.7. and VI.8.)
- Increased NF- κ B binding and nuclear P65 content (See Figure VI.9.)

Furthermore, our data showed an elevated p-I κ B α and p-IKK α and β levels immediately after exercise, whereas NF- κ B binding reached the peak ~2 hour post

VI. Summary of results and discussion

exercise. These findings regarding time sequence involved demonstrate that phosphorylation of I κ B α took place during muscular contraction, followed by P50 translocation and binding to the NF- κ B motif in muscle nucleus. It is interesting to note that cytosolic content of I κ B α was elevated markedly after the initial decline, and was 3 and 5 fold higher than resting levels at 24 and 48 hour, respectively. (See Figure VI.7.). These changes probably reflected a well-known negative feedback control mechanism, because I κ B α as a strong sequester of P50/P65 is also a gene target of NF- κ B signaling. High levels of I κ B α probably shuts down NF- κ B signal cascade and prevents unwanted over-expression of target genes (Schreck y cols., 1992).

Figure VI.7. Time course for I κ B α phosphorylation in rat deep vastus lateralis muscle after exercise until exhaustion.



Physical exercise can elicit a variety of physiological events that could potentially activate NF- κ B pathway. During heavy muscular contraction O_2^- and H_2O_2 are generated. H_2O_2 has been shown to activate IKK, which might explain the increased I κ B α phosphorylation in our study (Flohé *et al.*, 1997). This scenario was also supported by our data that IKK α and IKK β were activated (i.e. phosphorylated)

VI. Summary of results and discussion

in the exercised muscle (See Figure VI.8.). Regula *et al.* (Regula *et al.*, 2002) showed in the ventricular myocytes that IKK β was the primary enzyme to activate NF- κ B pathway due to phosphorylation of Ser-181 by MEKK-1. Since acute exercise has been reported to increase Raf-1/MEKK activity in human muscle (Aronson *et al.*, 1997), this mechanism is speculated to play a role in the current experimental model. However, IKK can be activated by other kinases such as the double strand-RNA activated protein kinase (PKR) and protein kinase C (PKC ζ), depending on the cell type (Cheshire *et al.*, 1999; Flohé *et al.*, 1997). NF- κ B-induced kinase (NIK) is also known to phosphorylate and activate IKK (Su *et al.*, 1997). The predominant form that could confer an exercise-induced activation of IKK in skeletal muscle remains to be identified.

Figure VI.8. Time course for IKK α and β phosphorylation in rat deep vastus lateralis muscle after exercise until exhaustion.

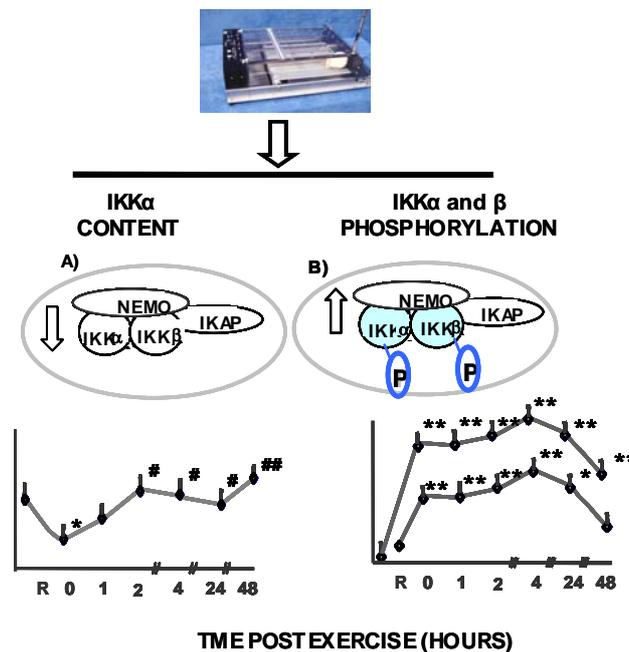
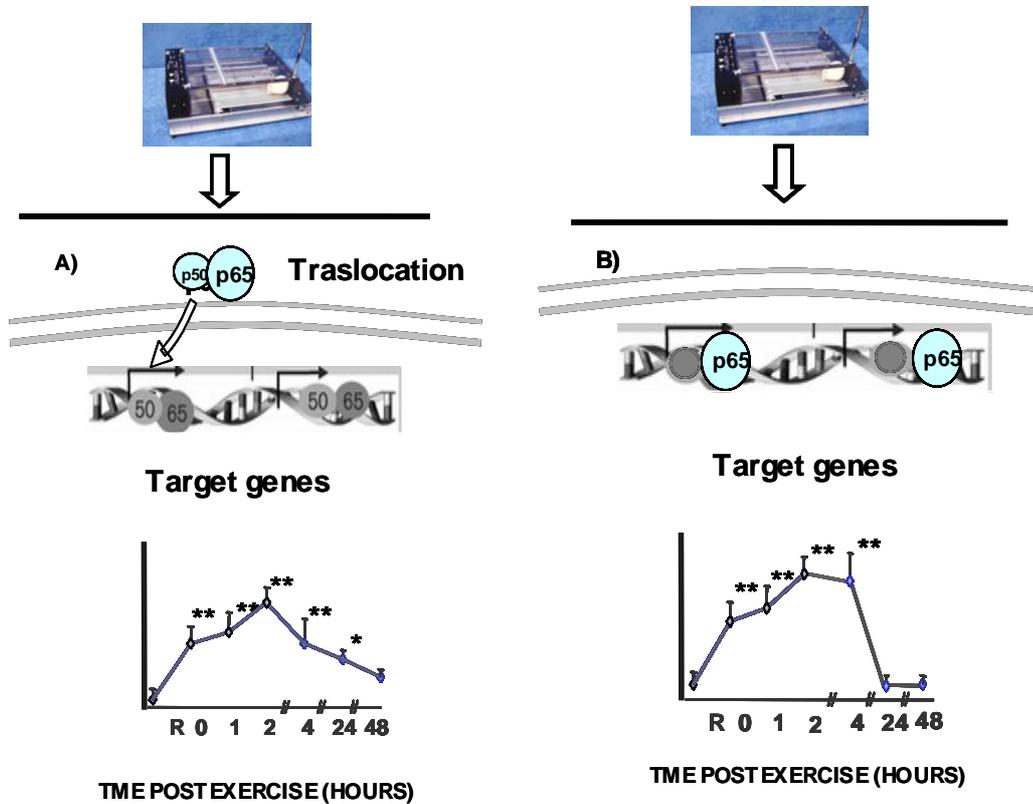
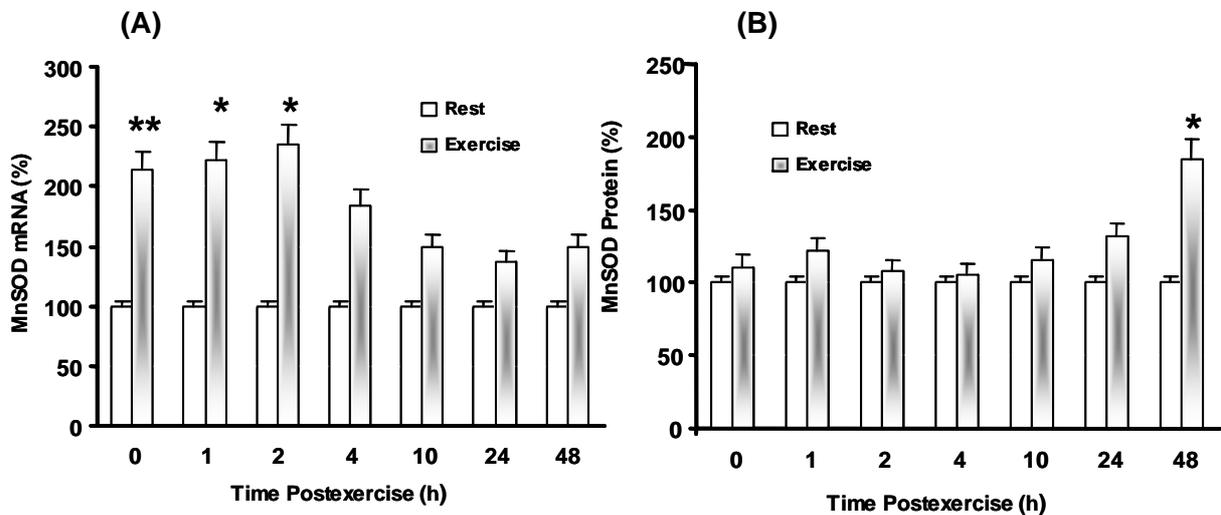


Figure VI.9. Time course for NF- κ B activation and nuclear P65 content in rat deep vastus lateralis muscle after exercise until exhaustion.



The physiological role of NF- κ B pathway activation during muscle contraction is still elusive. We hypothesized that the signaling cascade might target on genes that could be quickly activated transcriptionally to counter the increased ROS production, such as MnSOD, nitric oxide synthase (NOS) and GCS, all of which have mandatory NF- κ B binding sequences on their promoter region (Allen and Tresini, 2000; Ji, 2002). Oxidative stress has been reported to induce an increase in MnSOD gene expression (Ho *et al.*, 1991; Zhang, 1996). We report in our study an increase in MnSOD mRNA abundance, along with elevated NF- κ B and binding, in rat skeletal muscle shortly after an acute bout of treadmill running, followed by increased MnSOD protein content 48 hours later (See Figure VI.10.).

Figure VI.10. Time course for MnSOD gene expression in rat DVL muscle after exercise until exhaustion at different times.



Relative abundance of Mn SOD mRNA in deep vastus lateralis muscle. Each data point represents the mean (\pm SEM) from six animals, derived from autoradiographic signals. Relative abundance of mRNA was normalized with the 18S signal of the same sample as a reference. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$ vs control.

Relative abundance of Mn SOD protein content in deep vastus lateralis muscle. Each data point represents the mean (\pm SEM) from six animals, derived from autoradiographic signals. (*) $p < 0.05$ vs control.

This antioxidant enzyme inducing function NF- κ B may be especially important in tissues like skeletal muscle and myocardium wherein intrinsic antioxidant capacity is relatively low. Sufficient MnSOD activity is considered critical for protecting the mitochondria from cytotoxic effects of \bullet OH formed via Haber-Weiss reaction, which elicit oxidative damage to membrane lipid, amino acids, mtDNA and enzymes (Williams *et al.*, 1998).

The fact that exercise generates signals which are important in muscle cell physiology has been suspected for a long time, but it was in 1996 that Goodyear *et al.* showed that contractile activity increases ERK1 and ERK2 phosphorylation. This was confirmed by Hayashi *et al.* (1999) and more recently by Yu *et al.* (2003). In a similar fashion Reid (2001) showed that ROS and NO are continually generated in the muscles of healthy individuals and that these molecules modulate processes ranging from development to metabolism, blood flow and contractile function. Moreover, McArdle *et al.* (2002) showed that exercise increases the expression of heat shock proteins.

In most cases authors speculated that ROS generated in exercise might act as regulatory signals to mediate muscle adaptations to exercise (Essig and Nosek, 1997; Jackson, 1999). However, experimental evidence for this concept was lacking. In the present study, we report, to our knowledge for the first time, that ROS formed in exercise, in both humans and experimental animals, are responsible for such activation, because inhibition of ROS formation by treatment with allopurinol prevents, in the exercised muscle:

- The three-fold increase in phosphorylation of p38^{MAPK} and ERK 1/ 2^{MAPK} induced by exhaustive physical exercise (See Figure VI.11. and VI.12.).
- The exercise-induced DNA binding of NF-κB in nuclear extracts (See Figure VI.13.)
- The exercise-induced up-regulation of the expression of MnSOD, iNOS and eNOS (See Figure VI.14.)

Figure VI.11. Exercise-induced phosphorylation of p38^{MAPK} in rat gastrocnemius muscle. Effect of allopurinol administration.

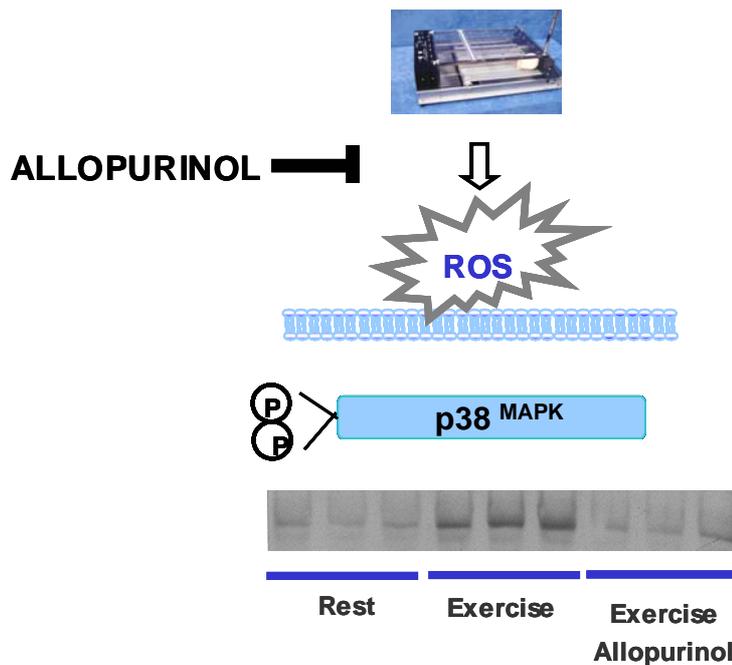


Figure VI.12. Exercise-induced phosphorylation of ERK 1/ 2^{MAPK} in rat gastrocnemius muscle. Effect of allopurinol administration.

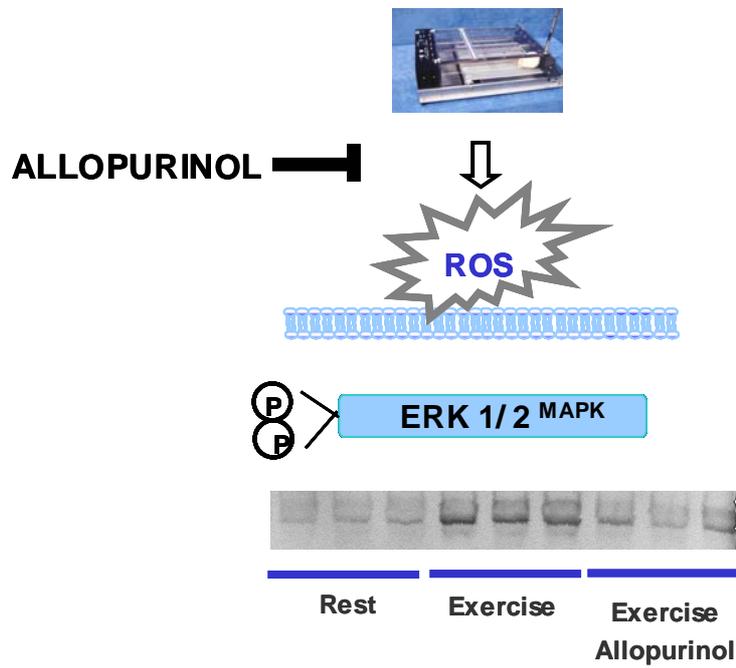


Figure VI.13. Exercise-induced activation of NF-κB in rat gastrocnemius muscle. Effect of allopurinol administration.

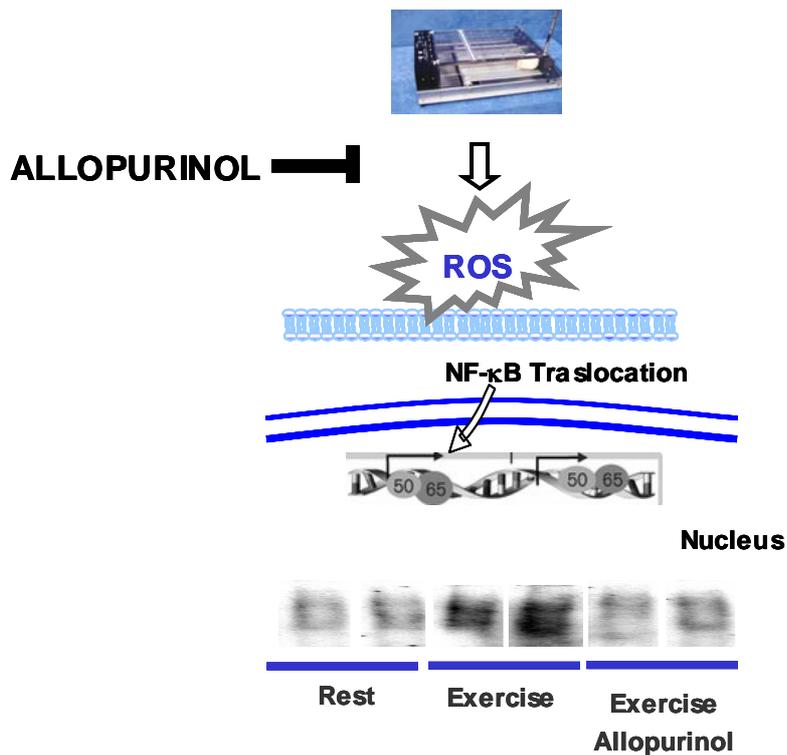


Figure VI.14. Exercise-induced up-regulation of the expression of MnSOD, iNOS and eNOS in rat gastrocnemius muscle. Effect of allopurinol administration.

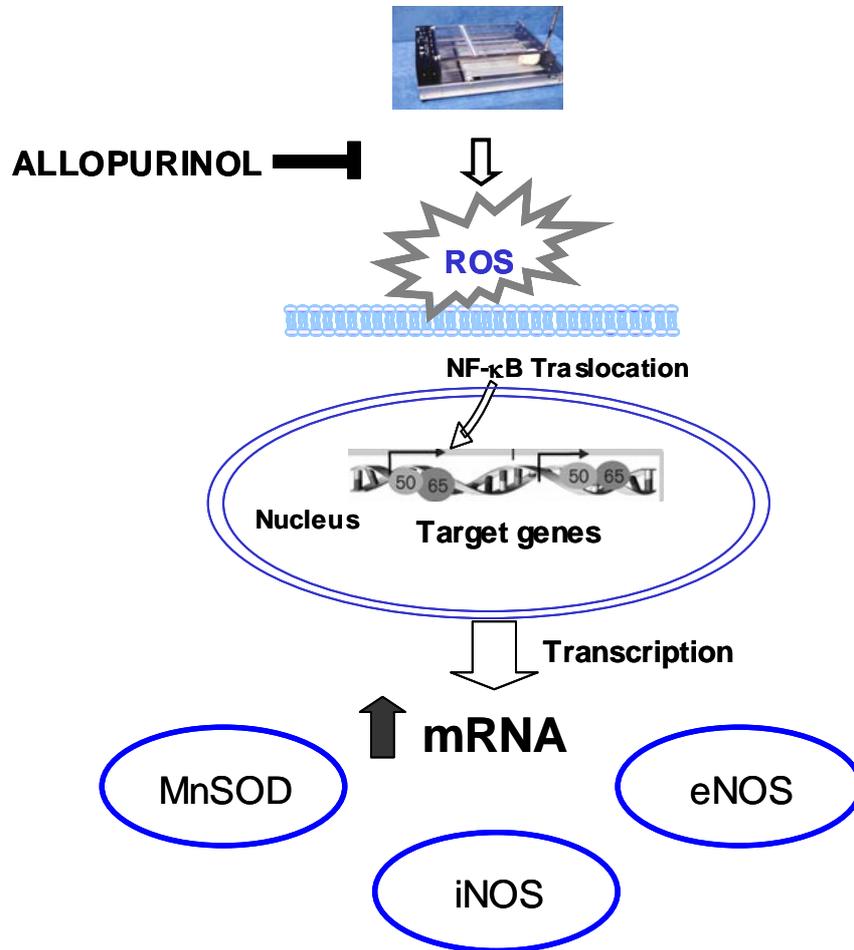


Figure VI.15. shows an schematic representation of the role of ROS in the regulation of cell function in exercise.

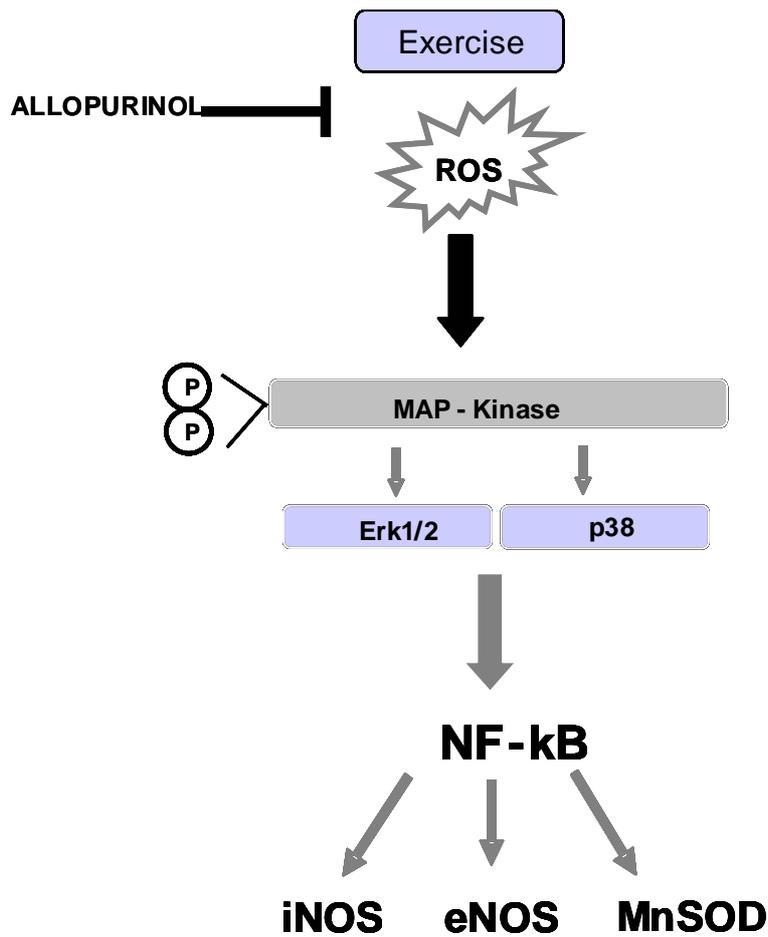
Thus the relevant fact reported in this paper is the demonstration that ROS produced in exercise act as signals to regulate molecules events, that are important in the muscle cell adaptations to exercise in animals and in humans.

Preventing oxidative stress associated with exercise by oral antioxidant administration could be detrimental by hampering the adaptive response.

The usual practice of recommending antioxidant supplements before exercise should be seriously questioned. Oral antioxidant supplementation is very

likely to be useful before competition when exercise is likely to be exhaustive, and damaging, but not when training.

Figure VI.15. Schematic representation of the role of ROS in the regulation of cell function in exercise.



VII. CONCLUSIONES

A la luz de los resultados obtenidos, podemos extraer las conclusiones que se enumeran a continuación:

1.- **E**l mecanismo de formación de radicales libres en el ejercicio físico agotador supone la activación de la xantina oxidasa. Como consecuencia, la inhibición de la enzima con alopurinol tiene un efecto protector frente a la formación de radicales libres por el ejercicio, tanto en animales de experimentación como en humanos.

2.- **E**l ejercicio físico agotador activa la vía de las MAPKinasas en músculo esquelético de rata. Este hecho se manifiesta con un aumento en la fosforilación de p38 y ERK 1/2. La administración de alopurinol previene dicha activación, lo que demuestra el papel que juega los radicales libres originados por esta vía en el proceso.

3.- **L**a vía de señalización de NF- κ B puede ser activada por modificaciones en el estado redox durante la contracción muscular. El estudio de la secuencia temporal de acontecimientos moleculares muestra un aumento en la unión al DNA de NF- κ B y un aumento en los niveles de la subunidad P65 del factor nuclear, dos horas después del ejercicio agotador. Del mismo modo muestra un descenso en los niveles citosólicos de I κ B α e IKK α acompañado por un incremento en la fosforilación de ambas kinasas inmediatamente, y transcurrida una hora tras el ejercicio.

4.- **E**l estrés oxidativo asociado al ejercicio físico agotador activa la vía de NF- κ B en el músculo esquelético de rata, lo que supone un aumento de la expresión de genes antioxidantes, como la MnSOD, y genes implicados en la respuesta adaptativa al ejercicio, iNOS y eNOS. La administración

de alopurinol previene la traslocación, de NF- κ B, al núcleo de la célula muscular y por tanto la expresión génica asociada.

5.- Las especies reactivas del oxígeno producidas durante el ejercicio físico actúan como señales que regulan procesos moleculares importantes para las adaptaciones de las células musculares al ejercicio físico.

6.- La prevención del estrés oxidativo asociado al ejercicio físico, con la administración de antioxidantes orales, puede llegar a ser perjudicial al condicionar la respuesta adaptativa al ejercicio. La tan extendida prescripción del uso de suplementos antioxidantes entre los deportistas, debe ser, por tanto, revisada.

7.- Los antioxidantes orales, aunque recomendables antes de la competición deportiva, cuando el ejercicio se espera sea realizado hasta el agotamiento, puede no ser tan apropiada durante los periodos de entrenamiento.

VIII.BIBLIOGRAFÍA

- Abdo KM, Rao G et al. (1986) "Thirteen-week toxicity study of d-alpha-tocopheryl acetate (vitamin E) in Fischer 344 rats". *Food Chem Toxicol.* 24: 1043-50.
- Adkison D, Hollwarth ME et al. (1986) "Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver". *Acta Physiol Scand Suppl.* 548: 101-7.
- Aguirre J, Buttery L et al. (2001) "Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstrate marked retardation in postnatal bone formation, reduced bone volume, and defects in osteoblast maturation and activity". *Am J Pathol.* 158: 247-57.
- Akerboom TP, Bilzer M et al. (1982) "The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused rat liver." *J. Biol. Chem.* 257: 4248-4252.
- Albertini R, Rindi S et al. (1996) "The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation." *Arch. Biochem. Biophys.* 327: 207-214.
- Aleman V and Handler P (1967) "Dihydroorotate dehydrogenase. I. General properties". *J Biol Chem.* 242: 4087-96.
- Alessio HM (1993) "Exercise-induced oxidative stress". *Med Sci Sports Exerc.* 25: 218-24.
- Alessio HM, Goldfarb AH et al. (1988) "MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat". *Am J Physiol.* 255: C874-7.
- Alessio HM, Hagerman AE et al. (2000) "Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise". *Med Sci Sports Exerc.* 32: 1576-81.
- Allen DG and Westerblad H (2001) "Role of phosphate and calcium stores in muscle fatigue". *J Physiol.* 536: 657-65.
- Allen RG and Tresini M (2000) "Oxidative stress and gene regulation". *Free Radic Biol Med.* 28: 463-99.
- Amaya Y, Yamazaki K et al. (1990) "Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O₂-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin". *J Biol Chem.* 265: 14170-5.

- Amelink GJ and Bar PR (1986) "Exercise-induced muscle protein leakage in the rat. Effects of hormonal manipulation". *J Neurol Sci.* 76: 61-8.
- Amelink GJ, Koot RW et al. (1990) "Sex-linked variation in creatine kinase release, and its dependence on oestradiol, can be demonstrated in an in-vitro rat skeletal muscle preparation". *Acta Physiol Scand.* 138: 115-24.
- Ames BN (1983) "Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases." *Science.* 221: 1256-1264.
- Ames BN, Cathcart R et al. (1981) "Uric acid provides an antioxidant defense against oxidant and radical". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 6858-6862.
- Ames BN, Shigenaga MK et al. (1993) "Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 7915-7922.
- Amici A, Levine RL et al. (1989) "Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions." *J. Biol. Chem.* 264: 3341-3346.
- Andrade FH, Reid MB et al. (1998) "Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse". *J Physiol.* 509 (Pt 2): 565-75.
- Angermuller S, Bruder G et al. (1987) "Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes. A cytochemical and biochemical study". *Eur J Cell Biol.* 45: 137-44.
- Apple FS, Hyde JE et al. (1991) "Geographic distribution of xanthine oxidase, free radical scavengers, creatine kinase, and lactate dehydrogenase enzyme systems in rat heart and skeletal muscle". *Am J Anat.* 192: 319-23.
- Arabadzjis PG, Tullson PC et al. (1993) "Purine nucleoside formation in rat skeletal muscle fiber types". *Am J Physiol.* 264: C1246-51.
- Armstrong RB, Ogilvie RW et al. (1983) "Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle". *J Appl Physiol.* 54: 80-93.
- Aronson D, Dufresne SD et al. (1997) "Contractile activity stimulates the c-Jun NH2-terminal kinase pathway in rat skeletal muscle". *J Biol Chem.* 272: 25636-40.
- Aronson D, Violan MA et al. (1997) "Exercise stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in human skeletal muscle". *J Clin Invest.* 99: 1251-7.
- Aruoma OI and Halliwell B (1989) "Inactivation of alpha 1-antiproteinase by hydroxyl radicals. The effect of uric acid". *FEBS Lett.* 244: 76-80.

- Aruoma OI, Halliwell B et al. (1989) "The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex". *Biochem J.* 258: 617-20.
- Asami S, Hirano T et al. (1998) "Effects of forced and spontaneous exercise on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organs". *Biochem Biophys Res Commun.* 243: 678-82.
- Asensi M, Sastre J et al. (1994) "A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples". *Analytical Biochemistry.* 217: 323-328.
- Aust SD, Chignell CF et al. (1993) "Free radicals in toxicology". *Toxicol Appl Pharmacol.* 120: 168-78.
- Babior BM (1978) "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes." *N. Engl. J. Med.* 298: 659-668.
- Baeuerle PA and Baltimore D (1988) "Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor". *Cell.* 53: 211-7.
- Baeuerle PA and Henkel T (1994) "Function and activation of NF-kappa B in the immune system". *Annu Rev Immunol.* 12: 141-79.
- Balnave CD and Thompson MW (1993) "Effect of training on eccentric exercise-induced muscle damage". *J Appl Physiol.* 75: 1545-51.
- Balon TW and Nadler JL (1997) "Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle". *J Appl Physiol.* 82: 359-63.
- Bangsbo J, Sjodin B et al. (1992) "Exchange of hypoxanthine in muscle during intense exercise in man". *Acta Physiol Scand.* 146: 549-50.
- Banister EW and Cameron BJ (1990) "Exercise-induced hyperammonemia: peripheral and central effects". *Int J Sports Med.* 11 Suppl 2: S129-42.
- Bannai S (1986) "Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts". *J Biol Chem.* 261: 2256-63.
- Bannister JV, Bannister WH et al. (1987) "Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase". *CRC Crit Rev Biochem.* 22: 111-80.
- Bar PR, Amelink GJ et al. (1988) "Prevention of exercise-induced muscle membrane damage by oestradiol". *Life Sci.* 42: 2677-81.
- Barclay CJ (1996) "Mechanical efficiency and fatigue of fast and slow muscles of the mouse". *J Physiol.* 497 (Pt 3): 781-94.
- Barclay JK and Hansel M (1991) "Free radicals may contribute to oxidative skeletal muscle fatigue". *Can J Physiol Pharmacol.* 69: 279-84.

- Barkley KB and Gregory EM (1990) "Tetrameric manganese superoxide dismutases from anaerobic *Actinomyces*". *Arch Biochem Biophys.* 280: 192-200.
- Bates TE, Loesch A et al. (1995) "Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver". *Biochem Biophys Res Commun.* 213: 896-900.
- Bates TE, Loesch A et al. (1996) "Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation?" *Biochem Biophys Res Commun.* 218: 40-4.
- Becker BF (1993) "Towards the physiological function of uric acid". *Free Radic Biol Med.* 14: 615-31.
- Beckman JS (1996) "Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite". *Chem Res Toxicol.* 9: 836-44.
- Beckman JS, Beckman TW et al. (1990) "Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 1620-4.
- Beckman JS, Chen J et al. (1994) "Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration". *Prog Brain Res.* 103: 371-80.
- Beckman JS and Koppenol WH (1996) "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly". *Am J Physiol.* 271: C1424-37.
- Beckman JS, Parks DA et al. (1989) "A sensitive fluorometric assay for measuring xanthine dehydrogenase and oxidase in tissues". *Free Radic Biol Med.* 6: 607-15.
- Behar D, Czaspski G et al. (1979) "The acid dissociation constant and decay kinetics of parhydroxyl radical." *J. Phys.Chem.* 74: 3209-3215.
- Bejma Jandji LL (1999) "Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle". *J Appl Physiol.* 87: 465-70.
- Bellomo C, Jewel SA et al. (1982) "Regulation of intracellular calcium compartmentation: Studies with isolated hepatocytes and t-butylhydroperoxide." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 6842-6846.
- Benboubetra M, Gleeson A et al. (1997) "Circulating anti-(xanthine oxidoreductase) antibodies in healthy human adults". *Eur J Clin Invest.* 27: 611-9.
- Bendich A (1997) "Vitamin C safety in humans". *Vitamin C in health and disease.* (L. Packer and K. Funchs Editors). New York: Marcel Dekker.

- Bendich A and Machlin LJ (1988) "Safety of oral intake of vitamin E". *Am J Clin Nutr.* 48: 612-9.
- Bendich A, Machlin LJ et al. (1986) "The antioxidant role of vitamina C". *Free radical biology and medicine.* 2: 419-444.
- Benzi G and Moretti A (1995) "Age and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system." *Free Rad. Biol. Med.* 19: 77-101.
- Berard A, Bravo G et al. (1997) "Meta-analysis of the effectiveness of physical activity for the prevention of bone loss in postmenopausal women". *Osteoporos Int.* 7: 331-7.
- Berg G, Andersson RG et al. (1987) "Effects of enprofylline, a new xanthine derivate, on human pregnant myometrium". *Am J Obstet Gynecol.* 156: 958-62.
- Bergmeyer HU, Horder M et al. (1986) "International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Scientific Committee, Analytical Section: approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase (L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.1)". *J Clin Chem Clin Biochem.* 24: 497-510.
- Bermejo P, Gomez-Serranillos P et al. (1997) "Determination of malonaldehyde in Alzheimer's disease: a comparative study of high-performance liquid chromatography and thiobarbituric acid test". *Gerontology.* 43: 218-22.
- Berne RM (1963) "Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow". *Am J Physiol.* 204: 317-22.
- Beyer RE, Segura-Aguilar JE et al. (1988) "The anticancer enzyme DT diaphorase is induced selectively in liver during ascites hepatoma growth". *Anticancer Res.* 8: 233-8.
- Biemond P, Swaak AJ et al. (1986) "Superoxide-dependent and -independent mechanisms of iron mobilization from ferritin by xanthine oxidase. Implications for oxygen-free-radical-induced tissue destruction during ischaemia and inflammation". *Biochem J.* 239: 169-73.
- Bird RP and Draper HH (1984) "Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination." *Methods Enzymol.* 105: 299-305.
- Blomstrand E, Celsing F et al. (1988) "Changes in plasma concentrations of aromatic and branched-chain amino acids during sustained exercise in man and their possible role in fatigue". *Acta Physiol Scand.* 133: 115-21.

- Blough E, Dineen B et al. (1999) "Extraction of nuclear proteins from striated muscle tissue". *Biotechniques*. 26: 202-4, 206.
- Bondy SC (1992) "Reactive oxygen species: relation to aging and neurotoxic damage". *Neurotoxicology*. 13: 87-100.
- Booth EW (1991) "Compassion fatigue". *Jama*. 266: 362.
- Boppart MD, Hirshman MF et al. (2001) "Static stretch increases c-Jun NH₂-terminal kinase activity and p38 phosphorylation in rat skeletal muscle". *Am J Physiol Cell Physiol*. 280: C352-8.
- Borel P, Grolier P et al. (1998) "Oxidative stress status and antioxidant status are apparently not related to carotenoid status in healthy subjects". *J Lab Clin Med*. 132: 61-6.
- Boveris A (1977) "Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide". *Adv Exp Med Biol*. 78: 67-82.
- Boveris A and Cadenas E (1975) "Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration". *FEBS Lett*. 54: 311-4.
- Boveris A and Chance BC (1973) "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen". *Biochem J*. 143: 707-716.
- Boveris A, Costa LE et al. (2000) "Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide". *Ann N Y Acad Sci*. 899: 121-35.
- Boveris A, Oshino N et al. (1972) "The cellular production of hydrogen peroxyde." *Biochem. J*. 128: 617-630.
- Bowie A and O'Neill LA (2000) "Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries". *Biochem Pharmacol*. 59: 13-23.
- Bradford MM (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal Biochem*. 72: 248-54.
- Bradley SJ, Kingwell BA et al. (1999) "Nitric oxide synthase inhibition reduces leg glucose uptake but not blood flow during dynamic exercise in humans". *Diabetes*. 48: 1815-21.
- Brady PS, Brady LJ et al. (1979) "Selenium, vitamin E and the response to swimming stress in the rat". *J Nutr*. 109: 1103-9.
- Brady PS, Ku PK et al. (1978) "Lack of effect of selenium supplementation on the response of the equine erythrocyte glutathione system and plasma enzymes to exercise". *J Anim Sci*. 47: 492-6.

- Brand MD and Murphy MP (1987) "Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells." *Biol. Rev.* 62: 141-193.
- Bredt DS, Glatt CE et al. (1991) "Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase". *Neuron.* 7: 615-24.
- Breen AP and Murphy JA (1995) "Reactions of oxyl radicals with DNA." *Free Rad. Biol. Med.* 18: 1033-1077.
- Brigelius R, Muckel C et al. (1983) "Identification and quantification of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide". *Biochem Pharmacol.* 32: 2529-2534.
- Brooks GA (1986) "The lactate shuttle during exercise and recovery". *Med Sci Sports Exerc.* 18: 360-8.
- Brooks GA, Hittelman KJ et al. (1971) "Temperature, skeletal muscle mitochondrial functions, and oxygen debt". *Am J Physiol.* 220: 1053-9.
- Brooks GA and White TP (1978) "Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise". *J Appl Physiol.* 45: 1009-15.
- Bruton JD, Lannergren J et al. (1998) "Mechanisms underlying the slow recovery of force after fatigue: importance of intracellular calcium". *Acta Physiol Scand.* 162: 285-93.
- Bush PA, Gonzalez NE et al. (1992) "Nitric oxide synthase from cerebellum catalyzes the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citrulline from L-arginine". *Biochem Biophys Res Commun.* 185: 960-6.
- Bushell A, Klenerman L et al. (1996) "Ischemia-reperfusion-induced muscle damage. Protective effect of corticosteroids and antioxidants in rabbits". *Acta Orthop Scand.* 67: 393-8.
- Buskirk E (1966) "The effect of altitude on physical performance". *Athletic Inst.* 65-72.
- Byers T (1993) "Vitamin E supplements and coronary heart disease." *Nutr. Rev.* 51: 333-345.
- Byrd SK (1992) "Alterations in the sarcoplasmic reticulum: a possible link to exercise-induced muscle damage". *Med Sci Sports Exerc.* 24: 531-6.
- Byrd SK, Bode AK et al. (1989) "Effects of exercise of varying duration on sarcoplasmic reticulum function". *J Appl Physiol.* 66: 1383-9.
- Cadenas E, Boveris A et al. (1977) "Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADPH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria". *Arch. Biochem. Biophys.* 180: 248-257.

- Cakatay U, Telci A et al. (2003) "Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle". *Clin Biochem.* 36: 51-5.
- Cannon JG, Orencole SF et al. (1990) "Acute phase response in exercise: interaction of age and vitamin E on neutrophils and muscle enzyme release". *Am J Physiol.* 259: R1214-9.
- Capdevila J, Chacos N et al. (1981) "Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78: 5362-6.
- Carmeli E, Ayalon M et al. (2002) "Isokinetic leg strength of institutionalized older adults with mental retardation with and without Down's syndrome". *J Strength Cond Res.* 16: 316-20.
- Chambers DE, Parks DA et al. (1985) "Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia". *J Mol Cell Cardiol.* 17: 145-52.
- Chance B, Sies H et al. (1979) "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs". *Physiol Rev.* 59: 527-605.
- Chance BandWilliams GR (1956) "Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. VI. The effects of adenosine diphosphate on azide-treated mitochondria". *J Biol Chem.* 221: 477-89.
- Chang LY, Slot JW et al. (1988) "Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes". *J Cell Biol.* 107: 2169-79.
- Charlat MI, O'Neill PG et al. (1987) "Evidence for a pathogenetic role of xanthine oxidase in the "stunned" myocardium". *Am J Physiol.* 252: H566-77.
- Cheeseman KH and Slater TF (1993) "An introduction to free radical biochemistry". *Br. Med. Bull.* 49: 588-603.
- Cheshire JL, Williams BR et al. (1999) "Involvement of double-stranded RNA-activated protein kinase in the synergistic activation of nuclear factor-kappaB by tumor necrosis factor-alpha and gamma-interferon in preneuronal cells". *J Biol Chem.* 274: 4801-6.
- Chirgwin JM, Przybyla AE et al. (1979) "Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease". *Biochemistry.* 18: 5294-9.
- Ciriolo MR, Civitareale P et al. (1994) "Purification and characterization of Ag,Zn-superoxide dismutase from *Saccharomyces cerevisiae* exposed to silver". *J Biol Chem.* 269: 25783-7.

- Clementi E, Brown GC et al. (1999) "On the mechanism by which vascular endothelial cells regulate their oxygen consumption". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 1559-62.
- Commoner B, Townsend J et al. (1954) "Free radicals in biological materials". *Nature*. 174: 689-91.
- Cooper CE, Volvaard NB et al. (2002) "Exercise, free radicals and oxidative stress". *Biochem Soc Trans*. 30: 280-5.
- Corte ED and Stirpe F (1972) "The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme". *Biochem J*. 126: 739-45.
- Costill DL, Sparks K et al. (1971) "Muscle glycogen utilization during exhaustive running". *J Appl Physiol*. 31: 353-6.
- Crapo JD, Oury T et al. (1992) "Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89: 10405-9.
- Crenshaw AG, Friden J et al. (1993) "Increased technetium uptake is not equivalent to muscle necrosis: scintigraphic, morphological and intramuscular pressure analyses of sore muscles after exercise". *Acta Physiol Scand*. 148: 187-98.
- Crinnion JN, Homer-Vanniasinkam S et al. (1996) "Role of neutrophil-endothelial adhesion in skeletal muscle reperfusion injury". *Br J Surg*. 83: 251-4.
- Cross AJ, Slater P et al. (1987) "Sodium dependent D-[3H]aspartate binding in cerebral cortex in patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases". *Neurosci Lett*. 79: 213-7.
- Cutler RG (1984) "Urate and ascorbate: their possible roles as antioxidants in determining longevity of mammalian species". *Arch Gerontol Geriatr*. 3: 321-48.
- Czapski G and Goldstein S (1995) "The role of the reactions of .NO with superoxide and oxygen in biological systems: a kinetic approach". *Free Radic Biol Med*. 19: 785-94.
- Daiho T and Kanazawa T (1994) "Reduction of disulfide bonds in sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase by dithiothreitol causes inhibition of phosphoenzyme isomerization in catalytic cycle. This reduction requires binding of both purine nucleotide and Ca²⁺ to enzyme". *J Biol Chem*. 269: 11060-4.

- Danzl DF, Vicario SJ et al. (1986) "Closed reduction of anterior subcoracoid shoulder dislocation. Evaluation of an external rotation method". *Orthop Rev.* 15: 311-5.
- Das DK, Engelman RM et al. (1987) "Role of xanthine oxidase inhibitor as free radical scavenger: a novel mechanism of action of allopurinol and oxypurinol in myocardial salvage". *Biochem Biophys Res Commun.* 148: 314-9.
- Davies KJ, Doroshov JH et al. (1983) "Mitochondrial NADH dehydrogenase-catalyzed oxygen radical production by adriamycin, and the relative inactivity of 5-iminodaunorubicin". *FEBS Lett.* 153: 227-30.
- Davies KJ and Lin SW (1988) "Oxidatively denatured proteins are degraded by an ATP-independent proteolytic pathway in *Escherichia coli*". *Free Radic Biol Med.* 5: 225-36.
- Davies KJ, Packer L et al. (1981) "Biochemical adaptation of mitochondria, muscle, and whole-animal respiration to endurance training". *Arch Biochem Biophys.* 209: 539-54.
- Davies KJA (1987) "Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects." *J. Biol. Chem.* 262: 9895-9901.
- Davies KJA, Quintanilha AT et al. (1982) "Free radicals and tissue damage produced by exercise." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 1198-1205.
- de Oliveira SL, Diniz DB et al. (2003) "Carbohydrate-energy restriction may protect the rat brain against oxidative damage and improve physical performance". *Br J Nutr.* 89: 89-96.
- Dean RT, Giese S et al. (1993) "Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins". *Trends Biochem Sci.* 18: 437-41.
- Deby C and Deby-Dupont G (1981) "Mechanism of intervention of uric acid metabolism in PG biosynthesis". *Agents Actions.* 11: 651-2.
- Dekkers JC, van Doornen LJ et al. (1996) "The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage". *Sports Med.* 21: 213-38.
- Della Corte E and Stirpe F (1968) "The regulation of rat-liver xanthine oxidase: Activation by proteolytic enzymes". *FEBS Lett.* 2: 83-84.
- Demple B and Halbrook J (1983) "Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*". *Nature.* 304: 466-8.
- Deneke SM and Fanburg BL (1989) "Regulation of cellular glutathione". *Am J Physiol.* 257: L163-73.

- Dennis SC, Noakes TD et al. (1997) "Nutritional strategies to minimize fatigue during prolonged exercise: fluid, electrolyte and energy replacement". *J Sports Sci.* 15: 305-13.
- Dignam JD, Lebovitz RM et al. (1983) "Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei". *Nucleic Acids Res.* 11: 1475-89.
- Dikov A, Alexandrov I et al. (1988) "[Ultracytochemical demonstration of enzymes by reduction of potassium hexacyanoferrate (III). I. A method for demonstration of xanthine oxidase]". *Acta Histochem.* 83: 107-15.
- Dillard CJ, Litov RE et al. (1978) "Effects of dietary vitamin E, selenium, and polyunsaturated fats on in vivo lipid peroxidation in the rat as measured by pentane production". *Lipids.* 13: 396-402.
- DiLorenzo TM, Bargman EP et al. (1999) "Long-term effects of aerobic exercise on psychological outcomes". *Prev Med.* 28: 75-85.
- Diplock AT, Charleux JL et al. (1998) "Functional food science and defence against reactive oxidative species". *Br J Nutr.* 80 Suppl 1: S77-112.
- Dizdaroglu M (1993) "Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry". *FEBS Lett.* 315: 1-6.
- Donaldson SK, Hermansen L et al. (1978) "Differential, direct effects of H⁺ on Ca²⁺ -activated force of skinned fibers from the soleus, cardiac and adductor magnus muscles of rabbits". *Pflugers Arch.* 376: 55-65.
- Doroshov JH and Davies KJ (1983) "Comparative cardiac oxygen radical metabolism by anthracycline antibiotics, mitoxantrone, bisantrene, 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide, and neocarzinostatin". *Biochem Pharmacol.* 32: 2935-9.
- Downey JM, Hearse DJ et al. (1988) "The role of xanthine oxidase during myocardial ischemia in several species including man". *J Mol Cell Cardiol.* 20 Suppl 2: 55-63.
- Droge W, Eck HP et al. (1992) "HIV-induced cysteine deficiency and T-cell dysfunction--a rationale for treatment with N-acetylcysteine". *Immunol Today.* 13: 211-4.
- Duarte JA, Appell HJ et al. (1993) "Endothelium-derived oxidative stress may contribute to exercise-induced muscle damage". *Int J Sports Med.* 14: 440-3.
- Dufresne SD, Bjorbaek C et al. (2001) "Altered extracellular signal-regulated kinase signaling and glycogen metabolism in skeletal muscle from p90 ribosomal S6 kinase 2 knockout mice". *Mol Cell Biol.* 21: 81-7.

- Duke MV and Salin ML (1985) "Purification and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Ginkgo biloba*". Arch Biochem Biophys. 243: 305-14.
- Dumelin EE and Tappel AIL (1977) "Hydrocarbon gases produced during in vitro peroxidation of polyunsaturated fatty acids and decomposition of preformed hydroperoxides." Lipids. 12: 894-900.
- Duncan RA and Davis JS (1991) "Prostaglandin F₂ alpha stimulates inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate formation in bovine luteal cells". Endocrinology. 128: 1519-26.
- Dupont-Versteegden EE, McCarter RJ et al. (1994) "Voluntary exercise decreases progression of muscular dystrophy in diaphragm of mdx mice". J Appl Physiol. 77: 1736-41.
- Duthie GG, Robertson JD et al. (1990) "Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running". Arch Biochem Biophys. 282: 78-83.
- Edwards RH (1981) "Human muscle function and fatigue". Ciba Found Symp. 82: 1-18.
- Eiserich JP, Hristova M et al. (1998) "Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils". Nature. 391: 393-7.
- Elion GB, Kovensky A et al. (1966) "Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase." Biochem. Pharmacol. 15: 863-880.
- Erdman JW, Jr., Bierer TL et al. (1993) "Absorption and transport of carotenoids". Ann N Y Acad Sci. 691: 76-85.
- Essig DA and Nosek TM (1997) "Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species?" Can J Appl Physiol. 22: 409-28.
- Esterbauer H, Schaur RJ et al. (1991) "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes." Free Rad. Biol. Med. 11: 81-128.
- Esterbauer H and Zollner H (1989) "Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products." Free Rad. Biol. Med. 7: 197-203.
- Estrela JM, Gil F et al. (1988) "Alpha-adrenergic modulation of glutathione metabolism in isolated rat hepatocytes". Am J Physiol. 255: E801-5.
- Estrela JM, Saez GT et al. (1983) "The effect of cysteine and N-acetylcysteine on rat liver glutathione." Biochem. Pharmacol. 32: 3483-3485.

- Fenton HJH (1894) "Oxidation of tartaric acid in the presence of iron." *J. Chem. Soc. Trans.* 65: 899-910.
- Finkel T and Holbrook NJ (2000) "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing". *Nature.* 408: 239-47.
- Flohe L, Brigelius-Flohe R et al. (1997) "Redox regulation of NF-kappa B activation". *Free Radic Biol Med.* 22: 1115-26.
- Force T and Bonventre JV (1998) "Growth factors and mitogen-activated protein kinases". *Hypertension.* 31: 152-61.
- Forstrom JW, Zakowski JJ et al. (1978) "Identification of the catalytic site of the rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine." *Biochemistry.* 17: 2639-2644.
- Foster RE and Estabrook RW (1993) "Is oxygen an essential nutrient?" *Annu. Rev. Nutr.* 13: 383-403.
- Fraga CG, Shigenaga MK et al. (1990) "Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 4533-4537.
- Frantseva MV, Carlen PL et al. (1999) "A submersion method to induce hypoxic damage in organotypic hippocampal cultures". *J Neurosci Methods.* 89: 25-31.
- Frederiks WM and Bosch KS (1996) "The proportion of xanthine oxidase activity of total xanthine oxidoreductase activity in situ remains constant in rat liver under various (patho)physiological conditions". *Hepatology.* 24: 1179-84.
- Freeman BA and Crapo J (1982) "Biology of disease: Free radicals and tissue injure." *Lab. Invest.* 47: 412-426.
- Frei B (1994) "Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action." *Am. J. Med.* 97: 5S-13S.
- Fridovich I (1974) "Superoxide dismutases". *Adv Enzimol.* 41: 35-97.
- Fridovich I (1978) "Superoxide dismutases: defence against endogenous superoxide radical". *Ciba Found Symp.* 77-93.
- Fridovich I (1986) "Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity". *Free radicals in biology.* 1. Pryor W.A. (ed) New York, Academic Press: 239-246.
- Fridovich I (1995) "Superoxide radical and superoxide dismutases". *Annu Rev Biochem.* 64: 97-112.
- Fridovich I (1997) "Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters". *J Biol Chem.* 272: 18515-7.

- Fridovich I and Handler P (1962) "Xanthine oxidase. V. Differential inhibition of the reduction of various electron acceptors". *J Biol Chem.* 237: 916-21.
- Friedenreich CM, Courneya KS et al. (1998) "The lifetime total physical activity questionnaire: development and reliability". *Med Sci Sports Exerc.* 30: 266-74.
- Friedl HP, Till GO et al. (1989) "Roles of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin". *Am J Pathol.* 135: 203-17.
- Fucci L, Oliver CN et al. (1983) "Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: Possible implication in protein turnover and aging." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 1521-1525.
- Galen RS (1979) "The enzyme diagnosis of myocardial infarction in the orthopedic patient". *Orthop Clin North Am.* 10: 451-63.
- Galter D, Mihm S et al. (1994) "Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factor kappa B and the activator protein-1". *Eur J Biochem.* 221: 639-48.
- Gaston B (1999) "Nitric oxide and thiol groups". *Biochim Biophys Acta.* 1411: 323-33.
- Geller BL and Winge DR (1982) "Rat liver Cu,Zn-superoxide dismutase. Subcellular location in lysosomes". *J Biol Chem.* 257: 8945-52.
- Gerbitz KD (1992) "Does the mitochondrial DNA play a role in the pathogenesis of diabetes?" *Diabetologia.* 35: 1181-6.
- Gerlach E, Deuticke B et al. (1963) "[on the Behavior of Nucleotides and Their Dephosphorylation Degradation Products in the Kidney in Ischemia and Short-Term Post-Ischemic Re-Establishment of Blood Circulation]". *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere.* 278: 296-315.
- Ghezzi P, Bianchi M et al. (1984) "Enhanced xanthine oxidase activity in mice treated with interferon and interferon inducers". *Biochem Biophys Res Commun.* 119: 144-9.
- Ghio AJ, Kennedy TP et al. (2002) "Iron regulates xanthine oxidase activity in the lung". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 283: L563-72.
- Gibala MJ (2001) "Regulation of skeletal muscle amino acid metabolism during exercise". *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 11: 87-108.
- Giesecke D and Tiemeyer W (1984) "Defect of uric acid uptake in Dalmatian dog liver". *Experientia.* 40: 1415-6.
- Giler S, Sperling O et al. (1975) "Serum xanthine oxidase in jaundice". *Clin Chim Acta.* 63: 37-40.

- Giulivi C (1998) "Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism". *Biochem J.* 332 (Pt 3): 673-9.
- Godber BL, Doel JJ et al. (2000) "A new route to peroxynitrite: a role for xanthine oxidoreductase". *FEBS Lett.* 475: 93-6.
- Godin DVandWohaieb SA (1988) "Nutritional deficiency, starvation, and tissue antioxidant status". *Free Radic Biol Med.* 5: 165-76.
- Gohil K, Packer L et al. (1986) "Vitamin E deficiency and vitamin C supplements: exercise and mitochondrial oxidation". *J Appl Physiol.* 60: 1986-91.
- Goldstein J, Paveto C et al. (2000) "Immuno and cytochemical localization of *Trypanosoma cruzi* nitric oxide synthase". *Biocell.* 24: 217-22.
- Goldstein S, Czapski G et al. (2000) "Tyrosine nitration by simultaneous generation of (.)NO and O-(2) under physiological conditions. How the radicals do the job". *J Biol Chem.* 275: 3031-6.
- Gomez-Cabrera MC, Pallardo FV et al. (2003) "Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France". *Jama.* 289: 2503-4.
- Goodyear LJ, Chang PY et al. (1996) "Effects of exercise and insulin on mitogen-activated protein kinase signaling pathways in rat skeletal muscle". *Am J Physiol.* 271: E403-8.
- Gore M, Fiebig R et al. (1998) "Endurance training alters antioxidant enzyme gene expression in rat skeletal muscle". *Can J Physiol Pharmacol.* 76: 1139-45.
- Goto S, Nakamura A et al. (1999) "Carbonylated proteins in aging and exercise: immunoblot approaches". *Mech Ageing Dev.* 107: 245-53.
- Goto S, Takahashi R et al. (2001) "Implications of protein degradation in aging". *Ann N Y Acad Sci.* 928: 54-64.
- Granger DN, Hollwarth ME et al. (1986) "Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals". *Acta Physiol Scand Suppl.* 548: 47-63.
- Granger DN and Kubes P (1996) "Nitric oxide as antiinflammatory agent". *Methods Enzymol.* 269: 434-42.
- Granger DN, McCord JM et al. (1986) "Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine". *Gastroenterology.* 90: 80-4.
- Granger DN, Rutili G et al. (1981) "Superoxide radicals in feline intestinal ischemia". *Gastroenterology.* 81: 22-29.

- Grant AJ, Jessup W et al. (1993) "Inefficient degradation of oxidized regions of protein molecules". *Free Radic Res Commun.* 18: 259-67.
- Green HJ (1997) "Mechanisms of muscle fatigue in intense exercise". *J Sports Sci.* 15: 247-56.
- Greenwald RA and Moy WW (1980) "Effect of oxygen derived free radicals on hyaluronic acid". *Arthritis Rheum.* 23: 455-463.
- Greger R, Lang F et al. (1976) "Renal excretion of purine metabolites, urate and allantoin, by the mammalian kidney". *Int Rev Physiol.* 11: 257-81.
- Gresser U (1991) "[Uric acid level in blood donors of southern Germany--almost constant since 1971]". *Fortschr Med.* 109: 449.
- Griendling KK, Minieri CA et al. (1994) "Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells". *Circ Res.* 74: 1141-8.
- Griffith OW and Meister A (1985) "Origin and turnover of mitochondrial glutathione". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 4668-4672.
- Grisham MB, Jourdain D et al. (1999) "Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation". *Am J Physiol.* 276: G315-21.
- Grisotto PC, dos Santos AC et al. (2000) "Indicators of oxidative injury and alterations of the cell membrane in the skeletal muscle of rats submitted to ischemia and reperfusion". *J Surg Res.* 92: 1-6.
- Grootveld M, Henderson EB et al. (1991) "Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise of the inflamed rheumatoid joint. Detection of abnormal low-molecular-mass metabolites by proton-n.m.r. spectroscopy." *Biochem. J.* 273: 459-467.
- Grozdanovic Z and Baumgarten HG (1999) "Nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: a signaling component of the dystrophin-glycoprotein complex". *Histol Histopathol.* 14: 243-56.
- Grum CM, Ragsdale RA et al. (1986) "Absence of xanthine oxidase or xanthine dehydrogenase in the rabbit myocardium". *Biochem Biophys Res Commun.* 141: 1104-8.
- Grune T, Reinheckel T et al. (1997) "Degradation of oxidized proteins in mammalian cells". *Faseb J.* 11: 526-34.
- Gutmann I and Wahlefeld AW (1974) "L-Lactate. Determination with lactate dehydrogenase and NAD". *Methods of Enzymatic Analysis* (Ed. Bergmeyer, H.U.) Academic Press. New York. 1464-1468.

- Gutteridge JM and Stocks J (1981) "Caeruloplasmin: physiological and pathological perspectives". *Crit Rev Clin Lab Sci.* 14: 257-329.
- Haber F and Weiss J (1932) "Über die Katalyse des Hydroperoxydes." *Naturweiss.* 20: 948.
- Haber F and Weiss J (1934) "The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts." *Proc. R. Soc. London.* 147: 332-351.
- Hageman HH, Bast A et al. (1992) "Monitoring of oxidative free radical damage in vivo: Analytical aspects". *Chem. Biol. Interactions.* 82: 243-293.
- Halliwell B (1985) "Use of desferrioxamine as a 'probe' for iron-dependent formation of hydroxyl radicals. Evidence for a direct reaction between desferal and the superoxide radical". *Biochem Pharmacol.* 34: 229-33.
- Halliwell B (1991) "Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease." *Am. J. Med.* 91: 14S-22S.
- Halliwell B (1994) "Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence?" *Lancet.* 344: 721-724.
- Halliwell B (1996) "Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation". *Biochemical Society Transactions.* 24: 1023-1027.
- Halliwell B (1996) "Antioxidants in human health and disease." *Annu. Rev. Nutr.* 16: 33-50.
- Halliwell B and Auroma OI (1991) "DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism of action and measurement in mammalian systems". *FEBS Lett.* 281: 9-19.
- Halliwell B and Gutteridge JM (1990) "The antioxidants of human extracellular fluids". *Arch Biochem Biophys.* 280: 1-8.
- Halliwell B and Gutteridge JM (1995) "The definition and measurement of antioxidants in biological systems". *Free Radic Biol Med.* 18: 125-6.
- Halliwell B and Gutteridge JMC (1986) "Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts". *Arch. Biochem. Biophys.* 246: 501-514.
- Han D, Handelman G et al. (1997) "Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization". *Biofactors.* 6: 321-38.
- Han J, Lee JD et al. (1994) "A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells". *Science.* 265: 808-11.
- Han J, Lee JD et al. (1996) "Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6)". *J Biol Chem.* 271: 2886-91.
- Hannon JP, Chinn KS et al. (1969) "Effects of acute high-altitude exposure on body fluids". *Fed Proc.* 28: 1178-84.

- Hargreaves MH and Snow R (2001) "Amino acids and endurance exercise". *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 11: 133-45.
- Harris ED (1992) "Regulation of antioxidant enzymes". *Faseb J.* 6: 2675-83.
- Harrison R (2002) "Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?" *Free Radic Biol Med.* 33: 774-97.
- Hassoun PM, Yu FS et al. (1998) "Upregulation of xanthine oxidase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and hypoxia. Role in acute lung injury". *Am J Respir Crit Care Med.* 158: 299-305.
- Hassoun PM, Yu FS et al. (1994) "Regulation of endothelial cell xanthine dehydrogenase xanthine oxidase gene expression by oxygen tension". *Am J Physiol.* 266: L163-71.
- Hayashi T, Hirshman MF et al. (1999) "Skeletal muscle contractile activity in vitro stimulates mitogen-activated protein kinase signaling". *Am J Physiol.* 277: C701-7.
- Hayes A and Williams DA (1996) "Beneficial effects of voluntary wheel running on the properties of dystrophic mouse muscle". *J Appl Physiol.* 80: 670-9.
- Hayward R, Ferrington DA et al. (1999) "Effects of dietary protein on enzyme activity following exercise-induced muscle injury". *Med Sci Sports Exerc.* 31: 414-20.
- Hazelton GA and Lang CA (1980) "Glutathione contents of tissues in the aging mouse". *Biochem J.* 188: 25-30.
- Hazzalin CA and Mahadevan LC (2002) "MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch?" *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3: 30-40.
- Helain MA (1993) "Exercise-induced oxidative stress." *Med. Sci. Sports.* 25: 218-224.
- Hellsten Y (1994) "Xanthine dehydrogenase and purine metabolism in man. With special reference to exercise". *Acta Physiol Scand Suppl.* 621: 1-73.
- Hellsten Y, Ahlborg G et al. (1988) "Indication of in vivo xanthine oxidase activity in human skeletal muscle during exercise". *Acta Physiol Scand.* 134: 159-60.
- Hellsten Y, Frandsen U et al. (1997) "Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation". *J Physiol.* 498 (Pt 1): 239-48.
- Hellsten Y, Hansson HA et al. (1996) "Increased expression of xanthine oxidase and insulin-like growth factor I (IGF-I) immunoreactivity in skeletal

- muscle after strenuous exercise in humans". *Acta Physiol Scand.* 157: 191-7.
- Hellsten Y, Svensson M et al. (2001) "Allantoin formation and urate and glutathione exchange in human muscle during submaximal exercise". *Free Radic Biol Med.* 31: 1313-22.
 - Hellsten-Westing Y (1993) "Immunohistochemical localization of xanthine oxidase in human cardiac and skeletal muscle". *Histochemistry.* 100: 215-22.
 - Hellsten-Westing Y (1993) "Immunohistochemical localization of xanthine oxidase in human cardiac and skeletal muscle". *Histochemistry.* 100: 215-22.
 - Hellsten-Westing Y, Balsom PD et al. (1993) "The effect of high-intensity training on purine metabolism in man". *Acta Physiol Scand.* 149: 405-12.
 - Hellsten-Westing Y, Kaijser L et al. (1994) "Exchange of purines in human liver and skeletal muscle with short-term exhaustive exercise". *Am J Physiol.* 266: R81-6.
 - Hellsten-Westing Y, Norman B et al. (1993) "Decreased resting levels of adenine nucleotides in human skeletal muscle after high-intensity training". *J Appl Physiol.* 74: 2523-8.
 - Hellsten-Westing Y, Sollevi A et al. (1991) "Plasma accumulation of hypoxanthine, uric acid and creatine kinase following exhausting runs of differing durations in man". *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 62: 380-4.
 - Hermansen L (1979) "Effect of acidosis on skeletal muscle performance during maximal exercise in man". *Bull Eur Physiopathol Respir.* 15: 229-41.
 - Herndon DN and Parks DH (1986) "Comparison of serial debridement and autografting and early massive excision with cadaver skin overlay in the treatment of large burns in children". *J Trauma.* 26: 149-52.
 - Herrero A and Barja G (1997) "Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon". *Mech Ageing Dev.* 98: 95-111.
 - Herzenberg LA, Stall AM et al. (1986) "The Ly-1 B cell lineage". *Immunol Rev.* 93: 81-102.
 - Heunks LM, Vina J et al. (1999) "Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease". *Am J Physiol.* 277: R1697-704.
 - Hille R and Massey V (1981) "Tight binding inhibitors of xanthine oxidase". *Pharmacol Ther.* 14: 249-63.

- Hille R and Massey V (1981) "Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase". *J Biol Chem.* 256: 9090-5.
- Hille R and Nishino T (1995) "Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase". *Faseb J.* 9: 995-1003.
- Hitka P, Vizek M et al. (2003) "Hypoxia and reoxygenation increase H₂O₂ production in rats". *Exp Lung Res.* 29: 585-92.
- Ho YS, Howard AJ et al. (1991) "Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase". *Am J Respir Cell Mol Biol.* 4: 278-86.
- Hoffman-Goetz L (1998) "Influence of physical activity and exercise on innate immunity". *Nutr Rev.* 56: S126-30.
- Hollander J, Fiebig R et al. (1999) "Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific adaptation to endurance training". *Am J Physiol.* 277: R856-62.
- Holloszy JO (1998) "Longevity of exercising male rats: effect of an antioxidant supplemented diet". *Mech Ageing Dev.* 100: 211-9.
- Holmgren A (1979) "Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Purification and characterization of glutaredoxin from *Escherichia coli*". *J Biol Chem.* 254: 3664-71.
- Hong KW, Lee WS et al. (1989) "Assessment of superoxide-mediated release of vascular-inhibitory factor(s) from endothelial cells by using a two-bath system". *Experientia.* 45: 320-2.
- Hortobagyi T and Denahan T (1989) "Variability in creatine kinase: methodological, exercise, and clinically related factors". *Int J Sports Med.* 10: 69-80.
- Hultman E, Spriet LL et al. (1986) "Biochemistry of muscle fatigue". *Biomed Biochim Acta.* 45: S97-106.
- Husain K and Hazelrigg SR (2002) "Oxidative injury due to chronic nitric oxide synthase inhibition in rat: effect of regular exercise on the heart". *Biochim Biophys Acta.* 1587: 75-82.
- Husain M and Moss B (2002) "Similarities in the induction of post-Golgi vesicles by the vaccinia virus F13L protein and phospholipase D". *J Virol.* 76: 7777-89.
- Iemitsu M, Miyauchi T et al. (2000) "Intense exercise causes decrease in expression of both endothelial NO synthase and tissue NO_x level in hearts". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279: R951-9.

- Ischiropoulos H, Nadziejko CE et al. (1990) "Effect of aging on pulmonary superoxide dismutase". *Mech Ageing Dev.* 52: 11-26.
- Ishibashi T, Lee CI et al. (1996) "Skeletal sarcoplasmic reticulum dysfunction induced by reactive oxygen intermediates derived from photoactivated rose bengal". *J Pharmacol Exp Ther.* 277: 350-8.
- Ishihara A, Yamasaki S et al. (1994) "[Inhibitory effect of running exercise on age-induced muscle atrophy]". *Nippon Seirigaku Zasshi.* 56: 111-7.
- Ishikawa T, Kobayashi K et al. (1989) "Evidence for leukotriene C4 transport mediated by an ATP-dependent glutathione S-conjugate carrier in rat heart and liver plasma membranes". *FEBS Lett.* 259: 95-8.
- Itoh H, Ohkuwa T et al. (2000) "Vitamin E supplementation attenuates leakage of enzymes following 6 successive days of running training". *Int J Sports Med.* 21: 369-74.
- Jackson MJ, Edwards RH et al. (1985) "Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle". *Biochim Biophys Acta.* 847: 185-90.
- Jackson MJ, Wagenmakers AJ et al. (1987) "Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on efflux of intracellular enzymes from skeletal muscle following experimental damage". *Biochem J.* 241: 403-7.
- Jarasch ED, Grund C et al. (1981) "Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium". *Cell.* 25: 67-82.
- Jenkins RR (1988) "Free radicals chemistry: Relationship to exercise". *Sport Med.* 5: 156-170.
- Jenkins RR, Friedland R et al. (1984) "The relationship of oxygen uptake to superoxide dismutase and catalase activity in human skeletal muscle". *Int J Sports Med.* 5: 11-4.
- Jennische E and Olivecrona H (1987) "Transient expression of insulin-like growth factor I immunoreactivity in skeletal muscle cells during postnatal development in the rat". *Acta Physiol Scand.* 131: 619-22.
- Jeroudi MO, Hartley CJ et al. (1994) "Myocardial reperfusion injury: role of oxygen radicals and potential therapy with antioxidants". *Am J Cardiol.* 73: 2B-7B.
- Jewett SL, Eddy LJ et al. (1989) "Is the autoxidation of catecholamines involved in ischemia-reperfusion injury?" *Free Radic Biol Med.* 6: 185-8.
- Ji LL (1993) "Antioxidant enzyme response to exercise and aging". *Med Sci Sports Exerc.* 25: 225-31.

- Ji LL and Fu R (1992) "Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide". *J Appl Physiol.* 72: 549-54.
- Ji LL and Leeuwenburgh C (1996) "Glutathione and exercise". *Pharmacology in exercise and sports* (Ed.Somani, S.) CRC Press. New York. 96-123.
- Ji LL, Stratman FW et al. (1988) "Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise". *Arch Biochem Biophys.* 263: 150-60.
- Joanny P, Steinberg J et al. (2001) "Operation Everest III (Comex'97): the effect of simulated severe hypobaric hypoxia on lipid peroxidation and antioxidant defence systems in human blood at rest and after maximal exercise". *Resuscitation.* 49: 307-14.
- Johns DR (1995) "Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Mitochondrial DNA and disease". *N Engl J Med.* 333: 638-44.
- Johnson JL, Waud WR et al. (1974) "Molecular basis of the biological function of molybdenum. Molybdenum-free xanthine oxidase from livers of tungsten-treated rats". *J Biol Chem.* 249: 5056-61.
- Johnson LV, Summerhayes IC et al. (1982) "Decreased uptake and retention of rhodamine 123 by mitochondria in feline sarcoma virus-transformed mink cells". *Cell.* 28: 7-14.
- Jones OT (1994) "The regulation of superoxide production by the NADPH oxidase of neutrophils and other mammalian cells". *Bioessays.* 16: 919-23.
- Jour'dheuil D, Jour'dheuil FL et al. (2001) "Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite. Implications for peroxynitrite-mediated oxidation reactions in vivo". *J Biol Chem.* 276: 28799-805.
- Kadambi A and Skalak TC (2000) "Role of leukocytes and tissue-derived oxidants in short-term skeletal muscle ischemia-reperfusion injury". *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 278: H435-43.
- Kaikkonen J, Kosonen L et al. (1998) "Effect of combined coenzyme Q10 and d-alpha-tocopheryl acetate supplementation on exercise-induced lipid peroxidation and muscular damage: a placebo-controlled double-blind study in marathon runners". *Free Radic Res.* 29: 85-92.
- Kanofsky JR (1989) "Singlet oxygen production by biological systems". *Chem Biol Interact.* 70: 1-28.
- Kanter MM, Nolte LA et al. (1993) "Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise". *J Appl Physiol.* 74: 965-9.

- Kappus H and Diplock AT (1992) "Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report". *Free Radic Biol Med.* 13: 55-74.
- Kasai H, Crain PF et al. (1986) "Formation of 8-hydroxiguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair." *Carcinogenesis.* 7: 1849-1851.
- Kasai H and Nishimura S (1984) "Hydroxylation of deoxy guanosine at the C-8 position by polyphenols and aminophenols in the presence of hydrogen peroxide and ferric ion". *Gann.* 75: 565-6.
- Kashiwagi A, Asahina T et al. (1994) "Abnormal glutathione metabolism and increased cytotoxicity caused by H₂O₂ in human umbilical vein endothelial cells cultured in high glucose medium". *Diabetologia.* 37: 264-9.
- Kaur H and Halliwell B (1994) "Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients". *FEBS Lett.* 350: 9-12.
- Kayyali US, Donaldson C et al. (2001) "Phosphorylation of xanthine dehydrogenase/oxidase in hypoxia". *J Biol Chem.* 276: 14359-65.
- Kennedy TA and Liebler DC (1992) "Peroxyl radical scavenging by beta-carotene in lipid bilayers. Effect of oxygen partial pressure". *J Biol Chem.* 267: 4658-63.
- Ketterer B (1986) "Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases". *Xenobiotica.* 16: 957-973.
- Khanna S, Atalay M et al. (1999) "Alpha-lipoic acid supplementation: tissue glutathione homeostasis at rest and after exercise". *J Appl Physiol.* 86: 1191-6.
- Kinnula VL, Crapo JD et al. (1995) "Biology of disease: Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung". *Lab. Invest.* 73: 3-19.
- Klein AS, Joh JW et al. (1996) "Allopurinol: discrimination of antioxidant from enzyme inhibitory activities". *Free Radic Biol Med.* 21: 713-7.
- Klingenberg M, Vorlop KD et al. (1990) "Immobilization of anaerobic thermophilic bacteria for the production of cell-free thermostable alpha-amylases and pullulanases". *Appl Microbiol Biotechnol.* 33: 494-500.
- Knight JA, Smith SE et al. (1988) "Urinary lipoperoxides quantified by liquid chromatography and determination of reference values for adults." *Clin. Chem.* 34: 1107-1110.
- Kobzik L, Reid MB et al. (1994) "Nitric oxide in skeletal muscle". *Nature.* 372: 546-8.

- Kolassa N, Pflieger K et al. (1970) "Specificity of adenosine uptake into the heart and inhibition by dipyridamole". *Eur J Pharmacol.* 9: 265-8.
- Korge P and Campbell KB (1995) "The importance of ATPase microenvironment in muscle fatigue: a hypothesis". *Int J Sports Med.* 16: 172-9.
- Korycka-Dahi M and Richardson T (1981) "Initiation of oxidative changes in food. Symposium: oxidative changes in milk." *J. Dairy Sciences.* 63: 1181-1208.
- Kosower NS and Kosower EM (1978) "The glutathione status of the cells". *Int. Rev. Cytol.* 54: 109-160.
- Koyama K, Kaya M et al. (1999) "Role of xanthine oxidase in delayed lipid peroxidation in rat liver induced by acute exhausting exercise". *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 80: 28-33.
- Kozłowski S, Brzezinska Z et al. (1985) "Exercise hyperthermia as a factor limiting physical performance: temperature effect on muscle metabolism". *J Appl Physiol.* 59: 766-73.
- Krasavage WJ and Terhaar CJ (1977) "d-alpha-Tocopheryl poly(ethylene glycol) 1000 succinate. Acute toxicity, subchronic feeding, reproduction, and teratologic studies in the rat". *J Agric Food Chem.* 25: 273-8.
- Kretzschmar M and Muller D (1993) "Aging, training and exercise. A review of effects on plasma glutathione and lipid peroxides". *Sports Med.* 15: 196-209.
- Krook A, Widegren U et al. (2000) "Effects of exercise on mitogen- and stress-activated kinase signal transduction in human skeletal muscle". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279: R1716-21.
- Kyparos A, Matziari C et al. (2001) "A decrease in soleus muscle force generation in rats after downhill running". *Can J Appl Physiol.* 26: 323-35.
- Kyriakis JM and Avruch J (2001) "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation". *Physiol Rev.* 81: 807-69.
- Lamas S, Marsden PA et al. (1992) "Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 6348-52.
- Lang JK, Gohil K et al. (1987) "Selenium deficiency, endurance exercise capacity, and antioxidant status in rats". *J Appl Physiol.* 63: 2532-5.

- Lau KS, Grange RW et al. (1998) "Skeletal muscle contractions stimulate cGMP formation and attenuate vascular smooth muscle myosin phosphorylation via nitric oxide". *FEBS Lett.* 431: 71-4.
- Laughlin MH, Simpson T et al. (1990) "Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training". *J Appl Physiol.* 68: 2337-43.
- Lawler JM, Powers SK et al. (1993) "Acute exercise and skeletal muscle antioxidant and metabolic enzymes: effects of fiber type and age". *Am J Physiol.* 265: R1344-50.
- Lawrence JD, Smith JL et al. (1975) "The effect of alpha tocopherol (vitamin E) and pyridoxine HCL (vitamin B6) on the swimming endurance of trained swimmers". *J Am Coll Health Assoc.* 23: 219-22.
- Leaf DA, Kleinman MT et al. (1997) "The effect of exercise intensity on lipid peroxidation". *Med Sci Sports Exerc.* 29: 1036-9.
- Lee C and Okabe E (1995) "Hydroxyl radical-mediated reduction of Ca(2+)-ATPase activity of masseter muscle sarcoplasmic reticulum". *Jpn J Pharmacol.* 67: 21-8.
- Lee J, Goldfarb AH et al. (2002) "Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayed onset of muscle soreness". *Med Sci Sports Exerc.* 34: 443-8.
- Lee JD, Ulevitch RJ et al. (1995) "Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase". *Biochem Biophys Res Commun.* 213: 715-24.
- Leeuwenburgh C, Hansen PA et al. (1999) "Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine". *Free Radic Biol Med.* 27: 186-92.
- Leeuwenburgh C and Ji LL (1996) "Alteration of glutathione and antioxidant status with exercise in unfed and refed rats". *J Nutr.* 126: 1833-43.
- Leeuwenburgh C and Ji LL (1998) "Glutathione and glutathione ethyl ester supplementation of mice alter glutathione homeostasis during exercise". *J Nutr.* 128: 2420-6.
- Leichtweis SB, Leeuwenburgh C et al. (1996) "Ischaemia-reperfusion induced alterations of mitochondrial function in hypertrophied rat heart". *Acta Physiol Scand.* 156: 51-60.
- Leipert B, Becker BF et al. (1992) "Different endothelial mechanisms involved in coronary responses to known vasodilators". *Am J Physiol.* 262: H1676-83.

- Leon-Velarde F, Bourin MC et al. (2001) "Differential alterations in cardiac adrenergic signaling in chronic hypoxia or norepinephrine infusion". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 280: R274-81.
- Levander OA, Morris VC et al. (1973) "Nutritional interrelationships among vitamin E, selenium, antioxidants and ethyl alcohol in the rat". *J Nutr.* 103: 536-42.
- Levine M, Conry-Cantilena C et al. (1996) "Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 3704-9.
- Levy EJ, Anderson ME et al. (1993) "On the synthesis and characterization of N-formyl glutathione and N-acetyl glutathione". *Anal Biochem.* 214: 135-7.
- Levy EJ, Anderson ME et al. (1993) "Transport of glutathione diethyl ester into human cells". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 9171-5.
- Lewisch SA and Levine RL (1995) "Determination of 2-oxohistidine by amino acid analysis." *Anal. Biochem.* 231: 440-446.
- Li H, Samouilov A et al. (2001) "Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrite reduction. Evaluation of its role in nitric oxide generation in anoxic tissues". *J Biol Chem.* 276: 24482-9.
- Li NandKarin M (1998) "Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF-kappaB through two distinct mechanisms". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 13012-7.
- Li QB, Haskell DW et al. (1999) "Coordinate and non-coordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato". *Plant Mol Biol.* 39: 21-34.
- Li ZW, Chu W et al. (1999) "The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis". *J Exp Med.* 189: 1839-45.
- Liang P, Hughes V et al. (1997) "Increased prevalence of mitochondrial DNA deletions in skeletal muscle of older individuals with impaired glucose tolerance: possible marker of glycemic stress". *Diabetes.* 46: 920-3.
- Lieber RL and Friden J (1999) "Mechanisms of muscle injury after eccentric contraction". *J Sci Med Sport.* 2: 253-65.
- Linder N, Rapola J et al. (1999) "Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues". *Lab Invest.* 79: 967-74.
- Linnane AW, Marzuki S et al. (1989) "Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases". *Lancet.* 642-645.

- Liochev SI and Fridovich I (1994) "The role of O₂⁻ in the production of HO₂·: In vitro and in vivo." *Free Rad. Biol. Med.* 16: 29-33.
- Liou HC and Baltimore D (1993) "Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I kappa B inhibitor system". *Curr Opin Cell Biol.* 5: 477-87.
- Lippman RD (1985) "Rapid in vivo quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man". *Exp. Gerontol.* 20: 1-5.
- Lipton SA, Choi YB et al. (1993) "A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds". *Nature.* 364: 626-32.
- Liu DF, Wang D et al. (1990) "The accessibility of the thiol groups on G- and F-actin of rabbit muscle". *Biochem J.* 266: 453-9.
- Lorch SA, Foust R, 3rd et al. (2000) "Immunohistochemical localization of protein 3-nitrotyrosine and S-nitrosocysteine in a murine model of inhaled nitric oxide therapy". *Pediatr Res.* 47: 798-805.
- Lounsbury KM, Hu Q et al. (2000) "Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature". *Free Radic Biol Med.* 28: 1362-9.
- Lowry OH, Rosebrough NJ et al. (1951) "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *J Biol Chem.* 193: 265-275.
- Lu SC, Garcia-Ruiz C et al. (1990) "Hormonal regulation of glutathione efflux". *J Biol Chem.* 265: 16088-95.
- Lukaski HC, Hoverson BS et al. (1990) "Physical training and copper, iron, and zinc status of swimmers". *Am J Clin Nutr.* 51: 1093-9.
- Lyman SV and Hurst JK (1995) "Role of compartmentation in promoting toxicity of leukocyte-generated strong oxidants". *Chem Res Toxicol.* 8: 833-40.
- Maclaren DP, Gibson H et al. (1989) "A review of metabolic and physiological factors in fatigue". *Exerc Sport Sci Rev.* 17: 29-66.
- Madsen K, Ertbjerg P et al. (1996) "Calcium content and respiratory control index of skeletal muscle mitochondria during exercise and recovery". *Am J Physiol.* 271: E1044-50.
- Maher JT, Manchanda SC et al. (1975) "Cardiovascular responsiveness to beta-adrenergic stimulation and blockade in chronic hypoxia". *Am J Physiol.* 228: 477-81.

- Manfredi TG, Fielding RA et al. (1991) "Plasma creatine kinase activity and exercise-induced muscle damage in older men". *Med Sci Sports Exerc.* 23: 1028-34.
- Mangels AR, Holden JM et al. (1993) "Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data." *J. Am. Dietetic Assoc.* 93: 284-296.
- Marklund SL, Holme E et al. (1982) "Superoxide dismutase in extracellular fluids". *Clin Chim Acta.* 126: 41-51.
- Markossian KA, Poghossian AA et al. (1978) "Superoxide dismutase activity of cytochrome oxidase". *Biochem Biophys Res Commun.* 81: 1336-1343.
- Martensson J and Meister A (1989) "Mitochondrial damage in muscle occurs after marked depletion of glutathione and is prevented by giving glutathione monoester". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86: 471-5.
- Massey V, Koami H et al. (1970) "On the mechanism by allopurinol and other pyrazolo (3,4-d) pyrimidines." *J.Biol.Chem.* 245: 2834-2844.
- Massey V, Komai H et al. (1970) "On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by allopurinol and other pyrazolo[3,4-d]pyrimidines". *J Biol Chem.* 245: 2837-44.
- Matthews JR, Botting CH et al. (1996) "Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide". *Nucleic Acids Res.* 24: 2236-42.
- McArdle A, Edwards RH et al. (1992) "Accumulation of calcium by normal and dystrophin-deficient mouse muscle during contractile activity in vitro". *Clin Sci (Lond).* 82: 455-9.
- McArdle A, Khera G et al. (1999) "In vivo microdialysis-A technique for analysis of chemical activators of muscle pain". *Muscle Nerve.* 22: 1047-52.
- McArdle A, Vasilaki A et al. (2002) "Exercise and skeletal muscle ageing: cellular and molecular mechanisms". *Ageing Res Rev.* 1: 79-93.
- McCord JM (1985) "Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury". *N Engl J Med.* 312: 159-63.
- McCord JM (1986) "Superoxide dismutase: rationale for use in reperfusion injury and inflammation". *J Free Radic Biol Med.* 2: 307-10.
- McCord JM (1987) "Radical explanations for old observations". *Gastroenterology.* 92: 2026-8.
- McCord JM and Fridovich I (1969) "Superoxide dismutase . An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)". *Journal of Biological Chemistry.* 244: 6049-6055.

- McCord JM, Keele BB et al. (1974) "An enzyme based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase". *Proc Natl Acad Sci USA*. 41: 35-97.
- McCormack JG and Osbaldeston NJ (1990) "The use of the Ca²⁺(+)-sensitive intramitochondrial dehydrogenases and entrapped fura-2 to study Sr²⁺ and Ba²⁺ transport across the inner membrane of mammalian mitochondria". *Eur J Biochem*. 192: 239-44.
- McCully KK, Kent JA et al. (1988) "Application of ³¹P magnetic resonance spectroscopy to the study of athletic performance". *Sports Med*. 5: 312-21.
- McIntosh MK, Goldfarb AH et al. (1993) "Vitamin E alters hepatic antioxidant enzymes in rats treated with dehydroepiandrosterone (DHEA)". *J Nutr*. 123: 216-24.
- McKelvey TG, Hollwarth ME et al. (1988) "Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney". *Am J Physiol*. 254: G753-60.
- McTiernan A, Schwartz RS et al. (1999) "Exercise clinical trials in cancer prevention research: a call to action". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 8: 201-7.
- Meissner G (1994) "Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors". *Annu Rev Physiol*. 56: 485-508.
- Meister A (1991) "Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy". *Pharmacol Ther*. 51: 155-94.
- Meister A and Anderson ME (1983) "Glutathione". *Annu Rev Biochem*. 52: 711-760.
- Mena P, Maynar M et al. (1991) "Plasma lipid concentrations in professional cyclists after competitive cycle races". *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 62: 349-52.
- Mercurio F, Zhu H et al. (1997) "IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation". *Science*. 278: 860-6.
- Merry P, Grootveld M et al. (1991) "Oxidative damage to lipids within the inflamed human joint provides evidence of radical-mediated hypoxic-reperfusion injury". *Am J Clin Nutr*. 53: 362S-369S.
- Messent M, Griffiths MJ et al. (1993) "Pulmonary vascular reactivity and ischaemia-reperfusion injury in the rat". *Clin Sci (Lond)*. 85: 71-5.

- Meydani M, Evans WJ et al. (1993) "Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults". *Am J Physiol.* 264: R992-8.
- Meyer G (1994) "[Gene technology--gene therapy]". *Sygeplejersken.* 94: 14.
- Miles AM, Bohle DS et al. (1996) "Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide". *J Biol Chem.* 271: 40-7.
- Millar TM, Stevens CR et al. (1997) "Xanthine oxidase can generate nitric oxide from nitrate in ischaemia". *Biochem Soc Trans.* 25: 528S.
- Mills PC, Smith NC et al. (1997) "Effect of allopurinol on the formation of reactive oxygen species during intense exercise in the horse". *Res Vet Sci.* 62: 11-6.
- Minami M, Mori K et al. (1981) "The effect of light exercise on the plasma superoxide dismutase activity and on the plasma noradrenaline concentration". *Ind Health.* 19: 133-8.
- Misko TP, Highkin MK et al. (1998) "Characterization of the cytoprotective action of peroxynitrite decomposition catalysts". *J Biol Chem.* 273: 15646-53.
- Mital S, Barbone A et al. (2002) "Endogenous endothelium-derived nitric oxide inhibits myocardial caspase activity: implications for treatment of end-stage heart failure". *J Heart Lung Transplant.* 21: 576-85.
- Miyagoe-Suzuki Y and Takeda SI (2001) "Association of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) with alpha1-syntrophin at the sarcolemma". *Microsc Res Tech.* 55: 164-70.
- Momken I, Fortin D et al. (2002) "Endothelial nitric oxide synthase (NOS) deficiency affects energy metabolism pattern in murine oxidative skeletal muscle". *Biochem J.* 368: 341-7.
- Moncada S, Palmer RMJ et al. (1991) "Nitric oxide: Physiology, pathology and pharmacology". *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.
- Moorhouse PC, Grootveld M et al. (1987) "Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers". *FEBS Lett.* 213: 23-8.
- Morin C, Zini R et al. (2003) "Anoxia-reoxygenation-induced cytochrome c and cardiolipin release from rat brain mitochondria". *Biochem Biophys Res Commun.* 307: 477-82.
- Munzel T and Harrison DG (1999) "Increased superoxide in heart failure: a biochemical baroreflex gone awry". *Circulation.* 100: 216-8.
- Murrell GA and Rapeport WG (1986) "Clinical pharmacokinetics of allopurinol". *Clin Pharmacokinet.* 11: 343-53.

- Nader GA and Esser KA (2001) "Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise". *J Appl Physiol.* 90: 1936-42.
- Nagawa T, Kita H et al. (1968) *Asian Med.* 11: 619-633.
- Nakamaru Y and Schwartz A (1972) "The influence of hydrogen ion concentration on calcium binding and release by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum". *J Gen Physiol.* 59: 22-32.
- Nakamura A and Goto S (1996) "Analysis of protein carbonyls with 2,4-dinitrophenyl hydrazine and its antibodies by immunoblot in two-dimensional gel electrophoresis". *J Biochem (Tokyo).* 119: 768-74.
- Nakamura M (1991) "Allopurinol-insensitive oxygen radical formation by milk xanthine oxidase systems". *J Biochem (Tokyo).* 110: 450-6.
- Nakanishi K, Tajima F et al. (1995) "Effects of hypobaric hypoxia on antioxidant enzymes in rats". *J Physiol.* 489 (Pt 3): 869-76.
- Nethery D, Stofan D et al. (1999) "Formation of reactive oxygen species by the contracting diaphragm is PLA(2) dependent". *J Appl Physiol.* 87: 792-800.
- Newham DJ, McPhail G et al. (1983) "Ultrastructural changes after concentric and eccentric contractions of human muscle". *J Neurol Sci.* 61: 109-22.
- Newsholme EA (1979) "The control of fuel utilization by muscle during exercise and starvation". *Diabetes.* 28 Suppl 1: 1-7.
- Newsholme EA (1981) "The glucose/fatty acid cycle and physical exhaustion". *Ciba Found Symp.* 82: 89-101.
- Newsholme EA, Blomstrand E et al. (1991) "Physical and mental fatigue: do changes in plasma amino acids play a role?" *Biochem Soc Trans.* 19: 358-62.
- Nicotera P, Moore M et al. (1985) "Inhibition of hepatocyte plasma membrane Ca²⁺-ATPase activity by menadione metabolism and its restoration by thiols". *FEBS Lett.* 181: 149-53.
- Nielsen B, Hyldig T et al. (2001) "Brain activity and fatigue during prolonged exercise in the heat". *Pflugers Arch.* 442: 41-8.
- Niki E (1987) "Interaction of ascorbate and alpha-tocopherol". *Ann N Y Acad Sci.* 498: 186-99.
- Nishino T (1994) "The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury". *J Biochem (Tokyo).* 116: 1-6.

- Novelli GP, Bracciotti G et al. (1990) "Spin-trappers and vitamin E prolong endurance to muscle fatigue in mice". *Free Radic Biol Med.* 8: 9-13.
- Novelli GP, Falsini S et al. (1991) "Exogenous glutathione increases endurance to muscle effort in mice". *Pharmacol Res.* 23: 149-55.
- Ochoa S (1983) "Regulation of protein synthesis initiation in eukaryotes." *Arch. Biochem. Biophys.* 223: 325-349.
- Oh-ishi S, Kizaki T et al. (1997) "Endurance training improves the resistance of rat diaphragm to exercise-induced oxidative stress". *Am J Respir Crit Care Med.* 156: 1579-85.
- Ohno H, Yahata T et al. (1988) "Physical training and fasting erythrocyte activities of free radical scavenging enzyme systems in sedentary men". *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 57: 173-6.
- Ohno Y, Seligmann BE et al. (1985) "Cytochrome b translocation to human neutrophil plasma membranes and superoxide release. Differential effects of N-formylmethionylleucylphenylalanine, phorbol myristate acetate, and A23187". *J Biol Chem.* 260: 2409-14.
- Okamoto H (1985) "Molecular basis of experimental diabetes degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic b-cells os islets of Langerhans." *Bioassays.* 2: 15-21.
- Okamoto KandNishino T (1995) "Mechanism of inhibition of xanthine oxidase with a new tight binding inhibitor". *J Biol Chem.* 270: 7816-21.
- Okamura K, Doi T et al. (1997) "Effect of endurance exercise on the tissue 8-hydroxy-deoxyguanosine content in dogs". *Free Radic Res.* 26: 523-8.
- Oliver CN, Ahn BW et al. (1987) "Age-related changes in oxidized proteins." *J. Biol. Chem.* 262: 5488-5491.
- Oliver CN, Starke-Reed PE et al. (1990) "Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 5144-7.
- Olson JA and Krinsky NI (1995) "Introduction: the colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators". *Faseb J.* 9: 1547-50.
- Omenn GS, Goodman GE et al. (1996) "Effects of combination ob b-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease." *New Eng. J. Med.* 334: 1150-1155.
- Onodera T and Ashraf M (1991) "Detection of hydroxyl radicals in the post-ischemic reperfused heart using salicylate as a trapping agent". *J Mol Cell Cardiol.* 23: 365-70.

- Orimo S, Hiyamuta E et al. (1991) "Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupivacaine-induced myonecrosis". *Muscle Nerve*. 14: 515-20.
- Orrenius S and Moldeus P (1984) "The multiple roles of glutathione in drug metabolism." *Trends. Pharmacol. Sci*. 5: 432-435.
- Ortega R (1999) "Ejercicio Físico". Curso a distancia de prevención en atención primaria. En: Martín Zurro A, editor. 139-154.
- Osman AA, Pendergrass M et al. (2000) "Regulation of MAP kinase pathway activity in vivo in human skeletal muscle". *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 278: E992-9.
- Pacifi RE and Davies KJ (1991) "Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free radical theory of aging revised." *Gerontology*. 37: 166-180.
- Packer L, Witt EH et al. (1995) "alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant". *Free Radic Biol Med*. 19: 227-50.
- Pahl HL, Sester M et al. (1996) "Activation of transcription factor NF-kappaB by the adenovirus E3/19K protein requires its ER retention". *J Cell Biol*. 132: 511-22.
- Pajares MA, Corrales F et al. (1992) "How is rat liver S-adenosylmethionine synthetase regulated?" *FEBS Letters*. 309: 1-4.
- Pajares MA, Durán C et al. (1992) "Modulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase activity by glutathione." *J. Biol. Chem*. 267: 17598-17605.
- Palozza PandKrinky NI (1992) "Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: an overview". *Methods Enzymol*. 213: 403-20.
- Panfili E, Sandri G et al. (1991) "Distribution of glutathione peroxidases and glutathione reductase in rat brain mitochondria". *FEBS Lett*. 290: 35-7.
- Papa S, Guerrieri F et al. (1997) "A possible role of slips in cytochrome c oxidase in the antioxygen defense system of the cell." *Bioscience Reports*. 17: 23-31.
- Park Y, Kanekal S et al. (1991) "Oxidative changes in hypoxic rat heart tissue". *Am J Physiol*. 260: H1395-405.
- Parker RS (1989) "Dietary and biochemical aspects of vitamin E." *Advances in food nutrition and research*. 33: 157-232.
- Parkington HC, Tare M et al. (1993) "Stretch revealed three components in the hyperpolarization of guinea-pig coronary artery in response to acetylcholine". *J Physiol*. 465: 459-76.

- Parks DA and Granger DN (1986) "Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation". *Am J Physiol.* 250: G749-53.
- Parks DA and Granger DN (1986) "Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology". *Acta Physiol Scand Suppl.* 548: 87-99.
- Pate RR, Pratt M et al. (1995) "Physical activity and public health. A recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine". *Jama.* 273: 402-7.
- Pauling L (1970) "Evolution and the need for ascorbic acid". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 67: 1643-8.
- Pauling L (1973) "Vitamin C, the common cold and the flu." Ed. Freeman S. Francisco.
- Peden DB, Hohman R et al. (1990) "Uric acid is a major antioxidant in human nasal airway secretions". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 7638-42.
- Pedersen BK, Bruunsgaard H et al. (1997) "Exercise-induced immunomodulation--possible roles of neuroendocrine and metabolic factors". *Int J Sports Med.* 18 Suppl 1: S2-7.
- Peng M, Huang L et al. (1995) "Oxidant-induced activations of nuclear factor-kappa B and activator protein-1 in cardiac myocytes". *Cell Mol Biol Res.* 41: 189-97.
- Perry MA, Wadhwa S et al. (1986) "Role of oxygen radicals in ischemia-induced lesions in the cat stomach". *Gastroenterology.* 90: 362-7.
- Peters DG, Mitchell HL et al. (1997) "Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase gene expression in congestive heart failure". *Circ Res.* 81: 703-10.
- Petersen EW, Ostrowski K et al. (2001) "Effect of vitamin supplementation on cytokine response and on muscle damage after strenuous exercise". *Am J Physiol Cell Physiol.* 280: C1570-5.
- Petrone WF, English DK et al. (1980) "Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77: 1159-63.
- Pfeffer KD, Huecksteadt TP et al. (1994) "Xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in renal epithelial cells. Cytokine and steroid regulation". *J Immunol.* 153: 1789-97.
- Phan SH, Gannon DE et al. (1989) "Xanthine oxidase activity in rat pulmonary artery endothelial cells and its alteration by activated neutrophils". *Am J Pathol.* 134: 1201-11.

- Philpot RM (1991) "Characterization of cytochrome P450 in extrahepatic tissues." *Methods. Enzymol.* 206: 623-631.
- Pincemail J, Camus G et al. (1990) "Exercise induces pentane production and neutrophil activation in humans. Effect of propranolol". *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 61: 319-22.
- Pollack M, Phaneuf S et al. (2002) "The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart". *Ann N Y Acad Sci.* 959: 93-107.
- Poss WB, Huecksteadt TP et al. (1996) "Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity by hypoxia". *Am J Physiol.* 270: L941-6.
- Postlethwait EM, Langford SD et al. (1995) "NO₂ reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids". *Free Radic Biol Med.* 19: 553-63.
- Powers SK and Lennon SL (1999) "Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle". *Proc Nutr Soc.* 58: 1025-33.
- Prem JT, Eppinger M et al. (1999) "The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model". *Am J Surg.* 178: 147-50.
- Prescott LF, Park J et al. (1977) "Treatment of paracetamol (acetaminophen) poisoning with N-acetylcysteine." *Lancet.* 2 (8035): 432-434.
- Pryor WA, Squadrito GL et al. (1995) "A new mechanism for the toxicity of ozone". *Toxicol Lett.* 82-83: 287-93.
- Pugh LG (1972) "Maximum oxygen intake in Himalayan mountaineers". *Ergonomics.* 15: 133-7.
- Quintanilha AT and Packer L (1983) "Vitamin E, physical exercise and tissue oxidative damage". *Ciba Found Symp.* 101: 56-69.
- Rabinowitch HD, Clare DA et al. (1983) "Positive correlation between superoxide dismutase and resistance to paraquat toxicity in the green alga *Chlorella sorokiniana*". *Arch Biochem Biophys.* 225: 640-8.
- Radak Z, Asano K et al. (1995) "Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise". *J Appl Physiol.* 79: 129-35.
- Radak Z, Kaneko T et al. (1999) "The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes". *Free Radic Biol Med.* 27: 69-74.

- Radak Z, Naito H et al. (2002) "Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle". *Pflugers Arch.* 445: 273-8.
- Radak Z, Nakamura A et al. (1998) "A period of anaerobic exercise increases the accumulation of reactive carbonyl derivatives in the lungs of rats". *Pflugers Arch.* 435: 439-41.
- Radak Z, Sasvari M et al. (2000) "Regular training modulates the accumulation of reactive carbonyl derivatives in mitochondrial and cytosolic fractions of rat skeletal muscle". *Arch Biochem Biophys.* 383: 114-8.
- Radak Z, Taylor AW et al. (2001) "Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain". *Exerc Immunol Rev.* 7: 90-107.
- Radi R, Rubbo H et al. (1997) "Xanthine oxidase binding to glycosaminoglycans: kinetics and superoxide dismutase interactions of immobilized xanthine oxidase-heparin complexes". *Arch Biochem Biophys.* 339: 125-35.
- Radi R, Tan S et al. (1992) "Inhibition of xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical production". *Biochim. Biophys. Acta.* 1122: 178-182.
- Radomski MW, Palmer RM et al. (1987) "The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium". *Biochem Biophys Res Commun.* 148: 1482-9.
- Rahman I and MacNee W (2000) "Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches". *Free Radic Biol Med.* 28: 1405-20.
- Rajguru SU, Yeargans GS et al. (1994) "Exercise causes oxidative damage to rat skeletal muscle microsomes while increasing cellular sulfhydryls". *Life Sci.* 54: 149-57.
- Rawley DA and Halliwell B (1983) "Formation of hidroxil radicals from hydrogen peroxide and iron salts by superoxide- and ascorbate-dependent machanism: Relevance to the pathology of rheumatoid disease". *Clin. Sci.* 64: 649-653.
- Reardon W, Ross RJ et al. (1992) "Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA". *Lancet.* 340: 1376-9.
- Reed DJ (1990) "Glutathione: Toxicological implications." *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 603-631.

- Reed DJ, Babson JR et al. (1980) "High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides". *Analytical Biochemistry*. 106: 55-62.
- Regnier CH, Song HY et al. (1997) "Identification and characterization of an I κ B kinase". *Cell*. 90: 373-83.
- Regula KM, Ens K et al. (2002) "IKK beta is required for Bcl-2-mediated NF- κ B activation in ventricular myocytes". *J Biol Chem*. 277: 38676-82.
- Reid MB (1998) "Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance". *Acta Physiol Scand*. 162: 401-9.
- Reid MB (2001) "Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't". *J Appl Physiol*. 90: 724-31.
- Reid MB, Grubwieser GJ et al. (1993) "Development and reversal of fatigue in human tibialis anterior". *Muscle Nerve*. 16: 1239-45.
- Reid MB, Kobzik L et al. (1998) "Nitric oxide modulates excitation-contraction coupling in the diaphragm". *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 119: 211-8.
- Reid MB, Shoji T et al. (1992) "Reactive oxygen in skeletal muscle. II. Extracellular release of free radicals". *J Appl Physiol*. 73: 1805-9.
- Reid MB, Stoik DS et al. (1994) "N-acetylcysteine inhibits muscle fatigue in humans". *J.Clin.Invest*. 94: 2468-2474.
- Reznick AZ, Witt E et al. (1992) "Vitamin E inhibits protein oxidation in skeletal muscle of resting and exercised rats". *Biochem Biophys Res Commun*. 189: 801-6.
- Rice-Evans CA and Miller NJ (1996) "Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food". *Biochem Soc Trans*. 24: 790-5.
- Rice-Evans CA, Miller NJ et al. (1995) "The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids". *Free Radic Res*. 22: 375-83.
- Richman P and Meister A (1975) "Regulation of g-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feed back inhibition by glutathione." *J. Biol. Chem*. 250: 1422-1426.
- Richter C, Park JW et al. (1988) "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 6465-6467.
- Rivett AJ (1985) "The effect of mixed-function oxidation of enzymes on their susceptibility to degradation by a nonlysosomal cysteine proteinase". *Arch Biochem Biophys*. 243: 624-32.

- Rock CL, Jacob RA et al. (1996) "Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids". *J Am Diet Assoc.* 96: 693-702; quiz 703-4.
- Rodriguez AM, Carrico PM et al. (2000) "Mitochondrial or cytosolic catalase reverses the MnSOD-dependent inhibition of proliferation by enhancing respiratory chain activity, net ATP production, and decreasing the steady state levels of H(2)O(2)". *Free Radic Biol Med.* 29: 801-13.
- Roederer M, Staal FJ et al. (1990) "Cytokine-stimulated human immunodeficiency virus replication is inhibited by N-acetyl-L-cysteine". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 4884-8.
- Rokitzki L, Logemann E et al. (1994) "alpha-Tocopherol supplementation in racing cyclists during extreme endurance training". *Int J Sport Nutr.* 4: 253-64.
- Romero FJ and Cadenas E (1987) "Hydroperoxide metabolism in vitamin E-deficient hepatocytes. Studies on low-level chemiluminescence, lipid peroxidation, and glutathione status". *Pharmacol Ther.* 33: 179-86.
- Rosenquist TA, Zharkov DO et al. (1997) "Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 7429-34.
- Rouault TA and Klausner RD (1996) "The impact of oxidative stress on eukaryotic iron metabolism." *EXS.* 77: 183-197.
- Rouquette M, Page S et al. (1998) "Xanthine oxidoreductase is asymmetrically localised on the outer surface of human endothelial and epithelial cells in culture". *FEBS Lett.* 426: 397-401.
- Ryder JW, Fahlman R et al. (2000) "Effect of contraction on mitogen-activated protein kinase signal transduction in skeletal muscle. Involvement Of the mitogen- and stress-activated protein kinase 1". *J Biol Chem.* 275: 1457-62.
- Satchek JM, Milbury PE et al. (2003) "Effect of vitamin E and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men". *Free Radic Biol Med.* 34: 1575-88.
- Saez G, Thornalley PJ et al. (1982) "The production of free radicals during the autoxidation of cysteine and their effect on isolated rat hepatocytes". *Biochim Biophys Acta.* 719: 24-31.
- Sagone AL, Jr., Greenwald J et al. (1983) "Glucose: a role as a free radical scavenger in biological systems". *J Lab Clin Med.* 101: 97-104.

- Sahlin K (1991) "Control of energetic processes in contracting human skeletal muscle". *Biochem Soc Trans.* 19: 353-8.
- Sahlin K, Broberg S et al. (1989) "Formation of inosine monophosphate (IMP) in human skeletal muscle during incremental dynamic exercise". *Acta Physiol Scand.* 136: 193-8.
- Sahlin K, Katz A et al. (1990) "Tricarboxylic acid cycle intermediates in human muscle during prolonged exercise". *Am J Physiol.* 259: C834-41.
- Sakamoto R, Hisamoto N et al. (2002) "[MAP kinase cascade regulating synaptic vesicle localization in *C. elegans* as a model animal]". *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 47: 1362-7.
- Samarasinghe DA, Tapner M et al. (2000) "Role of oxidative stress in hypoxia-reoxygenation injury to cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells". *Hepatology.* 31: 160-5.
- Samouilov A, Kuppusamy P et al. (1998) "Evaluation of the magnitude and rate of nitric oxide production from nitrite in biological systems". *Arch Biochem Biophys.* 357: 1-7.
- Sanders SA, Eisenthal R et al. (1997) "NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase--generation of superoxide anion". *Eur J Biochem.* 245: 541-8.
- Sandri M, Carraro U et al. (1995) "Apoptosis, DNA damage and ubiquitin expression in normal and mdx muscle fibers after exercise". *FEBS Lett.* 373: 291-5.
- Saris WH, van Erp-Baart MA et al. (1989) "Study on food intake and energy expenditure during extreme sustained exercise: the Tour de France". *Int J Sports Med.* 10 Suppl 1: S26-31.
- Sastre J, Asensi N et al. (1992) "Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: Prevention by antioxidant administration." *Am. J. Physiol.* 32: R992-R995.
- Saugstad OD (1990) "Oxygen toxicity in the neonatal period." *Acta Paediatr. Scand.* 79: 881-892.
- sds
- Saxton JM, Donnelly AE et al. (1994) "Indices of free-radical-mediated damage following maximum voluntary eccentric and concentric muscular work". *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 68: 189-93.
- Schardinger F (1902) *Z. Untersuch. Genussmittel.* 5: 1113-1121.
- Schmid P, Simmler M et al. (1983) "Mitochondrial reaction in skeletal muscle to induced activity". *Int J Sports Med.* 4: 116-8.

- Schreck R, Albermann K et al. (1992) "Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review)". *Free Radic Res Commun.* 17: 221-37.
- Schreck R and Baeuerle PA (1991) "A role for oxygen radicals as second messengers". *Trends Cell Biol.* 1: 39-42.
- Schreck R and Baeuerle PA (1994) "Assessing oxygen radicals as mediators in activation of inducible eukaryotic transcription factor NF-kappa B". *Methods Enzymol.* 234: 151-63.
- Schreck R, Grassmann R et al. (1992) "Antioxidants selectively suppress activation of NF-kappa B by human T-cell leukemia virus type I Tax protein". *J Virol.* 66: 6288-93.
- Selye H (1965) "[The stress syndrome]". *Kango Gijutsu.* 11: 92-8.
- Sen CK, Atalay M et al. (1994) "Exercise-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency". *J Appl Physiol.* 77: 2177-87.
- Sen CK, Marin E et al. (1992) "Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization". *J Appl Physiol.* 73: 1265-72.
- Sen CK and Packer L (1996) "Antioxidant and redox regulation of gene transcription". *Faseb J.* 10: 709-20.
- Sen CK, Roy S et al. (1997) "Regulation of cellular thiols in human lymphocytes by alpha-lipoic acid: a flow cytometric analysis". *Free Radic Biol Med.* 22: 1241-57.
- Sen RandBaltimore D (1986) "Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism". *Cell.* 47: 921-8.
- Serratos LandFernández A (1997) "Hipertensión arterial y ejercicio." *Rev Esp Cardiol.* 50 (Supl 4): 24-32.
- Sestili MA (1983) "Possible adverse health effects of vitamin C and ascorbic acid". *Semin Oncol.* 10: 299-304.
- Sevanian AandKim E (1985) "Phospholipase A2 dependent release of fatty acids from peroxidized membranes". *J Free Radic Biol Med.* 1: 263-71.
- Sexton WL (1995) "Vascular adaptations in rat hindlimb skeletal muscle after voluntary running-wheel exercise". *J Appl Physiol.* 79: 287-96.
- Shen CC, Wertelecki W et al. (1995) "Repair of mitochondrial DNA damage induced by bleomycin in human cells". *Mutat Res.* 337: 19-23.

- Sherwood DJ, Dufresne SD et al. (1999) "Differential regulation of MAP kinase, p70(S6K), and Akt by contraction and insulin in rat skeletal muscle". *Am J Physiol.* 276: E870-8.
- Shibutani S, Takeshita M et al. (1992) "Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG." *Nature.* 349: 431-434.
- Shigenaga MK, Hagen TM et al. (1994) "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 10771-10778.
- Shimomura Y, Suzuki M et al. (1991) "Protective effect of coenzyme Q10 on exercise-induced muscular injury". *Biochem Biophys Res Commun.* 176: 349-55.
- Shindoh C, DiMarco A et al. (1990) "Effect of N-acetylcysteine on diaphragm fatigue". *J Appl Physiol.* 68: 2107-13.
- Siebenlist U, Franzoso G et al. (1994) "Structure, regulation and function of NF-kappa B". *Annu Rev Cell Biol.* 10: 405-55.
- Sies H (1986) "Biochemistry of oxidative stress." *Angewandte Chem.* 25: 1058-1071.
- Sies H (1993) "Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection". *Mutation Research.* 299: 183.
- Sies H (1993) "Strategies of antioxidant defense". *European Journal of Biochemistry.* 215: 213.
- Sies HandAkerboom TP (1984) "Glutathione disulfide (GSSG) efflux from cells and tissues". *Methods Enzymol.* 105: 445-51.
- Sies H, Bartoli GM et al. (1978) "Glutathione efflux from perfused rat liver after phenobarbital treatment, during drug oxidations, and in selenium deficiency". *Eur. J. Biochem.* 89: 113-118.
- Simon-Schnass I (1993) "Vitamin requirements for increased physical activity: vitamin E". *World Rev Nutr Diet.* 71: 144-53.
- Simon-Schnass landKorniszewski L (1990) "The influence of vitamin E on rheological parameters in high altitude mountaineers". *Int J Vitam Nutr Res.* 60: 26-34.
- Simon-Schnass landPabst H (1988) "Influence of vitamin E on physical performance". *Int J Vitam Nutr Res.* 58: 49-54.
- Sjodin B, Hellsten Westing Y et al. (1990) "Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise". *Sports Med.* 10: 236-54.

- Skulachev VP (1996) "Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants". *Quat. Rev. Biophys.* 29: 169-202.
- Skulachev VP (1996) "Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell". *FEBS Lett.* 397: 7-10.
- Slade R, Crissman K et al. (1993) "Comparison of antioxidant substances in bronchoalveolar lavage cells and fluid from humans, guinea pigs, and rats." *Exp. Lung. Res.* 19: 469-484.
- Slater TF (1984) "Free radical mechanism in tissue injury." *Biochem. J.* 222: 1-15.
- Smilkstein MJ, Knapp GL et al. (1988) "Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. Analysis of the National Multicenter study (1976-1985)." *N. Engl. J. Med.* 319: 1557-1562.
- Smith JK, Carden DL et al. (1989) "Role of xanthine oxidase in postischemic microvascular injury in skeletal muscle". *Am J Physiol.* 257: H1782-9.
- Smith LW, Smith JD et al. (2002) "Involvement of nitric oxide synthase in skeletal muscle adaptation to chronic overload". *J Appl Physiol.* 92: 2005-11.
- Stadtman ER (1990) "Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences." *Free Rad. Biol. Med.* 9: 315-325.
- Stahl WandSies H (1993) "Physical quenching of singlet oxygen and cis-trans isomerization of carotenoids". *Ann N Y Acad Sci.* 691: 10-9.
- Stancovski I and Baltimore D (1997) "NF-kappaB activation: the I kappaB kinase revealed?" *Cell.* 91: 299-302.
- Stirpe F and Della Corte E (1969) "The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O)". *J Biol Chem.* 244: 3855-63.
- Stofan DA, Callahan LA et al. (2000) "Modulation of release of reactive oxygen species by the contracting diaphragm". *Am J Respir Crit Care Med.* 161: 891-8.
- Su YC, Han J et al. (1997) "NIK is a new Ste20-related kinase that binds NCK and MEKK1 and activates the SAPK/JNK cascade via a conserved regulatory domain". *Embo J.* 16: 1279-90.
- Sumida S, Tanaka K et al. (1989) "Exercise-induced lipid peroxidation and leakage of enzymes before and after vitamin E supplementation". *Int J Biochem.* 21: 835-8.

- Supinski G (1998) "Free radical induced respiratory muscle dysfunction". *Mol Cell Biochem.* 179: 99-110.
- Supinski G, Nethery D et al. (1997) "Effect of free radical scavengers on diaphragmatic fatigue". *Am J Respir Crit Care Med.* 155: 622-9.
- Suter MandRichter C (1999) "Fragmented mitochondrial DNA is the predominant carrier of oxidized DNA bases". *Biochemistry.* 38: 459-64.
- Suzuki YJ, Mizuno M et al. (1995) "Transient overexpression of catalase does not inhibit TNF- or PMA-induced NF-kappa B activation". *Biochem Biophys Res Commun.* 210: 537-41.
- Szasz G, Gruber W et al. (1976) "Creatine kinase in serum: 1. Determination of optimum reaction conditions". *Clin Chem.* 22: 650-6.
- Tan S, Yokoyama Y et al. (1993) "Xanthine oxidase activity in the circulation of rats following hemorrhagic shock". *Free Radic Biol Med.* 15: 407-14.
- Tateishi N, Higashi T et al. (1974) "Studies of the regulation of glutathione level in rat liver". *J. Biochem.* 75: 90-103.
- Tateishi N, Shiozaki H et al. (1977) "Rat liver glutathione: Possible role as reservoir of cysteine". *J. Nutr.* 107: 51-58.
- Tchou JandGrollman AP (1993) "Repair of DNA containig the oxidatively damaged base 8-oxoguanine". *Mutat. Res.* 299: 277-287.
- Tenenbein M, Kowalski S et al. (1992) "Pulmonary toxic effects of continuous desferrioxamine administration in acute iron poisoning". *Lancet.* 339: 699-701.
- Terada LS, Dormish JJ et al. (1992) "Circulating xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion". *Am J Physiol.* 263: L394-401.
- Terada LS, Piermattei D et al. (1997) "Hypoxia regulates xanthine dehydrogenase activity at pre- and posttranslational levels". *Arch Biochem Biophys.* 348: 163-8.
- Terada LS, Rubinstein JD et al. (1991) "Existence and participation of xanthine oxidase in reperfusion injury of ischemic rabbit myocardium". *Am J Physiol.* 260: H805-10.
- Terao M, Cazzaniga G et al. (1992) "Molecular cloning of a cDNA coding for mouse liver xanthine dehydrogenase. Regulation of its transcript by interferons in vivo". *Biochem J.* 283 (Pt 3): 863-70.
- Terrádez P, Asensi M et al. (1993) "Depletion of tumor glutathione in vivo by buthionine sulphoximine: Modulation by the rate of cellular proliferation and inhibition of cancer growth". *Biochem. J.* 292: 477-483.

- Tessier F, Margaritis I et al. (1995) "Selenium and training effects on the glutathione system and aerobic performance". *Med Sci Sports Exerc.* 27: 390-6.
- Tews DS, Goebel HH et al. (1997) "Expression of different isoforms of nitric oxide synthase in experimentally denervated and reinnervated skeletal muscle". *J Neuropathol Exp Neurol.* 56: 1283-9.
- Thomas MJ (1992) "Urate causes the human polymorphonuclear leukocyte to secrete superoxide". *Free Radic Biol Med.* 12: 89-91.
- Thompson D, Williams C et al. (2001) "Prolonged vitamin C supplementation and recovery from demanding exercise". *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 11: 466-81.
- Tidball JG, Lavergne E et al. (1998) "Mechanical loading regulates NOS expression and activity in developing and adult skeletal muscle". *Am J Physiol.* 275: C260-6.
- Tolbert NE and Essner E (1981) "Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes". *J Cell Biol.* 91: 271s-283s.
- Tonkonogi M, Harris B et al. (1998) "Mitochondrial oxidative function in human saponin-skinned muscle fibres: effects of prolonged exercise". *J Physiol.* 510 (Pt 1): 279-86.
- Tonkonogi M and Sahlin K (1999) "Actively phosphorylating mitochondria are more resistant to lactic acidosis than inactive mitochondria". *Am J Physiol.* 277: C288-93.
- Tonkonogi M and Sahlin K (2002) "Physical exercise and mitochondrial function in human skeletal muscle". *Exerc Sport Sci Rev.* 30: 129-37.
- Toosy N, McMorris EL et al. (1999) "Ischaemic preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury". *BJU Int.* 84: 489-94.
- Trush MA, Mimnaugh EG et al. (1982) "Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity". *Biochem Pharmacol.* 31: 3335-46.
- Uchida K and Kawakishi S (1993) "Oxo-histidine as a novel biological marker for oxidatively modified proteins". *FEBS.* 332: 208-210.
- Ukai T, Cheng CP et al. (2001) "Allopurinol enhances the contractile response to dobutamine and exercise in dogs with pacing-induced heart failure". *Circulation.* 103: 750-5.
- van Bree L, Groot EJ et al. (1989) "Reduction by acetylsalicylic acid of paracetamol-induced hepatic glutathione depletion in rats treated with 4,4'-

- dichlorobiphenyl, phenobarbitone and pregnenolone-16-alpha-carbonitrile". *J Pharm Pharmacol.* 41: 343-5.
- Van der Meulen JH, Kuipers H et al. (1991) "Relationship between exercise-induced muscle damage and enzyme release in rats". *J Appl Physiol.* 71: 999-1004.
 - Van Hemmen JJ and Meuling WJ (1975) "Inactivation of biologically active DNA by gamma-ray-induced superoxide radicals and their dismutation products singlet molecular oxygen and hydrogen peroxide". *Biochim Biophys Acta.* 402: 133-41.
 - Vance PG, Keele BB, Jr. et al. (1972) "Superoxide dismutase from *Streptococcus mutans*. Isolation and characterization of two forms of the enzyme". *J Biol Chem.* 247: 4782-6.
 - Vassilakopoulos T, Karatza MH et al. (2003) "Antioxidants attenuate the plasma cytokine response to exercise in humans". *J Appl Physiol.* 94: 1025-32.
 - Vaziri ND, Wang XQ et al. (2000) "Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats". *Hypertension.* 36: 142-6.
 - Vider J, Laaksonen DE et al. (2001) "Physical exercise induces activation of NF-kappaB in human peripheral blood lymphocytes". *Antioxid Redox Signal.* 3: 1131-7.
 - Vider J, Lehtmaa J et al. (2001) "Acute immune response in respect to exercise-induced oxidative stress". *Pathophysiology.* 7: 263-270.
 - Vignais GM and Vignais PV (1973) "Fusicin is an inhibitor of mitochondrial SH-dependent transport-linked functions". *Biochem. Biophys. Acta.* 325: 357-374.
 - Viinikka L, Vuori J et al. (1984) "Lipid peroxides, prostacyclin, and thromboxane A2 in runners during acute exercise". *Med Sci Sports Exerc.* 16: 275-7.
 - Vila-Petroff MG, Younes A et al. (1999) "Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes". *Circ Res.* 84: 1020-31.
 - Vina J, Perez C et al. (1989) "Effect of oral glutathione on hepatic glutathione levels in rats and mice". *Br J Nutr.* 62: 683-91.
 - Viner RI, Ferrington DA et al. (1997) "In vivo aging of rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. Chemical analysis and quantitative

- simulation by exposure to low levels of peroxy radicals". *Biochim Biophys Acta*. 1329: 321-35.
- Viña J, Gimenez A et al. (1992) "Impairment of cysteine synthesis from methionine in rats exposed to surgical stress". *Br J Nutr*. 68: 421-9.
 - Viña J, Gimeno A et al. (2000) "Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol". *IUBMB Life*. 49: 539-44.
 - Viña J, Gomez-Cabrera MC et al. (2000) "Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants". *IUBMB Life*. 50: 271-7.
 - Viña J, Pérez C et al. (1989) "Effect of oral glutathione on hepatic glutathione levels in rats and mice". *Br. J. Nutr*. 62: 683-691.
 - Viña J, Sáez GT et al. (1983) "The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes". *Biochem. J*. 212: 39-44.
 - Viña J, Sastre J et al. (1995) "Assay of blood glutathione oxidation during physical exercise". *Methods Enzymol*. 251: 237-43.
 - Viña J, Sastre J et al. (2003) "Mitochondrial theory of aging: importance to explain why females live longer than males". *Antioxid Redox Signal*. 5: 549-56.
 - Viña J, Viña JR et al. (1986) "Glutathione: metabolism and physiological functions." *Life Chem. Rep*. 4: 1-35.
 - von Sonntag C (1994) "Radiation chemistry in the 1990s: pressing questions relating to the areas of radiation biology and environmental research". *Int J Radiat Biol*. 65: 19-26.
 - Waintrub ML, Terada LS et al. (1990) "Xanthine oxidase is increased and contributes to paraquat-induced acute lung injury". *J Appl Physiol*. 68: 1755-7.
 - Walsh B, Tonkonogi M et al. (2001) "Effect of eccentric exercise on muscle oxidative metabolism in humans". *Med Sci Sports Exerc*. 33: 436-41.
 - Warner BB, Stuart L et al. (1996) "Redox regulation of manganese superoxide dismutase". *Am J Physiol*. 271: L150-8.
 - Wayner DD, Burton GW et al. (1987) "The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma". *Biochim Biophys Acta*. 924: 408-19.
 - Weber P, Bendich A et al. (1997) "Vitamin E and human health: rationale for determining recommended intake levels". *Nutrition*. 13: 450-60.

- Weicker HandStruder HK (2001) "Influence of exercise on serotonergic neuromodulation in the brain". *Amino Acids*. 20: 35-47.
- Weiland U, Haendeler J et al. (2000) "Inhibition of endogenous nitric oxide synthase potentiates ischemia-reperfusion-induced myocardial apoptosis via a caspase-3 dependent pathway". *Cardiovasc Res*. 45: 671-8.
- Weinbroum A, Nielsen VG et al. (1995) "Liver ischemia-reperfusion increases pulmonary permeability in rat: role of circulating xanthine oxidase". *Am J Physiol*. 268: G988-96.
- Weisger RAandFridovich I (1973) "Superoxide dismutase: organella specificity". *Journal of Biological Chemistry*. 248: 3582-3591.
- Werns SW, Grum CM et al. (1991) "Xanthine oxidase inhibition does not limit canine infarct size". *Circulation*. 83: 995-1005.
- Werns SWandLucchesi BR (1990) "Free radicals and ischemic tissue injury". *Trends Pharmacol Sci*. 11: 161-6.
- Westerblad HandAllen DG (2002) "Recent advances in the understanding of skeletal muscle fatigue". *Curr Opin Rheumatol*. 14: 648-52.
- Westerblad H, Lee JA et al. (1990) "Spatial gradients of intracellular calcium in skeletal muscle during fatigue". *Pflugers Arch*. 415: 734-40.
- White CR, Darley-Usmar V et al. (1996) "Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 8745-9.
- White MJandHeckler FR (1990) "Oxygen free radicals and wound healing". *Clin Plast Surg*. 17: 473-84.
- Widegren U, Jiang XJ et al. (1998) "Divergent effects of exercise on metabolic and mitogenic signaling pathways in human skeletal muscle". *Faseb J*. 12: 1379-89.
- Widegren U, Ryder JW et al. (2001) "Mitogen-activated protein kinase signal transduction in skeletal muscle: effects of exercise and muscle contraction". *Acta Physiol Scand*. 172: 227-38.
- Williams MD, Van Remmen H et al. (1998) "Increased oxidative damage is correlated to altered mitochondrial function in heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mice". *J Biol Chem*. 273: 28510-5.
- Willis WTandJackman MR (1994) "Mitochondrial function during heavy exercise". *Med Sci Sports Exerc*. 26: 1347-53.
- Wispe JR, Bell EF et al. (1985) "Assesment of lipid peroxidation in newborn infants and rabbitsby meassurements of expired ethane and pentane: influence of parenteral lipid infusion." *Pedriatr Res*. 19: 374-379.

- Wispe JR, Knight M et al. (1986) "Lipid peroxidation in newborn rabbits: Effects of oxygen, lipid emulsion and vitamin E." *Pediatr Res.* 20: 505-510.
- Wolf SP, Gamer A et al. (1986) "Free radicals, lipids and protein degeneration." *Trends Bioch. Sci.* 11: 27-31.
- Wolff SP and Dean RT (1987) "Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes". *Biochem J.* 245: 243-50.
- Woodgett JR, Avruch J et al. (1996) "The stress activated protein kinase pathway". *Cancer Surv.* 27: 127-38.
- Wrogemann K and Pena SD (1976) "Mitochondrial calcium overload: A general mechanism for cell-necrosis in muscle diseases". *Lancet.* 1: 672-4.
- Yang ZP and Dettbarn WD (1998) "Lipid peroxidation and changes in cytochrome c oxidase and xanthine oxidase activity in organophosphorus anticholinesterase induced myopathy". *J Physiol Paris.* 92: 157-61.
- Yeun JY and Hasbargen JA (1995) "Renal hypouricemia: prevention of exercise-induced acute renal failure and a review of the literature". *Am J Kidney Dis.* 25: 937-46.
- Yokoyama Y, Beckman JS et al. (1990) "Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury". *Am J Physiol.* 258: G564-70.
- Yoshikawa T, Furukawa Y et al. (1982) "Experimental hypoxia and lipid peroxide in rats". *Biochem Med.* 27: 207-13.
- Yost FJ and Fridovich I (1973) "An iron containing Superoxide dismutase from *E. coli*". *Journal of Biological Chemistry.* 248: 2905-2908.
- Young AJ, Evans WJ et al. (1982) "Sparing effect of chronic high-altitude exposure on muscle glycogen utilization". *J Appl Physiol.* 52: 857-62.
- Young SHY, Knight JA et al. (1987) "Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct". *Clinical Chemistry.* 33: 214-220.
- Yu M, Stepto NK et al. (2003) "Metabolic and mitogenic signal transduction in human skeletal muscle after intense cycling exercise". *J Physiol.* 546: 327-35.
- Yusa T, Crapo JD et al. (1984) "Hyperoxia enhances lung and liver nuclear superoxide generation". *Biochim Biophys Acta.* 798: 167-74.
- Zamanian-Daryoush M, Mogensen TH et al. (2000) "NF-kappaB activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase". *Mol Cell Biol.* 20: 1278-90.

- Zandi E and Karin M (1999) "Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the I κ B kinase complex". *Mol Cell Biol.* 19: 4547-51.
- Zehavi-Willner T, Kosower NS et al. (1970) "GSH oxidation and protein synthesis in rabbit reticulocytes". *Biochem Biophys Res Commun.* 40: 37-42.
- Zerba E, Komorowski TE et al. (1990) "Free radical injury to skeletal muscles of young, adult, and old mice". *Am J Physiol.* 258: C429-35.
- Zhang N (1996) "Characterization of the 5' flanking region of the human MnSOD gene". *Biochem Biophys Res Commun.* 220: 171-80.
- Zhang Z, Blake DR et al. (1998) "A reappraisal of xanthine dehydrogenase and oxidase in hypoxic reperfusion injury: the role of NADH as an electron donor". *Free Radic Res.* 28: 151-64.
- Zimmerman BJ, Parks DA et al. (1988) "Allopurinol does not enhance antioxidant properties of extracellular fluid". *Am J Physiol.* 255: H202-6.
- Zuo L, Christofi FL et al. (2000) "Intra- and extracellular measurement of reactive oxygen species produced during heat stress in diaphragm muscle". *Am J Physiol Cell Physiol.* 279: C1058-66.