

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ANTIOXIDANTES
ORALES EN LAS ADAPTACIONES AL EJERCICIO FÍSICO

ELENA DOMÉNECH DE ANTONIO

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 10 de Novembre de 2006 davant un tribunal format per:

- D. Federico Pallardó Calatayud
- D. Josep Tur Marí
- D^a. Ana Navarro Arévalo
- D. Manuel Castillo Garzón
- D^a. M^a Jesús Sanz Ferrando

Va ser dirigida per:

D. José Viña Ribes

D^a. Mari Carmen Gómez Cabrera

©Copyright: Servei de Publicacions
Elena Doménech de Antonio

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6759-9

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

Facultad de Farmacia

Departamento de

Fisiología



EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN

DE ANTIOXIDANTES ORALES EN

LAS ADAPTACIONES AL

EJERCICIO FÍSICO

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Elena Doménech de Antonio

Dirigida por:

Prof. D. José Viña Ribes

Prof. Dña. Mari Carmen Gómez Cabrera

Valencia, 2006



**Facultad de Medicina y
Odontología
Departamento de Fisiología**

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

Prof. **Dña. Mari Carmen Gómez Cabrera**, Profesora de la Universidad Católica de Valencia.

CERTIFICAN:

Que Dña. Elena Doménech de Antonio, Licenciada Farmacia por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección la presente tesis titulada:

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ANTIOXIDANTES
ORALES EN LAS ADAPTACIONES AL EJERCICIO FÍSICO**

para la obtención del título de Doctora.

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

Valencia, a 18 de Mayo de 2006

Fdo. Prof. D. José Viña Ribes

Fdo. Prof. Dña. Mari Carmen
Gómez Cabrera

A MIS PADRES

A VÍCTOR

Agradecimientos

El tiempo que he pasado realizando esta tesis me ha servido para crecer como investigadora, pero más como persona, es por ello, que quiero agradecer a toda la gente que ha pasado por esta etapa tan importante de mi vida. No os olvidaré nunca.

Alguien dijo una vez que la vida es como una carretera y las personas que la componen, caminos que empiezan y acaban, y que finalmente conducen al destino. Gracias a todos esos caminos.

Antes de empezar me gustaría agradecer a los directores de esta tesis el tiempo que le han dedicado. Gracias a Pepe y a Mari Carmen.

Pepe, muchas gracias por dejarme formar parte de este maravilloso grupo de investigación. En él, he aprendido mucho, sobre ciencia y sobre lo que no lo es.

Meri, tú siempre vas a ser “*My boss*”, contigo he disfrutado de cada proceso de esta tesis, de cada experimento, de cada conversación en la que me dejabas con la boca abierta. He descubierto un maravilloso mundo, el del ejercicio físico. Pero si he aprendido algo de ti, es que con aplicación y perseverancia todo se consigue. Siempre vas a tener un sitio en mi corazón. Muchas gracias, sin ti, estoy segura de que no estaría donde estoy.

Gracias **Juan**, tú me abriste las puertas de la investigación recién salidita del horno de la facultad. Fuiste mi profesor, y nunca se me olvidará que contigo empecé esta andadura científica. Tu despacho siempre ha estado abierto para mí, para hablar de ciencia o simplemente de la vida. De ti he aprendido mucho, y me he dado cuenta de lo que me queda por aprender. Te voy a estar siempre agradecida.

Fede, te estoy muy agradecida por todo este tiempo que he pasado en el departamento, gracias por las risas y sonrisas que has arrancado de mi boca cuando menos lo esperaba. También quiero agradecerte lo que te has preocupado por mí.

Gracias **Marco** por haberme ayudado con el *horribilus* entrenamiento de los animales, y por el estudio en humanos. Pero también te quiero agradecer tu eterna sonrisa.

También tengo que agradecer a **Vladi** por ayudarme en las últimas fases de esta tesis, vas a realizar un trabajo precioso, tienes a la mejor maestra. Te deseo toda la suerte del mundo... **Fabián**, aunque nos hemos conocido poco, te agradezco tu simpatía. A **Carol**, por ayudarme en los inicios. Sé que vas a ser un gran médico. Mucha suerte!!!

A **Lapain**, voy a estar eternamente agradecida a este tiempo que he pasado en fisio porque gracias a él te he conocido. Hemos pasado muy buenos momentos en el departamento, pero los mejores han estado fuera de él. Sé que he ganado una amiga para toda la vida, pero más que una amiga, he ganado una hermana.

A **Javi**, tú fuiste mi *maestro Jedi*, y yo tu *Padawain*. Contigo aprendí casi todo lo que necesitaba saber del laboratorio, pero eso no fue lo más importante, lo más importante ha sido conocerte y saber que tengo un amigo que estará siempre a mi lado y en mi recuerdo. Nunca olvidaré lo mucho que me reí contigo durante el proceso pancreático. Inolvidable.

A **Chelo**, gracias especialmente por tu ayuda en el proceso experimental y por haber sido siempre tan cariñosa. A **Soraya** porque el viaje a Cuneo nunca hubiese sido igual sin ti. Eres totalísima!!!! A **Ana Lloret**, por haberme hecho reír tantas veces. A **Diana**, por su ilusión. A **Mari Carmen, Jelena, Nancy, Alessandro, Alfonso, Consuelo y Asun**, por haberme hecho el día a día más agradable. Aunque ya no estén con nosotros, quiero agradecer a **Juamba** y a **Rafa** su apoyo y alegría.

A **Esco** y **Gambini**, porque nunca olvidaré lo bien que lo pasé en ese viaje a Italia. Estos últimos meses en el laboratorio han sido muy divertidos gracias a vosotros. A los nuevos talentos masculinos, **Raúl** y **Rubén**, me alegro mucho de haberos conocido y os deseo toda la buena suerte del mundo.

A **Raquel** y **Jessica**, chicas, sois el futuro. He disfrutado mucho con vosotras en las fases finales de esta tesis. Estoy segura de que vais a arrasarse!!!

Al director del departamento, **Antonio Alberola**. Gracias. A las **Secres**, sois una PASADA!!! No he conocido nunca a nadie tan eficiente como vosotras. Siempre me habéis tratado con mucho cariño, es por este y otros muchos motivos por los que siempre os recordaré. Gracias **Inma** por recibirme cada día con una sonrisa.

A los **Estrela Boys** y como no, a **María**, porque vuestra dedicación a la ciencia es abrumadora y siempre la realizáis con una sonrisa en la boca.

Al **grupo de Luis Such**, porque aunque no coincidimos mucho dentro del laboratorio, fuera de él nos lo pasamos muy bien.

Al **personal de la UCI**, porque me hicieron más llevadero el eterno proceso de entrenamiento.

A **Juan Viña y a la fundación del Hospital Clínico de Valencia**, porque sin su soporte económico no habría podido finalizar esta tesis. A **su grupo de investigación** que me han ayudado mucho con las hiperlipidemias. Al **grupo de Guillermo Sáez**, que siempre me ha tratado muy bien y con los que he compartido más de una comida.

A **mis friendsitas, Laura B, Txondi, Laura LI, Judith, Raquel y Leti**, siempre habéis estado conmigo, desde que éramos unas crías, hemos crecido juntas y aunque sigamos caminos lejanos, siempre estaréis en lo más profundo de mi corazón. Os agradezco tanto... Os quiero!!! Pa morise!!!

A **las perritas/os, Edo, Miguel, Gemi, Rebe, Pepe, Ana, Teresa y Jorge**, que tantas y tantas veces me han oído hablar de la tesis. Gracias a ese Bolero, que permitió que nos conociéramos. Y sobretodo, gracias a vosotros por ser como sois.

A mi familia, que siempre me ha apoyado. A **mi hermano y a Patricia**, por quererme tanto, y sobre todo **a mis padres**, por apoyarme en cada momento y por hacerme creer desde pequeña que podía conseguir todo lo que me propusiese. Me habéis dado la confianza necesaria para conseguirlo. Os quiero, no sabéis cuánto.

Y si tengo que agradecer a alguien ese es a ti, **Víctor**. Has sido la persona con la que había soñado toda la vida. Has *sufrido* esta tesis conmigo, has oído hablar de mitocondrias mil veces, has aguantado mis llantos y alegrías... es por este motivo por el que esta tesis es tan tuya como mía. Te debo mucho. Toda la vida.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

I- Introducción.....	1-100
1-Radicales libres.....	1-11
1.1 Concepto de radical libre.....	1-2
1.2 Clases de radicales libres.....	2-6
1.3 Génesis de radicales libres.....	6-11
2- Estrés oxidativo	11-16
2.1- Concepto de estrés oxidativo.....	11-12
2.2- Estrés oxidativo y daño a biomoléculas.....	12-14
3- Antioxidantes fisiológicos.....	14-33
3.1- Concepto de antioxidante.....	14
3.2- Antioxidantes enzimáticos.....	14-17
3.3- Antioxidantes no enzimáticos.....	17-29
4-Ejercicio físico.....	30-54
4.1.-Concepto.....	30-31
4.2.-Clasificación de los ejercicios físicos.....	31-33
4.3.-Adaptaciones al Ejercicio Físico.....	33-41
4.4.- Clasificación de la fatiga.....	42-44
4.5.-Radicales libres y ejercicio físico.....	44-64

5- Biogénesis mitocondrial.....	55-88
5.1- Mecanismos celulares de la Biogénesis Mitocondrial.....	62-68
5.2- Estabilidad del ARNm.....	68
5.3- Ejemplo de Gen nuclear que codifica una proteína mitocondrial: citocromo C.....	69-72
5.4- Cadena de importación de proteínas.....	72-75
5.5- Expresión del ADNmt.....	75-78
5.6- Síntesis de proteínas mitocondriales.....	78
6- Enfermedades mitocondriales.....	81-87
6.1-Ejercicio y enfermedades mitocondriales.....	87-93
6.2- Biogénesis Mitocondrial y enfermedades mitocondriales.....	93-97
II- Objetivos.....	101-102
III- Materiales y Métodos.....	103-112
1- Materiales.....	103-112
1.1-Estudio con animales de experimentación.....	103-106
1.2-Estudio con humanos.....	107
1.3-Aparatos.....	108-110
1.4-Reactivos.....	110-112

2- Métodos.....	112-154
2.1- Determinación de Aspartato-aminotransferasa (GOT).....	112-113
2.2- Método para determinar la concentración de proteínas: Método Bradford.....	113-115
2.3- Extracción de proteínas citoplasmáticas a partir de tejido muscular.....	115-116
2.4-Aislamiento de ARN a partir de tejido.....	116-118
2.5-Electroforesis en gel de agarosa.....	118-119
2.6- Retrotranscripción-Amplificación del ARN (RT-PCR).....	119-125
2.7- Retrotranscripción-Amplificación cuantitativa del ARN (RT-PCR en tiempo real).....	125-131
2.8- Estudio de la expresión de citrato sintasa, PGC-1, FRN-1, ftmA y citocromo C mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) y posterior Western Blotting.....	132-136
2.9.-Determinación de la actividad Glutación Peroxidasa (GPx).....	136-139
2.10.-Determinación de los valores de glutación total.....	139-146
2.11.-Determinación del glutación oxidado (GSSG).....	146-147
2.12.-Determinación del MDA.....	148-149

2.12.-Determinación de la actividad MnSOD.....	150-152
2.13.-Determinación del VO ₂ max en humanos.....	152-154
3- Análisis estadístico de los resultados.....	154
IV- Resultados.....	155-182
1.- Estudio del efecto de la administración de antioxidantes en el posible daño muscular asociado al entrenamiento. Resultados en animales.....	155-156
1.1.- Efecto de la administración de vitamina C y alopurinol sobre la actividad en plasma de la GOT en ratas entrenadas durante 3 semanas.....	156
2.- Estudio del estrés oxidativo asociado al entrenamiento. Resultados en animales.....	157-160
2.1.- Efecto de la administración de antioxidantes sobre el estatus del glutatión en sangre de ratas entrenadas durante 3 semanas.	157-159
2.2.- Efecto de la administración de antioxidantes sobre los niveles de MDA en plasma de ratas entrenadas durante 3 semanas.....	159-160

3.- Estudio las adaptaciones neuromusculares al entrenamiento de resistencia. Resultados en animales.....160-162

3.1.- Efecto de la administración de antioxidantes sobre la expresión de MyoD en músculo gastrocnemio de ratas entrenadas durante 3 semanas.161

3.2.- Efecto de la administración de antioxidantes sobre la expresión de la miogenina en músculo gastrocnemio de ratas entrenadas durante 3 semanas.....162

4.- Efecto de la administración de antioxidantes en la inducción de la defensa antioxidante enzimática por el entrenamiento de resistencia. Resultados en animales.....163-168

4.1.- Estudio de la expresión mediante RT-PCR de la MnSOD tras 3 semanas de entrenamiento en músculo gastrocnemio de rata.....163-164

4.2. Estudio de la actividad de la MnSOD tras 6 semanas de entrenamiento en músculo gastrocnemio de rata.....165

4.3. Estudio de la expresión mediante RT-PCR y de la actividad de la GPx tras 3 semanas de entrenamiento en músculo gastrocnemio de rata.....166-167

4.4. Estudio de la actividad de la GPx tras 6 semanas de entrenamiento en músculo gastrocnemio de rata.....	168
5.- Estudio del papel de los radicales libres en la biogénesis mitocondrial inducida por el entrenamiento de resistencia. Resultados en animales.....	169-178
5.1. Estudio de la expresión y fosforilación de las AMPKs mediante Western-blot en músculo gastrocnemio de rata entrenada durante 6 semanas. Efecto de la administración de vitamina C.....	170-171
5.2. Estudio de la expresión de PGC-1 mediante Western-blot en músculo gastrocnemio de rata entrenada durante 6 semanas. Efecto de la administración de vitamina C.....	171-172
5.3. Estudio de la expresión de FRN-1 mediante RT-PCR en músculo gastrocnemio de rata tras 3 semanas de entrenamiento. Efecto de la administración de antioxidantes.....	173
5.4. Estudio de la expresión de FRN-1 mediante Western-blot en músculo gastrocnemio de rata tras 6 semanas de entrenamiento. Efecto de la administración de vitamina C.....	174

5.5. Estudio de la expresión de ftmA mediante RT-PCR en músculo gastrocnemio de rata tras 3 semanas de entrenamiento. Efecto de la administración de antioxidantes.....	175
5.6. Estudio de la expresión de ftmA mediante Western-blot en músculo gastrocnemio de rata tras 6 semanas de entrenamiento. Efecto de la administración de vitamina C.....	176
5.7. Estudio de la expresión de la citrato sintasa mediante Western-blot en músculo gastrocnemio de rata tras 6 semanas de entrenamiento. Efecto de la administración de vitamina C.....	177
5.8. Estudio de la expresión del citocromo C mediante Western-blot en músculo gastrocnemio de rata tras 6 semanas de entrenamiento. Efecto de la administración de vitamina C.....	178
6.- Estudio del efecto de la administración de antioxidantes sobre el rendimiento físico en animales y en humanos.....	179-182
6.1. Prueba de resistencia para animales entrenados durante 6 semanas. Efecto de la administración de Vitamina C.....	179-180
6.2. Mejora del VO ₂ max (ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹) después de 8 semanas de entrenamiento en humanos sedentarios. Efecto de la administración de Vitamina C.....	180-182

V- Discusión.....	183-226
1.- Estudio del efecto de la administración de antioxidantes en el posible daño muscular asociado al entrenamiento. Resultados en animales.....	183-184
2.- Estudio del estrés oxidativo asociado al entrenamiento. Resultados en animales.....	184-189
2.1.- Efecto de la administración de antioxidantes sobre el estatus del glutatión en sangre de ratas entrenadas durante 3 semanas.	184-187
2.2.- Efecto de la administración de antioxidantes sobre los niveles de MDA en plasma de ratas entrenadas durante 3 semanas.....	187-189
3.- Estudio las adaptaciones neuromusculares al entrenamiento de resistencia. Resultados en animales.....	189-192
4.- Efecto de la administración de antioxidantes en la inducción de la defensa antioxidante enzimática por el entrenamiento de resistencia. Resultados en animales.....	192-198

5.- Estudio del papel de los radicales libres en la biogénesis mitocondrial inducida por el entrenamiento de resistencia.	Resultados	en
animales.....		199-216
5.1. Estudio de la expresión de la expresión y fosforilación de las AMPKs mediante Western-blot en músculo gastrocnemio de rata entrenada durante 6 semanas. Efecto de la administración de vitamina C.....		200-204
5.2. Expresión de PGC-1 durante el entrenamiento. Efecto de la administración de antioxidantes.....		205-209
5.3. Expresión de FRN-1 durante el entrenamiento. Efecto de la administración de antioxidantes.		210-212
5.4. Expresión de ftmA durante el entrenamiento. Efecto de la administración de antioxidantes.....		212-213
5.5. Estudio del contenido mitocondrial por la expresión de citocromo C y citrato cintasa durante el entrenamiento. Efecto de la administración de antioxidantes.....		214-216
6.- Estudio del efecto de la administración de antioxidantes sobre el rendimiento físico en animales y en humanos.....		217-224

6.1. Efecto del entrenamiento y de la administración de antioxidantes en la resistencia y el rendimiento del entrenamiento. Estudios en animales.....	217-222
6.2. Efecto del entrenamiento y de la administración de antioxidantes en el consumo máximo de oxígeno. Estudios en humanos.....	222-224

VI-Conclusiones.....227-228

VII-Bibliografía.....229-250

ÍNDICE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

I-Introducción

Tabla I.1- Vida media de algunos radicales libres celulares.....	1
Tabla I. 2- Tipos de radicales libres.....	6
Tabla I.3- Tipos de Superóxido Dismutasa.....	13
Tabla I. 4- Observaciones publicadas sobre la seguridad de la suplementación con vitamina C.....	23
Tabla I.5- Clasificación general del Ejercicio Físico.....	33
Tabla I.6- Secuencias de reconocimiento de genes nucleares para FRN-1 requeridos para la expresión y función de la cadena respiratoria.....	65

II- Objetivos

III- Materiales y Métodos

Tabla III.1- Media y desviación estándar de las características de los dos grupos de estudio.....	107
Tabla III.2- Secuencia génica de los cebadores para los genes a estudiar.....	122

Tabla III.3- Relación de los anticuerpos utilizados en la técnica del Western-blot.....	134
--	-----

IV- Resultados

V- Discusión

Tabla V. 1- Entrenamiento y actividad SOD en humanos.....	196
Tabla V.2- Efecto de la suplementación con antioxidantes en el EF agotador.....	219
Tabla V.3- Efecto de la suplementación con antioxidantes en el rendimiento físico.....	220
Tabla V.4- Efecto de la suplementación con antioxidantes en las adaptaciones al ejercicio físico.....	223
Tabla V.5- Efectos negativos de la suplementación con antioxidantes.....	222

VI-Conclusiones

VII-Bibliografía

ÍNDICE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

I- Introducción

Figura I.1.- La cadena de transporte electrónico mitocondrial.	8
Figura I.2.- Esquema de degradación de las purinas.....	9
Figura I.3.- Sistemas antioxidantes celulares	17
Figura I.4- Estructura química del glutatión.....	18
Figura I.5- Ciclo Redox del glutatión.....	18
Figura I.6- Estructura de la Vitamina C.....	22
Figura I.6- Estructura de la Vitamina E.....	24
Figura I.7- Inhibición de la Xantina Oxidasa por el alopurinol.....	29
Figura I.8- Posibles fuentes de generación de radicales libres en el músculo esquelético.....	45
Figura I.9- Producción de radicales libres por la mitocondria en el ejercicio físico.....	47
Figura I.10- Representación de los efectos del estado redox celular sobre la fuerza isométrica. El modelo integra datos de músculos fatigados y no fatigados.....	54
Figura I.11- Metabolismo de los nucleótidos de adenina durante el ejercicio agudo.....	58

Figura I.12- Mejora de la sensibilidad de la respiración mitocondrial al ADPI debido al entrenamiento o a otros modelos de actividad contráctil crónica.....	59
Figura I.13- Anillo de ADNmt.....	61
Figura I.14- Importancia de PGC-1 a en la biología celular.....	68
Figura I.15- Descripción parcial de la expresión de citocromo C en el músculo durante la actividad contráctil.....	71
Figura I.16- Cadena de importación de proteínas.....	74
Figura I.17- Proceso de biogénesis mitocondrial estimulada por la contracción del músculo esquelético.....	79
Figura I.18- Secuencia temporal establecida para los procesos de biogénesis mitocondrial inducidos por el ejercicio.....	80
Figura I.19- El espectro de desórdenes mitocondriales.....	82
Figura I.20- Prueba de esfuerzo para personas con y sin enfermedades mitocondriales.....	88
Figura I.21- Resumen de los cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares encontrados en diez pacientes con diversos defectos en el ADNmt después de catorce semanas de entrenamiento de resistencia.....	91

II- Objetivos

III- Materiales y Métodos

Figura III.1- Imagen de una electroforesis en gel de agarosa	119
Figura III.2- Representación de la amplificación que obtenemos utilizando la RT-PCR.....	126
Figura III.3- Curva de amplificación tras transformar el eje de ordenadas en logarítmico.....	127
Figura III.4- Resumen de la técnica de la RT-PCR en tiempo real.....	131
Figura III.5- En la que se muestra la emisión de fotones debido a la reacción del anticuerpo secundario y el reactivo ECL.....	135
Figura III.6- Esquema de la técnica del Western-blot.....	136

IV-Resultados

Figura IV.1- Actividad GOT en plasma de ratas entrenadas 3 semanas.	156
Figura IV.2- Valores de GSH en plasma de ratas entrenadas durante 3 semanas.....	158
Figura IV.3- Valores de GSSG en plasma de ratas entrenadas durante 3 semanas.....	158
Figura IV.4- Cociente GSSG/GSH en plasma de ratas entrenadas durante 3 semanas	159
Figura IV.5- MDA en plasma de ratas entrenadas durante 3 semanas...	160

Figura IV.6- Expresión de MyoD en ratas entrenadas durante 3 semanas.....	161
Figura IV.7- Expresión de Miogenina en ratas entrenadas durante 3 semanas.....	162
Figura IV.8- RT-PCR de MnSOD en gastrocnemio de rata entrenada durante 3 semanas.....	164
Figura IV.9- Actividad MnSOD en gastrocnemio de rata entrenada durante 6 semanas.....	165
Figura IV.10- RT-PCR de GPX en gastrocnemio de rata entrenada durante 3 semanas.....	167
Figura IV.11- Actividad GPx en homogenado de gastrocnemio de rata entrenada durante 3 semanas.....	167
Figura IV.12- Actividad GPx en homogenado de gastrocnemio de rata entrenada durante 6 semanas.....	168
Figura IV.13- Western-blot de AMPK en gastrocnemio de rata entrenada 6 semanas.....	170
Figura IV.14- Western-blot de AMPK fosforilada en gastrocnemio de rata entrenada durante 6 semanas.....	171
Figura IV.15- Western-blot de PGC-1 en gastrocnemio de rata entrenada durante 6 semanas.....	172

Figura IV.16- RT-PCR de FRN-1 en gastrocnemio de rata entrenada durante 3 semanas.....	173
Figura IV.17- Western-blot de FRN-1 en gastrocnemio de rata durante entrenada 6 semanas.....	174
Figura IV.18- RT-PCR de ftmA en gastrocnemio de rata entrenada durante 3 semanas.....	175
Figura IV.19- Western-blot de ftmA en gastrocnemio de rata entrenada durante 6 semanas.....	176
Figura IV.20- Western-blot de Citrato Sintasa en gastrocnemio de rata entrenada durante 6 semanas.....	177
Figura IV.21- Western-blot de Citocromo C en gastrocnemio de rata entrenada durante 6 semanas.....	178
Figura IV.22- Tiempo de carrera en ratas entrenadas durante 6 semanas.....	180
Figura IV.23- VO ₂ max en humanos sometidos a un entrenamiento de 8 semanas.....	181

V-Discusión

Figura V.1- Expresión de MnSOD, iNOS, y eNOS en músculo gastrocnemio de rata, inducida por el ejercicio agotador. Efecto de la administración de alopurinol.....	195
---	-----

Figura IV.2- Metabolismo de los nucleótidos de Adenina durante el ejercicio agudo. Reacción de la Mioquinasa.....	200
Figura IV.3- Reacción de la Adenilato Quinasa.....	201
Figura V.4- Vía de señalización relacionada con la biogénesis mitocondrial en células de mamíferos.....	204
Figura V.5- Esquema para entender el control nuclear de las funciones mitocondriales y la biogénesis mitocondrial inducida por activadores y coactivadores transcripcionales.....	206
Figura V.6- Vía de señalización de la Biogénesis Mitocondrial a través de PGC-1.....	207
Figura V.7- Reacción de la Citrato Sintasa.....	215
Figura V.8- Esquema de la Biogénesis mitocondrial producida por los diferentes factores de transcripción. Efecto de la administración de antioxidantes.....	216

VI-Conclusiones

VII-Bibliografía

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AA: Aminoácidos.

ACT: Agua corporal total

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNmt: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial

ADP: Adenosín-5'-difosfato.

ADPI: Adenosín difosfato libre

Alopurinol: 4-hidroxi pirazolo(3,4-d) pirimidina.

ALT: Alanino Amino Transferasa.

AMP: Adenosín-5'-monofosfato.

AMPc: Adenosín-5'-monofosfato cíclico

APS: Persulfato amónico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal

ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia

AST: Aspartato Amino Transferasa.

ATP: Adenosín-5'-trifosfato.

BM: Biogénesis mitocondrial

BSA: Albúmina Suero Bovino.

CDNB: Cloro dinitrobenceno.

CHES: 2-(N-hidroxietil)piperacina-N'-(2-ácido etanosulfónico).

CK: Creatin quinasa.

Complejo TIM: Complejo receptor Translocasa de la membrana Interna mitocondrial

Complejo TOM: Complejo receptor Translocasa de la membrana Externa mitocondrial

COX: Citocromo oxidasa.

- CPT-1** carnitina palmitoiltransferasa-1
- CR:** Cociente respiratorio
- CRE:** Elementos de respuesta a AMPc
- CS:** Citrato Sintasa.
- Cu,Zn-SOD:** Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc.
- DEPC:** Dietil pirocarbonato
- DMSO:** Dimetil sulfóxido.
- DNPH:** 2,4-dinitrofenilhidrazina.
- DTT :** DL-Ditiotreitol.
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético.
- EF:** Ejercicio físico.
- EGTA:** Etileno glicol-bis (aminoetil eter)- N,N,N',N'- ácido tetracético.
- 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.
- ftmA:** Factor de transcripción mitocondrial A
- FRN-1:** Factor de respiración Nuclear 1
- 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.

HDL: High Density Lipoprotein

HEPES: N-(2-hidroexietil)piperacina-N'-(2-ácido etanosulfónico).

HOCl: Ácido hipocloroso.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

HSP: Proteína de estrés térmico.

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico.

IMP: Inosina monofosfato.

Kb: Kilobase.

Kd: Kilodalton.

KOH: Hidróxido potásico.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LDL: Low Density Lipoprotein

L-NAME: N ω -nitro-L-arginina metil éster.

LPS: Lipopolisacárido.

MAPK: Protein kinasas activadas por mitógenos.

MCAD :cadena media de acyl-coA deshidrogenasa

MDA: Malondialdehído.

MET: Metabolic equivalent tasks.

mmHg: Milímetros de mercurio.

Mn-SOD: Superóxido dismutasa dependiente de manganeso

MOPS: Ácido propano sulfónico.

MPP: Peptidasa procesadora mitocondrial

mtADN: ADN mitocondrial.

NAC: N-acetilcisteína.

NAD: Nictotinamida adenin dinucleótido.

NEM: N-etilmaleimida.

NF κ B: 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)

O₂: Oxígeno singlete.

O₂^{•-} : Anión superóxido.

OH[•]: Radical hidroxilo.

ONOO⁻: Peroxinitrito.

OR: Óxidoreductasa.

8oxodG: 8-hidroxi-2' deoxiguanosina:

p/v: peso/volumen.

PBS: Fosfato tampón salino.

PC: Fosfocreatina.

PDTC: Pirrolidin ditiocarbamato.

PI3K: fosfatidilinositol 3'kinasa

PFK: Fosfofructoquinasa.

PCG-1α: coactivador-1α del receptor-γ activado por proliferación del peroxisoma, PPARγ

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.

sGC: Guanilato ciclasa soluble

SOD: Superóxido dismutasa.

Sp1: Factor de transcripción selectivo del promotor 1

TBA: 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.

UCP: Uncoupling Protein

UI: Unidades internacionales.

VM: Volumen minuto

v/v: volumen/volumen

VO₂máx: Consumo máximo de oxígeno.

W: Watios.

XDH: Xantina deshidrogenasa.

XO: Xantina oxidasa.

XOR: Xantina oxidoreductasa.

I-INTRODUCCIÓN

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.

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

Tabla I.1- Vida media de algunos radicales libres celulares.

Radical	Sustrato ^a	Concentración n ^b	Vida Media (a 37°C)
HO•	LH	1 M	10 ⁻⁹ seg
RO•	LH	100mM	10 ⁻⁶ seg
ROO•	LH	1mM	7 seg
L•	O ₂	20mM	10 ⁻⁸ seg
Q•			Días

- a) El sustrato elegido son moléculas diana típicas de las especies de la primera columna.
- b) Los valores de concentración tratan de reproducir la selectividad "in vivo" del radical por su molécula diana.

1.2 Clases de radicales libres

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

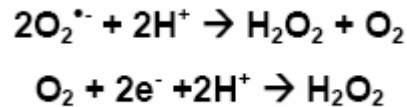
1.2.1. Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

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, (Behard et al. 1979), también en reacciones no enzimáticas del oxígeno con la cisteína (Viña y cols., 1983) o la riboflavina, o bien se produce en la cadena respiratoria mitocondrial (Boveris, Oshino et al. 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



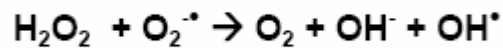
No es un radical libre, pero su toxicidad es importante ya que atraviesa fácilmente las membranas. Muchas enzimas producen agua oxigenada a partir de oxígeno (Fridovich 1986). También puede producirse por reacciones químicas, como la autooxidación del ácido ascórbico catalizada por el cobre (Korycka-Dahi et al., 1981). Se convierte en agua por acción de la catalasa, un proceso que determina su vida media.

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 and Fridovich 1994). Puede generarse *in vivo* como consecuencia de radiaciones de alta energía (rayos X, rayos γ) que pueden provocar rotura hemolítica 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 and 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 (O₂)

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•)

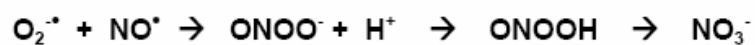
El óxido nítrico ha cobrado gran relevancia en los últimos años por la importante función fisiológica que desempeña, además de ser considerado un intermediario tóxico importante por su condición de radical libre.

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 (Nisoli, Clementi et al. 2003). Dicha enzima presenta tres isoformas: la neuronal nNOS (tipo I), la endotelial eNOS (tipo III) y la inducible iNOS (tipo II) (Bredt, Glatt et al. 1991; Lamas, Marsden et al. 1992)

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, Chen et al. 1994).

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



1.2.7. Dióxido de nitrógeno (NO₂·)

El dióxido de nitrógeno es un radical libre contaminante producido primariamente a partir de la oxidación del NO· atmosférico (Postlethwait, Langford et al. 1995). Es un iniciador muy efectivo de la cadena de peroxidación lipídica (Kaur and Halliwell 1994)

Tabla I.2- Tipos de radicales libres

Especie	Símbolo
Radical superóxido	O ₂ ^{-·}
Radical hidroperóxido	HO ₂ ^{-·}
Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂
Radical hidroxilo	OH [·]
Radical alcóxido	RO [·]
Radical Peróxido	ROO [·]
Óxido de nítrico	NO [·]
Dióxido de nitrógeno	NO ₂

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.

1.3.1. Fuentes exógenas.

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

- Agentes antineoplásicos

- Radiaciones electromagnéticas o de partículas

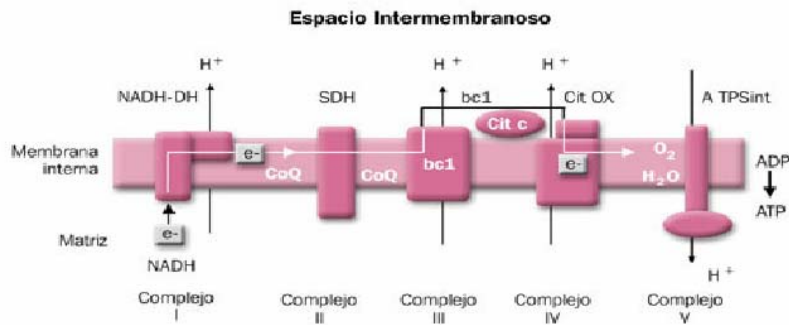
- Factores ambientales

1.3.2. Fuentes endógenas.

1.3.2.1 Cadena de transporte electrónico mitocondrial.

La cadena de transporte electrónico mitocondrial (Figura I.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 I.1- La cadena de transporte electrónico mitocondrial



1.3.2.2. Reacción de Fenton-Haber-Weiss.

Consiste en la reducción del H_2O_2 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 (H_2O_2) es una molécula relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición.

1.3.2.3 El sistema hipoxantina/ xantina oxidasa

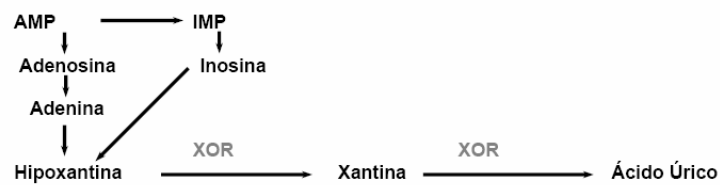
La enzima xantina oxidoreductasa (XOR) es una enzima descrita originalmente como una aldehído oxidasa en 1902 (Schardinger, 1902). Esta enzima está ampliamente distribuida entre seres vivos de distinta complejidad.

En las distintas especies cataliza la hidroxilación de una amplia gama de sustratos como purinas, pirimidinas, pterinas y aldehídos.

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.

Es la enzima encargada de la degradación de las purinas como se muestra en la figura 2

Figura I.2. Esquema de degradación de las purinas



1.3.2.4- Los sistemas de transporte electrónico del retículo endoplasmático

Estos sistemas de membrana contienen los citocromos P450 y b5, que pueden oxidar ácidos grasos insaturados (Capdevila, Chacos et al. 1981) y xenobióticos (Aust, Chignell et al. 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 de defensa frente a los microorganismos.

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, Oshino et al. 1972).

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 dióxígeno 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, flavinprotein deshidrogenasa y triptófano dioxigenasa, generan radicales libres durante su ciclo catalítico (Aleman and Handler 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).

2- Estrés oxidativo:

2.1- Concepto de estrés oxidativo

A pesar del papel fisiológico que desempeñan algunas especies reactivas de oxígeno también pueden dar lugar a reacciones de oxidación indeseadas, contra las cuales los organismos han tenido que desarrollar defensas antioxidantes (Moorhouse, Grootveld et al. 1987).

El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Chance, Sies et al. 1979). Así pues, el estrés oxidativo puede originarse por un exceso de sustancias prooxidantes, una deficiencia de agentes antioxidantes, o por ambos factores a la vez.

Cuando se produce un desequilibrio entre sustancias prooxidantes y antioxidantes a favor de las primeras, el resultado es un daño oxidativo, que puede afectar a diversas moléculas, y que puede reflejarse en sus funciones fisiológicas.

2.2- Estrés oxidativo y daño a biomoléculas

2.2.1 Daño oxidativo a lípidos

Los lípidos, y sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados, son las biomoléculas más susceptibles a ser atacadas por los radicales libres. Los radicales libres que pueden empezar esta reacción son: el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), el peróxido ($\text{ROO}\cdot$), el alcóxido ($\text{RO}\cdot$) y el alquílico ($\text{R}\cdot$). El proceso de ataque oxidativo a los lípidos se denomina peroxidación lipídica. Esta es una reacción en cadena, de modo que el ataque por un solo radical libre da lugar a la formación de un gran número de especies activadas, lo cual desemboca en la oxidación de una gran cantidad de especies, sobre todo aldehídos. Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, causando daños en los mismos.

2.2.2 Daño oxidativo a proteínas

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles (sobre todo grupos carbonilo) de ser atacados por los radicales libres (principalmente en radical hidroxilo). Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína, y por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica.

2.2.2 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 peroxilo. Las posteriores reacciones de estas especies radicalarias en el ADN dan lugar a un gran número de productos.

La alteración de este tipo que más se observa es la 8-hidroxi-2'desoxiguanosina (8-oxodG). Su importancia reside en su poder mutagénico ya que durante la replicación producirá transversiones G-T (Kasai, Tanooka et al. 1984) La cantidad del nucleósido 8-hidroxi-2'desoxiguanosina se utiliza como índice del daño oxidativo al ADN.

El ADN mitocondrial sufre mucho más daño oxidativo que el ADN nuclear (Hellsten, Frandsen et al. 1997). 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 et al. 1995); el sistema de reparación es poco efectivo (Shen, Wertelecki et al. 1995; Suter and Richter 1999) 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 and Cadenas 1998). Otro factor distintivo del ADN mitocondrial es que no posee intrones, de manera que la modificación de cualquier base afecta a una zona de ADN codificante (Linnane, Marzuki et al. 1989; Shigenaga, Hagen et al. 1994) y su repercusión suele ser, por tanto, más importante.

2.2.4. Daño oxidativo a glúcidos.

Los glúcidos reaccionan con facilidad con los radicales hidroxilo. Por ello, se ha observado que diversos polisacáridos actúan como agentes protectores celulares. El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que da lugar a procesos degenerativos.

3- Antioxidantes fisiológicos

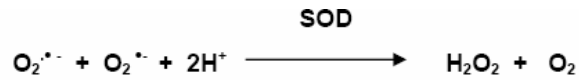
3.1- Concepto de antioxidante

Todas las células aeróbicas están sujetas a estrés oxidativo. El organismo ha desarrollado una serie de mecanismos, diseñados para protegerse de la acción de los radicales libres. Se denominan antioxidantes, y desde un punto de vista bioquímico, pueden clasificarse según sean de naturaleza enzimática o no enzimática.

3.2- Antioxidantes enzimáticos

3.2.1- Superóxido dismutasa

Es la familia de antioxidantes más ampliamente distribuida en la naturaleza. Su actividad fue descrita por primera vez por McCord y Fridovich en 1969 (McCord and Fridovich 1969). La superóxido dismutasa (SOD) transforma el radical superóxido en peróxido de hidrógeno,



constituyendo el primer medio natural de defensa ((McCord 1974; Fridovich 1978).

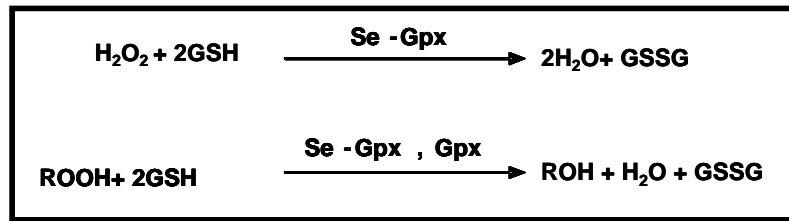
Hay descritas cuatro formas diferentes de esta enzima antioxidante, según el grupo prostético ligado a ella. En la siguiente tabla se resumen los tipos y su localización mayoritaria.

Tabla I.3- Tipos de Superóxido dismutasa

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

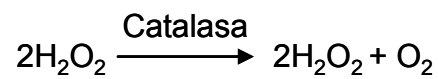
3.2.2- Glutación peroxidasa

La Glutación peroxidasa (Gpx) juega un papel importante en la detoxificación del peróxido de hidrógeno y lipoperóxidos que se generan en las células (Chance y cols., 1979). La mayor parte de la actividad Gpx se encuentra en el citosol, aunque también está presente en la matriz mitocondria. Existen dos tipos de glutación peroxidasa, una selenio dependiente (Se-Gpx), y otra que no contiene selenio (Gpx). Ambas requieren Glutación reducido como dador de equivalentes reductores para catalizar la siguiente reacción:

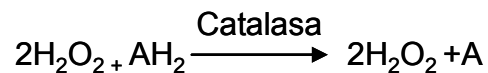


3.2.3- Catalasa

La catalasa participa en la detoxificación del peróxido de hidrógeno, dando a lugar a agua y a una molécula de oxígeno (Chance, Sies et al. 1979)

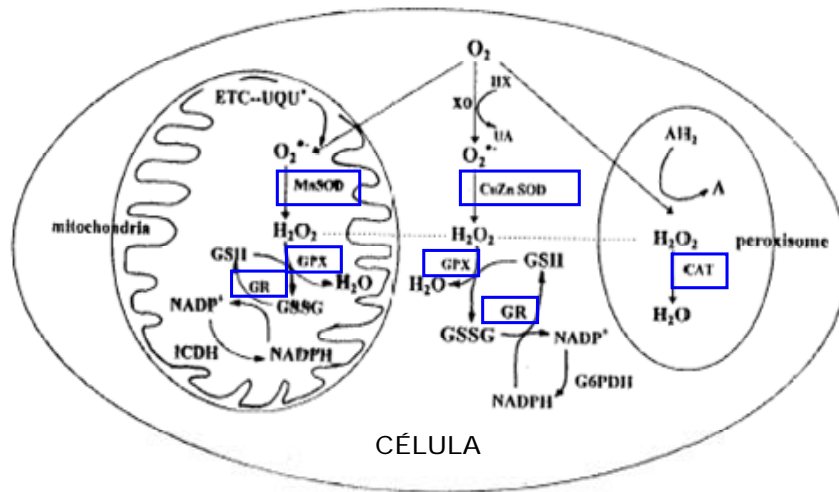


También es capaz de catalizar ciertas reacciones de peroxidación en presencia de H_2O_2 , actuando sobre algunos alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos como sustratos.



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

Figura I.3: Sistemas antioxidantes celulares



3.3- Antioxidantes no enzimáticos

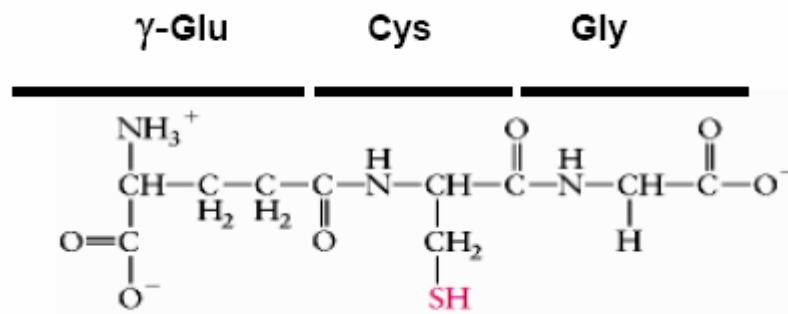
3.3.1- Glutación

Es el tiol no proteico más abundante en las células de mamíferos. Fue descubierto por Hopkins en 1921 y está constituido por 3 aminoácidos: ácidoglutámico, 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 oxidoreducción: 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 (Vina, Gimeno et al. 2000), 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.

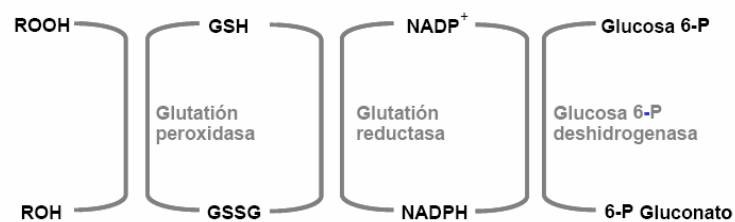
Figura I.4- Estructura química del glutatión



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 (Fujii, Hayashi et al. 2000)

Figural..5- Ciclo Redox del glutatión



3.3.2- Vitamina C

La vitamina C corresponde al grupo de las vitaminas hidrosolubles, y como la gran mayoría de ellas no se almacena en el cuerpo por un largo período de tiempo y se elimina en pequeñas cantidades a través de la orina. Por este motivo, es importante su administración diaria, ya que es más fácil que se agoten sus reservas que las de otras vitaminas. Es una sustancia de color blanco, estable en su forma seca, pero en solución se oxida con facilidad, más aún si se expone al calor. Un pH alcalino (mayor a 7), el cobre y el hierro, también aceleran su oxidación. Su estructura química recuerda a la de la glucosa (en muchos mamíferos y plantas, esta vitamina se sintetiza a partir de la glucosa y galactosa). Se llama con el nombre de vitamina C a todos los compuestos que poseen la actividad biológica del ácido ascórbico.

Absorción y Depósito

Se absorbe fácilmente en el intestino delgado, más precisamente en el duodeno. Pasa a la sangre por transporte activo y tal vez, también por difusión. Pareciera ser que el mecanismo de absorción es saturable, debido a que cuando se ingieren cantidades muy grandes de la vitamina, el porcentaje que se absorbe es mucho menor. En ingestas normales (20-120 mg), se absorbe un 90%, contra un 16% en una ingesta de 12g. La concentración de vitamina C en los leucocitos esta en relación con la concentración de la vitamina en los tejidos, por lo que midiendo la concentración de la vitamina C en los leucocitos, sabemos el nivel real de la vitamina en los tejidos. El pool de vitamina C que el ser humano posee en condiciones normales es de aproximadamente 1500 gr. Cuando este

pool esta lleno, la vitamina C se elimina en un alto porcentaje por orina, bajo la forma de ácido oxálico (catabolito) o si se ingiere en dosis muy elevadas, como ácido ascórbico. Si hay deficiencias, la absorción es muy alta y no hay eliminación por orina. El ácido ascórbico se encuentra en altas concentraciones en varios tejidos, como por ejemplo, el tejido suprarrenal, hígado, bazo y riñones.

El consumo de alcohol disminuye la absorción de la vitamina, y el hábito de fumar depleciona los niveles de la vitamina en el organismo, por lo que se recomienda a los fumadores y consumidores regulares de alcohol, que suplementen su dieta.

La vida media del ácido ascórbico en el organismo es de aproximadamente 16 días. Es por este motivo que los síntomas del escorbuto tardan meses en aparecer en sujetos con una dieta deficiente en vitamina C.

Funciones

Sus funciones son diversas, pero todavía no se sabe si actúa como coenzima o como cofactor. Al tener gran capacidad de captar y liberar hidrógeno (oxido-reducción), su papel en el metabolismo es de gran importancia. Es importante su función como reductora del Fe^{+3} a Fe^{+2} lo que asegura una mayor absorción a nivel del intestino. Facilita a la vez la liberación del hierro de la transferrina (proteína que transporta el hierro en sangre) y también de la ferritina (una de las principales formas de almacenamiento del hierro).

Es importante su participación en la formación del colágeno y mucopolisacáridos, ya que es necesaria junto con el O_2 y el Fe^{+2} para formar hidroxiprolina e hidroxilisina (componentes del colágeno). El colágeno es una sustancia de la cual depende la integridad de todos los

tejidos fibrosos, como son la piel, el tejido conjuntivo, la dentina, matriz ósea, cartílago y los tendones; en la formación de esta proteína radica su importancia como cicatrizante de heridas y fracturas.

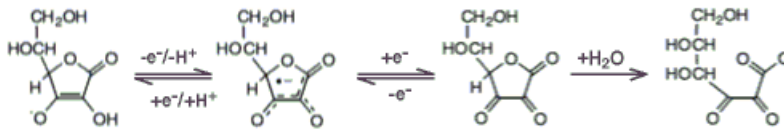
Participa también en la formación de ciertos neurotransmisores como la serotonina, en la conversión de dopamina a noradrenalina, y en otras reacciones de hidroxilación que incluyen a los aminoácidos aromáticos y a los corticoides. Su concentración disminuye bajo situaciones de stress cuando hay mucha actividad de las hormonas de la corteza suprarrenal.

La vitamina C cumple una función importante en el sistema inmunológico, al ayudarlo a luchar contra las infecciones y contra las células cancerosas. Esto es gracias a la actividad de los leucocitos, la estimulación de anticuerpos, neutrófilos y fagocitos, la producción de interferón, el proceso de la reacción inflamatoria o la integridad de las mucosas.

Comúnmente se le atribuyen a la vitamina C varios poderes curativos, desde simples resfriados, hasta enfermedades como el cáncer, pero aunque se ha demostrado que reduce los síntomas y la duración del resfriado, se aconseja no consumir megadosis de la vitamina por largos períodos de tiempo.

Cuando reacciona con radicales libres de oxígeno se oxida a dehidroascorbato que será reciclado a ácido ascórbico por el enzima dehidroascorbato 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. Es uno de los antioxidantes más potentes.

Figura I.5- Estructura de la Vitamina C

Ascorbato	Radical Ascorbil	Dehidroascorbato	2,3 - Diketogulonato
-----------	------------------	------------------	----------------------

Requerimiento, Recomendaciones y Normas

En el ser humano, en los primates y cobayas, entre otros, la vitamina C o ácido ascórbico no puede ser sintetizada, por lo cual debemos ingerirla a diario. Esto es debido a la ausencia de la enzima L-gulonolactona oxidasa que participa en la Vía del Acido Urónico.

El requerimiento mínimo de vitamina C necesario para que desaparezcan los síntomas del escorbuto es de 10 mg, mientras que la recomendación alcanza a los 60 mg y es la adecuada para mantener en forma óptima el pool corporal.

Existe mucha controversia acerca de los efectos adversos que podrían producirse debido a la ingesta de la vitamina C y las dosis a las que se debería administrar. En una publicación reciente de Traber (Hathcock, Azzi et al. 2005), en la que se estudian las dosis seguras de vitamina C y Vitamina E no se llega a una conclusión clara sobre las dosis máximas y tóxicas. Como se puede observar en la siguiente tabla, existen numerosos estudios en los que se ha administrado grandes dosis de vitamina C y no se han descrito grandes efectos adversos.

Tabla 1.4- Observaciones publicadas sobre la seguridad de la suplementación con vitamina C

Estudio publicado y población	Características	Dosis y diseño	Duración	Observaciones de seguridad
(Hughes, Cho et al. 1993) n = 3 n = 9	Voluntarios Pacientes con uricosuria	8 g/d, en dosis divididas 4g en una única dosis	3-9 días 2 horas	Ácido úrico en orina aumentó un 41-54% que llevó a uricosuria en 1 voluntario El ácido úrico y el aclaramiento de creatinina aumentaron un 202%, hubo un caso de diarrea
(Creagan, Moertel et al. 1979) n=150	Pacientes con cáncer avanzados	10g/d dosis dividida, aleatoria y controlada	50-210 días	No existieron diferencias.
(Tsao and Salimi 1984) n=6	Voluntarios	10g/d en dosis divididas, observacional	12-20 días	Excreción urinaria de oxalacetato aumentó un 16%
(Wandzilak, D'Andre et al. 1994) n=15	Voluntarios	10g/d en dosis divididas, observacional	5 días	Excreción urinaria de oxalacetato aumentó un 18-40%, pero permaneció en el rango de referencia
(Levine, Rumsey et al. 1999) n=7	Voluntarios	30-2500mg/d en dosis divididas. Estudio para controlar el metabolismo	40 días	Excreción urinaria de oxalacetato aumentó 0-40%, pero permaneció en el rango de referencia, el ácido úrico urinario aumentó 0-20.

3.3.3- Vitamina E

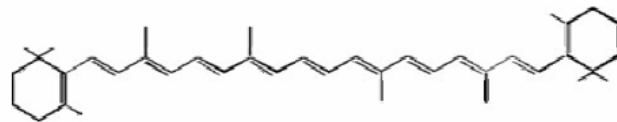
Bajo esta denominación se incluye una familia de compuestos fenólicos llamados tocoferoles y tocotrienoles. En el organismo existen 4 tipos principales de tocoferoles: alfa, beta, gamma y delta tocoferol. Estos grupos de compuestos altamente lipofílicos, tienden a concentrarse en las membranas biológicas y en lipoproteínas plasmáticas.

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

Los niveles de vitamina E en plasma en humanos son de alrededor de 22 $\mu\text{moles/L}$; 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 (Polekhina, Gupta et al. 2003)

Figura I.6- Estructura de la Vitamina E



3.3.4- Carotenoides

La familia completa de los carotenos se encuentra de forma natural en muchas verduras y frutas. Específicamente el beta caroteno se encuentra en las frutas y verduras naranja oscuro o verde. Suplementos de beta caroteno y otros carotenoides, constituyen un aporte apropiado y atractivo. Desafortunadamente, la mayoría de las dietas carecen de estos importantes nutrientes.

Los alfa y beta carotenos son precursores de la vitamina A y actúan como nutrientes antioxidantes. Son los únicos carotenoides que se transforman en cantidades apreciables de vitamina A. Sin embargo, el organismo solo convierte estos carotenoides en vitamina A conforme los va necesitando. Los alfa y beta carotenos son importantes para el sistema inmune y proporcionan resistencia a la infección. También son necesarios para el desarrollo y mantenimiento de un tejido epitelial saludable y de las membranas mucosas, como el revestimiento de los pulmones, los bronquios y otros tejidos respiratorios. El tejido epitelial forma una barrera frente a las bacterias y sustancias extrañas y ayuda directamente a la prevención de infecciones y enfermedades. Recientemente, se ha prestado mucha atención a la familia completa de los carotenoides incluyendo: alfa caroteno, luteína, licopeno, zeaxantina y capxantina. La investigación ha demostrado que alguno de estos carotenoides proporciona unos beneficios antioxidantes y protectores significativamente superiores al beta caroteno.

Son colorantes naturales con pronunciada actividad antioxidante (Krinsky 1995). La propiedad química que les da este carácter antioxidante se basa en un extendido sistema de dobles enlaces conjugados.

Al igual que la Vitamina E, los carotenoides pertenecen a un conjunto de antioxidantes lipofílicos presentes en lipoproteínas como la LDL o HDL, Se pueden encontrar en una gran variedad de frutas y verduras.

3.3.5- Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Los contienen diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana.

Propiedades

- **Propiedades antioxidantes:** La mayoría de ellos, y especialmente las catequinas del té verde, tienen una alta capacidad para neutralizar los radicales libres e impedir los perniciosos efectos que estos ejercen en la salud de nuestro organismo. Usados como complementos en combinación muchas veces con la vitamina C pueden ser capaces de neutralizar ciertos virus como los del herpes.
- **Propiedades anticancerosas:** Muchos flavonoides se han mostrado tremendamente eficaces en el tratamiento del cáncer. Se sabe que muchos inhiben el crecimiento de las células cancerosas
- **Propiedades cardiotónicas:** Tienen un efecto tónico sobre el corazón, potenciando el músculo cardíaco y mejorando la circulación. Atribuidas

fundamentalmente al flavonoide quercetina aunque aparece en menor intensidad en otros como la genisteína y la luteolina.

- Fragilidad capilar: Mejoran la resistencia de los capilares y favorecen el que estos no se rompan, por lo que resultan adecuados para prevenir el sangrado. Entre todos los flavonoides tendríamos que mencionar por orden de importancia la hesperidina, la rutina y la quercetina.

- Propiedades antitrombóticas: La capacidad de estos componentes para impedir la formación de trombos en los vasos sanguíneos posibilita una mejor circulación y una prevención de muchas enfermedades cardiovasculares.

- Disminución del colesterol: Su capacidad para rebajar el colesterol y los triglicéridos supone una ventaja en la salud del aparato circulatorio.

- Protección del hígado: algunos flavonoides han demostrado su poder protector contra las enfermedades del hígado. La silimarina se ha probado experimentalmente como protectora y regeneradora del hígado en la hepatitis. Este mismo flavonoide, junto con la apigenina y la quercetina, son muy útiles para eliminar ciertas dolencias digestivas relacionadas con el hígado, como la sensación de plenitud o los vómitos.

- Protección del estómago: Ciertos flavonoides, como la quercetina, la rutina y el kamferol, tienen propiedades antiulcéricas al proteger la mucosa gástrica.

- Antiinflamatorias y analgésicas: La hesperidina y otros flavonoides, por sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas, se han utilizado para el tratamiento de ciertas enfermedades como la artritis.

- Antimicrobianas: La mayoría de estos principios han demostrado tener propiedades antivirales, antifúngicas y antibacterianas.

En los frutos la mayoría de ellos se encuentran en la piel, por lo que es mejor comerlos sin pelar, debidamente lavados previamente. Son un grupo de antioxidantes polifenólicos que se pueden encontrar en forma de O-glicósidos principalmente en muchas frutas, vegetales, bebidas como el té, el vino y la cerveza.

3.3.6. Alopurinol.

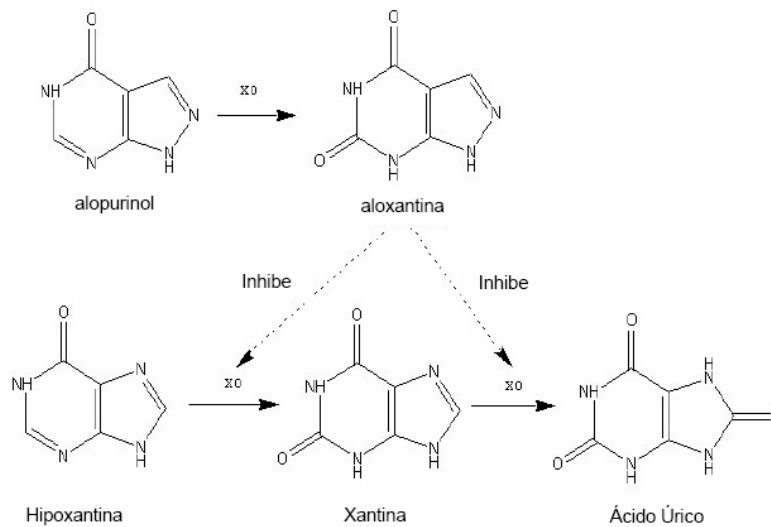
El alopurinol [1H-pirazolo (3,4-d)pirimidina-4-ol] es un análogo estructural de la base púrica natural hipoxantina (peso molecular 136.11) y actúa sobre el catabolismo de las purinas sin modificar su biosíntesis. Reduce la producción de ácido úrico al inhibir las reacciones bioquímicas que conducen a su formación. El alopurinol es un análogo estructural de la base púrica natural hipoxantina 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 en el hombre. 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, Kovensky et al. 1966). El alopurinol inhibe la xantina oxidasa formando un complejo reversible con el molibdeno e interfiriendo así la interacción de las purinas con la enzima, de forma que no puede realizarse la oxidación de éstas (Massey, Komai et al. 1970)

El alopurinol es absorbido por el tracto intestinal en un 90% aproximadamente.

El alopurinol es metabolizado al oxipurinol que también es un inhibidor de la xantina oxidasa. El alopurinol y el oxipurinol son eliminados por los riñones; por lo tanto, los cambios en la función renal tienen un efecto profundo en la dosificación.

Se ha comprobado que la reutilización de la xantina y de la hipoxantina para la síntesis de los nucleótidos y de los ácidos nucleicos se mejora cuando sus oxidaciones son inhibidas por el alopurinol y oxipurinol. Esta reutilización no afecta el normal anabolismo de los ácidos nucleicos. Como resultado de la inhibición de la xantina oxidasa, en los pacientes tratados con alopurinol se han detectado unos niveles de xantina + hipoxantina de 0.3 a 0.4 mg/dl en comparación con los niveles normales de aproximadamente 0.15 mg/dl. El valor máximo detectado, de 0.9 mg/dl de estas oxipurinas después de dosis muy altas de alopurinol están muy por encima de la saturación (> 7 mg/dl).

Figura I.7- Inhibición de la Xantina Oxidasa por el alopurinol



4-Ejercicio físico:

4.1.-Concepto:

Debemos diferenciar los conceptos de actividad, ejercicio y deporte. La actividad física se define como cualquier movimiento corporal producido por los músculos esqueléticos que origine consumo de energía.

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 ejercicio físico, sobre todo cuando no es agotador resulta una práctica claramente sana y beneficiosa para la prevención de muchas enfermedades. La práctica usual de EF se asocia con una disminución de la mortalidad global ajustada por la edad y un aumento de la esperanza de vida en más de dos años sobre la media poblacional (Ortega, 1999). Puede aumentar la vida media en roedores en un 9%, y en un reciente estudio (Navarro, Gomez et al. 2004) se ha demostrado que también puede aumentar la vida máxima. Reduce el riesgo de sufrir enfermedades coronarias o la muerte por ésta (Pate et al. 1995), de diabetes mellitus tipo 2 (Beaulieu M, 2000), obesidad, hipertensión arterial (Serratosa and Fernández, 1997) y distintos tipos de cáncer (Hoffman-Goetz 1998); (Friedenreich, Courneya et al. 1998; McTiernan, Schwartz et al. 1999). A su vez, contribuye a evitar la osteoporosis y a mantener la funcionalidad de las articulaciones (Berard, Bravo et al. 1997). Ciertas formas de EF mejoran la función del músculo esquelético (Dupont-Versteegden, McCarter et al. 1994; Hayes and Williams 1996) y sus propiedades tales como las adaptaciones vasculares y el mantenimiento de la masa muscular (Laughlin, Simpson et al. 1990)

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. 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. (Notice to readers publications of surgeon general's report on physical activity and health. MMWR 1996;45:591-592)

4.2.-Clasificación de los ejercicios físicos

A) Según el volumen de la masa muscular implicada:

- Locales: Ejercicios que involucran menos de 1/3 de la masa muscular total. P.e. los ejercicios con miembros superiores o inferiores que provocan cambios mínimos en el organismo.

- Regionales: Ejercicios en donde participan entre 1/3 a 1/2 de la masa muscular total, p. e. miembros superiores y tronco.

- Globales: Ejercicios en donde participan más de la mitad del volumen de la masa muscular total, provocando cambios en el organismo.

B) Según el tipo de contracción

a- Dinámicos: También llamados isotónicos. Hay modificación de la longitud del músculo. Puede subclasificarse a su vez en:

1- Concéntricos: Se produce una contracción con acortamiento del vientre muscular.

2- Excéntricos: Se produce una contracción con elongación del vientre muscular.

b- Estáticos: También llamados isométricos. Predomina la energía anaerobia. Estos ejercicios son de escasa duración y provocan serios cambios funcionales en el organismo.

C) Según fuerza y potencia

- Ejercicios de fuerza: Son aquellos en los que se emplea más del 50% de la capacidad de fuerza de un individuo.

- Ejercicios de velocidad-fuerza: Son aquellos en donde se emplea un 30 a 50% de la fuerza de un individuo.

- Ejercicios de duración: No hay empleo de mucha fuerza del individuo, es mínima

D) Según costos funcionales:

Esta clasificación se realiza en base a algunos indicadores que son:

- MET: Consumo de O₂ en ml/min en estado de reposo por kg. de peso.

- VO₂: Consumo de O₂.

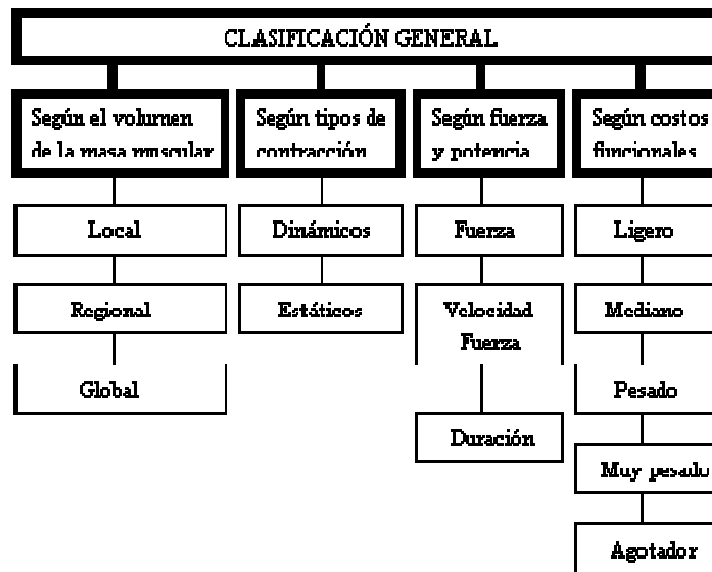
- FC: Frecuencia cardíaca

- VMR: Equivalente metabólico, en litros/min.

- T°: Temperatura en °C

- Lact.: Producción de lactato

Tabla I.5: Clasificación general del Ejercicio Físico



4.3.-Adaptaciones al Ejercicio Físico:

Una *Respuesta o Adaptación aguda* al ejercicio se define como aquella que tiene lugar en el transcurso del ejercicio físico.

Una *Adaptación crónica* se define como aquella que se manifiesta por los cambios estructurales y funcionales de las distintas adaptaciones agudas (cuando el ejercicio es repetido y continuo), p. e. aumento del número de mitocondrias musculares, agrandamiento cardíaco, incremento del consumo máximo de oxígeno ($VO_2\text{max}$), disminución de la frecuencia cardíaca, incremento de la capacidad oxidativa del músculo, etc. Estas manifestaciones se producen a largo plazo.

4.3.1-Adaptaciones orgánicas al Ejercicio Físico

- I - Adaptaciones Metabólicas.
- II - Adaptaciones Circulatorias.
- III - Adaptaciones Cardíacas.
- IV - Adaptaciones Respiratorias.
- V – Adaptaciones Hematológicas.
- VI - Adaptaciones en el Medio Interno.

I - Adaptaciones Metabólicas

Sistemas metabólicos musculares

El ATP es la única fuente directa de energía para formar y romper puentes transversales durante la contracción de los sarcómeros. Durante el ejercicio máximo, el músculo esquelético utiliza hasta 1×10^{-3} mol de ATP/gramo de músculo/minuto. Esta velocidad de consumo de ATP es de 100 a 1000 veces superior al consumo de ATP del músculo en reposo. El músculo esquelético posee solo 5×10^{-6} mol/gramo de ATP acumulados, lo que supondrá una depleción de ATP en menos de 1 seg., si no fuera por que existen mecanismos para la generación de ATP de considerable capacidad y rapidez.

Los sistemas metabólicos musculares son:

- a) Reserva de ATP acumulada intracelularmente
- b) Conversión de las reservas de alta energía de la forma de fosfocreatina a ATP
- c) Generación de ATP mediante glucólisis anaeróbica
- d) Metabolismo oxidativo del acetyl-CoA

Con el comienzo del ejercicio de intensidad moderada a grande, la transferencia de fosfato y la glucólisis anaeróbica representan las fuentes iniciales de combustible para reponer el ATP consumido. Los niveles de glucógeno y fosfocreatina descienden rápidamente y aumenta la

concentración de lactato en la célula. La preferencia inicial de estas vías metabólicas, está relacionado en parte con la velocidad de las reacciones para la producción de ATP. El metabolismo oxidativo es mucho más lento y además necesita una mayor captación de sustrato y O_2 , los cuales requieren un incremento del flujo sanguíneo. Una vez alcanzado este estado, la generación de ATP puede atribuirse casi por completo a la captación de O_2 y sustratos de la sangre.

Tanto en reposo como en ejercicio, el músculo esquelético utiliza ácidos grasos libres (AGL) como una de las principales fuentes de combustible para el metabolismo aeróbico.

Para el músculo esquelético de cualquier capacidad aeróbica, el transporte de O_2 y sustratos (principalmente AGL) limita el nivel de rendimiento en trabajos submáximos de media y larga duración.

En el músculo en reposo el cociente respiratorio ($CR=VCO_2 / VO_2$) se acerca a 0,7 (normal en el organismo en reposo = 0,82), lo cual indica una dependencia casi total de la oxidación de AGL. La captación de glucosa representa menos del 10% del consumo total de O_2 por el músculo.

Durante la fase inicial del ejercicio sin embargo, el glucógeno muscular constituye la principal fuente de energía consumida.

El índice de glucogenólisis muscular es más elevado durante los primeros 5 a 10 minutos de ejercicio, si éste continúa los sustratos transportados por la sangre se convertirán en fuentes cada vez más importante de energía.

En el período comprendido entre los 10 a 40 minutos aumenta de 7 a 20 veces la captación de glucosa, representando el 30 al 40% del consumo de O_2 total, equiparada a la proporcionada por los AGL.

Si el ejercicio continúa más de 40 minutos la utilización de glucosa alcanza su pico máximo entre los 90 y 180 minutos, declinando posteriormente. Este proceso viene acompañado por un aumento progresivo de la utilización de AGL, que a las 4 hs. alcanza el 61%.

El aumento de la utilización de la glucosa está asociado con un aumento de la excreción de alanina del músculo, es proporcional a la intensidad del ejercicio efectuado. Si se prolonga el ejercicio pueden ser importantes combustibles energéticos los aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina) que son excretados por el hígado y captados por el músculo, donde se obtienen de 32 a 42 moles de ATP por cada mol de aminoácidos.

En resumen durante ejercicios prolongados la utilización de combustibles está caracterizada por una secuencia trifásica, en la cual predomina como sustrato principal para brindar productos de energía el glucógeno muscular, la glucosa sanguínea y los AGL sucesivamente.

Recuperación posterior al ejercicio

a) Metabolismo de la glucosa

El efecto inmediato del metabolismo de la glucosa en fase de recuperación es iniciar la reposición de las reservas de glucógeno en el músculo y en el hígado.

Durante el período de recuperación temprana hay una rápida elevación de insulina que disminuye la liberación de glucosa hepática hasta niveles basales. El glucagón se mantiene elevado y contribuye al aumento de la captación hepática de precursores gluconeogénicos, principalmente lactato y piruvato y en menor grado alanina.

El músculo mantiene una captación de glucosa 3 a 4 veces superior a los niveles basales.

A las 12 - 14 h. posteriores al ejercicio las reservas de glucógeno muscular aumentan el 50% o más, aún en ausencia de ingesta alimentaria. Esto se explica por la acelerada gluconeogénesis hepática y su liberación posterior al torrente sanguíneo.

b) Catabolismo y anabolismo proteico

Durante el ejercicio existe catabolismo proteico para obtener sustratos para la gluconeogénesis.

Finalizada la contracción muscular se produce un aumento de la respuesta anabólica, y si se repiten las sesiones de ejercicio el efecto a largo plazo se manifiesta con una hipertrofia muscular.

Similar fenómeno ocurre con las reservas de glucógeno.

II - ADAPTACIONES CIRCULATORIAS

Durante el ejercicio, el mayor requerimiento de O₂ por los músculos que se contraen es satisfecho por un aumento del aporte sanguíneo. Esto es posible porque el corazón bombea más sangre por minuto y porque ocurren adaptaciones circulatorias, que desvían gran parte del torrente sanguíneo desde tejidos menos activos hacia los músculos.

Estas adaptaciones circulatorias no se circunscriben únicamente a los músculos esqueléticos ya que aumenta el requerimiento de O₂ del corazón y se debe evitar que se desvíe sangre desde el encéfalo hacia los músculos.

Por supuesto, el flujo sanguíneo a través de los pulmones debe aumentar en la misma proporción que el flujo en la circulación sistémica, pero sin que la velocidad se acelere tanto como para dificultar el intercambio gaseoso adecuado. Estos grandes cambios adaptativos de la circulación obedecen a la interacción de factores nerviosos y químicos.

III - ADAPTACIONES CARDÍACAS

En los períodos de reposo, los músculos almacenan sustancias nutritivas en cantidades suficientes como para iniciar y mantener el ejercicio hasta que se puedan movilizar las reservas, pero no tienen capacidad de almacenar O_2 , por lo que el aumento de las necesidades de O_2 debe ser satisfecho de dos maneras:

• Incremento del flujo sanguíneo para los músculos activos

- Desviando sangre desde zonas menos activas
- Aumentando el volumen minuto (VM)
- Incremento de la extracción de O_2 de la sangre

Se considera que el aumento del VM es la más importante de las respuestas adaptativas para incrementar la entrega de O_2 a los músculos en actividad siendo el factor que suele establecer el límite superior de la capacidad para el ejercicio.

IV - ADAPTACIONES RESPIRATORIAS

Consumo de O_2 y ventilación pulmonar

El consumo normal de O_2 para el varón adulto joven en reposo es de 250 ml/min., pero en condiciones extremas este valor puede llegar a 3600 ml/min sin entrenamiento 4000 ml/min con entrenamiento deportivo, y 5100 ml/min. en un corredor de maratón masculino.

El consumo de O_2 y ventilación pulmonar total aumenta unas 20 veces desde el estado de reposo al de ejercicio de intensidad máxima

La capacidad respiratoria máxima es cerca del 50% mayor que la ventilación pulmonar real durante el ejercicio máximo, ello brinda un elemento de seguridad para los deportistas dándoles ventilación adicional

en caso de ejercicios a grandes alturas, ambientes muy cálidos o anomalías en el sistema respiratorio.

Efecto del entrenamiento sobre la VO_2 máx.

El consumo máximo de O_2 bajo un metabolismo aeróbico (VO_2 máx.) en períodos cortos de entrenamiento (2-3 meses) solo aumenta el 10%. Sin embargo los corredores de maratón presentan un VO_2 máx. alrededor del 45% superior al de las personas no entrenadas. En parte ese valor superior corresponde a la determinación genética.

V - ADAPTACIONES HEMATOLÓGICAS

Efectos del ejercicio sobre los eritrocitos.

El recuento de glóbulos rojos de la sangre con frecuencia está aumentado en los primeros momentos del ejercicio, probablemente por simple hemoconcentración (transferencia de líquido sanguíneo a los tejidos). Durante ejercicios más prolongados este líquido pasa a la sangre por lo que hay hemodilución. Un esfuerzo muy agotador puede causar incremento de la destrucción de los glóbulos rojos como consecuencia de compresiones capilares por la contracción muscular y el aumento de la velocidad del flujo sanguíneo, sobre todo en personas de hábitos sedentarios que practican de forma esporádica actividades físicas.

Modificaciones de los glóbulos blancos durante el ejercicio.

El ejercicio de cualquier naturaleza aumenta el recuento leucocitario. En los primeros instantes del ejercicio intenso el aumento relativo de los leucocitos se debe sobre todo al mayor número de linfocitos, pero si el

ejercicio se prolonga la elevación consecutiva depende casi exclusivamente del incremento de neutrófilos. Este aumento se produce muy rápidamente y se han registrado cifras de 35.000/mm³ (normal 5.000 a 10.000/mm³). La explicación más razonable es que gran número de células, que durante el reposo permanecen adheridas a las paredes de los vasos, son arrastradas a la circulación por el aumento del volumen y la velocidad del flujo sanguíneo.

Cuando mayor es el grado de estrés asociado con el ejercicio, mayor es la elevación del recuento de glóbulos blancos. Un estrés de cualquier tipo (ejercicio agotador, excitación, ansiedad, etc.) determina mayor secreción de hormonas de la corteza suprarrenal.

Coagulación de la sangre y fibrinólisis

El ejercicio acentúa la coagulación de la sangre, acompañado de mayor actividad fibrinolítica. Inmediatamente después del ejercicio se acorta el tiempo de coagulación, normalizándose a las pocas horas, probablemente por aumento de la actividad del factor antihemofílico. El aumento de la actividad fibrinolítica se debe a la mayor concentración de un activador del plasminógeno.

VI - ADAPTACIONES DEL MEDIO INTERNO

Regulación del volumen y la composición de los compartimentos líquidos

El agua corporal total (ACT) está determinada por el equilibrio entre el ingreso de agua (incluyendo la contenida en los alimentos y la producida

durante el metabolismo) y la pérdida hídrica con la orina, heces, sudor y aire espirado. El equilibrio se mantiene con ajustes adecuados entre los distintos factores cuando hay modificaciones, p. e., si se pierde excesiva cantidad de agua con la sudoración, disminuye la excreción urinaria; y si se ingiere agua en exceso, por la misma vía se incrementa la excreción.

Los cuatro factores de regulación más importantes en el mantenimiento del equilibrio hídrico son:

- Ingestión voluntaria de agua, controlada por la sensación de sed.
- Excreción de orina, controlada por la ADH
- Sistema Renina/ Angiotensina/ Aldosterona
- Hormona natriurética auricular

Alteración del equilibrio líquido en el ejercicio agudo

Durante el ejercicio se produce hemoconcentración, o sea, mayor concentración de glóbulos rojos, hemoglobina y proteínas plasmáticas.

El mecanismo básico consiste en el paso de líquido desde la sangre hacia los espacios hísticos por el incremento de la presión sanguínea en los capilares musculares, junto con la elevación de la presión sistólica durante el ejercicio. Si se agrega a ello transpiración excesiva, esta pérdida de agua contribuirá a la hemoconcentración, a menos que se equilibre mediante la disminución de la excreción renal de agua, o por la mayor ingestión voluntaria de agua. Finalmente, hay pruebas de que el aumento del metabolismo celular, por transformación de las moléculas grandes en otras pequeñas con el consiguiente aumento en el número de partículas, puede contribuir a la absorción osmótica de líquido de los compartimentos intersticial y vascular por las células.

4.4.- Clasificación de la fatiga

Desde un punto de vista fisiológico podemos definir la fatiga como la incapacidad de un organismo para mantener la producción de energía (Booth and Thomason 1991) o como la incapacidad del músculo para mantener una potencia determinada (Jackson, Edwards et al. 1985).

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 así la aparición de lesiones celulares irreversibles y numerosas lesiones deportivas.

Clasificación de la fatiga según el tiempo de aparición

1. Aguda: Ocurre durante una sesión de ejercicios, (Entrenamiento o competición) produciendo una disminución del rendimiento o detención del ejercicio.

- Local si afecta a un grupo de músculos
- General afecta 2/3 partes o más de los músculos del cuerpo. Su recuperación es rápida (horas o días).

2. Subaguda: Ocurre después de uno o varios microciclos relativamente intensos, con pocas sesiones de recuperación.

Está asociada a períodos de entrenamiento muy intensos. Su recuperación se produce en una o dos semanas. Sirve para estimular mecanismos de supercompensación.

3 .Crónica: Ocurre después de varios microciclos intensos con muy poco tiempo de recuperación. En este caso, la fatiga es siempre general.

También se llama síndrome de Sobreentrenamiento. La duración de los síntomas y su gravedad es mayor que en la fatiga subaguda. Su recuperación se produce en uno o varios meses.

Clasificación de la fatiga según el lugar de aparición:

a. Central: Cuando afecta a los procesos neurales de la contracción muscular, como consecuencia de varios factores inhibitorios (alteraciones metabólicas, aspectos psicológicos, etc.) que impiden una correcta activación muscular.

Se debe principalmente a:

Motivación (Disposición mental ante la competición) y *Alteraciones Metabólicas* (Altos niveles de amonio, estados de hipoglucemia).

b. Periférica: Cuando afecta a cualquier estructura comprendida entre la placa motora y la fibra muscular.

- A nivel de sarcolema.
- A nivel de retículo sarcoplásmico.
- A nivel de la unión de Ca^{2+} con la Troponina C.
- Fallo en la interacción actina –miosina por disminución de Sustratos (PC y ATP). Cuando el ejercicio es de alta intensidad, sin periodos de recuperación.

Factores que determinan la fatiga

- Aumento de temperatura
- Deshidratación: Con la consecuente disminución del volumen plasmático y alteración hidroelectrolítica.

disminución de las concentraciones de K^+ intracelular y acumulación de K^+ extracelular.

- Aumento en las concentraciones de amonio.
- Aumento en la producción de radicales libres.
- Disminución del glucógeno muscular.
- Hipoglucemia.
- Acumulación de Lactato.

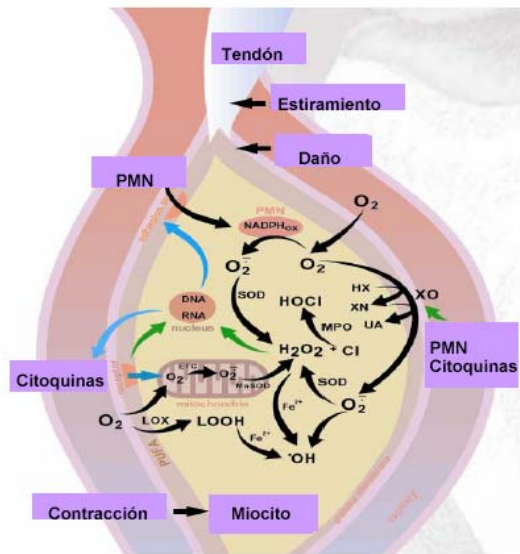
4.5.-Radicales libres y ejercicio físico

El ejercicio físico regular tiene una gran cantidad de efectos beneficiosos. Por otra parte, el ejercicio físico agotador en sujetos no entrenados, puede generar estrés oxidativo. En 1954, el grupo de Commomer, utilizando resonancia paramagnética de electrones detectaron radicales libres en músculo esquelético (Commer et al, 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.

4.5.1- 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 (figura 8)

Figura I.8- Posibles fuentes de generación de radicales libres en el músculo esquelético.



Fuentes de generación de RL en el músculo esquelético como la mitocondria, la NADPH y la Xantina Oxidasa

4.5.1.1- 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, Sies et al. 1979; Shigenaga, Hagen et al. 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 and 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

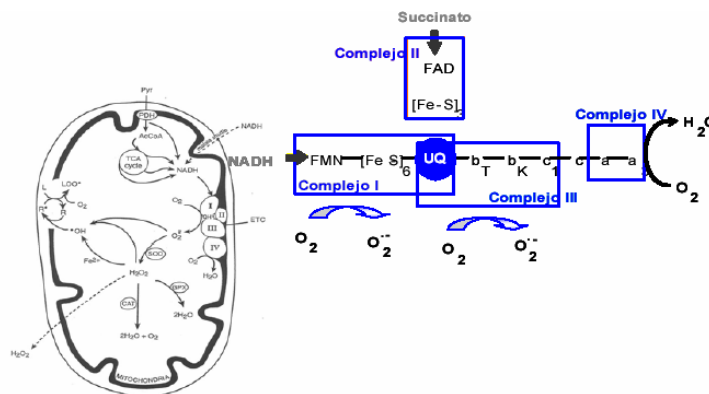
superóxido. Asimismo, también se ha evidenciado la presencia de radical hidroxilo en la mitocondria de músculo esquelético ejercitado, el cual parece estar relacionado con la tensión desarrollada por el músculo (Barclay and Hansel 1991). Durante el ejercicio físico el consumo de oxígeno por parte del músculo puede aumentar más de 100 veces (Tonkonogi and Sahlin 2002) y el consumo de oxígeno del organismo entero puede aumentar 20 veces (Meydani, Evans et al. 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, Sies et al. 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 el grupo de Papa (Papa, Guerrieri et al. 1997) dieron una explicación molecular a este hecho.

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 and Jackman 1994) Estudios morfológicos demuestran cambios en la ultraestructura mitocondrial tras realizar ejercicio de alta intensidad (Schmid, Simmler et al. 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, Ertbjerg et al. 1996) o por el ejercicio excéntrico (Walsh, Tonkonogi et al. 2001) y otros han visto que la función mitocondrial aumenta tras ejercicio intermitente (Tonkonogi, Walsh et al. 1999) y tras ejercicio prolongado a moderada intensidad (Tonkonogi, Harris et al. 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 el aumento de la cantidad de RL intracelular durante contracciones musculares continuas (Nethery, Stofan et al. 1999) y depende de la entrada de Ca²⁺ extracelular por canales tipo L (Supinski 1998). Las mitocondrias de animales control liberan peróxido de hidrógeno; esta señal es estimulada por el Ca²⁺ y el AMP y disminuida por inhibidores de la 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, Bombeck et al. 1999)

Figura I.9- Producción de radicales libres por la mitocondria en el ejercicio físico



Los radicales libres que se producen en la mitocondria se generan en el complejo I y el complejo III

4.5.1.2- Xantina oxidasa

Pese a que varios grupos de investigación, como hemos comentado en el apartado anterior, 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, Shoji et al. 1992) y en el compartimento vascular (Lee and Okabe 1995). 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, Rapola et al. 1999). La administración de inhibidores de la enzima disminuye la liberación de radical superóxido en el espacio vascular en los músculos en contracción (Stofan, Callahan et al. 2000) y parcialmente inhibe la fatiga *in vivo* (Barclay and 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 (XO) 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, Frandsen et al. 1997) o en el daño causado por los procesos de isquemia-reperfusión (Kadambi and Skalak 2000). Se han encontrado niveles más elevados de ARNm para Xantina

deshidrogenasa/Xantina oxidasa (XDH/XO) en músculos dañados frente a controles, acompañados con un aumento de la actividad XDH/XO.

La xantina oxidasa fue inicialmente identificada como una fuente potencial de radicales libres en el citosol de la célula muscular (Laughlin, Hale et al. 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 en la sangre (Sahlin, Ekberg et al. 1991). 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, Sollevi et al. 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, Broberg et al. 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.

Con respecto al ácido úrico, las observaciones publicadas sobre la ausencia significativa de liberación del ácido úrico por el músculo (Sahlin 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, Tullson et al. 1993). Existe una correlación lineal entre el pico de hipoxantina y el de ácido úrico en plasma tras un ejercicio físico agotador (Hellsten-Westing, Kaijser et al. 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 el grupo de Granger (Granger, Perry et al. 1981) 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 reintroducción del oxígeno molecular durante la reperfusión, una considerable cantidad de radical superóxido, podría ser generada en la reacción catalizada por la XO.

4.5.1.3- 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 (Griendling, Minieri et al. 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 (Hollander, Fiebig et al. 1999).

4.5.2.- 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.

4.5.2.1. Efecto de las ERO en la contracción muscular.

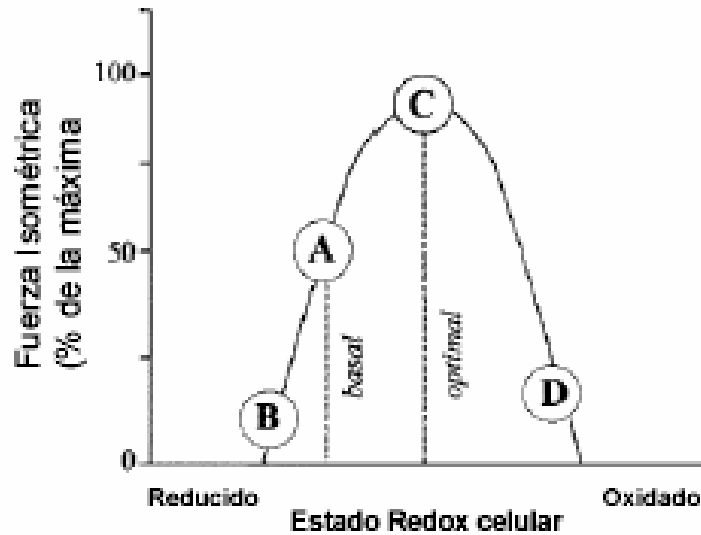
Las ERO tienen un efecto bifásico en la función contráctil del músculo no fatigado. Los bajos niveles de ERO presentes en condiciones basales son esenciales para la producción de fuerza. Una depleción selectiva de las ERO en músculo no fatigado, utilizando SOD o catalasa provoca una caída en la fuerza 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, Stokic et al. 1994).

Otros factores como la edad pueden también incrementar la cantidad de ERO en el músculo (Cakatay, Telci et al. 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, dos Santos et al. 2000).

En la Figura 10 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 que 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 I.10- 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)

5- Biogénesis mitocondrial:

Una de las adaptaciones más importantes al entrenamiento aeróbico es la biogénesis mitocondrial (BM). El término biogénesis mitocondrial implica los procesos celulares relacionados con la síntesis y degradación del orgánulo.

Hace relativamente pocos años que se sabe que el tamaño de las mitocondrias, el número y el volumen aumenta en respuesta a estímulos fisiológicos (Holloszy JO, 1967;(Gollnick and King 1969) Este hecho fue relevante para los fisiólogos del ejercicio interesados en las bases moleculares del rendimiento en las pruebas de resistencia y también para los atletas que siguen distintos programas de entrenamiento. También es relevante el hecho de que el contenido mitocondrial puede verse reducido durante períodos prolongados de desuso del músculo como la inmovilización (Booth 1977) o la denervación muscular (Wicks and Hood 1991).

La biogénesis mitocondrial se puede producir por diferentes condiciones fisiológicas.

Se sabe que los entrenamientos de resistencia, empleando una duración apropiada por día, una determinada frecuencia por semana y una intensidad submáxima por ejercicio puede aumentar el contenido mitocondrial de un 50% a un 100% en un periodo aproximado de seis semanas (Hood 2001).

Esto directamente conlleva un aumento en la resistencia independientemente de los pequeños cambios que se producen en el

consumo máximo de oxígeno ($VO_2\text{max}$) inducido por el entrenamiento. (Fitts, Booth et al. 1975; Davies, Packer et al. 1981)

La BM se puede conseguir en base a modelos artificiales de ejercicio como por ejemplo la actividad contráctil crónica producida por estimulación eléctrica del nervio motor. Este modelo tiene la ventaja de producir cambios más evidentes en un menor tiempo si la comparamos con la biogénesis producida por el ejercicio voluntario (Takahashi and Hood 1993; Pette and Staron 1997). La biogénesis en el músculo también puede ser producida por otros mecanismos como por ejemplo por acción de la hormona tiroidea (Fitts, Winder et al. 1980) La respuesta del músculo a esta hormona es fibroespecífica (Fitts, Winder et al. 1980), y dependiente de la distribución de los receptores de la hormona tiroidea (Schuler and Pette 1998).

El contenido mitocondrial tiene una corta vida media y el fenotipo mitocondrial puede cambiar. El contenido mitocondrial se puede medir directamente utilizando estudios morfométricos del volumen del orgánulo en relación con el volumen celular total. Si embargo se utiliza con más frecuencia el estudio de la actividad y cantidad de los marcadores de contenido mitocondrial como son la citrato sintasa o el citocromo C (Dudley, Abraham et al. 1982).

Las adaptaciones mitocondriales no ocurren en células del músculo esquelético que no se ejercitan, lo que supone que el estímulo para la BM se origina por la propia actividad contráctil del músculo y es independiente de estímulos humorales.

La alta intensidad y la poca duración de muchos entrenamientos de resistencia, representa un gran estímulo para la síntesis de proteínas de miofibrillas que conducen a la hipertrofia muscular y que enmascararán el contenido mitocondrial del tejido (MacDougall, Sale et al. 1979; Luthi, Howald et al. 1986).

Las aproximadas seis semanas necesarias para que se produzca el “nuevo estado” mitocondrial en respuesta al entrenamiento de resistencia, no refleja los eventos moleculares iniciales que conllevarán finalmente a los cambios morfológicos. Las proteínas mitocondriales se renuevan con una frecuencia media de alrededor de una semana desde el inicio de la actividad contráctil del músculo; (Henriksson and Reitman 1977; Hickson 1981; Dudley, Abraham et al. 1982) (Bereiter-Hahn 1990). Esto significa que se necesita un estímulo continuo para mantener el contenido mitocondrial en un nivel elevado siguiendo el protocolo de entrenamiento. Es interesante recalcar que el contenido mitocondrial de fosfolípidos cambia muy rápidamente y tienen una corta vida media de alrededor de 4 días (Wicks and Hood 1991; Takahashi and Hood 1993), esto sugiere que el ensamblaje y/o degradación del orgánulo se puede iniciar con cambios en la composición de fosfolípidos.

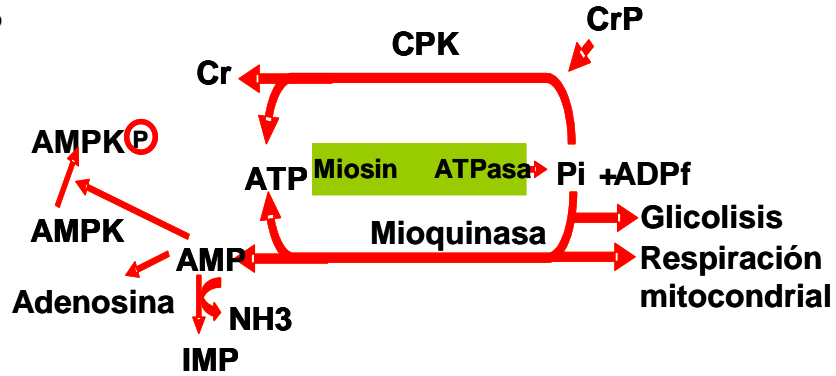
La BM conlleva cambios en el metabolismo celular y en el rendimiento del músculo durante el ejercicio de resistencia

.

Durante la contracción intensa del músculo la concentración de ADPI (Adenosin difosfato libre) aumenta. La consecuencia es un desplazamiento del equilibrio de la creatinfosfoquinasa (CPK) hacia la formación de ATP y creatina. El ADPI es además un sustrato y un activador alostérico en el proceso glicolítico y controla el estado 3 de la respiración mitocondrial. Ya que el entrenamiento de resistencia aumenta el contenido mitocondrial del músculo esquelético sin grandes efectos en la CPK y en las enzimas glicolíticas parece razonable asumir que una gran fracción del requerimiento energético se va a desplazar al metabolismo aeróbico (ver figura 11). Esto refiere a una gran sensibilidad de la respiración mitocondrial al ADPI, es decir que un pequeño aumento en la

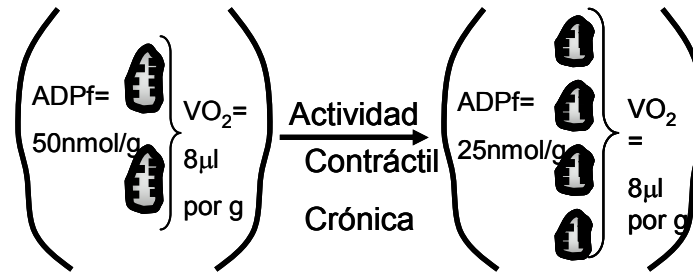
concentración de este metabolito, conlleva a un mismo nivel de consumo de oxígeno (Dudley, Abraham et al. 1982; Constable, Favier et al. 1987)

Figura I.11- Metabolismo de los nucleótidos de adenina durante el ejercicio agudo



Desde el principio hasta el final de las contracciones musculares, el ADP libre (ADPI) se forma por reacción de la Miosin ATPasa. Al ADPI se combina con la fosfocreatina (CrP) a través de la Creatin (Cr) fosfoquinasa (CPK), como resultado se restauran los niveles de ATP a expensas de la disminución de las reservas de CrP. El ADPI también estimula la glicólisis y la respiración mitocondrial. Dos moléculas de ADPI se pueden convertir en ATP y AMP a través de la enzima mioquinasa. En tipos de fibras rápidas el AMP es metabolizado a inosin monofosfato (IMP) y amoníaco (NH₃) por la AMP desaminasa. En tipos de fibras más lentas, el metabolismo del AMP está dirigido predominantemente en dirección de la adenosina, vía reacción 5'-nucleotidasa.

Figura I.12- Mejora de la sensibilidad de la respiración mitocondrial al ADPI debido al entrenamiento o a otros modelos de actividad contráctil crónica.



El mayor contenido mitocondrial hace que una concentración menor de ADPI (50nmol/g vs 25nmol/g) sea requerida para consumir el mismo nivel de oxígeno (VO₂) por gramo de músculo. Esta reducción del consumo de CrP atenúa la glucólisis, la producción de ácido láctico, reduce la formación de AMP y NH₃, mejora la fracción de energía obtenida aeróbicamente y atenúa la activación de AMPK. También supone que la cadena de transporte electrónico opere a una fracción más baja de su máximo para producir el mismo VO₂ que antes de que se produjese esta adaptación.

Un pequeño aumento en la concentración de ADPI aumentará la glicólisis y la formación de ácido láctico, lo que supone un descenso de las reservas de fosfocreatina. Un mayor contenido mitocondrial como resultado del ejercicio crónico mejorará la oxidación del lactato.

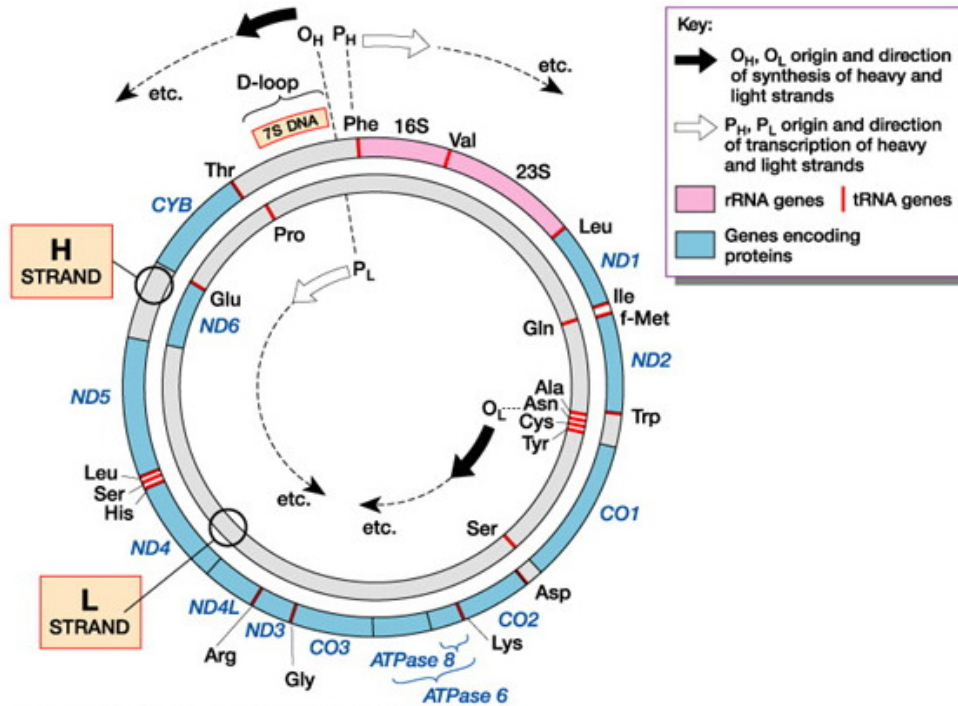
Todo esto supone una reducción del daño potencial por las especies reactivas del oxígeno (ERO) (Davies, Packer et al. 1981) con el mismo consumo por gramo de músculo. La combinación de la baja producción de ERO junto con un aumento en las enzimas antioxidantes mitocondriales (Gore, Fiebig et al. 1998) apoya la idea del beneficio de la actividad contráctil crónica.

Por el contrario, el bajo contenido mitocondrial en algunos tejidos como consecuencia del envejecimiento (Melov, Shoffner et al. 1995) y la gran tendencia que tienen los ERO para inducir daño se hace evidente particularmente en el daño al ADN mitocondrial.

La BM requiere la cooperación entre el genoma nuclear y mitocondrial

Uno de los más fascinantes aspectos de la síntesis de mitocondrias es que se requiere la cooperación de los dos genomas. La mitocondria es única en el hecho de que tiene múltiples pequeñas copias de ADN circular que contiene 16,659 nucleótidos. Esto es minúsculo en comparación a los tres billones de nucleótidos encontrados en el genoma nuclear. El ADNmt contiene 13 ARNm (Ácido ribonucleico mensajero), 22ARNt (Ácido ribonucleico de transferencia) y 2 ARNr (Ácido ribonucleico ribosomal) que son esenciales para las funciones mitocondriales (ver figura 13). Los trece ARNm codifican componentes proteicos de la cadena respiratoria responsables del transporte de electrones y de la síntesis de ATP.

Figura I.13- Anillo de ADNmt



¿Cómo se produce la cooperación entre los dos genomas?

Los trece componentes comentados en el apartado anterior comprenden sólo una pequeña fracción de todas las proteínas de la cadena respiratoria. Algunas actúan como subunidades únicas, pero muchas se combinan con proteínas codificadas por el núcleo para formar holoenzimas como por ejemplo la COX (Citocromo Oxidasa) y la NADH deshidrogenasa.

Se sabe que la transcripción del ADNmt y su replicación requieren la importación de los productos génicos nucleares que actúan como polimerasas y factores de transcripción el grupo de Williams (Williams, Garcia-Moll et al. 1987; Lezza, Boffoli et al. 1994) fueron los primeros en

demostrar que la actividad contráctil lleva a un aumento en la expresión tanto de los genes nucleares como de los mitocondriales.

5.1- Mecanismos celulares de la Biogénesis

Mitocondrial

El inicio de la BM en la célula muscular empieza con la contracción del músculo. La magnitud de las señales está sin duda relacionada con la intensidad y duración del esfuerzo contráctil.

5.1.1-Señales iniciales:

Calcio

Cuando se libera Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico se permite la interacción entre la actina y la miosina. También se reconoce al Ca^{2+} como un importante segundo mensajero en diferentes tipos celulares. Cuando se aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular se activan numerosas kinasas y fosfatasas que finalmente traslocarán sus señales al núcleo activando la transcripción de genes. Debido a tremendas fluctuaciones en los niveles citosólicos de Ca^{2+} durante la contracción del músculo se ha estudiado el papel del calcio en las adaptaciones al ejercicio por parte del músculo esquelético.

Recambio de ATP

Desde hace menos de 25 años se ha hipotetizado que los desarreglos en el metabolismo energético, que conllevan a la depleción de ATP, una alteración en el potencial de fosforilación, pueden iniciar una respuesta compensatoria que conlleve a un aumento en el contenido mitocondrial (Rabinowitz and Zak 1975). Pese a que, un entrenamiento de moderada intensidad puede inducir BM en ausencia de cambios marcados en los niveles celulares de ATP. La idea de que la depleción de ATP aumente el contenido mitocondrial celular ha recibido considerables apoyos científicos. En primer lugar, experimentos usando ácido β -guanidopropiónico que consigue deplecionar los compuestos altamente energéticos de fosfato, fosfocreatina y ATP induce un aumento en la expresión de enzimas mitocondriales (Taivassalo, Shoubridge et al. 2001) y ARNm de citocromo C en el músculo esquelético (Lai and Booth 1990). En segundo lugar, como resultado del acelerado recambio de ATP, el ejercicio aumenta el nivel de AMP y baja los niveles de fosfocreatina en el músculo resultando en una activación de α 2-AMK (Nielsen, Mustard et al. 2003). Se cree que las AMPK activadas están parcialmente relacionadas con las adaptaciones a la actividad contráctil. En tercer lugar, la hipótesis ha recibido apoyo de recientes estudios sobre el desacople mitocondrial. Desacople se refiere a la disipación del gradiente electroquímico a través de la membrana interna, que disminuye la producción de ATP por desensamblaje de la F_1 - F_0 -ATP_{asa}. Consecuentemente el transporte electrónico mitocondrial y el consumo de oxígeno están acelerados debido a que el control ejercido por el ADP se pierde y la utilización del ATP excede su síntesis. Esta condición es análoga a la del ejercicio intenso. Después de seis horas de desacople se induce la transcripción de FRN-1 (Factor de Respiración nuclear 1) (Li, Holloszy et al. 1999). FRN-1 está ampliamente implicado en la activación

transcripcional de múltiples genes relacionados con la BM (SogI, Gellissen et al. 2000). (Ver tabla I.6) Subsecuentemente a la inducción de FRN-1, se produce un aumento en la expresión de genes diana de FRN-1, incluyendo la ácido γ -aminolevulínico sintasa (ALAs).

Resumiendo estos dos apartados, existen grandes evidencias para apoyar la idea de los papeles complementarios que juegan los niveles de calcio y el recambio de ATP sobre los eventos iniciales de la BM.

Tabla I.6- Secuencias de reconocimiento de genes nucleares para FRN-1 requeridos para la expresión y función de la cadena respiratoria

<p>Fosforilación Oxidativa Citocromo C de rata Citocromo C de humano</p> <p>Complejo I NADH deshidrogenasa humana subunidad 8 (TYKY)</p> <p>Complejo II Succinato deshidrogenasa humana subunidad B Succinato deshidrogenasa humana subunidad C Succinato deshidrogenasa humana subunidad D</p> <p>Complejo III Proteína de unión de la ubiquinona humana</p> <p>Complejo IV Citocromo Oxidasa humana subunidad IV Citocromo Oxidasa de ratón subunidad IV Citocromo Oxidasa de ratón subunidad Vb Citocromo Oxidasa de rata subunidad Vb Citocromo Oxidasa de humano/primate subunidad Vb Citocromo Oxidasa de rata subunidad VIc Citocromo Oxidasa humana subunidad VIaL Citocromo Oxidasa bovina subunidad VIaL Citocromo Oxidasa humana subunidad VIIaL</p>	<p>Complejo V ATP sintasa bovina subunidad γ ATP sintasa bovina subunidad c ATP sintasa humana subunidad β</p> <p>Replicación y transcripción del ADNmt ftmA humano ARN de MRP humano ARN de MRP de ratón ftmB humano ftmA de rata y ratón</p> <p>Biosíntesis de HEMO 5-aminolevulinato sintasa de rata Uroporfirinogeno III sintasa de ratón</p> <p>Importación y ensamblaje de proteínas TOM-20 humano Chaperonina 10 de la matriz</p> <p>Canales de Iones VDAC3 humana VDAC3 de ratón</p> <p>Genes de Translación Proteína ribosomal mitocondrial humana S12</p>
--	--

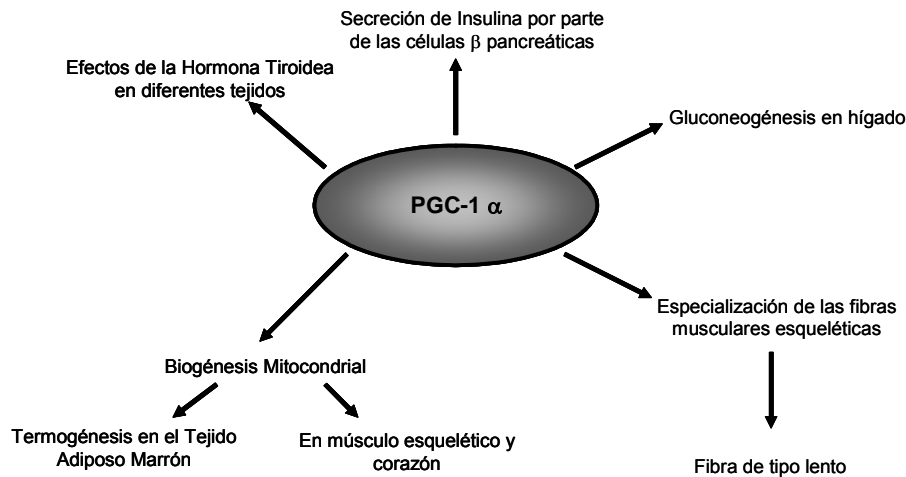
La mayoría de las referencias están extraídas de (Scarpulla 1997; Scarpulla 2002)

5.1.2- Transcripción de genes nucleares

Generalmente, la transcripción de genes está regulada por proteínas llamadas factores de transcripción que se unen a las regiones reguladoras de los genes. Algunas de ellas están implicadas en la BM: FRN-1, FRN-2, PGC-1 (Lehman, Barger et al. 2000), Egr-1, c-jun, c-fos y sp1 (Nelson, Luciakova et al. 1995; Lenka, Vijayasarathy et al. 1998). La actividad contráctil induce un aumento en los niveles de ARNm y/o de proteínas de varios de ellos, coincidiendo con sus papeles como mediadores de cambios en los fenotipos como resultado del ejercicio (Abu-Shakra, Cole et al. 1993; Michel, Ordway et al. 1994; Poulton, Morten et al. 1994; Li, Neuffer et al. 1995; Cresci, Wright et al. 1996; Murakami, Shimomura et al. 1998; Sherwood, Dufresne et al. 1999). Los genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales poseen elementos de respuesta a estos factores de transcripción. Existe un sitio de unión en los promotores para FRN-1 en muchos genes nucleares incluyendo el de *ftmA* (factor de transcripción mitocondrial A), así como para ALAs, la enzima limitante para la síntesis del grupo hemo. Sin embargo, los sitios para FRN-1 no están generalizados y definidos, por ejemplo, no todas las subunidades nucleares que codifican COX tienen un sitio para FRN-1 en sus extremos reguladores (Lenka, Vijayasarathy et al. 1998).

El reciente descubrimiento del coactivador de PPAR- γ llamado PGC-1 se ha revelado como el potencial regulador de la BM (Wu, Puigserver et al. 1999). El factor de transcripción PGC-1 (coactivador-1 α del receptor- γ activado por proliferación del peroxisoma, PPAR γ) juega un papel muy importante en el metabolismo de la glucosa, la biogénesis mitocondrial, en la especialización de las fibras musculares y en la adaptación a la termogénesis (Lin, Wu et al. 2002). En el músculo esquelético el aumento de expresión de PGC-1 aumenta el número de copias del ADN

mitocondrial (mtADN) y estimula la proliferación de mitocondrias. Una sobreexpresión de PGC-1 induce morfológicamente un aumento en los índices de contenido mitocondrial así como de expresión de ARNm de genes nucleares en células musculares incluyendo FRN-1, FRN-2, *ftmA*, UCP-2, subunidades nucleares y mitocondriales que codifican COX y citocromo C. El aumento en la expresión de *ftmA* mediada por la activación transcripcional del promotor de *ftmA*, lleva a un aumento en el ADNmt. Este efecto es, probablemente, resultado de la coactivación de PGC-1 con FRN-1 en el promotor de *ftmA*. De hecho se sabe que FRN-1 es necesario para que se observe el efecto de PGC-1 en la BM. Un trabajo de Kelly (Vega, Huss et al. 2000) demostró que PGC-1 era capaz de coactivar una segunda proteína, PPAR- α , un receptor conocido que aumenta la expresión de enzimas relacionadas con la oxidación de ácidos grasos (AG), la cadena media de acyl-coA deshidrogenasa (MCAD) y carnitina palmitoiltransferasa-1 (CPT-1). Esto se demostró usando células cardíacas aisladas durante el período perinatal. Los autores encontraron aumentos en la expresión de ARNm de PGC-1, de MCAD, CPT-1 y PPAR- α (Lehman, Barger et al. 2000). Además, una sobreexpresión de PGC-1 lleva a un aumento en la expresión de genes nucleares y mitocondriales localizados en la matriz y en la cadena respiratoria mitocondrial.

Figura I.14- Importancia de PGC-1 α en la biología celular

PGC-1 α está relacionado con un gran número de eventos metabólicos relacionados con la insulina y el metabolismo de la glucosa, el gasto energético, y la estructura muscular.

5.2- Estabilidad del ARNm

La estabilidad del ARNm normalmente está mediada por factores proteicos que interactúan con el extremo 3' para estabilizar o desestabilizar en ARNm. Estos factores están expresados de manera específica en los tejidos, de ahí se deduce la variabilidad entre los diferentes tejidos en lo que se refiere a estabilidad del ARNm. Por ejemplo, la estabilidad de los genes nucleares que codifican componentes mitocondriales suele ser menor en hígado que en músculo esquelético. (Connor, Takahashi et al. 1996). Otro parámetro que condiciona la estabilidad del ARNm es la síntesis de proteínas, si ésta se redujese, se interrumpiría el ensamblaje de la cadena respiratoria, se llevaría a un aumento en la actividad de las proteínas que se unen al ARNm y le daría estabilidad (Chrzanowska-Lightowlers, Preiss et al. 1994)

5.3- Ejemplo de Gen nuclear que codifica una proteína mitocondrial: citocromo C

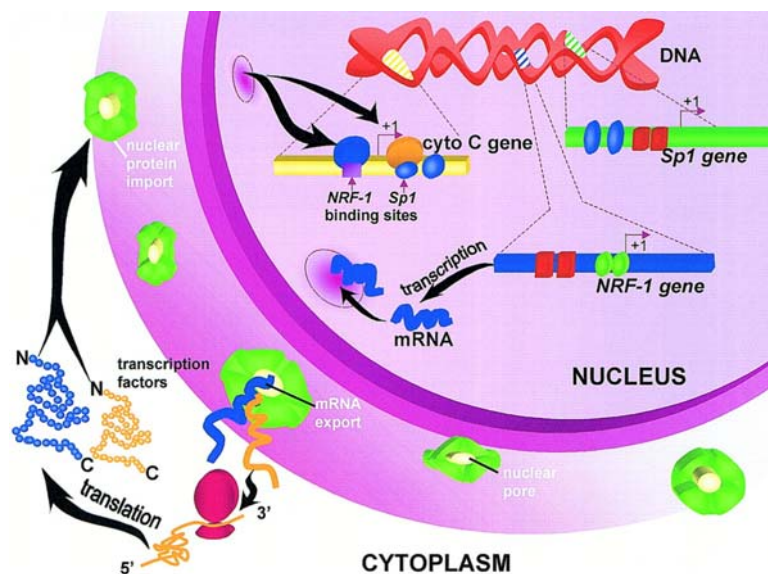
El citocromo C ha sido utilizado durante muchos años como un marcador representativo de contenido mitocondrial en el músculo. Su variación está influenciada por modificaciones en la contracción muscular (Booth 1977; Morrison, Montgomery et al. 1987). Su concentración está regulada e influenciada por el estatus de la hormona tiroidea (Cogswell, Stevens et al. 1993). Evans y Scarpulla (Evans and Scarpulla 1988) encontraron que tanto los elementos intrónicos como los extremos reguladores eran necesarios para las máximas actividades del promotor del gen de citocromo C. El más importante de estos elementos es al que se une la proteína FRN-1 junto con un segundo sitio independiente que se localiza en la sección I (Evans and Scarpulla 1989). Los sitios de unión para Sp1 (factor de transcripción selectivo del promotor 1), encontrados dentro del primer intrón, también confiere actividad al promotor de Citocromo C (Evans and Scarpulla 1989), y tiene elementos de respuesta a AMPc (CRE) pero sólo son activos en tejidos específicos (Gopalakrishnan and Scarpulla 1994).

Para llegar a entender la regulación en la expresión de Citocromo C debido a la actividad contráctil, se han utilizado medidas como la de la estimulación eléctrica de miocitos neonatales cardíacos (Xia, Buja et al. 1997; Xia, Buja et al. 1998). El aumento en el ARNm de citocromo C se dio a las 48 horas de estimulación y fue precedido por un aumento en los niveles de ARNm de FRN-1 (1-12h), c-Fos y c-Jun (0,25-3h). Aumentos en la activación transcripcional de citocromo C se observaron a las 12 horas de la estimulación. El efecto de la estimulación se atenuó cuando el sitio de unión de FRN-1 o de CRE se encontraba mutado (Xia, Buja et al. 1997).

También se demostró que tanto la transcripción basal como la magnitud de la respuesta a la estimulación se encontraban reducidas si existía mutación en el sitio de unión de Sp1. Otro de los efectos observados en el estudio era que c-Jun, más que la proteína de unión a CRE (CREB) (Proteína de unión de la proteína de respuesta a AMPc) era la proteína que cuando se unía a CRE le confería la mayor activación transcripcional durante la estimulación eléctrica (Xia, Buja et al. 1998). Este dato demuestra la importancia que tiene FRN-1, c-Jun, y Sp1 en la activación transcripcional de citocromo C al menos en células cardíacas. Utilizando células del músculo esquelético C₂C₁₂, se ha probado que la actividad contráctil aumenta la transcripción de citocromo C y está acompañado de un aumento del nivel de la proteína Sp1 y de la unión al ADN después de cuatro días de estimulación (Connor, Bezborodova et al. 2000). Otros estudios *in vivo* también han indicado que la expresión de citocromo C puede estar regulada por la estabilidad del ARNm. El grupo de Freyssenet (Freyssenet, Connor et al. 1999) empleó una inyección directa de plásmidos de ADN para introducir el promotor de Citocromo C acompañado con una acetiltransferasa de cloramfenicol introducida en los músculos tibiales anteriores de los animales y éstos fueron sometidos a estimulación eléctrica tres horas al día de uno a siete días. Gracias a la ayuda de esta técnica se pueden observar los cambios dependientes del tiempo en la actividad transcripcional y en la estabilidad del ARNm. Los resultados indicaron que el aumento en el ARNm de citocromo C se debe al aumento en la estabilidad del ARNm durante dos y cuatro días y que este hecho fue seguido por la activación transcripcional a los cinco días de estimulación crónica. Se sospechaba que cambios en la estabilidad del ARNm podrían estar relacionados con la regulación del ARNm de citocromo C ya que Yan y colaboradores (Yan, Salmons et al. 1996) habían demostrado previamente que el extremo 3' del ARNm de citocromo

C se une menos a una proteína desestabilizadora como resultado de una contracción crónica de nueve a trece días. Esto sugiere que la actividad contráctil crónica hace que se eleven los niveles de inducción de un inhibidor de la unión del ARNm de citocromo C y la proteína desestabilizante permitiéndose así la sobreexpresión. Este hecho enfatiza la importancia de la estabilidad del ARNm como una pieza importante en los cambios en la expresión de genes como resultado de la actividad contráctil en el músculo esquelético.

Figura I.15- Descripción parcial de la expresión de Citocromo C en el músculo durante la actividad contráctil.



Una señal estimula la transcripción del factor nuclear 1 (FRN-1) y/o de la proteína específica 1 (sp-1). Los ARNm derivados de esos genes son exportados desde el núcleo al citosol a través de los poros nucleares. Estos ARNm se transforman en proteína en el citosol, los cuales son de vuelta trasladados al núcleo. Se sabe que la actividad contráctil aumenta la expresión y la unión al ADN de FRN-1 y de Sp1, de ese modo aumentan la transcripción del gen de citocromo C. Otros genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales son también activados por FRN-

1 y Sp-1 con lo que se demuestra la importancia que tienen estos factores de transcripción para la biogénesis mitocondrial. C, Extremo carboxi-terminal; N Extremo amino-terminal.

5.4- Cadena de importación de proteínas

A pesar de la importancia del genoma mitocondrial para las proteínas de la cadena respiratoria, se sabe que las proteínas mitocondriales más importantes provienen del genoma nuclear. Muchas proteínas se fabrican como precursores con una secuencia señal, que frecuentemente se encuentra en el extremo NH₂ o bien como una señal interna (Ver figura 15). Para las proteínas de la matriz, la carga positiva en el extremo NH₂ actúa como señal que interactúa con una chaperona citosólica, extiende el precursor y dirige la proteína a la membrana exterior donde se encuentra un complejo receptor llamado Translocasa de la membrana Exterior (Complejo Tom). Las chaperonas citosólicas incluyen la HSP70 (Proteína de respuesta al calor de 70 kDa) y también el factor estimulador de importación mitocondrial (MSF). Los precursores de proteínas pueden dirigirse a uno de los dos complejos dentro de Tom. Uno de éstos son los receptores Tom 20 y Tom 22, cuya ruta preferencial es por HSP70. Por otra parte, las proteínas que interactúan con MSF están dirigidas al heterodímero Tom70-Tom37 (Mihara and Omura 1996). Los precursores son transferidos después a los receptores de Tom al Tom40 y a proteínas pequeñas Tom 5, 6 y 7, las cuales forman un canal acuoso por el que pasa la proteína precursora (Lithgow 2000). Las proteínas son después dirigidas a la membrana externa, interna o bien a la translocasa de la membrana interna (Tim), otro complejo proteico que permite el movimiento de los precursores de proteínas desde la matriz a la membrana interna. Estas proteínas relacionadas con la traslocación del precursor en la matriz son

Tim17, Tim23 y Tim44. Tim17 y Tim23 actúan como proteínas integrales de membrana (Pfanner and Meijer 1997) y de una forma similar a los complejos receptores Tom, se unen a la proteína precursora, previenen un último plegamiento que inhibiría la translocación del precursor a la matriz y forman un poro acuoso por el que el precursor puede viajar. Por el contrario, Tim44 es una proteína periférica de membrana que está bien sujeta a la parte interior de la membrana mitocondrial. Tim44 ancla la chaperona de la matriz HSP70 (mtHSP70), la cual actúa empujando al precursor hacia la matriz (ver figura 15). Junto con esas proteínas, la cardiolipina es necesaria para la traslocación de proteínas porque parece que orienta al precursor hacia la posición correcta para la interacción del complejo Tim44-mtHSP70. La importancia de ese fosfolípido se ha demostrado en estudios en los que la función de la cardiolipina se bloqueó usando la droga Adriamicina y se obtuvo una atenuación de la importación de proteínas destinadas a la matriz (Eilers, Endo et al. 1989; Craig, Chesley et al. 1998).

Se necesitan otros dos elementos para la correcta importación de precursores de proteínas a la matriz. Estos son:

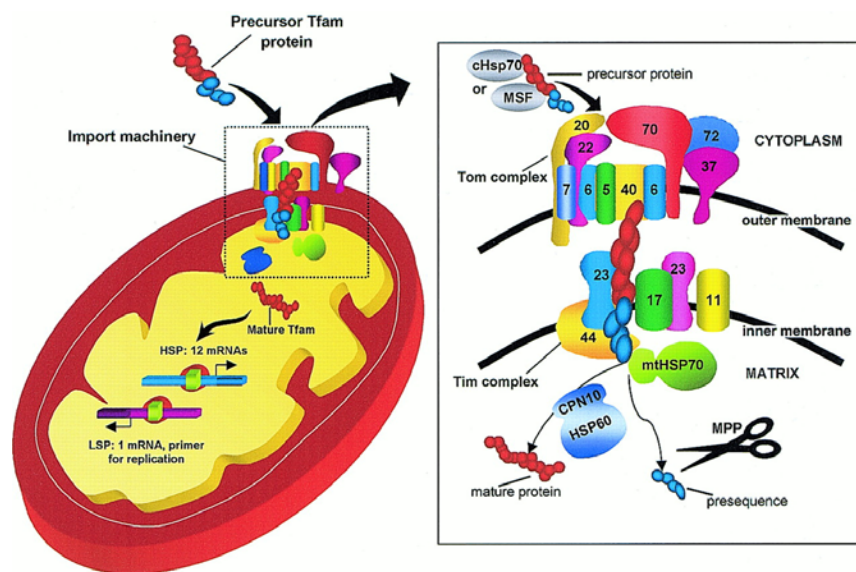
- 1) La presencia de un potencial de membrana interno ($\Delta\psi$, negativo en el interior) para ayudar a la entrada de la carga positiva de la presecuencia dentro de la matriz.
- 2) La disponibilidad de ATP tanto en la matriz como en el citosol (Connor, Takahashi et al. 1996).

Agentes desacopladores que disipan el $\Delta\psi$ reducen la importación de proteínas, mientras que la depleción de ATP previene el despliegue del precursor en el citosol y la acción de mtHSP70 (Glick 1995). Esas reducciones en los niveles de ATP celular como los que se producen debido a actividad contráctil severa o bien por defectos en la producción de

ATP, en células con mutaciones en el ADNmt, pueden afectar a la importación de proteínas.

Después de que llegue a la matriz, la secuencia señal NH₂-terminal se dirige a una peptidasa procesadora mitocondrial (MPP) para formar la proteína madura. Entonces ésta es reestructurada a su conformación activa debido a la acción de un sistema chaperonin mitocondrial de 60 kDa (HSP60) y un chaperonin de 10kDa (Cpn10).

Figura I.16- Cadena de importación de proteínas



Izquierda: El Factor de transcripción mitocondrial A (*tfam*) es un factor de transcripción codificado en el genoma nuclear que se sintetiza en el citosol como una proteína “precursora” con una carga positiva en el extremo NH₂ en la presecuencia (en azul). Ésta debe interactuar con la cadena de importación de proteínas para entrar en el orgánulo. Una vez dentro de la matriz, la proteína madura de *tfam* se va a unir a una región del ADNmt circular tanto en los

promotores de la hebra pesada (HSP) como en los promotores de la ligera (LSP) y estimula la transcripción y la replicación del ADNmt.

Derecha: *Componentes de la cadena de importación de proteínas. La proteína precursora τ am es desdoblada y dirigida a la cadena de importación de proteínas por una chaperona citosólica como es la cHsp70 (proteína de respuesta al calor citosólica de 70 kDa) o por el MSF (factor estimulador de importación mitocondrial). Ésta interactúa con el complejo receptor llamado Translocasa de la membrana Exterior (Complejo Tom) y es correctamente orientado para interactuar y ser transferida posteriormente al complejo llamado Translocasa de la membrana Interna (Complejo Tim). La chaperona de la matriz mtHSP70 estira de la proteína precursora que es cortada por la Peptidasa procesadora mitocondrial (MPP). Posteriormente, la proteína madura es reestructurada por chaperonas de la matriz (HSP60 y Cpn10). Se necesita ATP en varios de los pasos del proceso de importación.*

5.5- Expresión del ADNmt

Los genes de ADNmt de mamíferos están distribuidos de modo dispar en las cadenas pesadas y ligeras del genoma circular (Melov, Shoffner et al. 1995). El ADNmt contribuye a la formación de proteínas vitales para la función de la cadena respiratoria mitocondrial. Deleciones o mutaciones en el ADNmt conlleva a la ausencia o defectos en productos génicos que a la larga llevarán a defectos en la respiración celular y a enfermedades mitocondriales muchas de las cuales aún no han sido descritas (Melov, Shoffner et al. 1995). Éstas son enfermedades tejido-específicas localizadas en órganos con alta demanda energética, como por ejemplo cerebro, corazón y músculo. Una anomalía en el ADNmt en el músculo esquelético puede tener como consecuencias: una intolerancia al ejercicio físico (Andreu, Hanna et al. 1999), fatiga, y una producción exagerada de ácido láctico (Robinson 1993).

El ADNmt se puede replicar independientemente del ADN nuclear. Su replicación requiere la presencia de la ADN polimerasa- γ (Pol- γ), de una proteína de unión de única hebra (single-stranded binding protein (SSB)) la cual facilita la actividad de Pol- γ , de *ftmA*, el cual inicia la transcripción y genera cebadores que permiten la replicación del ADN y el procesamiento de la endonucleasa del ARN mitocondrial (RNasaMRP), lo que conlleva a la transcripción del cebador para la replicación (Larsson, Wang et al. 1998).

Usando el modelo de estimulación crónica para inducir BM, Williams (Williams 1986) demostró que los niveles de los factores de transcripción mitocondriales se correlacionaban bien con las variaciones de ADNmt (Annex and Williams 1990). Una relación cercana se observó entre el ADNmt y el ARNmt en músculos entrenados y no entrenados y en pacientes con una delección significativa de ADNmt (Heddi, Lestienne et al. 1993). Estos datos sugieren que la replicación de ADNmt en múltiples copias, o su conformación dentro de la región controladora del bucle-D, regulan el nivel de la expresión de genes en células de músculo esquelético. Sin embargo, estudios en músculo y otros tejidos sugieren que este hecho no es universal. Cualquier evento que se observe que aumente el número de copias de ADNmt como resultado de la actividad contráctil crónica irá acompañado de un aumento en la expresión de SSB (Darr and Schultz 1987), la subunidad de ARN de la RNAasa MRP (Michel, Ordway et al. 1994), y *ftmA*, pero no Pol- γ (Darr and Schultz 1987).

FtmA se ha estudiado mucho y es el factor de transcripción más importante en mamíferos para transcribir el ADNmt. El nivel de *ftmA* se correlaciona bien con la abundancia de ADNmt, y su pérdida, bien sea en pacientes con miopatías mitocondriales (Poulton, Morten et al. 1994; Larsson, Wang et al. 1998) o bien experimentalmente suprimiendo el gen de *ftmA* (Larsson, Wang et al. 1998), hará que finalmente se produzca una parcial o total

depleción del ADNmt (ver figura 17). Los animales knockout homocigotos de *ftmA* mueren antes del décimo día embrionario y están caracterizados por una mitocondria anormal y por tener abolida la fosforilación oxidativa (Larsson, Wang et al. 1998). Los animales que presentan alteraciones en *ftmA* tanto en corazón como en músculo, tienen niveles reducidos de ADNmt y de ARNm aunque muestran pequeños cambios en las actividades de las enzimas de la cadena respiratoria en el músculo esquelético, (posiblemente debido a la renovación del ARNm en este tejido) (Connor, Takahashi et al. 1996; Larsson, Wang et al. 1998). Sin embargo, estos animales presentan características similares que también se dan en la enfermedad mitocondrial del síndrome de Kearns-Sayre, que cursa con dilatación cardiomiopática, morfología y proliferación anormal de las mitocondrias y un progresivo bloqueo atrioventricular (Larsson, Wang et al. 1998). Este hecho evidencia la importancia de *ftmA* en la normal función cardíaca, posiblemente porque el corazón posee la mayor cantidad de mitocondrias de todos los tejidos.

En el músculo esquelético la expresión de *ftmA* se ve alterada por la actividad contráctil crónica. Durante una estimulación de tres horas/día, y una duración de entre uno y siete días, Gordon y colaboradores (Gordon, Rungi et al. 2001), encontraron un aumento en el ARNm de *ftmA* que se mantuvo durante cuatro días. Este hecho fue seguido por una importación acelerada a la mitocondria (5 días), un aumento en la proteína de *ftmA*, y un aumento en la unión al ADN (siete días). Esto posteriormente se acompañó de aumentos paralelos de niveles de ARNm de COXIII y la actividad enzimática de COX (Gordon, Rungi et al. 2001). Esto sugiere que la expresión de *ftmA* está bien relacionada con alteraciones en las actividades transcripcionales mitocondriales y con la capacidad oxidativa.

5.6- Síntesis de proteínas mitocondriales

Además de un genoma diferente, la mitocondria contiene su propia maquinaria translacional. Después de que los transcritos policistrónicos se unan para formar moléculas individuales de ARN, éstas son usadas conjuntamente con los ARNr y los ARNt en el proceso translacional. Si alguno de los 22 genes de ARNt se encuentra mutado, se puede formar una proteína defectuosa, creando problemas muy severos con síntomas clínicos serios en niños y jóvenes incluyendo cardiomiopatía hipertrófica y miopatía mitocondrial. Se han descrito alrededor de 30 mutaciones de proteínas debido al ADNmt (Melov, Shoffner et al. 1995). En músculo esquelético, medidas *in vitro* revelaron que mitocondrias MIF (Mitocondrias intermiofibrilares) sintetizaban más proteínas que las MSS (Mitocondrias subsarcolémicas) (Cogswell, Stevens et al. 1993) debido a la mayor capacidad oxidativa de las MIF.

Figura I.17- Proceso de biogénesis mitocondrial estimulada por la contracción del músculo esquelético

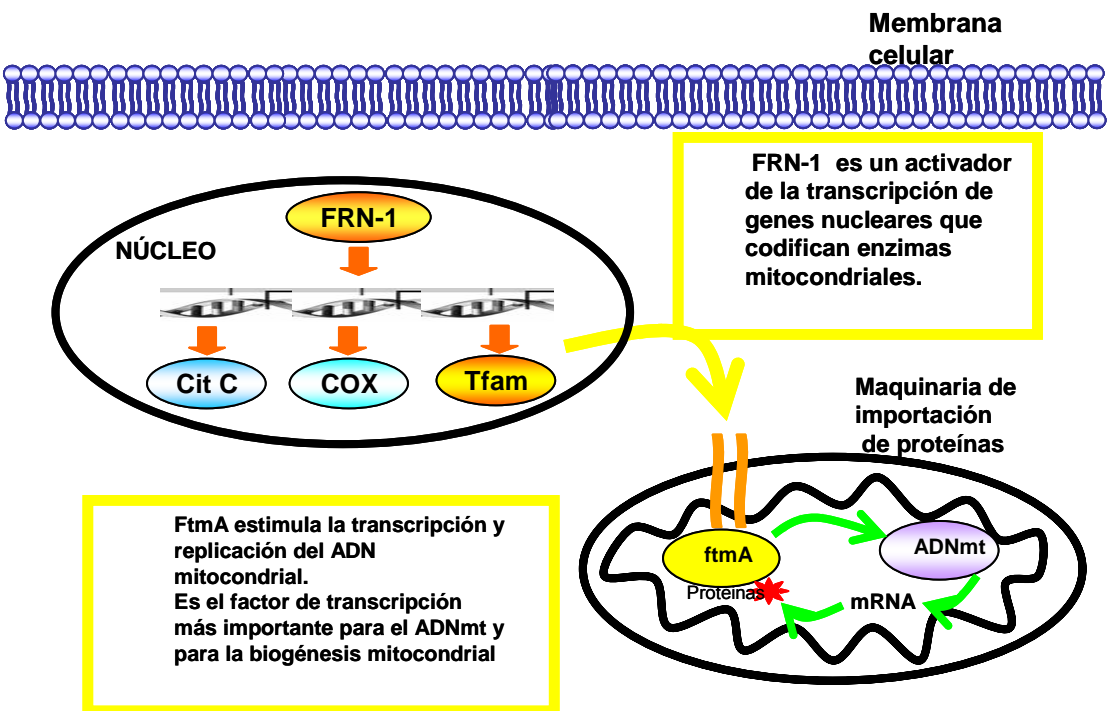
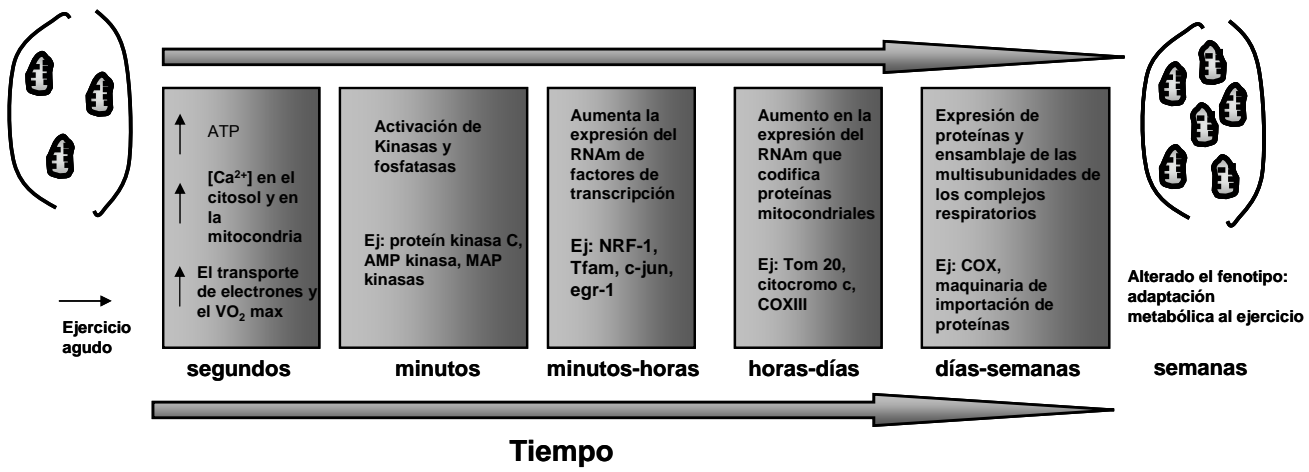


Figura I.18- Secuencia temporal establecida para los procesos de biogénesis mitocondrial inducidos por el ejercicio



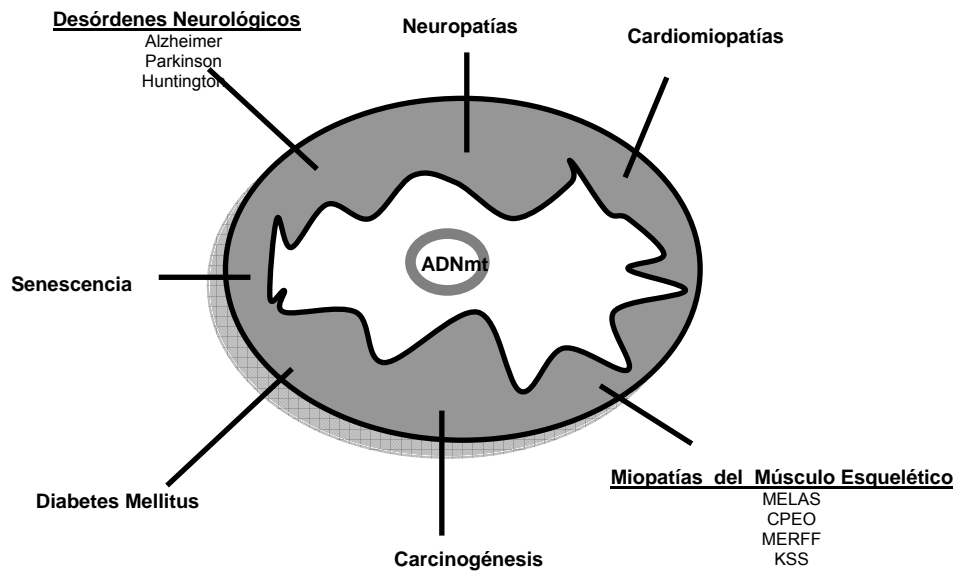
6- Enfermedades mitocondriales

Los defectos en el ADNmt son la causa más común de enfermedades y disfunciones mitocondriales.

El ADNmt presenta un porcentaje mayor de mutaciones que el ADN nuclear debido tres motivos, a) la ausencia de histonas protectoras, b) la proximidad del ADNmt a la cadena de transporte electrónico donde se producen las especies reactivas del oxígeno y c) debido a que no existen tantos mecanismos reparadores del daño al ADN en la mitocondria (Bohr, Stevnsner et al. 2002).

Se sabe que deficiencias en la ingesta de hierro puede llevar a disfunciones mitocondriales (Hood, Kelton et al. 1992). El hierro es un componente vital en los grupos prostéticos hemo y es muy importante para los citocromos de la cadena de transporte electrónico. Las enfermedades mitocondriales empezaron a reconocerse en los años ochenta (Land, Morgan-Hughes et al. 1981; Taivassalo, Jensen et al. 2003). Desórdenes en las funciones mitocondriales están comúnmente asociados con diferentes enfermedades como se puede observar en la Figura 19 Estas enfermedades se manifiesta en tejidos que son muy sensibles a detrimentos de ATP como por ejemplo el cerebro, el corazón o el músculo.

Figura I.19- El espectro de desórdenes mitocondriales



Los desórdenes mitocondriales en un principio afectan a tejidos con una alta demanda energética como son el cerebro, el corazón y el músculo. Varios de estos desórdenes, y particularmente las miopatías mitocondriales, se han clasificado en diferentes categorías basándose en el fenotipo clínico de la enfermedad. La Senescencia es una condición en la que las funciones celulares están afectadas en parte debido a alteraciones en la apoptosis y en parte en alteraciones y mutaciones en el ADNmt. MELAS: Encefalopatía Mitocondrial, acidosis láctica, y accidentes cerebro-vasculares; CPEO: Oftalmoplegia externa progresiva y crónica; MERFF: Epilepsia mioclónica de las fibras musculares rojas; KSS: Síndrome de Kearns-Sayre.

El ADN mitocondrial es de herencia materna y se pueden encontrar frecuentes polimorfismos en él con aproximadamente 50 pares de bases que difieren entre dos individuos. Muchos polimorfismos no tienen consecuencias ni biológicas ni genéticas, aunque si existen suelen estar

unidos a modificaciones en el consumo de oxígeno (Murakami, Shimomura et al. 1998; Acuna, Escames et al. 2002) y a posibles problemas en la capacidad para realizar ejercicio físico (Murakami, Shimomura et al. 1998). En contraste con polimorfismos benignos, pueden ocurrir mutaciones patológicas que afecten a la función de la mitocondria y que puede conducir a una diabetes tipo II (Kahara, Takamura et al. 2002; Schrauwen and Hesselink 2004), sordera (Fischel-Ghodsian 2003), a desórdenes severos como una depleción en el ADN mitocondrial (Nevo, Soffer et al. 2002) y la enfermedad de Leigh (Cacic, Wilichowski et al. 2001) que resulta en la muerte durante la infancia. La herencia de las mutaciones patológicas, normalmente sigue un único patrón llamado "heteroplásmido". Heteroplásmido se refiere a la proporción de la región mutada con respecto a la región control sin mutación en la célula. Las manifestaciones del fenotipo de la enfermedad puede variar entre tejidos u órganos (por ej: cerebro, ataques de apoplejía; o en músculo: intolerancia profunda al ejercicio físico).

Una de las funciones mitocondriales más importantes, es abastecer de ATP al organismo mediante la decarboxilación oxidativa de grasas, carbohidratos y proteínas. Además, la mitocondria es uno de los orgánulos donde se producen más radicales libres y se regula el balance del calcio y la apoptosis (Dudley, Abraham et al. 1982; Nicholls and Budd 2000). Los RL tienen un papel regulador en diferentes funciones fisiológicas, sin embargo, pueden llevar a daños patológicos como por ejemplo durante el ejercicio físico agotador o en diferentes miopatías mitocondriales (Dudley, Abraham et al. 1982; Hollander, Fiebig et al. 1999; Bailey, Young et al. 2004). Aunque las células están capacitadas para el metabolismo anaeróbico, la mayor parte del ATP en células eucariotas, proviene de la mitocondria y sólo las células rojas de la sangre están desprovistas de mitocondrias. La absoluta dependencia de la mitocondria en la vida

humana se refleja en los altos índices de mortalidad que se observan como resultado de una depleción en los niveles de ADNmt.

Podemos dividir las enfermedades mitocondriales que cursan con defectos en el ADNmt en dos grupos de mutaciones:

- 1- Deleciones
- 2- Mutaciones puntuales

Ambas llevan a actividades no funcionales de los complejos que realizan la fosforilación oxidativa o bien a aberraciones en la síntesis de estos complejos. Las grandes deleciones en el ADNmt son generalmente de entre una a diez kilobases (kb) en tamaño, la más común es la deleción de 4977-bp (Moraes, DiMauro et al. 1989). Tres enfermedades conocidas relacionadas con deleciones en el ADNmt son Oftalmoplegia progresiva crónica (CPEO), el síndrome de Kearns-Sayre (KSS) y el síndrome de Pearson (Lestienne and Ponsot 1988; Moraes, DiMauro et al. 1989; McShane, Hammans et al. 1991).

En los desórdenes asociados con mutaciones puntuales en los complejos encargados de la fosforilación oxidativa encontramos la Neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) que consiste en mutaciones puntuales en las subunidades del complejo I (Johns, Neufeld et al. 1992; Melov, Shoffner et al. 1995). Pacientes con flojedad neurogénica en el músculo, ataxia y retinitis pigmentosa (NARP), y el síndrome letal infantil de Leigh presentan mutaciones en el gen de la ATP6 que afectan al complejo V (Nijtmans, Henderson et al. 2001). Mutaciones puntuales que alteran la función de los ARNt^{Lys} y ARNt^{Leu} son comunes en la Epilepsia que cursa con las fibras rojas musculares rasgadas (MERRF) (Melov, Shoffner et al. 1995), en la miopatía mitocondrial, la encefalopatía, la acidosis láctica y los episodios del síndrome de Stroke (MELAS) (Goto, Nonaka et al. 1990).

Las enfermedades mitocondriales debidas a mutaciones en el ADN nuclear se dividen en tres categorías. Éstas son mutaciones que alteran:

- 1- La secuencia de una proteína mitocondrial (ej: subunidades del complejo que realiza la fosforilación oxidativa)
- 2- Proteínas de importación y ensamblaje de proteínas mitocondriales
- 3- El mantenimiento del ADNmt

Mutaciones en el ADN que codifica proteínas de fosforilación oxidativa están asociadas al síndrome de Leigh. Predominantemente, parece ser que afectan a subunidades del complejo I y del complejo II (Bourgeron, Rustin et al. 1995; Loeffen, Smeitink et al. 2000). Mutaciones en el ADN nuclear también pueden causar problemas en el proceso de importación de proteínas. Un ejemplo de ello es el síndrome de Mohr-Tranebjaerg (Koehler, Leuenberger et al. 1999), el cual se debe a mutaciones en el gen de la proteína de la distonía y la sordera (DDP), una proteína intermembrana que está relacionada con la unión de las porciones exteriores e interiores de la cadena de importación de proteínas. Mutaciones en el DDP acabarán en una importación disfuncional de productos que provienen del genoma nuclear (por ej: precursores de proteínas).

Varios trabajos describen enfermedades con mutaciones en proteínas que están relacionadas con el ensamblaje del complejo IV (Shoubridge 2001). Éstos afectan a la proteína surf-a, causando la acumulación de intermediarios tempranos y una drástica reducción del ensamblaje de la COX (Tiranti, Hoertnagel et al. 1998). Mutaciones en Sco1 y Sco2 son responsables de una cardiomiopatía severa (Papadopoulou, Sue et al. 1999; Valnot, von Kleist-Retzow et al. 2000) que resultará en una menor actividad de la COX. Además mutaciones en los genes de COX10 y de COX15 acabará en una disfuncional biosíntesis del grupo prostético hemo en la holoenzima COX que finalmente supondrá un menor consumo de oxígeno (Valnot, von Kleist-Retzow et al. 2000; Antonicka, Mattman et al. 2003).

Se han encontrado mutaciones en genes que codifican la helicasa Twinkle del ADNmt (Spelbrink, Li et al. 2001) y la subunidad catalítica de la polimerasa POLG1 específica del ADNmt (Van Goethem, Dermaut et al. 2001). El síndrome de depleción del ADNmt (MDS), caracterizado por una reducción en el número de copias de ADNmt y se ha relacionado con mutaciones en los genes de timidina kinasa 2 (TK2) y desoxiguanosina kinasa. Ambas proteínas están relacionadas con el metabolismo de los desoxirribonucleótidos y en la formación del "pool" de nucleótidos (Lieber, Johansson et al. 1986; Saada, Shaag et al. 2001). La enfermedad definida como encefalomiopatía neuro-gastrointestinal (MNGIE) está relacionada con depleciones y múltiples deleciones de ADNmt. Este fenómeno está asociado a la deficiencia en la proteína timidina fosforilasa (TP) (Nishino, Spinazzola et al. 1999) y con la homeostasis de nucleótidos.

Envejecimiento

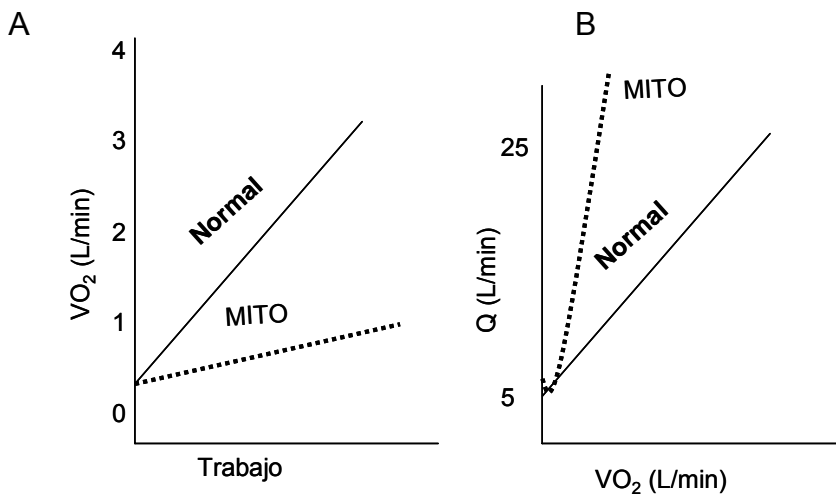
La acumulación de mutaciones y reducciones en las actividades de las enzimas mitocondriales hace tiempo que están descritas en el envejecimiento, sobre todo se asocian a unos tejidos determinados como son el cerebro y el músculo (Cortopassi, Shibata et al. 1992; Lezza, Boffoli et al. 1994). Muchos investigadores consideran que estas mutaciones llevarán a una disfunción mitocondrial con la edad, por una producción excesiva de especies reactivas del oxígeno, y un acelerado daño oxidativo a macromoléculas. Las mutaciones en el ADNmt son relativamente bajas en un normal envejecimiento en comparación con pacientes jóvenes con enfermedades mitocondriales, lo que contribuye a un descenso en la capacidad oxidativa de un determinado tejido. Varias líneas de investigación sugieren que la disfunción mitocondrial asociada con el envejecimiento está localizada, a nivel muscular. Este tejido muestra focos

de acumulación de ADNmt mutado y una deficiente fosforilación oxidativa (Bua, McKiernan et al. 2002; Khrapko, Nekhaeva et al. 2003). Además la progresiva disfunción mitocondrial en el músculo es importante ya que se reduce la oxidación de lípidos, se acumulan intramuscularmente los metabolitos de los lípidos y se asocia una resistencia a la insulina con la edad (Petersen, Befroy et al. 2003). Por lo tanto, la edad parece ser una forma progresiva de enfermedad mitocondrial con un desarreglo en las vías de la biogénesis mitocondrial, pero eso sí, es menos severa que los casos reales de enfermedades mitocondriales.

6.1-Ejercicio y enfermedades mitocondriales

El test de ejercicio es una gran ayuda para el “screening” y evaluación de miopatías mitocondriales. Uno de los sellos distintivos de las miopatías mitocondriales es la reducción del consumo máximo de oxígeno (VO_{2max}) (Taivassalo, Jensen et al. 2003). Ya que el VO_{2max} está determinado por el gasto cardíaco (Qc) y por la extracción periférica de oxígeno (la diferencia entre la presión arterio-venosa de O_2 ($A - vO_2$)) algunas citopatías mitocondriales afectan a la función cardíaca donde el abastecimiento de sangre se encuentra alterado; sin embargo la mayor parte de las miopatías mitocondriales presentan un déficit característico en la extracción periférica de oxígeno ($A - vO_2$) y un aumento en el reparto de oxígeno (circulación hipercinética) (Taivassalo, Jensen et al. 2003) Fig. 20.

Figura I.20- Prueba de esfuerzo para personas con y sin enfermedades mitocondriales



- A- Test de esfuerzo en el que se demuestra el bajo $VO_{2\text{máx}}$ en un paciente con miopatía mitocondrial.
- B- Test de esfuerzo en el que se mide el gasto cardiaco en relación con $VO_{2\text{máx}}$. Esto indica que la extracción periférica de oxígeno y el no reparto de oxígeno es limitante en pacientes con miopatías mitocondriales

Debido a la falta de un tratamiento efectivo para las miopatías mitocondriales, se ha estudiado la posibilidad de que el músculo se adapte al entrenamiento y que esto se refleje en una mejora en la función de la cadena respiratoria. La intolerancia al ejercicio físico puede ser una manifestación clara de que existen altos niveles de mutaciones en el ADNmt en el músculo esquelético. La intolerancia al EF se caracteriza por el desarrollo de fatiga a relativamente bajos niveles de esfuerzo y por flojedad en los músculos activos, acidosis láctica, taquicardia y respiración acortada. Como resultado los pacientes optan por una vida sedentaria que al final conllevará a una miopatía mitocondrial, con una restricción en la capacidad de fosforilación oxidativa (por descender los niveles de

mitocondrias funcionales), limitaciones funcionales y que desemboca en un círculo vicioso que empeora cada vez más la intolerancia al EF.

El grado de intolerancia al EF en pacientes con defectos en el ADNmt puede variar desde suave a muy limitante en sus actividades diarias.

6.1.1- Ejercicios de resistencia con defectos en el ADNmt: Fundamentos

Está bien establecido que si se realizan con regularidad actividades aeróbicas se producen adaptaciones en el corazón, en la circulación periférica, y en los sistemas del músculo esquelético los cuales aumentan su capacidad para consumir O₂ muchos más que los pacientes con enfermedades mitocondriales. Existen diversos procesos adaptativos que ocurren cuando se realiza un protocolo aeróbico de resistencia y que ocurren dentro de la célula. Ya han sido comentados en la presente tesis, pero cabe destacar el aumento de la densidad capilar, la mejora en la conductividad vascular, y la mayor capacidad oxidativa mitocondrial (Saltin and Rowell 1980). En particular, el entrenamiento que produzca una biogénesis mitocondrial, estará asociado a un aumento en los niveles de enzimas de la cadena respiratoria, lo que permitirá una mayor capacidad oxidativa y finalmente se obtendrá una mayor capacidad para generar energía vía fosforilación oxidativa (Booth 1977). Como la BM está asociada a un aumento en el número de copias de ADNmt (Connor, Bezborodova et al. 2000) que es resultado de una mayor replicación del ADNmt, finalmente se aumentarán los niveles de proteínas mitocondriales.

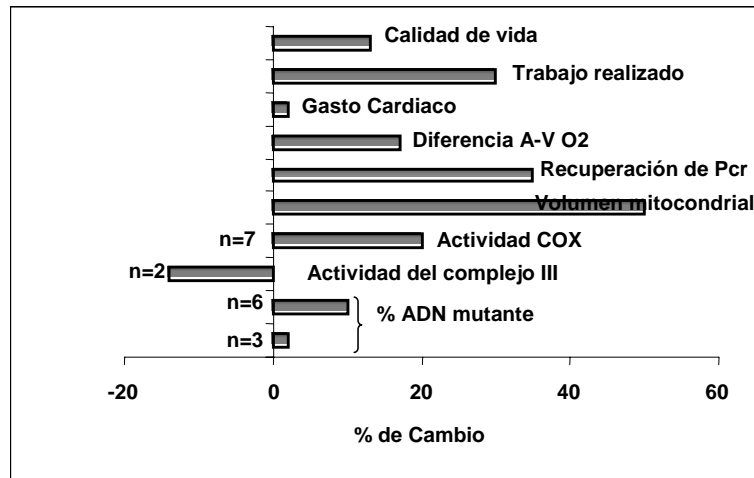
Otra adaptación notable es que los individuos que están entrenados tienen niveles de lactato en sangre y en músculo menores que los no entrenados cuando realizan el mismo tipo de ejercicio y al mismo nivel submáximo, esto da a entender que existe una mayor eficiencia metabólica en los

músculos entrenados. Aumentos en los niveles de enzimas mitocondriales en músculos entrenados favorecerán la oxidación de ácidos grasos y una reducción de la oxidación de carbohidratos (y por tanto reducirán la producción de lactato), permitiendo de ese modo, proveer al organismo de la energía necesaria sin aumentar tanto los niveles de ADPI (Henriksson and Reitman 1977; Moore, Thacker et al. 1987).

6.1.2-Entrenamiento de resistencia cuando existen defectos en el ADNmt

En un estudio reciente, se evaluaron los efectos del entrenamiento entre sujetos con mutaciones en el ADNmt con respecto a sujetos sanos (Taivassalo, Shoubridge et al. 2001). El estudio se realizó con diez pacientes con varios defectos en el ADNmt confirmados previamente al estudio (Fig. 21).

Figura I.21– Resumen de los cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares encontrados en diez pacientes con diversos defectos en el ADNmt después de catorce semanas de entrenamiento de resistencia.



A pesar de las mejoras significativas en la calidad de vida, la capacidad de utilización de oxígeno, y de la función mitocondrial, la carga mutante (%mutante con respecto a no mutante en homogenado de músculo) aumenta en seis pacientes y no cambia en tres. Un descenso se observó en la actividad del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial en dos pacientes con mutaciones en el citocromo b, lo que sugiere que la naturaleza de la mutación influye en la respuesta adaptativa al entrenamiento.

La capacidad para realizar ejercicio y la calidad de vida aumentó significativamente y se atribuye a un aumento del 20% en la utilización de oxígeno. El volumen mitocondrial aumenta en un 50% (medido gracias a los niveles del marcador de contenido mitocondrial citrato sintasa). En varios pacientes, la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria afectados por la mutación también aumentó aunque menos (un 20% menos). Estas adaptaciones de las mitocondrias del músculo otorgan

las bases moleculares y bioquímicas del aumento de la diferencia sistémica de a-v de O₂ durante el ejercicio. El aumento en el volumen mitocondrial que se observó fue 10-20% mayor que lo observado en pacientes sanos, individuos sedentarios que se sometieron a un entrenamiento similar.

El análisis de las mutaciones reveló un inesperado aumento en la proporción de ADNmt mutado en los homogenados de músculo de seis de los nueve pacientes y no existieron cambios en tres de ellos. Estos descubrimientos pusieron de manifiesto la conveniencia y seguridad de realizar entrenamientos en pacientes con mutaciones en el ADNmt y plantearon la siguiente cuestión: ¿Puede el entrenamiento de resistencia promover la progresiva expansión de ADNmt mutante con posibles daños potenciales a largo plazo? Este concepto nos lleva a la creencia general de que la progresión clínica de las enfermedades mitocondriales se atribuyen a una acumulación de ADNmt mutante que conllevará finalmente a un aumento en la proporción de fibras respiratoriamente incompetentes que clínicamente afectarán a los tejidos (Chinnery, Howel et al. 2003). Los mecanismos responsables de la acumulación de las mutaciones en algunas fibras no están muy definidos, sin embargo algunas hipótesis han tomado fuerza incluyendo la de la ventaja replicativa del ADNmt mutante (Melov, Shoffner et al. 1995) pudiendo ser debida al aumento compensatorio que se produce del ADNmt total en respuesta a la deficiencia bioquímica (Johnson, Turnbull et al. 1983).

No se puede interpretar la paradoja existente entre los factores que controlan las copias de ADNmt normal o mutante. De hecho, los mecanismos reguladores y varios factores de transcripción que regulan la Biogénesis Mitocondrial en respuesta a la actividad contráctil en un músculo normal aún no están del todo claros. Gracias al descubrimiento de ftmA, de FRN-1 y de PGC-1 y de los mecanismos asociados a la BM

inducida por ejercicio se ha arrojado luz a la respuesta proliferativa del ADNmt mutante en pacientes con desórdenes mitocondriales.

La cuestión para descubrir la seguridad de los entrenamientos de resistencia es demostrar que los aumentos en las copias de ADNmt normal, de hecho son las responsables de la mejora en la capacidad oxidativa mitocondrial, de la realización del ejercicio, y de la mejora en la calidad de vida de los pacientes que tienen mutaciones heteroplásmicas en el ADNmt. Se debe investigar la proporción y distribución del ADNmt mutante y normal dentro de la célula muscular y correlacionar los cambios con las personas que no presentan mutaciones en el ADNmt así como los cambios en las actividades enzimáticas.

6.2- Biogénesis Mitocondrial y enfermedades mitocondriales

Uno de los principales rasgos de las enfermedades mitocondriales bien sea por mutaciones en el ADNmt o bien en el genoma nuclear es un descenso en la capacidad de realizar la fosforilación oxidativa. Los tejidos dependientes de una gran demanda de energía en forma de ATP como son el cerebro, el corazón o el músculo esquelético son los más afectados por defectos mitocondriales. Uno de los cambios morfológicos más comunes en el músculo esquelético debido a una deficiente fosforilación oxidativa es la presencia de las fibras rojas rasgadas (RRF). Este cambio histológico es el resultado de una proliferación anormal de las mitocondrias subsarcoméricas que presentan una apariencia rasgada en la periferia de las células musculares.

Se trataron células con células con bromuro de etidio lo que produjo un muy bajo nivel de ADNmt (células rho⁰) y un bajo nivel de ADNmt (células

rho⁻) y presentaron comportamientos similares a las que tenían miopatías mitocondriales. En estas células debido a la falta de ADNmt se produce un descenso en la función de la cadena respiratoria y una menor producción de ATP llevando a la célula a un estrés metabólico. En células de pacientes con el síndrome de depleción mitocondrial (MDS), la ausencia de ADNmt induce respuestas diferentes en proteínas que están codificadas en el núcleo (Lieber, Johansson et al. 1986; Marusich, Robinson et al. 1997), produciendo así mitocondrias con una composición de proteínas alterada. Algunos complejos codificados nuclearmente se encontraban sobre-regulados mientras otros permanecían sin cambios. En el páncreas el uso de las células rho⁰ ha señalado la importancia de las alteraciones del ADNmt en la etiología de la diabetes tipo 2 heredada de la madre. La mitocondria juega un papel muy importante en la regulación de la glucosa estimulando la secreción de insulina por parte de la célula β pancreática. Un aumento en la concentración de glucosa en la sangre lleva a la síntesis de ATP en las células β pancreáticas vía glucolítica y por vías mitocondriales con la subsecuente secreción de insulina. Cualquier evento que haga que decaiga la síntesis de ATP hace que cese la secreción de insulina produciendo así un riesgo de padecer diabetes. Depleción de ADNmt inducida por el tratamiento con bromuro de etidio (Kennedy, Maechler et al. 1998) o bien bloqueando el gen de *ftmA* lleva seguro a una diabetes tipo 2. Este modelo celular se parece a la forma más común de diabetes heredada vía materna que ocurre por transversión de una Adenina por una Guanina en el gen de ARNt^{Leu} (Gerbitz, van den Ouweland et al. 1995) que afecta a un 15% de la población que padece diabetes tipo 2.

Los pacientes que tienen múltiples defectos mitocondriales tienen una discapacidad en la importación de las proteínas codificadas nuclearmente. Sin embargo, fibroblastos de pacientes con varias enfermedades

mitocondriales no presentaron ratios diferentes de importación de proteínas con respecto a personas sanas, pero presentaron una menor expresión de las chaperonas HSP60 y de la mtHSP70 (Gordon, Rungi et al. 2001). La expresión del receptor importador Tom20 no estaba afectada en los pacientes. La sobreexpresión de este receptor produce un aumento en la importación de proteínas mientras que su depleción conlleva a un descenso en la importación en células C₂C₁₂ (Grey, Connor et al. 2000). En pacientes de MELAS así como en células rho⁻, la importación de precursores nucleares a la mitocondria estaba mantenida (Irrcher, Adhietty et al. 2003). Sin embargo, la expresión de factores clave de la maquinaria de importación de proteínas variaba considerablemente, y se observó un perfil diferente de proteínas de importación. Este resultado demuestra que la expresión de componentes de la maquinaria de importación de proteínas y los mecanismos compensatorios del genoma nuclear que llevan a la BM es dependiente del tipo de defecto en el ADNmt.

La expresión de factores de transcripción también varía en relación con el defecto en el ADNmt. Por ejemplo, en células con ADNmt deplecionado. El contenido celular de ftmA se encuentra dramáticamente reducido (Darr and Schultz 1987) a pesar de que los niveles de ARNm fueran normales. La expresión de FRN-1 parece seguir un perfil similar a ftmA y varía dependiendo del desorden mitocondrial que presente el paciente. En contraste, los niveles de PGC-1 α el importante factor de transcripción que coactiva otros factores de transcripción relacionados con la BM no se encuentra afectado en la enfermedad MELAS ni en células rho⁻ (Irrcher, Adhietty et al. 2003). El nivel de PGC-1 α es muy importante para el mantenimiento del volumen mitocondrial y para asegurar la supervivencia de las células en esas condiciones.

Sin embargo, condiciones que alteran la resistencia del músculo a la insulina con un descenso en los niveles de expresión de genes mitocondriales como los factores reguladores FRN-1 y PGC-1 α (Wu, Puigserver et al. 1999; Patti, Butte et al. 2003). Las causas principales de este descenso no están claras, sin embargo, un historial familiar de diabetes y factores ambientales como la inactividad física contribuyen al descenso en la expresión de PGC-1 α y de los productos de genes mitocondriales. El subsecuente descenso en la fosforilación oxidativa y en la oxidación de lípidos lleva a una acumulación de lípidos en el músculo y un desarrollo de resistencia a la insulina. La práctica usual de ejercicio está demostrado que es una terapia eficaz para conseguir un aumento de la expresión de PGC-1 α y una mejora en la acción de la insulina en el músculo.

6.2.1- Biogénesis Mitocondrial inducida por ejercicio en enfermedades mitocondriales.

El músculo es uno de los tejidos más afectados por los desórdenes mitocondriales ya que es uno de los tejidos que más demanda energética tiene. Déficit de energía causado por enfermedades mitocondriales en células de músculo esquelético hace que éstas recurran a otras vías metabólicas para obtener energía. La mayoría de las miopatías están asociadas a acumulación de lactato en sangre, lo que indica una gran dependencia de la glucólisis para generar ATP. Se sabe que la práctica crónica de EF mejora la capacidad oxidativa del músculo y reduce la aparición de fatiga gracias a la BM (Hood 2001). El ejercicio crónico aumenta el número de copias de ADNmt proporcionalmente al cambio en el contenido mitocondrial (Williams, Salmons et al. 1986; Irrcher, Adhihetty

et al. 2003). Por tanto, pacientes con bajos niveles de ADNmt deberían practicar EF para aumentar el número la concentración de ADNmt. FtmA que es la proteína responsable del aumento en el número de copias de ADNmt también se sobreexpresa en el EF. Sin embargo, los efectos del EF sobre la proporción de ADNmt mutante con respecto al ADNmt normal siguen sin resolverse. Se necesitan más estudios para elucidar como el entrenamiento de resistencia puede atenuar el descenso en la capacidad oxidativa muscular y cómo mejorar la calidad de vida de los pacientes con enfermedades mitocondriales.

7- Hipertrofia

El músculo esquelético de un adulto es un tejido dinámico y capaz de cambiar su fenotipo dependiendo de las demandas existentes. Los factores externos como el uso y el desuso, la actividad de la motoneurona, el suministro de nutrientes y oxígeno, la estimulación mecánica y cambios en los niveles de hormonas pueden alterar las características bioquímicas, funcionales y fisiológicas del músculo. Después de un daño en la columna vertebral, ocurren cambios significativos en los músculos cercanos al daño. Se produce una atrofia severa en el área de la lesión además de una elevada fatigabilidad debido a un aumento en expresión de la cadena pesada de la miosina (MHC) 2b que se observa tanto en personas como en animales (Lieber, Johansson et al. 1986; Grounds and Yablonka-Reuveni 1993). Se ha demostrado que el ejercicio puede revertir la expresión de MHC a valores control en el músculo soleus en gatos que han sido sometidos a un corte en su espina dorsal (Roy, Talmadge et al. 1998).

Numerosos estudios sugieren que las células satélite están relacionadas con la respuesta hipertrófica del músculo esquelético a los estímulos externos (Snow 1990; Rosenblatt, Yong et al. 1994; Allen, Monke et al. 1995). Las células satélite son las “células madre” del músculo esquelético de los mamíferos. Se localizan debajo de la lámina basal, pero fuera del subsarcolema y están implicadas en la reparación del daño al músculo esquelético (Grounds and Yablonka-Reuveni 1993). La activación de las células satélite se ha demostrado que ocurre después de una sobrecarga del músculo, tras protocolos de entrenamientos de resistencia o tras sesiones de ejercicio excéntrico (Cabric and James 1983; Darr and Schultz 1987; Allen, Monke et al. 1995; Jacobs, Wokke et al. 1995). La activación de las células satélite después del ejercicio y en modelos de sobrecargas musculares ocurre rápidamente y se puede observar veinticuatro horas después del estímulo (Grounds and Yablonka-Reuveni 1993). Los protocolos que inducen atrofia tales como mantener a los animales en fase de crecimiento suspendidos están asociadas con un descenso en el número de células satélite y en la capacidad proliferativa (Grounds, Garrett et al. 1992). Las células satélite se activan debido al daño muscular y existen varios modelos de ejercicio que causan daño en este tipo de fibras. Se ha sugerido que el daño es necesario para que se activen las células satélite durante el ejercicio (Kasper, White et al. 1990; Snow 1990). Sin embargo, otros estudios han demostrado que el daño producido por una sola sesión de ejercicio genera una activación de células satélite mucho mayor de lo necesario para repararlo (Darr and Schultz 1989), por lo que se sugiere que la activación de estas células no tiene una relación directa con el grado de agresión muscular (Jacobs, Wokke et al. 1995). Así, varios autores especulan sobre la existencia de otros mecanismos a parte del daño muscular de activación de las células satélite.

Los factores reguladores del músculo (MRF) juegan un papel importante en la respuesta del músculo a los estímulos externos, contribuyendo a cambios en la expresión de genes característicos de la plasticidad del músculo. Los cuatro MRF, MyoD, miogenina, MRF-4 y myf-5, están relacionados con la expresión, músculo-específica, de determinados genes durante la embriogénesis (Olson and Klein 1994). Su papel en el desarrollo del músculo está ampliamente estudiado, pero está menos claro el papel que juegan los MRF en el adulto. Los MRF se inducen en músculo esquelético del adulto por denervación (Eftimie, Brenner et al. 1991), estimulación eléctrica (Jacobs-Ei, Zhou et al. 1995), y daño (Eppley, Kim et al. 1993) tanto en células satélite como en núcleos de miofibrillas. De hecho, myoD y miogenina se han utilizado como marcadores de activación de las células satélite en modelos en los que el daño muscular es evidente (Grounds, Garrett et al. 1992; Koishi, Zhang et al. 1995)

En un adulto normal los valores de ARNm de en el músculo esquelético de MRF son bajos; sin embargo, myf-5 y MRF-4 se expresan el mismo nivel en músculos con diferentes tipos de fibras, myoD y miogenina presentan diferentes expresiones entre músculos (Hughes, Cho et al. 1993; Voytik, Przyborski et al. 1993; Hughes, Koishi et al. 1997). Por su parte, MyoD está expresada sobre todo en músculos que contienen MHC tipo2 y la miogenina se expresa sobre todo en músculos que expresan MHC tipo1.

II-OBJETIVOS

II-OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis consiste en el estudio del papel de los radicales libres en las adaptaciones al entrenamiento aeróbico tanto en seres humanos como en animales de experimentación y el papel que juegan los antioxidantes orales en estas adaptaciones.

Objetivos específicos:

Los objetivos específicos son:

- 1.-** Estudiar el estrés oxidativo y el daño muscular asociado a un protocolo de entrenamiento moderado en tapiz rodante.
- 2.-** Estudiar el papel de los radicales libres en la expresión de enzimas antioxidantes en músculo esquelético inducida por un protocolo de entrenamiento moderado.
- 3.-** Estudiar el papel de los radicales libres en la expresión de factores de transcripción relacionados con el posible proceso de hipertrofia inducida por un protocolo de entrenamiento moderado en músculo esquelético.
- 4.-** Estudiar el papel de los radicales libres en la cascada de señalización que conduce a la activación del proceso de biogénesis mitocondrial inducida por un protocolo de entrenamiento moderado en músculo esquelético.

5.- Estudiar el efecto de la administración de antioxidantes sobre el consumo máximo de oxígeno en sujetos sedentarios sometidos a un programa de entrenamiento.

6.- Estudiar el efecto de la administración de antioxidantes sobre el rendimiento en un protocolo aeróbico de carrera en tapiz rodante en animales de experimentación.

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

III-MATERIALES Y MÉTODOS

1-Materiales

1.1-Estudio con animales de experimentación

1.1.1- Entrenamiento durante tres semanas

Se emplearon 34 ratas Wistar macho de 3 meses de edad y de alrededor de 250g de peso. 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 12h-12h. 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.

Las ratas se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos experimentales:

- 8 ratas grupo reposo
- 6 ratas grupo entrenado control
- 6 ratas grupo entrenado tratado con vitamina C (250mg/kg/día)
- 6 ratas grupo entrenado tratado con alopurinol (32mg/kg/día)

A los animales se les controló la bebida y la comida cada día, así como el peso adquirido durante el periodo de entrenamiento.

1.1.1.1- Protocolo de entrenamiento

Se utilizó un tapiz rodante de la marca **Columbus Instruments (Model 1050 LS Exer3/6)** con tres carriles, las velocidades y tiempos de carrera fueron los siguientes:

- 5min a 10 m/min
- 10min a 17m/min
- 10min a 24m/min
- 20 min a 26 m/min

Las ratas entrenaron 5 días a la semana, durante 3 semanas, los animales fueron sacrificados transcurridas 24 h después de la última sesión de entrenamiento.

1.1.2.- Entrenamiento durante seis semanas

Se emplearon 34 ratas Wistar machos de 3 meses de edad y de alrededor de 250g de peso. 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 12h- 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.

Las ratas se dividieron aleatoriamente en tres grupos:

- 6 ratas grupo reposo

- 6 ratas grupo entrenado control
- 6 ratas grupo entrenado tratado con vitamina C (250mg/kg/día)

1.1.2.1- Protocolo de entrenamiento

El entrenamiento duró seis semanas y se realizó durante 5 días a la semana. El protocolo empleado para el entrenamiento consistió en una modificación del descrito por Davies (Davies, Packer et al. 1981). El primer día de entrenamiento, las ratas corrieron durante 25 minutos, cada día se aumentó el tiempo de carrera 5 minutos hasta un tiempo total de 85 minutos que se alcanzó el último día de la tercera semana. El grupo de animales entrenado durante 6 semanas se mantuvo a un tiempo de carrera de 85 minutos con la única modificación de la velocidad de carrera. (30m/min con una inclinación del tapiz del 15%). El grupo reposo fue ejercitado durante 10 minutos cada 3 días durante las 6 semanas que duró el período de entrenamiento. El entrenamiento fue moderado ya que se encuentra por debajo del 75% del consumo máximo de oxígeno del animal (Pica and Brooks 1982). Cada grupo fue entrenado a la misma hora cada día para no modificar demasiado su ciclo horario.

Al final del período de entrenamiento, al grupo entrenado y al grupo entrenado tratado con vitamina C se les sometió a una prueba de resistencia a una velocidad constante de 28m/min hasta el agotamiento con 15° de inclinación en el tapiz rodante, el agotamiento se determinó por la incapacidad del animal para enderezarse al colocarlo sobre su costado.

Los animales fueron sacrificados 48 horas después la prueba de esfuerzo.

1.1.3- Sacrificio de los animales

Un día después del ejercicio en el caso del entrenamiento durante tres semanas, y dos días después de la prueba de esfuerzo en el caso del entrenamiento durante 6 semanas, los animales fueron anestesiados con Pentotal Sódico (50 mg/Kg de peso). Posteriormente se procedió a la apertura de 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 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 se recogió en una alícuota y fue almacenado a -20°C para posteriormente realizar la medición espectrofotométrica de la actividad enzimática GOT, fluorimétrica de la XO, y de los análisis de Glutación y MDA por HPLC.

Los tejidos recogidos fueron:

- Cerebro
- Músculo gastrocnemio
- Músculo soleus
- Hígado

Todos ellos se recogieron con la técnica del “freeze-clamping”, en la que utilizando unas pinzas previamente sumergidas en nitrógeno líquido, se aplasta el tejido y se congela en nitrógeno preservando así todas sus características bioquímicas.

1.2- Estudios con humanos

Un total de 19 sujetos voluntarios, sanos y sedentarios se utilizaron para el estudio. Todos ellos eran no fumadores y sin enfermedad reconocida. Cualquier sujeto que tomara alguna forma de vitamina C fue excluido del estudio. Todos los sujetos fueron informados verbalmente y por escrito de la naturaleza del estudio, incluyendo los riesgos potenciales del mismo.

Los sujetos fueron aleatoriamente divididos en dos grupos experimentales:

Grupo entrenado: n= 9

Grupo entrenado tratado con 1 g vitamina C diariamente: n= 5

Grupo reposo: n=5

Antes de iniciar las pruebas experimentales, los sujetos se sometieron a la medida del VO₂max, de talla, peso y del Índice de masa corporal (IMC). No existió diferencia significativa entre los diferentes grupos. Todas estas características se pueden encontrar en la siguiente tabla.

Tabla III.1: Media y desviación estándar de las características de los dos grupos de estudio

	Edad (años)	Altura (cm)	Peso (Kg)	VO₂max (ml/min)	IMC (Kg/m²)
Sujetos	29,7±4,3	180,0± 0,1	77,1± 10,3	3052,2± 475,3	24,7± 3,4

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.

•Espectrofotómetro

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

•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.

•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.

•**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.

•**Sistema de Análisis de Imágenes.**

Marca FUJIFILM, modelo LAS-1000 plus.

• **Transiluminador ultravioleta**

Marca Vilverlourmat, modelo TFX-35M.

• **Genequant**

• **Termociclador** Marca BIORAD, modelo iCycler iQTM Multi-Color, Real-Time PCR Detection System

• **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 μm 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 CLASSLC10.
- Columna TEKNOKROMA de fase reversa, modelo Spherisorb C18 cuyas dimensiones son 15 x 0,46 cm y de un tamaño de partícula de 5 μm .

• **Bicicleta ergométrica** (Monark Ergomedic 828, Suecia)

• **Medidor de pulso cardíaco** (Polar, Sportester, PE3000, Demepele, Finlandia)

1.4- Reactivos

• **Determinación de proteínas**

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 ARN total.**

Se utilizó el reactivo Trizol de la marca Invitrogen

- **Retrotranscripción y amplificación.**

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

- **Agua DEPC**

Agua tratada con diethylpirocarbonato.

- **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

- **Superoxide Dismutase Assay Kit de laboratorios Cayman**

- **Enzimas**

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, ARNasa 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, aprotina, leupeptina, pepstatina, metanol, ácido bórico, ácido maleico, Tween 20. Los reactivos se obtuvieron de las firmas: Sigma-Aldrich Química (España), Boehringer Mannheim S.A. (Alemania), Panreac, Merck Biochemica (Alemania).

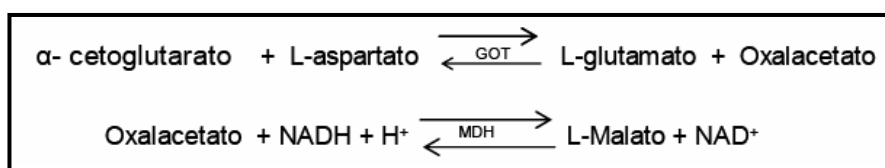
2- Métodos

2.1. Determinación de Aspartato-aminotransferasa (GOT)

2.1.1 Fundamento.

La GOT cataliza la transferencia de un grupo amino de aminoácidos específicos (L-glutámico o L-aspartico) a cetoácidos específicos (α -cetoglutarico 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.

2.1.2. Preparación de la muestra.

Se recogieron muestras de sangre en tubo seco. Transcurrido un tiempo aproximado de 30 minutos, se centrifuga la sangre a 2000g durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido es el suero donde realizaremos la determinación.

2.1.3. 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 \geq 0.46 U/mL; LDH \geq 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

2.2- Método para determinar la concentración de proteínas: Método Bradford

2.2.1.Fundamento:

La unión de las proteínas con el reactivo de Bradford produce un cambio en el color del reactivo, y por tanto un cambio en su absorbancia. El

reactivo Bradford contiene ácido fosfórico, metanol y también azul de comassie que al unirse a los residuos aminoacídicos de proteínas y en especial de arginina, cambia su máximo de absorbancia de 465 a 595 nm.

2.2.2.-Reactivos:

Agua Bidestilada

Bradford Reagent (Biorad®)

Homogenado de tejido

BSA (Bovine Seric Albumine): Para realizar la recta patrón

2.2.3.-Procedimiento:

Se realiza una recta patrón de BSA, para posteriormente interpolar nuestras muestras de concentración desconocida.

Se mezclan 800 μ l de H₂O con 200 μ l de Bradford. Se lee la absorbancia a 595 nm de cada microcubeta para hacer el blanco. Después se le añade 2 μ l de muestra o patrón, según corresponda en cada microcubeta y se lee la absorbancia a 595nm. Ésta debe haber aumentado gracias a la unión del Bradford con las proteínas que contiene la muestra y la recta patrón.

2.2.4.-Cálculos:

Los cálculos consisten en realizar una recta patrón de concentración de proteínas realizada con BSA e interpolar en esa recta los valores de absorbancia obtenidos de nuestras muestras. El valor que se utiliza para hacer la recta y para calcular la concentración de las muestras es:

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{blanco}}$$

2.3- Extracción de proteínas citoplasmáticas a partir de tejido muscular.

2.3.1. Fundamento

Para llevar a cabo la valoración de la expresión de PGC-1, Citrato sintasa, citocromo C FRN-1 y ftmA transfiriendo estas proteínas desde geles a membranas (Western Blotting) , es necesaria la obtención de extractos de proteínas citoplasmáticas.

2.3.2. 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 alicuotado y almacenado a -80°C hasta su valoración y utilización.

2.3.3.Cuantificación.

En los extractos citoplasmáticos los valores de concentración de proteínas fueron obtenidos por el método de Bradford (Bradford, 1976).

2.4-Aislamiento de ARN a partir de tejido

El aislamiento de ARN a partir de tejido se realizó con el reactivo Trizol de la casa Invitrogen. 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 isopícnica utilizando cloruro de litio y trifluoroacetato de cesio.

2.4.1- Reactivos

- Reactivo Trizol, de la marca Invitrogen
- Cloroformo de SIGMA
- Alcohol isopropílico de SIGMA
- Etanol de 70°
- Agua DEPC

2.4.2- Procedimiento

1-Se homogeniza el tejido con Trizol en el Ultraturax, en la siguiente proporción 100mg tejido/ 1ml de Trizol

2-Se deja a temperatura ambiente durante 5 minutos

3-Se añaden 200 µl de de cloroformo y se agita vigorosamente durante 15 segundos

4-Se deja reposar durante 3 minutos

5-Se centrifuga a 12000g durante 10 minutos a 4°C

6-Se recoge la fase acuosa superior y se lleva a un tubo limpio. Se añaden 0.5 ml de isopropil alcohol para precipitar el ARN y se agita .Se deja reposar durante 10 minutos a T^a ambiente

7-Se centrifuga durante 10 minutos a 12000g

8-Se elimina el alcohol y el pellet restante se lava con etanol 75°, se vortea para mezclar.

9-Se centrifuga a 7500g durante 5 minutos.

10-Se elimina el etanol y se añaden 50 µl de agua DEPC

11-Se calienta a 65°C para disolver el ARN

12-Se hacen alícuotas

13-Se congela a -80°C para así evitar degradaciones

Todo este protocolo se debe realizar con mucho cuidado, ya que el ARN es muy lábil y existe mucho riesgo de degradación debido a la acción de

las RNAsas. El material debe estar perfectamente libre de RNAsas y autoclavado.

2.4.3-Cuantificación de la concentración de ARN

Se utiliza el GeneQuant, que actúa como espectrofotómetro, y capilares de cuarzo. Inicialmente se determina el blanco con H₂O DEPC y posteriormente se introduce un capilar con el ARN.

Los cálculos de la concentración de ARN, los realiza el aparato automáticamente siguiendo el siguiente procedimiento:

Se mide la absorbancia a 260 nm y después a 280nm, la pureza del ARN se calcula realizando el cociente entre ambas absorbancias: 260/280 nm, de forma que valores comprendidos entre 1.8 y 2.0 indican que se obtuvo un ARN de buena calidad.

Además de las medidas de absorbancia, y con el fin de asegurar la integridad del ARN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa.

2.5-Electroforesis en gel de agarosa

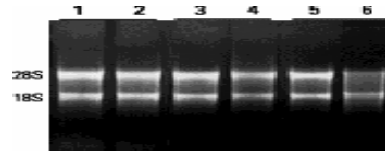
1.- Para el análisis de la calidad del ARN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% y en tampón MOPS con bromuro de etidio.

2.- La cantidad de muestra cargada fueron 25µg de ARN 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 ARN.

Deben aparecer 2 bandas claras, la del ARN mayoritario, el 28s y la del 18s ribosomales. Si no aparecen estas 2 bandas, el ARN está degradado y se debe volver a extraer.

Figura III.1: Imagen de una electroforesis en gel de agarosa



2.6- Retrotranscripción-Amplificación del ARN (RT-PCR).

2.6.1. Fundamento.

En la actualidad, existen varios métodos de determinación de la expresión del ARN mensajero, como el Northern Blotting, la hibridación in situ, los ensayos basados en la protección frente a las ARNasas, cDNA arrays y retrotranscripción-amplificación(RT-PCR) del ARN.

La RT-PCR consiste en dos pasos:

2.6.1.1 Síntesis de cDNA: Retrotranscripción (RT).

Consiste en la obtención de un DNA copia (cDNA) a partir de un ARN mensajero (mARN), 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 ARN 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 ARN utilizamos cebadores (“primers”) específicos del gen cuya expresión queremos determinar, de modo que la retrotranscripción es específica del cDNA que queremos amplificar.

2.6.1.2 Amplificación del cDNA: 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 manganeso.

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.

2.6.2. 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 Ver tabla III.2

Tabla III.2- Secuencia génica de los cebadores para los genes a estudiar

Gen	Secuencia génica
MnSOD	CGT GCT CCC ACA CAT CAA TC TGA ACG TCA CCG AGG AGA AG
GPx	GAC ATC AGG AGA ATG GCA AG CAT CAC CAA GCC AAT ACC AG
FRN-1	GTA TGC TAA GTG CTG ATG AA GGG TTT GGA GGG TGA GAT
ftmA	AGT TCA TAC CTT CGA TTT TC TGA CTT GGA GTT AGC TGC
Miogenina	GCA GTC CCA TCC AGT ACA TTG AGC CCT TCC ACT GTC TGT ATA GGA GGT G
Myo D	CAA CTG CTC TGA TGG CATGAT GG ACA AGA CGT AGC GAA CTC CTA CAG

Todos expresados en dirección 5'- 3'

2.6.3. 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

Glutación Peroxidasa (GPx)

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 ARN (RT-PCR en tiempo real).

Factor Respiratorio Nuclear 1 (FRN-1)

Retrotranscripción: 50°C durante 30'

Desnaturalización previa: 94°C durante 3'

Amplificación: (30 ciclos)

Desnaturalización: 94°C durante 30 segundos

Unión o "annealing": 58.2°C durante 30 segundos

Extensión: 72°C durante 30 segundos

Extensión final: 72°C durante 7 minutos

Factor de Transcripción mitocondrial A (ftmA)

Retrotranscripción: 50°C durante 30'

Desnaturalización previa: 94°C durante 3'

Amplificación: (30 ciclos)

Desnaturalización: 94°C durante 30 segundos

Unión o “annealing”: 51°C durante 30 segundos

Extensión: 72°C durante 30 segundos

Extensión final: 72°C durante 7 minutos

Miogenina

Retrotranscripción: 50°C durante 30'

Desnaturalización previa: 94°C durante 3'

Amplificación: (30 ciclos)

Desnaturalización: 94°C durante 30 segundos

Unión o “annealing”: 59°C durante 30 segundos

Extensión: 72°C durante 30 segundos

Extensión final: 72°C durante 7 minutos

Myo D

Retrotranscripción: 50°C durante 30'

Desnaturalización previa: 94°C durante 3'

Amplificación: (30 ciclos)

Desnaturalización: 94°C durante 30 segundos

Unión o “annealing”: 63,9 °C durante 30 segundos

Extensión: 72°C durante 30 segundos

Extensión final: 72°C durante 7 minutos

En la presente tesis hemos utilizado el método de retrotranscripción-amplificación (RT-PCR) cuantitativo en tiempo real para determinar la expresión del ARN.

2.7. Retrotranscripción-Amplificación cuantitativa del ARN (RT-PCR en tiempo real).

2.7.1. Fundamento.

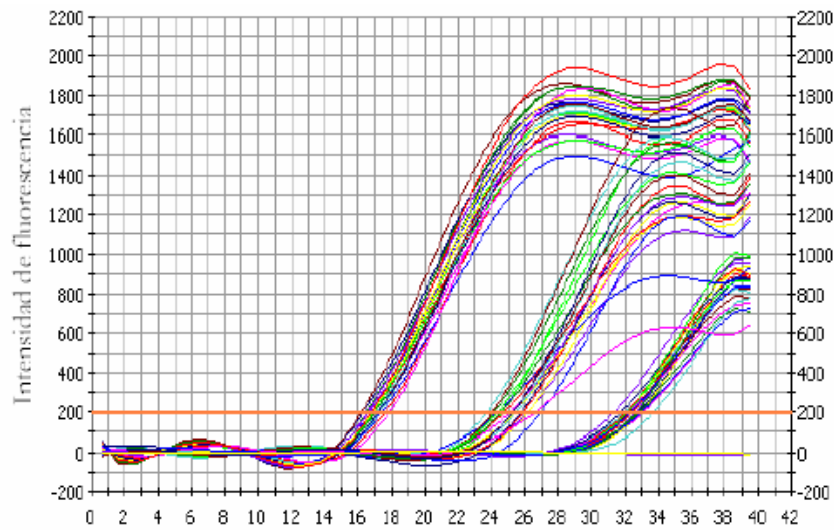
La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RTPCR) es actualmente el método más sensible y exacto para la detección de niveles de ARN mensajeros (ARNm), tanto en células como en tejidos.

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 la dos hebras complementarias de DNA estén unidas.

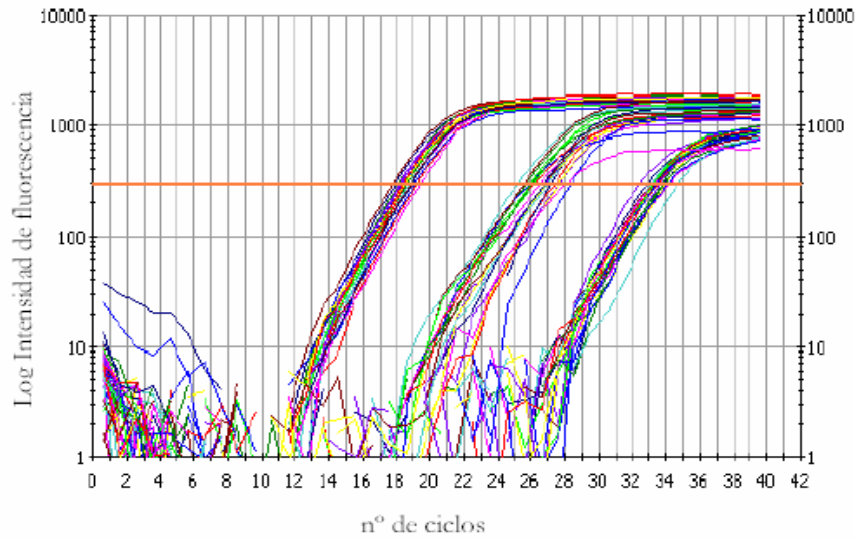
Así, este método nos permite seguir la reacción a medida que transcurre a través del incremento de fluorescencia, y nos permite controlar la reacción en todo momento (aumento del nº de ciclos, repetición de ciclos, pausa...).

Figura III.2-Representación de la amplificación que obtenemos utilizando la RT-PCR.



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 3)

Figura III.3- Curva 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 ARNm (ARN 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 ARNm 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 ARNm 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 ARNm de partida haya, 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.

2.7.2. 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 μ M cada uno, concentración final
 Muestra de ARN.....20 ng de ARN
 Agua libre de ARNsas.....c.s.p. 12.5 μ L

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 ARNsas.....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 ya señaladas para los genes a medir. 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.

2.7.3. 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:

$$2^{\Delta Ct}$$

donde $\Delta Ct = \Delta.Ct1 - \Delta.Ct2$

siendo $\Delta Ct1 = Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia de la muestra 1}$

$\Delta Ct2 = Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia de la muestra 2}$

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 ARN 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:

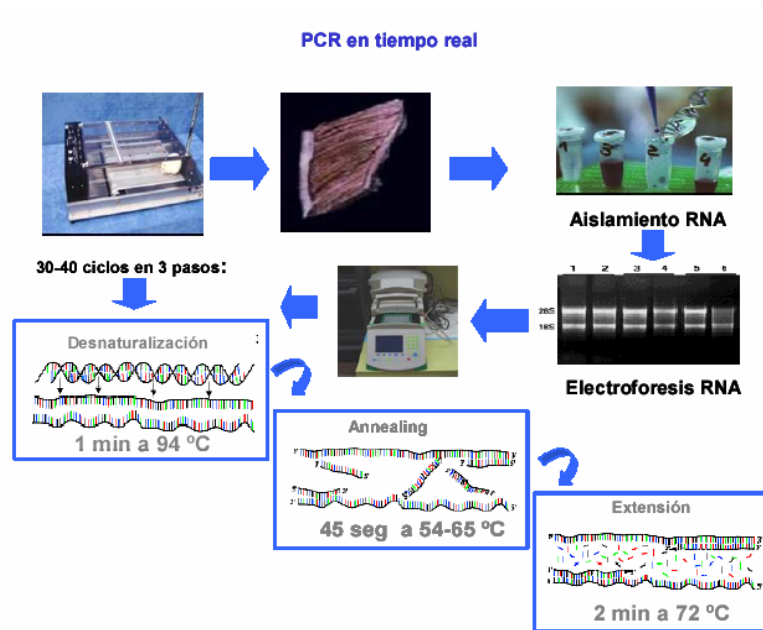
$$\text{Eficiencia} = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1$$

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 al 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, ejercicio con vitamina C y ejercicio con alopurinol por triplicado. Posteriormente aplicamos la ecuación de comparación de Ct mencionada anteriormente para el cálculo de la diferencia de expresión del gen manganeso-superóxido dismutasa, del gen de la Glutathion peroxidasa, de FRN-1 y de *ftmA* entre los cuatro grupos.

Figura III.4-Resumen de la técnica de la RT-PCR en tiempo real.



2.8- Estudio de la expresión de citrato sintasa, PGC-1, FRN-1, ftmA y citocromo C mediante Electroforesis en Geles de Poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) y posterior Western Blotting.

2.8 1. Fundamento

La electroforesis es un transporte bajo la acción de un campo eléctrico. La electroforesis en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida, se utiliza mayoritariamente para la separación de proteínas. Concretamente se utilizó el PAGE en condiciones desnaturizantes. En presencia de algunos compuestos químicos las proteínas pierden su estructura nativa. Tales compuestos, agentes desnaturizantes, producen el desplegamiento de la proteína que aparece así sin la organización tridimensional característica de su función biológica. La combinación de un detergente desnaturizante (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.

Mediante la utilización de esta técnica se valoró la expresión de las proteínas relacionadas con la biogénesis mitocondrial como: citrato Sintasa, PGC-1, FRN-1, ftnA, citocromo C y la fosforilación de AMPK.

Todas ellas se valoraron utilizando como referencia los niveles de α -actina en los extractos citosólicos musculares.

2.8.2. Condiciones del gel y transferencia.

Para detectar la expresión de PGC-1 se cargaron 50 μ g de proteína citoplasmática en geles discontinuos al 12% de Acrilamida (29:1Acrilamida: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 Miniprotean II (Bio-Rad, USA).

El proceso se desarrolla durante 70 minutos, a una temperatura de 4°C, una intensidad constante de 240 mAmperios y en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20% v/v, pH 8,3).

2.8.3. 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 y Santa Cruz)

(Ver Tabla III.3)

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 para PGC-1 y de cabra para FRN-1, citrato sintasa, y ftmA (Cell Signaling Technology y Santa Cruz). El anticuerpo se disuelve en tampón de bloqueo (1:2000 en el caso de conejo y 1:1500 para el de cabra).

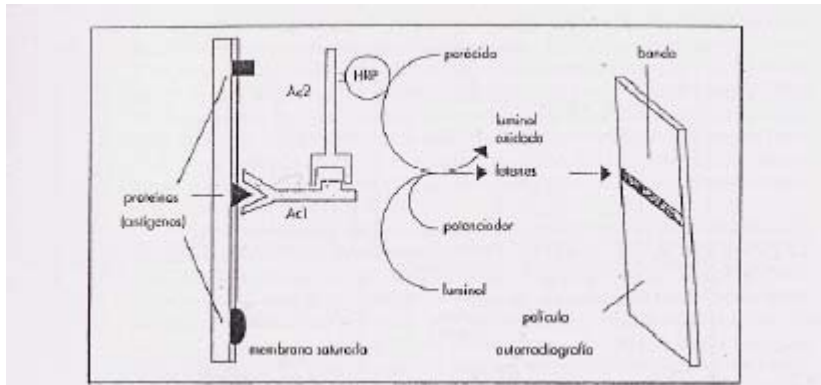
6.- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 15 mL de TBS-T.

7.- La membrana se incuba 1 minuto con reactivo ECL (Amersham Pharmacia, USA) e inmediatamente se expone a un digitalizador de imagen de la marca Fujifilm.

Tabla III.3- Relación de los anticuerpos utilizados en la técnica del Western-blot

Anticuerpo	Pm (KDa)	Dilución
Anti PGC-1	100	1:200
Anti Citrato Sintasa	121	1:500
Anti FRN-1	85	1:200
Anti ftmA	25	1:300
Anti Citocromo C	12	1:500
Anti AMPK	62	1:1000
Anti AMPKP	62	1:1000
Anti α -actina	42	1:500

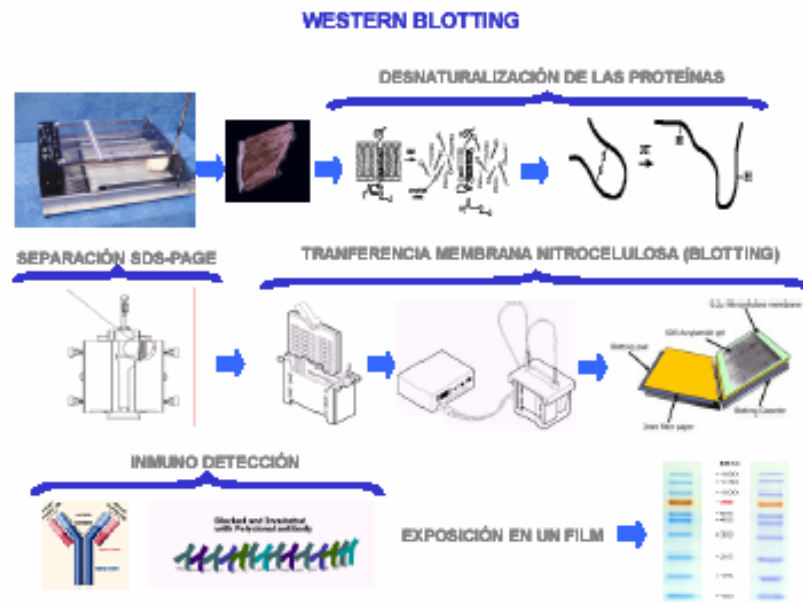
Figura III.5- Emisión de fotones debido a la reacción del anticuerpo secundario y el reactivo ECL



Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante un programa informático de la casa Fujifilm mediante el cual se realizó la densitometría de las bandas.

Los valores de las proteínas estudiadas se expresaron en función de los valores de expresión de α -actina en los extractos citosólicos musculares.

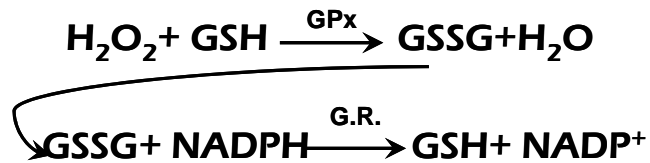
Figura III.6- Esquema de la técnica del Western-blot



2.9.-Determinación de la actividad Glutación Peroxidasa (GPx)

2.9.1.- Fundamento

Se basa en una reacción acoplada en la que se mide la desaparición del NADPH a 340nm. La GPx detoxifica el H_2O_2 utilizando el glutatión reducido (GSH) formándose Glutatión oxidado (GSSG) y agua. La glutatión reductasa utiliza el NADPH para reducir el Glutatión oxidado formándose de nuevo GSH y $NADP^+$.



2.9.2.- Preparación y homogenado de la Muestra

Se homogeneizaron los tejidos que habían sido previamente congelados mediante la técnica del freeze-clamping con un tampón Kpi con inhibidor de proteasas siguiendo la siguiente proporción:

1000 μl de tampón homogenado----- 100mg de muestra

Posteriormente se centrifugó a 12000g durante 12 minutos y se recogió el sobrenadante y se realizó el protocolo de medida de la actividad GPx. El homogenado debe realizarse el mismo día en el que se hace el experimento.

2.9.3.- Reactivos

- NADPH: 1,5mM disuelto en NaHCO_3 al 0,1%
- H_2O_2 : 1,5mM
- GSH: 10mM disuelto en H_2O
- Glutati3n Reductasa: 25 μl diluida 5 ml de KPi
- KPi: 0,1M PH=7 EDTA 1mM
- Azida de Sodio: 1mM

2.9.4.-Procedimiento

Se mezclan en la misma microcubeta:

450 μ l de KPi

50 μ l de azida de sodio

100 μ l de Glutación reductasa

100 μ l de GSH

50 μ l de muestra

Se incuba durante 5 minutos a 37°C

Se añaden 100 μ l de NADPH

Se registra la absorbancia en el espectrofotómetro a 340nm hasta que la línea de base sea estable

Se añaden 100 μ l de H₂O₂ que es el reactivo que inicia la reacción y se registra durante 3 minutos

Se anota la y_{max}, la y_{min}, la pendiente de la recta obtenida y el coeficiente de correlación de la reacción.

Para hacer el blanco no se le añade muestra si no agua, de esta manera no debemos observar la desaparición del NADPH, ya que no se estaría formando GSSG debido a que no existe actividad Gutación Peroxidasa.

2.9.5.-Cálculos

Se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{OD/min} \times \frac{V_f (\text{ml})}{V_m (\text{ml})} \times \frac{1}{6,22} \times F_d = \text{U/ml}$$

Siendo:

$$\frac{\Delta OD/min : (\text{Absorbancia máxima} - \text{Absorbancia mínima})}{3 \text{ minutos}}$$

Vf: Volumen final de la microcubeta

Vm: Volumen de muestra utilizado

Fd: Factor de dilución

Los resultados finales se expresaron en U/g de proteína.

2.10.-Determinación de los valores de glutatión total.

2.10.1.-Fundamento

El glutatión total se determina por H.P.L.C., siguiendo el método descrito por Reed y colaboradores (Reed, Babson et al. 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, Sastre et al. 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.

2.10.2.- Obtención de las muestras y conservación

Se realiza una extracción sanguínea en la que inmediatamente se pipetea 200 μ L de sangre y se mezclan con 800 μ L 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.

2.10.3.-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 0.3M y una vez alcanzado el pH adecuado, se incuba la muestra durante 10 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.

3.- Al finalizar el tiempo de 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.

2.10.4.-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 elusión 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.

2.10.5.-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.

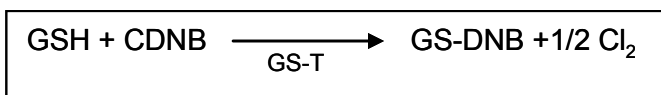
El glutatión total lo expresamos como equivalentes de GSH, sumándole a la concentración de GSH 2 veces la de GSSG.

$$[\text{GSH}] = \text{Glutation total} - (2 \times \text{GSSG})$$

2.10.5.1. -Cálculo de la concentración de los patrones de glutatión reducido por medio de la reacción de la glutatión transferasa.

2.10.5.1.1.-Fundamento.

Hemos utilizado el método descrito por Brigelius (Brigelius et al, 1983). Se basa en la determinación espectrofotométrica de la conjugación del GSH con el cloro-2,4-dinitrobenceno. Esta reacción está catalizada por la glutatión-S- transferasa. El aducto formado, 2,4-dinitrofenil-S-glutatión, presenta un máximo de absorción a 340 nm.



2.10.5.1.2.-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-dinitrobenceno 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 glutatión-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.

2.10.5.1.3. Cálculos.

Para calcular la concentración de GSH se utiliza el coeficiente de extinción molar del 2,4-dinitrofenil-S-glutatión 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:

$$[\text{PATRÓN GSH}] = \frac{A_{\text{PATRÓN GSH}}}{A_{\text{PI}}} [\text{PI}] \times \text{Factor respuesta}$$

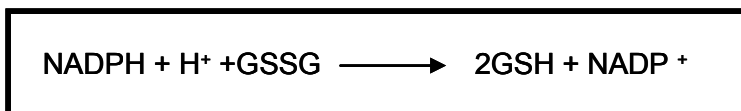
Por medio de esta relación podremos calcular posteriormente las concentraciones de nuestras muestras problema:

$$[\text{GSH PROBLEMA}] = \frac{A_{\text{GSH PROBLEMA}}}{A_{\text{PI}}} [\text{PI}] \times \text{Factor respuesta}$$

2.10.5.2. Cálculo de la concentración de los patrones de glutatión oxidado por medio de la reacción de la glutatión reductasa.

2.10.5.2.1. Fundamento:

Se sigue la reducción dependiente de NADPH (340 nm) del GSSG a GSH.



2.10.5.2.2.- 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.

2.10.5.2.3.-Cálculos

Calculamos la concentración de GSSG por medio de la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{OD}/\text{min} \times \text{Vf}(\text{ml})}{\text{Vm}(\text{ml})} \times \frac{1}{6,22} \times \text{factor de dilución} = \text{U/mlmuestra}$$

Siendo Vf: Volumen final de la cubeta

Vm: Volumen de la muestra en la cubeta

Factor de dilución: Factor de dilución

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.

$$[\text{PATRÓN GSSG}] = \frac{A_{\text{PATRÓN GSSG}}}{A_{\text{PI}}} [\text{Pi}] \times \text{Factor respuesta}$$

$$[\text{GSH PROBLEMA}] = \frac{A_{\text{GSH PROBLEMA}}}{A_{\text{PI}}} [\text{Pi}] \times \text{Factor respuesta}$$

2.11.-Determinación del glutatión oxidado (GSSG)

2.11.1.- Fundamento

Para la determinación del GSSG se siguió el método cromatográfico descrito por Asensi y colaboradores (Asensi, Sastre et al. 1994). Se basa en la separación cromatográfica de los dinitrobenzeno 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.

2.11.2.-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° C. El sobrenadante ácido libre de proteínas se usará posteriormente para la determinación del GSSG. Las muestras pueden ser conservadas a -20° C hasta el momento de su análisis.

2.11.3.-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 dinitrobencono 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.

2.11.4.-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.

2.11.5.-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.

2.12.- Determinación de lipoperóxidos en forma de malondialdehído.

2.12.1.- Fundamento.

Se ha seguido el método descrito por Wong y colaboradores (Wong, Knight et al. 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.

2.12.2.- 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-tiobarbitúricomalondialdehído es estable a pH neutro-básico un máximo de 20 minutos, por lo que se debe operar con rapidez.

2.12.3.-Técnica cromatográfica

Todo el proceso se realiza a un flujo constante de 1 ml/minuto. La elusión 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.

2.12.4.-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.

2.13.- Determinación de la actividad Manganese Superóxido Dismutasa

2.13.1.- Fundamento

La SOD cataliza la detoxificación del anión superóxido como se muestra en la siguiente figura:



El $O_2^{\cdot -}$ se produce gracias a la acción de una enzima que se añade al medio de reacción que es la Xantina Oxidasa. El radical se detecta gracias a la adición de un detector de radicales libres, la sal de tetrazolio. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para producir un 50% de la dismutación del radical superóxido. Para nuestro experimento decidimos inhibir la isoforma Cu/Zn de la SOD y para ello añadimos KCN al medio de reacción.

2.13.2.- Preparación y homogenado de la Muestra

Se homogeneizaron los tejidos que habían sido previamente congelados mediante la técnica del freeze-clamping con un tampón HEPES con inhibidor de proteasas siguiendo la siguiente proporción:

1000 μ l de tampón homogenado----- 100mg de muestra

Después se centrifugó el homogenado a 1500g durante 5 minutos y se procedió a realizar la medida de la actividad.

2.13.3.- Reactivos

-Tampón Hepes 20mM pH=7,2 EGTA 1mM, 210 mM manitol y 70mM de sacarosa

-KCN para inhibir la isoforma Cu/zn de la SOD

- Superoxide Assay Kit de Cayman que contiene:

-Tampón de ensayo o de reacción

-Tampón de muestra

-Radical detector

-SOD estándar

-Xantina Oxidasa

2.13.4.-Procedimiento

-Se prepara la recta patrón en la que habrán diferentes concentraciones de SOD

-Se añade a cada pocillo 200 μ l de tampón de reacción a cada pocillo de los estándares y 10 μ l de patrón a cada uno.

-Se añade 190 μ l de tampón de reacción a cada pocillo de la muestra a analizar y 10 μ l de KCN.

-Se añade 10 μ l de muestra a cada pocillo.

-Empieza la reacción añadiendo 20 μ l de XO

-Se mide después de 20 minutos a una $\lambda=450$ nm

2.13.5.-Cálculos

-Se debe de calcular el cociente de absorbancia para cada punto de la recta patrón, para ello se obtiene el valor del patrón 0 y éste se divide por cada valor del patrón.

-Se realiza la recta patrón de SOD poniendo en el eje de las x la concentración de SOD y en el de las y el valor del cociente de absorbancia.

-Se calcula el cociente de absorbancia para cada muestra

-Se interpola en la recta patrón siguiendo la siguiente fórmula

$$\text{SOD(U/ml)} = \left[\frac{\text{Cociente de abs muestra} - \text{o.o}}{\text{pendiente}} \right] \times \frac{0,23\text{ml}}{0,01\text{ml}}$$

Siendo o.o la ordenada en el origen de la recta patrón.

2.14.- Determinación del VO₂max en humanos

El experimento se realizó en una cicloergómetro (Monark Ergomedic 828, Suecia).

Los valores basales de VO₂max se obtuvieron para todos los sujetos después de un período de cinco minutos de reposo. Después, el sujeto realizó un calentamiento de tres minutos a una intensidad de 80 watos. El ejercicio empezó tras tres minutos de reposo, con una carga correspondiente a 2 MET con aumentos de 2 MET cada tres minutos (Billat, Flechet et al. 1999). Durante todo el test, el sujeto se mantuvo a un pedaleo constante de 70 rpm. Cuando el sujeto llegó al agotamiento, continuó pedaleando contra una resistencia de 50 watos durante tres

minutos. VO_2max se tomó de todos los valores de VO_2 que se obtuvieron. VO_2 se tomó cada diez segundos, y se estableció siguiendo los siguientes criterios:

- 1-Pulso cardíaco cuando se realiza el ejercicio máximo mayor del 90% del pulso cardíaco máximo predicho para esa edad (Tanaka, Monahan et al. 2001).
- 2- $\text{CR} > 1,15$
- 3- Meseta de consumo de oxígeno a pesar del trabajo realizado.
- 4-Concentración de lactato $> 10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

Las fracciones de oxígeno y dióxido de carbono espirado fueron obtenidos cada treinta segundos y analizados por un espirómetro de circuito abierto (Oxicon Pro, Jaeger, Alemania). El volumen y la composición de los gases espirados fueron expresados en términos estándares (temperatura y presión estándar, humedad). El pulso cardíaco fue medido continuamente por un pulsómetro (Polar, Sportester, PE3000, Dempele, Finlandia) en intervalos de cinco segundos.

2.14.1.-Diseño experimental

Cada sujeto participó en dos pruebas experimentales (antes y después de ocho semanas de entrenamiento). Los sujetos llegaron entre las 10 y las 11 de la mañana. Tenían instrucciones de seguir su dieta habitual y que evitaran el alcohol en las 24 horas previas al estudio. Los sujetos debían anotar toda su ingesta durante las 24 horas previas y repetir la misma dieta en la segunda visita. Todos ellos debían evitar cualquier ejercicio extenuante 72 horas previas a la participación en la prueba.

Después del primera prueba de medida del VO_2max , todos los sujetos se sometieron a un programa de EF regular 3días/semana durante ocho semanas en una bicicleta estática. La intensidad del entrenamiento

aumentó de un 65% a un 80% del VO_2max durante todo el período (5% de aumento cada dos semanas). La duración de las sesiones de entrenamiento fue de cuarenta minutos.

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.

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

IV-RESULTADOS

1.- Estudio del efecto de la administración de antioxidantes en el posible daño muscular asociado al entrenamiento. Resultados en animales.

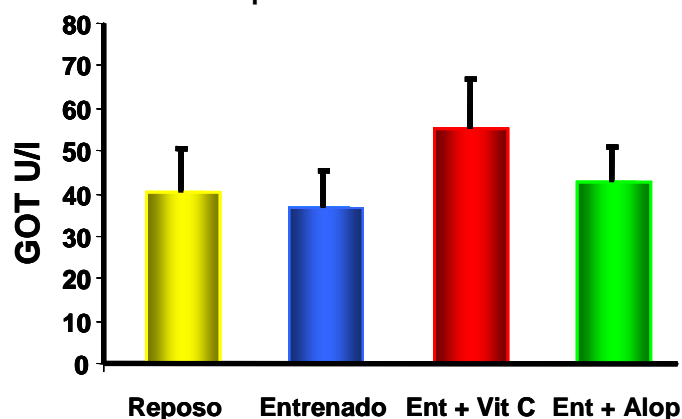
El daño muscular inducido por el ejercicio físico está asociado a la práctica agotadora o a un elevado componente excéntrico (Armstrong, Ogilvie et al. 1983; Kyparos, Matziari et al. 2001) de la misma. En este apartado de los resultados, nos planteamos comprobar la idoneidad en la selección de las intensidades y el tipo de ejercicio en la aplicación de un protocolo de entrenamiento de tres semanas en animales. El objetivo de nuestro trabajo es el de determinar el papel de los radicales libres en las adaptaciones al ejercicio físico moderado. Por tanto, una intensidad moderada (75% VO_2max) y un ejercicio eminentemente concéntrico (carrera en tapiz rodante con una inclinación del 15%) fueron la dos variables que nos propusimos aplicar. Con esa intención determinamos el posible daño muscular inducido por el entrenamiento con la determinación de la actividad de la enzima aspartato amino transferasa (GOT) en plasma de ratas entrenadas con y sin tratamiento con antioxidantes.

1.1. Efecto de la administración de vitamina C y alopurinol sobre la actividad en plasma de la GOT en ratas entrenadas durante 3 semanas.

La GOT es una enzima que cataliza la transferencia de un grupo amino de aminoácidos específicos (L-glutámico o L-aspartico) a cetoácidos específicos (α -cetoglutámico u oxalacético). Esta enzima se encuentra en el citoplasma y las mitocondrias de células del tejido cardíaco, hepático y esquelético, principalmente. Los valores normales en animales para GOT son 5-50 U/l.

Determinamos la actividad de la enzima GOT, como marcador de daño muscular, en muestras de plasma de animales sometidos a un programa de entrenamiento en tapiz rodante 5 días a la semana durante 3 semanas. Como se puede observar en la figura 1, todos los grupos presentan los mismos niveles de actividad enzimática por lo que podemos deducir que el entrenamiento al que se sometieron no produjo daño muscular.

Figura IV.1- Actividad GOT en plasma de rata entrenada durante 3 semanas



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=8$ en grupo reposo, $n=6$ en grupo entrenado, $n=6$ en grupo entrenado + vitamina C y $n=6$ en grupo entrenado + alopurinol.

2.- Estudio del estrés oxidativo asociado al entrenamiento. Resultados en animales.

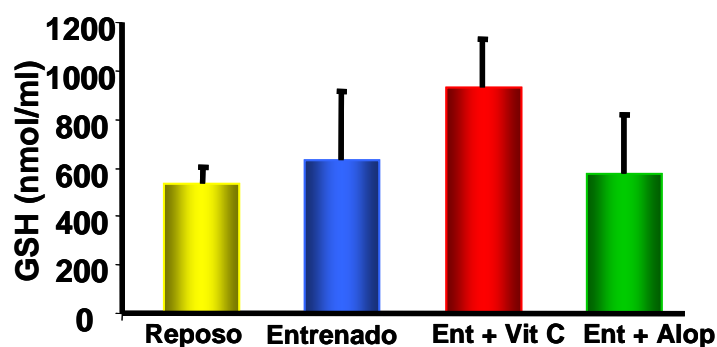
Nuestro grupo de investigación a principio de los años 90 demostró que el ejercicio físico, cuando se realiza hasta el agotamiento, puede generar radicales libres (Sastre, Asensi et al. 1992). Diversos investigadores han estudiado el efecto que el ejercicio físico continuado y de menor intensidad pueden tener sobre distintos parámetros de estrés oxidativo (Sen, Rankinen et al. 1994; Vina, Sastre et al. 1995; Laaksonen, Atalay et al. 1996). En esta sección del apartado de resultados nos planteamos estudiar el efecto que un entrenamiento de tres semanas tiene sobre los niveles de dos sensibles marcadores de estrés oxidativo, el glutatión y el malondialdehído.

2.1. Efecto de la administración de antioxidantes sobre el estatus del glutatión en sangre de ratas entrenadas durante 3 semanas.

Determinamos la concentración de GSH, GSSG y calculamos el cociente $GSSG/GSH \times 100$ en sangre venosa de nuestros animales.

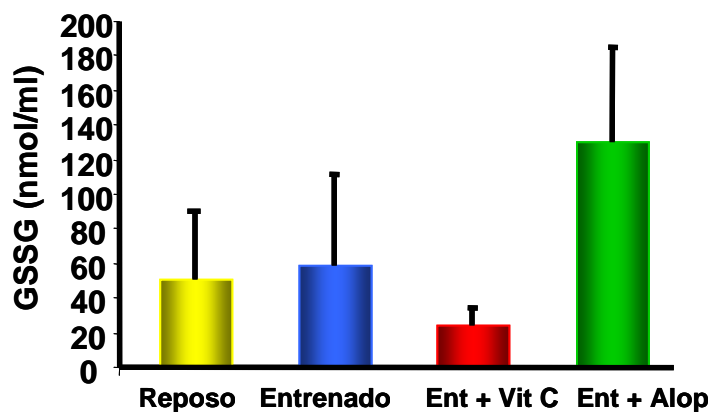
En la figura IV.2 se muestran los valores de GSH en sangre de rata. Como se observa no existen diferencias significativas entre los grupos. En la figura IV.3 se detallan los valores de GSSG, tampoco detectándose en este parámetro diferencias intergrupales. Utilizando los datos de las figuras IV.2 y IV.3 calculamos el cociente $(GSSG/GSH) \times 100$ sin observar, de nuevo, ningún cambio estadísticamente significativo entre los distintos grupos y tratamientos.

Figura IV.2- Valores de GSH en sangre de ratas entrenadas durante 3 semanas



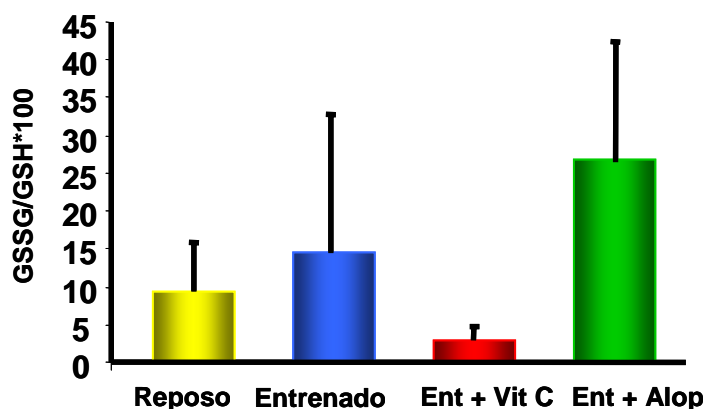
Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=8$ en grupo reposo, $n=6$ en grupo entrenado, $n=6$ en grupo entrenado + vitamina C y $n=6$ en grupo entrenado + alopurinol.

Figura IV.3- Valores de GSSG en sangre de ratas entrenadas durante 3 semanas



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=8$ en grupo reposo, $n=6$ en grupo entrenado, $n=6$ en grupo entrenado + vitamina C y $n=6$ en grupo entrenado + alopurinol.

Figura IV.4- Cociente (GSSG/GSH) x 100 en sangre de ratas entrenadas durante 3 semanas



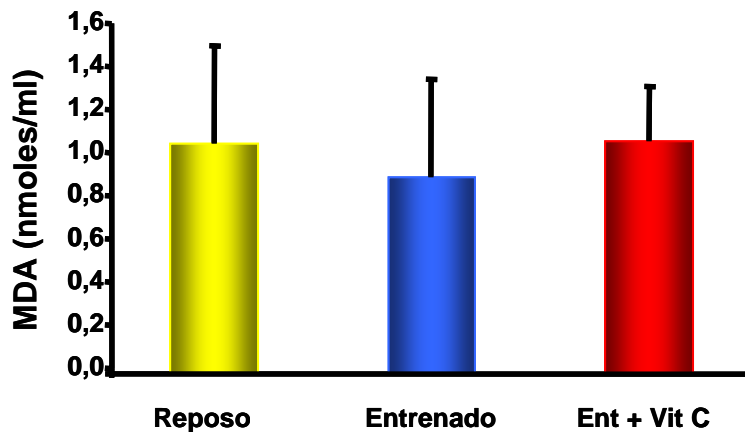
Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=8$ en grupo reposo, $n=6$ en grupo entrenado, $n=6$ en grupo entrenado + vitamina C y $n=6$ en grupo entrenado + alopurinol.

2.2. Efecto de la administración de antioxidantes sobre los niveles de MDA en plasma de ratas entrenadas durante 3 semanas.

La peroxidación lipídica se puede determinar por diferentes parámetros; TBARS, hidroperóxidos lipídicos, etano y pentano en aire expirado y el MDA. El MDA es un parámetro que presenta una elevada estabilidad en el plasma de animales.

En la figura IV.5 se muestra como no existen diferencias entre los grupos en lo que se refiere a este marcador biológico de oxidación lipídica. Estos datos, junto a los de GSH indican que tras tres semanas de entrenamiento no existen evidencias en nuestro modelo de estrés oxidativo.

Figura IV.5- MDA en plasma de ratas entrenadas durante 3 semanas



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=6$ en grupo reposo, $n=6$ en grupo entrenado, y $n=6$ en grupo entrenado + vitamina C

3.- Estudio las adaptaciones neuromusculares al entrenamiento de resistencia. Resultados en animales.

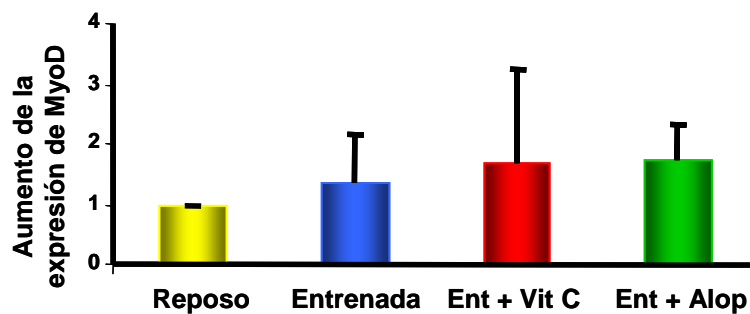
Durante el entrenamiento deportivo, especialmente el de fuerza, se producen diversas adaptaciones musculares y neuronales. Diversos estudios muestran que las adaptaciones neuronales dominan pronto en el entrenamiento, mientras que la mayoría de los cambios que se producen durante las fases posteriores están asociados con la hipertrofia muscular (Sale 1988). En este apartado de la sección de resultados nos propusimos comprobar el posible efecto que el entrenamiento en tapiz rodante podría tener en el inicio de las señales moleculares responsables del aumento de la masa muscular y el efecto de la administración de antioxidantes.

3.1. Efecto de la administración de antioxidantes sobre la expresión de MyoD en músculo gastrocnemio de ratas entrenadas durante 3 semanas.

MyoD es un factor de transcripción relacionado con la hipertrofia muscular, pertenece a la familia de los factores reguladores miogénicos (MRF). Éstos aparecen sobreexpresados durante la fase embrionaria cuando se produce la formación del músculo y durante el proceso de hipertrofia.

Como se puede observar en la figura IV.6, no existen diferencias significativas en la expresión de Myo D entre los distintos grupos experimentales utilizados así como en los tratamientos. De estos resultados se puede deducir que el periodo de entrenamiento al que sometimos a los animales o el tipo de ejercicio (concéntrico) es insuficiente o inadecuado para activar las señales tempranas que desembocan en la inducción del fenómeno de hipertrofia en el músculo esquelético.

Figura IV.6- Expresión de MyoD en ratas entrenadas durante 3 semanas



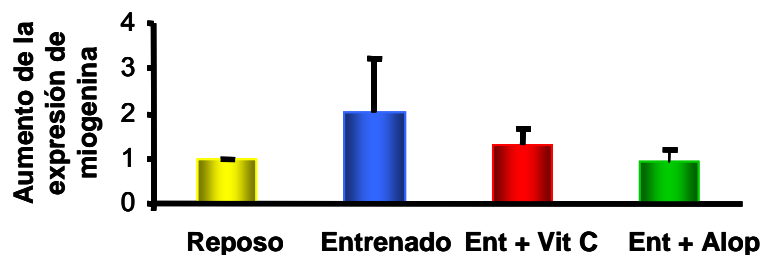
Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=8$ en grupo reposo, $n=6$ en grupo entrenado, $n=6$ en grupo entrenado + vitamina C y $n=6$ en grupo entrenado + alopurinol.

3.2. Efecto de la administración de antioxidantes sobre la expresión de la miogenina en músculo gastrocnemio de ratas entrenadas durante 3 semanas.

La Miogenina es otro de los factores de transcripción relacionados con la hipertrofia muscular, y perteneciente a la familia de los MRF.

Como se puede observar en la figura IV.7, no existe diferencia significativa en la expresión de Miogenina entre los grupos, por lo que podemos deducir que no existe hipertrofia debido al entrenamiento. El protocolo al que fueron sometidas las ratas era de un ejercicio aeróbico sin ser hipertrofiante, por lo que los resultados no son sorprendentes en este sentido.

Figura IV.7- Expresión de Miogenina en ratas entrenadas durante 3 semanas



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=8$ en grupo reposo, $n=6$ en grupo entrenado, $n=6$ en grupo entrenado + vitamina C y $n=6$ en grupo entrenado + alopurinol.

4.- Efecto de la administración de antioxidantes en la inducción de la defensa antioxidante enzimática por el entrenamiento de resistencia. Resultados en animales.

Dos de los tres sistemas enzimáticos antioxidantes más importantes los constituyen la MnSOD y la GPx. Basándonos en el paradigma de que las enzimas antioxidantes suponen la primera línea de defensa frente a los radicales libres cabría la posibilidad de pensar que el ejercicio físico puede tener efectos inductores sobre esos mecanismos. De hecho son varios los grupos de investigación que han demostrado que el ejercicio físico agotador (Hollander, Fiebig et al. 2001; Gomez-Cabrera, Borrás et al. 2005) aumenta la expresión de la MnSOD en músculo esquelético de rata. Los trabajos sobre el efecto del ejercicio físico sobre GPx son más inconsistentes y contradictorios (Laughlin, Simpson et al. 1990; Ji, Leeuwenburgh et al. 1998). En este apartado de los resultados nos planteamos determinar el posible efecto inductor que el entrenamiento (frente al ejercicio agotador) tiene sobre la defensa antioxidante enzimática y el papel que juegan los radicales libres en el mismo.

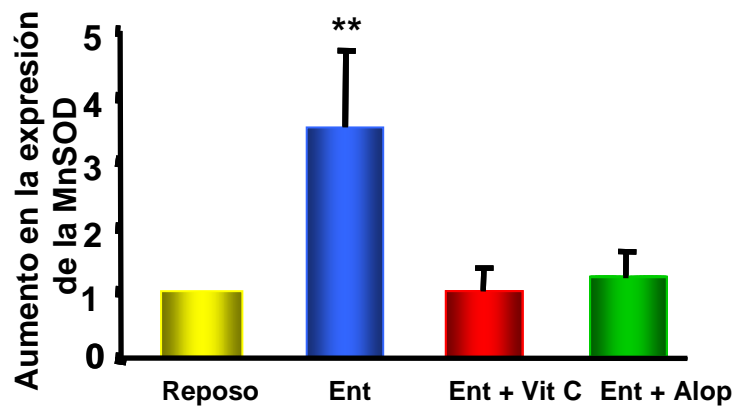
4.1. Estudio de la expresión mediante RT-PCR de la MnSOD tras 3 semanas de entrenamiento en músculo gastrocnemio de rata.

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima antioxidante que juega un importante papel en la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno. En los mamíferos coexisten dos formas de SOD: una enzima

mitocondrial, dependiente de manganeso (MnSOD) y una enzima citosólica, dependiente de cobre y zinc (CuZn SOD). El estrés oxidativo se ha demostrado que aumenta su inducción (Warner, Stuart et al. 1996). Por este motivo decidimos estudiar el efecto del entrenamiento sobre la expresión de la isoforma mitocondrial.

La figura IV.8 muestra como la cantidad de ARNm para la MnSOD en el músculo gastrocnemio aumenta tras la realización de un entrenamiento moderado. Los grupos de animales entrenados y tratados con vitamina C y alopurinol mantienen unos niveles de ARNm similares al grupo control.

Figura IV.8- RT-PCR de MnSOD en gastrocnemio de rata entrenada durante 3 semanas

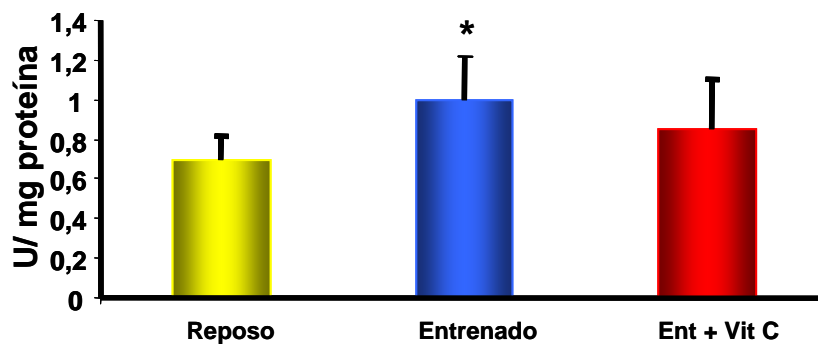


Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=8$ en grupo reposo, $n=6$ en grupo entrenado, $n=6$ en grupo entrenado + vitamina C, y $n=6$ en grupo entrenado + alopurinol. La significación estadística se expresa como (**) $p<0,0001$ frente a reposo

4.2. Estudio de la actividad de la MnSOD tras 6 semanas de entrenamiento en músculo gastrocnemio de rata.

Cuando medimos la actividad MnSOD en homogenado de músculo, observamos que esta se encontraba aumentada significativamente en el grupo entrenado control, mientras que el grupo que había entrenado tomando vitamina C no presentaba un incremento significativo frente al grupo reposo.

Figura IV.9- Actividad MnSOD en gastrocnemio de rata entrenada durante 6 semanas



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=6$ en grupo reposo, $n=6$ en grupo entrenado, $n=6$ en grupo entrenado + vitamina C. La significación estadística se expresa como (*) $p<0,05$ frente a reposo

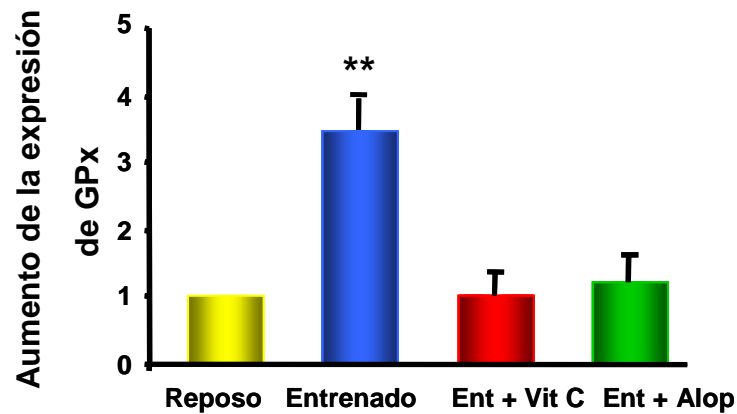
4.3. Estudio de la expresión mediante RT-PCR y de la actividad de la GPx tras 3 semanas de entrenamiento en músculo gastrocnemio de rata

La Glutación Peroxidasa se encarga de la conversión del peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos en moléculas inocuas, de escasa reactividad. Para detoxificar los agentes oxidantes utiliza el glutatión. Su localización mayoritaria es en el citosol aunque se ha demostrado que existe cierta actividad en la matriz mitocondrial.

En la figura IV.10 podemos observar una sobreexpresión de la GPx en el músculo de los animales entrenados durante 3 semanas mientras que los grupos de animales entrenados pero tratados con antioxidantes tienen valores de ARNm muy similares al grupo reposo.

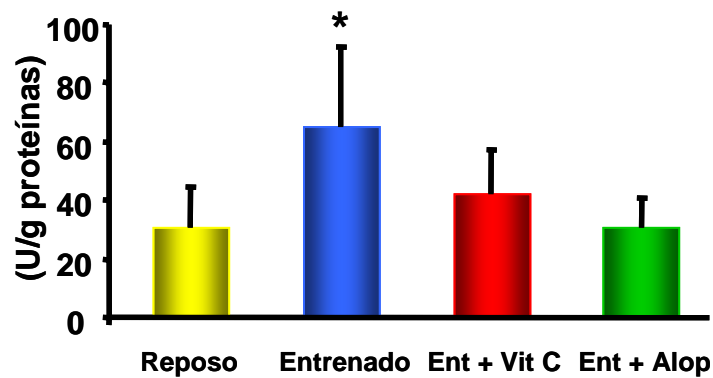
En los mismos grupos musculares determinamos la actividad de la enzima. En la figura IV.11 se muestra el aumento en la actividad de la GPx en el grupo entrenado control, mientras que los grupos tratados con antioxidantes durante el período de entrenamiento no mostraron el aumento en la actividad de la enzima. En este caso, los valores de ARNm se correlacionan con la actividad enzimática.

Figura IV.10- RT-PCR de GPX en gastrocnemio de rata entrenada durante 3 semanas



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=8$ en grupo reposo, $n=6$ en grupo entrenado, $n=6$ en grupo entrenado + vitamina C, y $n=6$ en grupo entrenado + alopurinol. La significación estadística se expresa como (**) $p<0,01$ frente a reposo

Figura IV.11- Actividad GPx en homogenado de gastrocnemio de rata entrenada durante 3 semanas

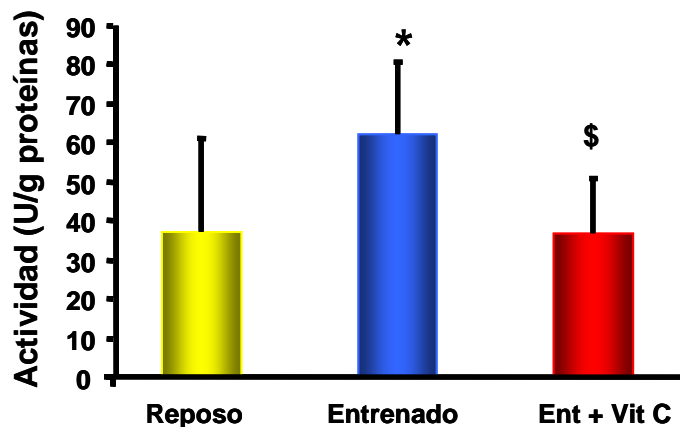


Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=8$ en grupo reposo, $n=6$ en grupo entrenado, $n=6$ en grupo entrenado + vitamina C, $n=6$ en grupo y $n=6$ en grupo entrenado + alopurinol. La significación estadística se expresa como (*) $p<0,05$ frente a reposo

4.4. Estudio de la actividad de la GPx tras 6 semanas de entrenamiento en músculo gastrocnemio de rata

Como en el estudio realizado en tres semanas, decidimos medir la actividad de la GPx en homogenado de gastrocnemio de rata entrenada durante seis semanas. Como podemos observar en la figura IV.12, la actividad GPx se encuentra aumentada en el grupo entrenado control. Sin embargo el grupo entrenado tratado con vitamina C no presenta dichos incrementos.

Figura IV.12- Actividad GPx en homogenado de gastrocnemio de rata entrenada durante 6 semanas



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=6$ en grupo reposo, $n=6$ en grupo entrenado, y $n=6$ en grupo entrenado + vitamina C. La significación estadística se expresa como (*) $p<0,05$ frente a reposo y (&) $p<0,05$ frente al grupo entrenado.

5.- Estudio del papel de los radicales libres en la biogénesis mitocondrial inducida por el entrenamiento de resistencia. Resultados en animales.

La biogénesis mitocondrial es el resultado de una compleja interacción entre el genoma nuclear y mitocondrial. Durante la actividad contráctil del músculo se produce la activación de kinasas y fosfatas que actuarán como señales para que se expresen factores de transcripción que harán que finalmente el número de mitocondrias aumente. La BM es uno de las adaptaciones más importantes al EF de resistencia.

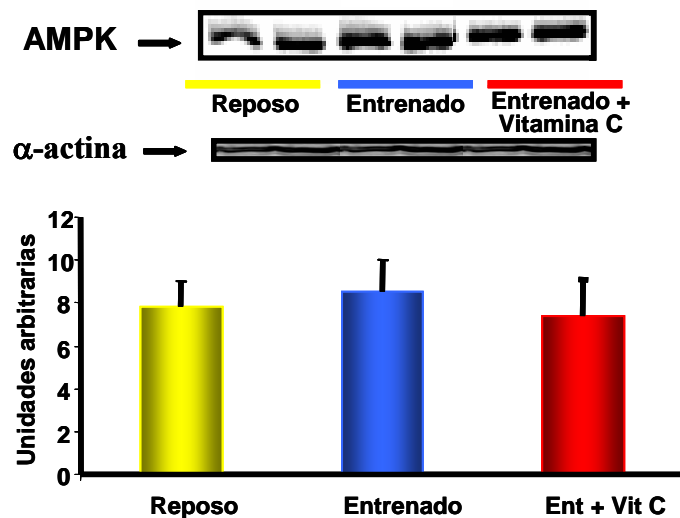
Seis semanas es aproximadamente el periodo que se requiere para conseguir un incremento en el contenido mitocondrial muscular como respuesta al entrenamiento de resistencia. Este periodo, sin embargo no refleja los eventos moleculares tempranos que finalmente desembocan en una modificación cuantificable del número de mitocondrias. De hecho las modificaciones en el contenido de ARNm de proteínas mitocondriales aparecen en las primeras semanas de entrenamiento (Hood, 2001). Con el objetivo de determinar tanto las modificaciones a corto como a largo plazo aplicamos dos protocolos de entrenamiento de resistencia de distinta duración: 3 semanas y 6 semanas de entrenamiento. En este apartado presentamos los resultados relativos a los dos protocolos de entrenamiento de forma consecutiva.

5.1. Estudio de la expresión y fosforilación de las AMPKs mediante Western-blot en músculo gastrocnemio de rata entrenada durante 6 semanas. Efecto de la administración de vitamina C.

Las AMPK son unas proteínas que se fosforilan en presencia de AMP. Durante el ejercicio físico se produce la contracción del músculo y se consume ATP. El AMP se forma por acción de la mioquinasa. La mioquinasa es la enzima que une dos moléculas de ADPI y las convierte en AMP y ATP. La fosforilación de estas proteínas se da a los pocos minutos del comienzo de la contracción y su actividad se ve disminuida de forma proporcional al incremento en el contenido mitocondrial del tejido.

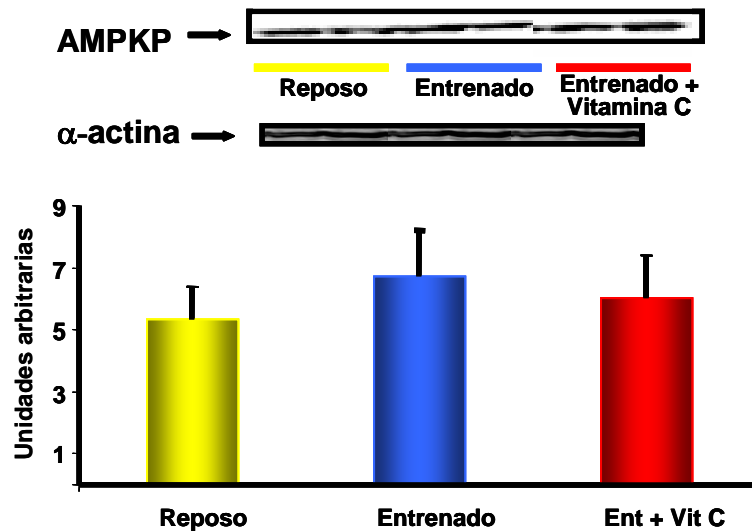
Como podemos observar en las figuras IV.13 y IV.14, no existen diferencias entre los grupos en lo que se refiere a la expresión de AMPK tanto de la forma fosforilada como de la no fosforilada.

Figura IV.13- Western-blot de AMPK en gastrocnemio de rata entrenada durante 6 semanas



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=6$ en grupo reposo, $n=6$ en grupo entrenado y $n=6$ en grupo entrenado + vitamina C

Figura IV.14- Western-blot de AMPK fosforilada en gastrocnemio de rata entrenada durante 6 semanas



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=6$ en grupo reposo, $n=6$ en grupo entrenado y $n=6$ en grupo entrenado + vitamina C

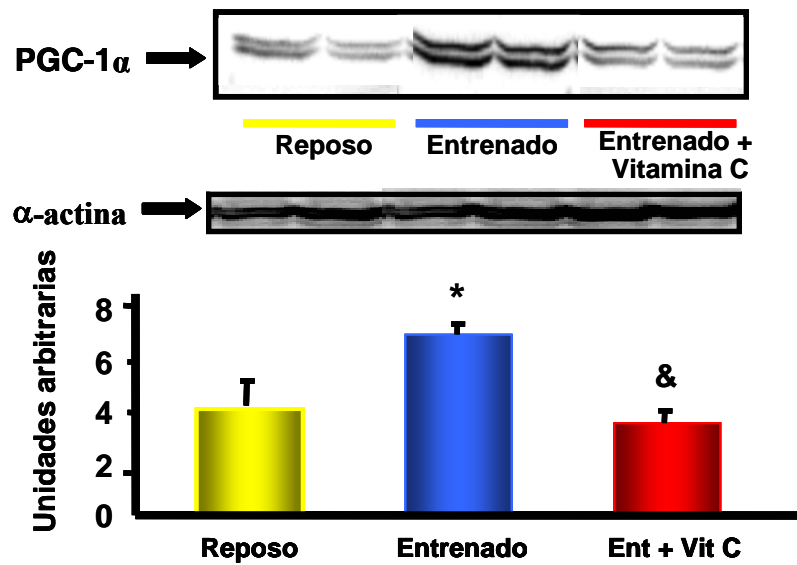
5.2. Estudio de la expresión de PGC-1 mediante Western-blot en músculo gastrocnemio de rata entrenada durante 6 semanas. Efecto de la administración de vitamina C.

PGC-1 es un coactivador de genes nucleares recientemente descubierto. Induce la expresión del ARNm de la β -ATP sintasa y factores muy importantes para la BM como son el Factor de Respiración Nuclear 1 (FRN-1) y el factor de transcripción mitocondrial A (ftmA). Es sensible a estrés oxidativo y en el músculo esquelético el aumento de expresión de PGC-1 aumenta el número de copias de ADNmt y estimula la proliferación de mitocondrias.

En la figura IV.15 se muestra un Western-Blot representativo de PGC-1 en el que se observa un aumento significativo en la expresión del factor de

transcripción en el grupo entrenado que se previene cuando éste se acompaña con la suplementación con vitamina C.

Figura IV.15- Western-blot de PGC-1 en gastrocnemio de rata entrenada durante 6 semanas



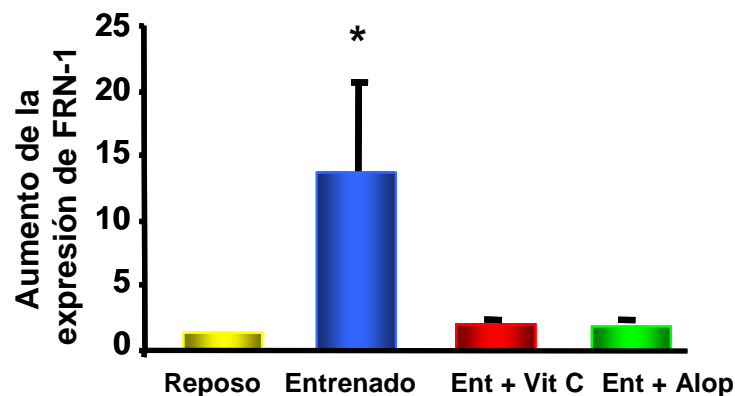
Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=6$ en grupo reposo, $n=6$ en grupo entrenado y $n=6$ en grupo entrenado + vitamina C. La significación estadística se expresa como (*) $p<0,05$ frente a reposo y (&) $p<0,05$ frente a entrenado.

5.3. Estudio de la expresión de FRN-1 mediante RT-PCR en músculo gastrocnemio de rata tras 3 semanas de entrenamiento. Efecto de la administración de antioxidantes.

Los estudios para elucidar los mecanismos relacionados con la BM llevaron a la identificación de FRN-1. Los genes nucleares que contienen sitios de reconocimiento para FRN-1 están relacionados con la expresión de proteínas que regulan la función respiratoria mitocondrial. Entre estos genes se encuentran por ejemplo: citocromo c, tres de las cinco subunidades respiratorias y la ácido γ -aminolevulinico sintasa.

En la figura IV.16 se observa como el entrenamiento induce una sobreexpresión de FRN-1 prevenida, de forma significativa, con la administración tanto de vitamina C como de alopurinol.

Figura IV.16- RT-PCR de FRN-1 en gastrocnemio de rata entrenada durante 3 semanas



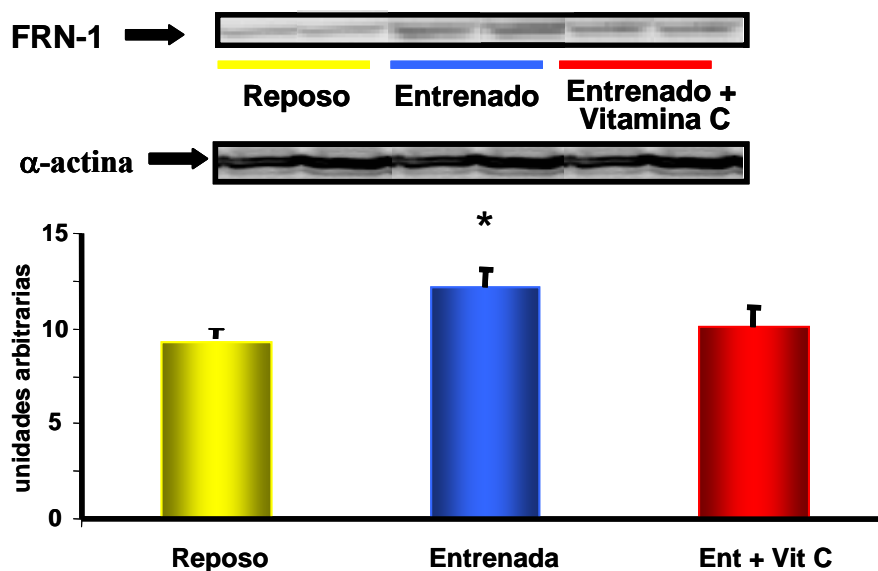
Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=8$ en grupo reposo, $n=6$ en grupo entrenado, $n=6$ en grupo entrenado + vitamina C, y $n=6$ en grupo entrenado + alopurinol. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0,05$ frente a reposo

5.4. Estudio de la expresión de FRN-1 mediante Western-blot en músculo gastrocnemio de rata tras 6 semanas de entrenamiento. Efecto de la administración de vitamina C.

FRN-1 es un factor de transcripción clave en la biogénesis mitocondrial ya que es éste el que activa junto a PGC-1 la transcripción de *ftmA*. En músculo esquelético un aumento en la expresión de FRN-1 se traducirá en un aumento en la proteína *ftmA* y por tanto un aumento en las copias de mtDNA que estimulará la proliferación de mitocondrias.

En la figura IV.17 se muestra un western-blot de FRN-1 en el que se observa un aumento en la expresión del factor de transcripción en el grupo entrenado y no se acompaña de un aumento en el grupo entrenado y tratado con vitamina C.

Figura IV.17- Western-blot de FRN-1 en gastrocnemio de rata entrenada durante 6 semanas



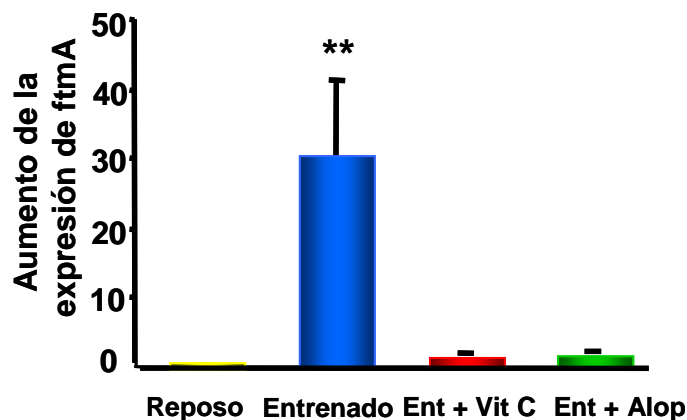
Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=6$ en grupo reposo, $n=6$ en grupo entrenado y $n=6$ en grupo entrenado + vitamina C. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0,05$ frente a reposo.

5.5. Estudio de la expresión de ftmA mediante RT-PCR en músculo gastrocnemio de rata tras 3 semanas de entrenamiento. Efecto de la administración de antioxidantes.

FtmA es una proteína de 25 kDa y es el factor de transcripción clave para la replicación, mantenimiento y transcripción del ADNmt (Larsson, Wang et al. 1998). Actúa directamente sobre el genoma mitocondrial uniéndose a él. Su acción está modulada por otros factores de transcripción como FRN-1.

Como se observa en la figura IV.18, el grupo entrenado control sobreexpresa el factor de transcripción mientras que los grupos tratados con antioxidantes muestran niveles semejantes de ARNm al grupo reposo.

Figura IV.18- RT-PCR de ftmA en gastrocnemio de rata entrenada durante 3 semanas

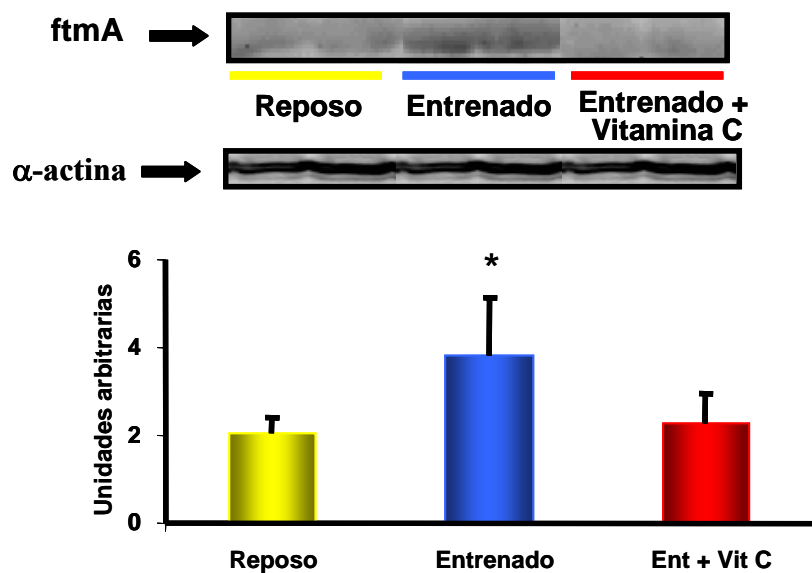


Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=8$ en grupo reposo, $n=6$ en grupo entrenado, $n=6$ en grupo entrenado + vitamina C, y $n=6$ en grupo entrenado + alopurinol. La significación estadística se expresa como (**) $p<0,001$ frente a reposo.

5.6. Estudio de la expresión de ftmA mediante Western-blot en músculo gastrocnemio de rata tras 6 semanas de entrenamiento. Efecto de la administración de vitamina C.

Como se muestra en la figura IV.19 el grupo entrenado control tiene niveles mayores del factor de transcripción mientras que el grupo entrenado tratado con vitamina C y el grupo reposo presentan valores proteicos similares.

Figura IV.19- Western-blot de ftmA en gastrocnemio de rata entrenada durante 6 semanas



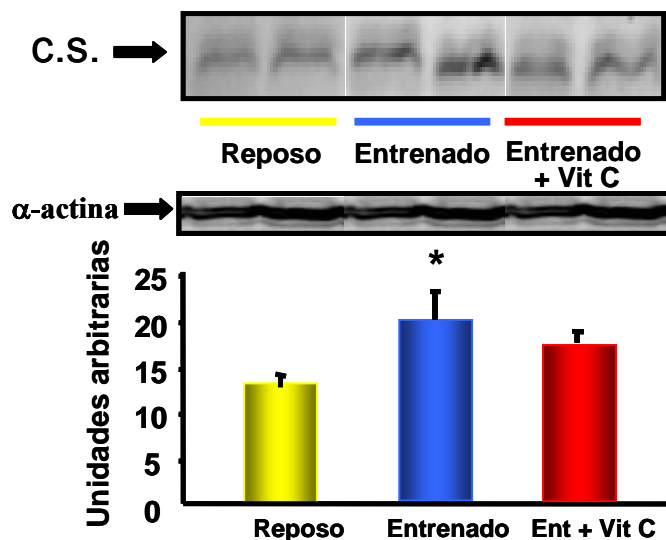
Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=6$ en grupo reposo, $n=6$ en grupo entrenado y $n=6$ en grupo entrenado + vitamina C. La significación estadística se expresa como (*) $p<0,05$ frente a reposo.

5.7. Estudio de la expresión de la Citrato Sintasa mediante Western-blot en músculo gastrocnemio de rata tras 6 semanas de entrenamiento. Efecto de la administración de vitamina C.

La enzima citrato sintasa cataliza la primera reacción del ciclo de Krebs en la que se une el oxalacetato y el AcCoA para obtener citrato y CoA. La determinación de esta enzima se utiliza como marcador clásico de contenido mitocondrial.

En la figura IV.20 podemos ver como la enzima se sobreexpresa de forma significativa en el grupo entrenado control mientras que los grupos entrenado tratado con vitamina C, y el grupo reposo presentan niveles de proteína Citrato sintasa muy similares.

Figura IV.20- Western-blot de Citrato Sintasa en gastrocnemio de rata entrenada durante 6 semanas



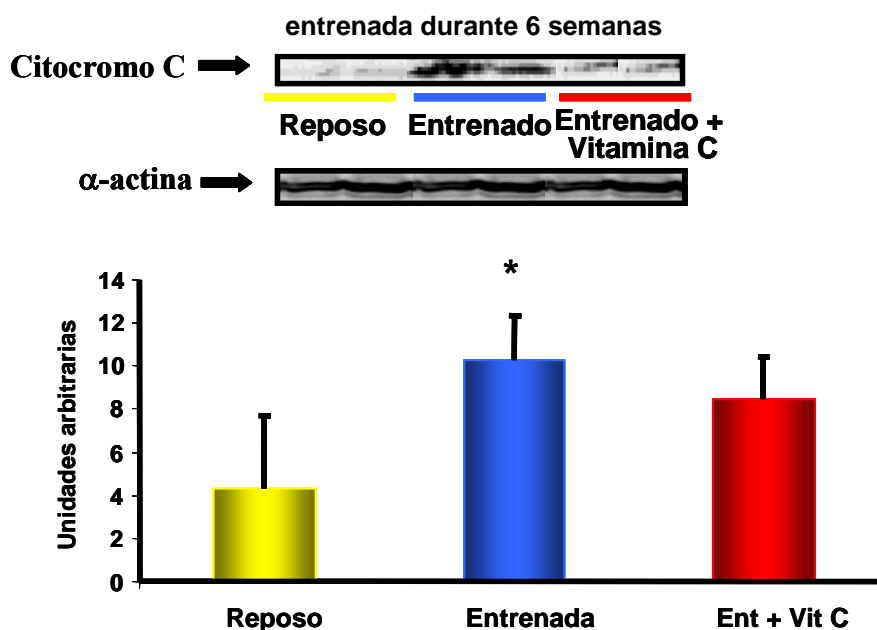
Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=6$ en grupo reposo, $n=6$ en grupo entrenado y $n=6$ en grupo entrenado + vitamina C. La significación estadística se expresa como (*) $p<0,05$ frente a reposo.

5.8. Estudio de la expresión del citocromo C mediante Western-blot en músculo gastrocnemio de rata tras 6 semanas de entrenamiento. Efecto de la administración de vitamina C.

El Citocromo C es una proteína del complejo de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y sus niveles se han relacionado al igual que en el caso de la citrato sintasa con el contenido de mitocondrial. Su variación está influenciada por modificaciones en la contracción muscular (Both 1977, Morrison, Montgomery et al. 1987). El gen de citocromo C tiene sitios de unión para el factor de transcripción FRN-1.

Como se observa en la figura IV.21, la cantidad de Citocromo C es mayor en el grupo entrenado control, mientras que el grupo entrenado tratado con vitamina C no presenta diferencias significativas frente al grupo reposo.

Figura IV.21- Western-blot de Citocromo C en gastrocnemio de rata



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=6$ en grupo reposo, $n=6$ en grupo entrenado y $n=6$ en grupo entrenado + vitamina C. La significación estadística se expresa como (*) $p<0,05$ frente a reposo.

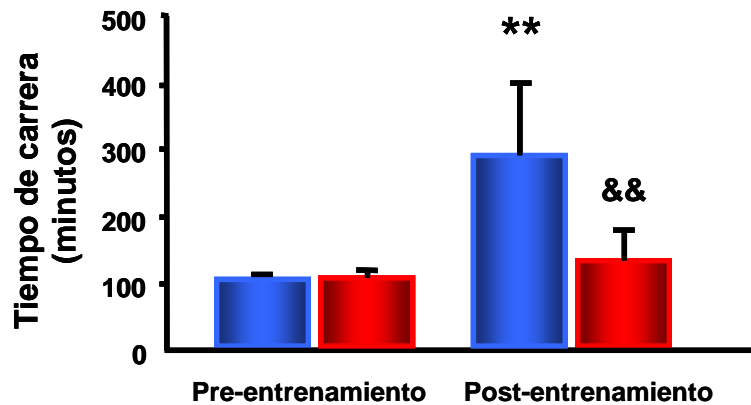
6.- Estudio del efecto de la administración de antioxidantes sobre el rendimiento físico en animales y en humanos.

6.1. Prueba de resistencia para animales entrenados durante 6 semanas. Efecto de la administración de vitamina C.

El rendimiento del entrenamiento se determinó con la aplicación de una prueba de resistencia en tapiz rodante, en ella se midió el tiempo de carrera antes y después de iniciarse el entrenamiento. La resistencia a un ejercicio aeróbico es, según diversos estudios, muy modificable con el entrenamiento y se cree que está muy relacionada con el número de mitocondrias en el músculo esquelético. De hecho, la fosforilación oxidativa se considera uno de los factores limitantes para la resistencia en carrera en tapiz rodante. El tiempo de carrera hasta el agotamiento antes y después del entrenamiento fu el parámetro estudiado.

Nuestros resultados, muestran una mejora en el tiempo de carrera de un 200% (100 minutos antes del entrenamiento y 300 minutos tras 6 semanas de ejercicio continuado) del grupo entrenado control. El grupo entrenado tratado con vitamina C, sin embargo, no mejora significativamente el tiempo de carrera (100 minutos antes de entrenar frente a 120 días tras 6 semanas de ejercicio).

Figura IV.22- Tiempo de carrera en ratas entrenadas 6 durante semanas



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=6$ en grupo entrenado, $n=6$ en grupo entrenado + vitamina C. La significación estadística se expresa como (**) $p<0,001$ frente a pre-entrenamiento y (&&) $p<0,001$ frente al grupo entrenado.

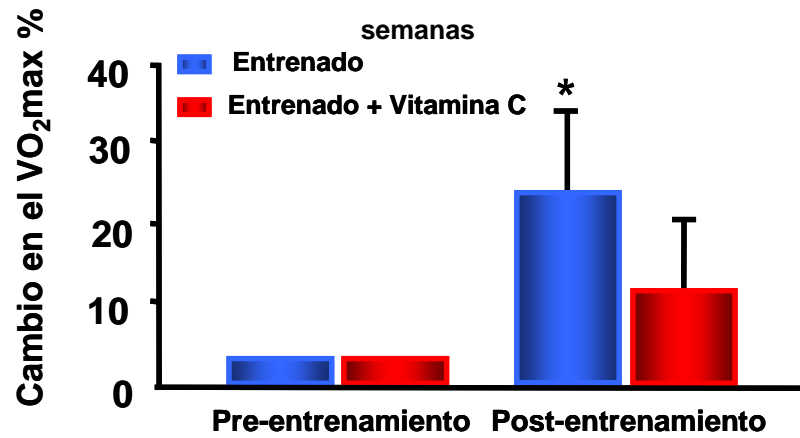
6.2. Mejora del $VO_2\text{max}$ ($\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) después de 8 semanas de entrenamiento en humanos sedentarios. Efecto de la administración de vitamina C.

El consumo máximo de oxígeno es la cantidad máxima de oxígeno que el organismo puede absorber, transportar y consumir por unidad de tiempo. Se considera la manera más eficaz de medir la capacidad aeróbica de un individuo y un claro predictor del rendimiento físico.

En la figura IV.23 se muestra el consumo máximo de oxígeno de un grupo de voluntarios sedentarios y sanos antes y después de la aplicación de un entrenamiento de 8 semanas. Nuestros datos muestran un aumento significativo $VO_2\text{max}$ en el grupo control, mientras el grupo entrenado y

tratado con vitamina C (1g/día vía oral) no se produce un incremento estadísticamente significativo del VO₂max asociado al entrenamiento.

Figura IV.23- VO₂max en humanos sometidos a un entrenamiento de 8



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=9$ en grupo entrenado, $n=5$ en grupo entrenado + vitamina C. La significación estadística se expresa como (**) $p<0,05$ frente al grupo pre-entrenamiento control.

V-DISCUSIÓN

V-DISCUSIÓN

1.- Estudio del efecto de la administración de antioxidantes en el posible daño muscular asociado al entrenamiento. Resultados en animales.

El aumento en la actividad plasmática de enzimas intramusculares tales como la GOT se considera un marcador indirecto de daño muscular (Van der Meulen, Kuipers et al. 1991; Balnave and Thompson 1993). Esta enzima se encuentra localizada en el citoplasma y las mitocondrias de células del tejido cardíaco, hepático y esquelético principalmente. Diversos grupos de investigación han demostrado que cuando se produce daño muscular la enzima es liberada a plasma (Chen and Hsieh 2001). Concretamente nuestro grupo de investigación realizó un estudio en el año 2001 en el que se medían los niveles tanto de GOT como de CK tras distintas etapas del Tour de Francia en los ciclistas del US Postal Team (Gomez-Cabrera, Pallardo et al. 2003). El equipo fue dividido en dos grupos experimentales, uno tratado con alopurinol y otro grupo placebo. Nuestros resultados mostraron que sólo tras la contrarreloj por equipos (la etapa más exigente) se evidenció daño muscular en el grupo placebo, mientras que el tratado con alopurinol no presentaba una menor elevación del marcador de daño muscular. Este hecho nos confirmó el papel de la XO en la generación de RL en el EF agotador y el efecto del alopurinol en la prevención del daño asociado a la activación de esta enzima.

Nuestros resultados, con respecto a la actividad GOT, se muestran en la figura IV.1. Como se puede observar, no existe elevación de este marcador

de daño en ningún grupo. Podemos, por tanto considerar, que durante el entrenamiento no se ha producido daño muscular, lo que garantiza la idoneidad del protocolo de entrenamiento seleccionado para el desarrollo de nuestro trabajo.

2.- Estudio del estrés oxidativo asociado al entrenamiento. Resultados en animales.

2.1.-Estudio de los niveles de GSH, GSSG y GSSG/GSH en ratas entrenadas. Efecto de la administración de antioxidantes.

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 and Anderson 1983). Existen considerables discrepancias entre los distintos artículos publicados acerca del efecto del ejercicio sobre el estatus del glutatión. Estas diferencias son sin duda debidas a la diferente metodología utilizada para determina este índice de estrés oxidativo. Como hemos comentado en la introducción de la presente tesis, la medida del estatus de glutatión es un buen índice para determinar estrés oxidativo tanto en tejidos como en fluidos biológicos (Sies and Mehlhorn 1986; Vina, Blay et al. 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. 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. Nuestro grupo de investigación (Asensi, Sastre et al. 1994) 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).

En 1988 Gohil y colaboradores (Gohil, Viguie et al. 1988) fueron los primeros en señalar que el ejercicio submáximo inducía la oxidación del GSH sanguíneo. Estos autores encontraron un 100% de aumento en los niveles de GSSG sanguíneo tras ejercitar a ciclistas al 65% de VO_{2max} (Gohil, Viguie et al. 1988). Este incremento en los niveles de GSSG sanguíneo, durante el EF, se ha demostrado en múltiples estudios posteriores (Sen, Rankinen et al. 1994; Vina, Sastre et al. 1995; Laaksonen, Atalay et al. 1996). Los resultados en humanos se asemejan a los obtenidos en sangre de rata (Lew, Pyke et al. 1985).

Nuestro grupo dio un paso más es la relación existente entre la intensidad del EF y el estrés oxidativo al establecer la correlación lineal entre el cociente GSSG/GSH y el cociente lactato/piruvato en sangre tanto en animales de experimentación como en humanos (Sastre, Asensi et al. 1992). El EF agotador influye en el metabolismo del GSH en el músculo esquelético e hígado de ratas (Sen, Atalay et al. 1994). En este sentido Lew y colaboradores, y nosotros mismo, hemos demostrado que el agotamiento coincide con una disminución de los niveles de glutatión en estos mismos tejidos (Lew, Pyke et al. 1985; Gomez-Cabrera, Borrás et al. 2005).

El entrenamiento parece ser otra variable influyente en los niveles de glutatión. En hombres moderadamente entrenados, se observó un descenso de un 50% de los niveles de GSH durante los 15 primeros

minutos de EF. Este descenso se acompañó de un aumento en los niveles de GSSG sanguíneo. Los niveles de GSH volvieron a sus valores basales tras 15 minutos de reposo (Sastre, Asensi et al. 1992).

Se sabe que el entrenamiento modula las actividades de las enzimas relacionadas con el ciclo redox del glutatión (Ortenblad, Madsen et al. 1997). El trabajo de resistencia, por otra parte, aumenta la defensa antioxidante lo que mejora el rendimiento del mismo (Venditti and Di Meo 1997). Kihlström (Kihlstrom 1990) evidenció que un entrenamiento de resistencia en natación en ratas mejoraba la protección del corazón frente al estrés oxidativo. Esta mejora en la capacidad para detoxificar las ERO se debía a un incremento en los niveles de glutatión y a una mejora en la eficiencia del sistema dador de NADPH.

En un modelo distinto de entrenamiento, la carrera en tapiz rodante, Sen y colaboradores, observaron un aumento en los niveles de GSH total en el hígado de los animales entrenados, pero no en músculo esquelético. (Sen, Marin et al. 1992).

En la figura IV.2, IV.3 y IV.4 de los resultados podemos observar los niveles de GSH, GSSG y GSSG/GSH en sangre de ratas tras haber sido entrenadas durante un período de tres semanas a una intensidad del 75% de su VO_2 max. La ausencia de diferencias puede deberse al tiempo de obtención de la muestra, ya que la última sesión de EF se realizó 24 horas antes del sacrificio. El objetivo de la presente tesis se ha centrado principalmente en el estudio de las adaptaciones al ejercicio físico. Estas modificaciones que sabemos se producen a largo plazo, tardan tiempo en desaparecer y se manifiestan incluso en reposo, requieren para su estudio de la estabilización de las modificaciones que se producen como respuesta al ejercicio. Este es el motivo por el que dejamos transcurrir un período mínimo de 24 horas desde el desarrollo de la última sesión de ejercicio

físico para la obtención de las muestras biológicas (Davies, Packer et al. 1981).

Hemos comentado anteriormente la conveniencia de proceder con rapidez en los experimentos de determinación de las modificaciones en el glutatión sanguíneo. 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 GSH en el EF. En una de las tablas de este trabajo se muestra como una diferencia de un minuto en la recogida de una misma muestra supone una diferencia en los valores de oxidación de GSH de un 30% en sangre (Vina, Sastre et al. 1995). Por otra parte, como hemos comentado anteriormente, en únicamente un par de estudios, parece evidenciarse un aumento en los niveles de GSH tras un periodo de entrenamiento, uno en corazón y otro en hígado. Ambos protocolos de ejercicio diferentes al nuestro y tras un período de entrenamiento más largo. Por tanto, consideramos que nuestros resultados no contradicen a los previamente publicados por nuestro grupo de investigación teniendo en cuenta las características del entrenamiento realizado y las condiciones de obtención de la muestra.

2.2.-Estudio del MDA en ratas entrenadas. Efecto de la administración de antioxidantes.

Otro marcador de estrés oxidativo muy utilizado en los estudios de ejercicio es la determinación de lipoperóxidos en plasma. Determinamos, por tanto, MDA, un producto formado a partir de la hidrólisis ácida, a 100° C, de los lipoperóxidos siguiendo el método de Wong (Wong, Knight et al. 1987). 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.

El daño a los lípidos causado por las ERO puede tener distintos efectos tales como la inactivación de las enzimas situadas en las membranas lipídicas y aumento de la permeabilidad de los iones a través de las membranas (empeorando así la función celular y aumentando la agregación plaquetaria en los vasos sanguíneos) (Esterbauer, Striegl et al. 1989). Otros problemas pueden incluir la progresión de enfermedades degenerativas (enfermedades cardiovasculares y cáncer) y una menor efectividad del sistema inmunitario (Frei, Stocker et al. 1988; Esterbauer, Striegl et al. 1989; Halliwell and Chirico 1993; Seyama 1993).

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, Grootveld et al. 1991), hidroperóxidos lipídicos (Alessio and Goldfarb 1988), sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Kanter, Nolte et al. 1993), y etano y pentano en aire expirado (Pincemail, Camus et al. 1990). Sin embargo, todas estas medidas muestran inconvenientes y resultados contradictorios.

El tiempo de medida del biomarcador es extremadamente importante. Basándonos en los trabajos de Maughan y colaboradores (Maughan, Donnelly et al. 1989; McBride, Kraemer et al. 1998) el tiempo ideal para medir los niveles de MDA es de seis horas después de realizarse el ejercicio. En un estudio posterior (Sacheck, Milbury et al. 2003) utilizando un protocolo similar al de Maughan se observó que el pico máximo de MDA aparecía inmediatamente después del ejercicio. Como ya se ha comentado, existe mucha controversia en lo que se refiere al tiempo ideal

de medida de niveles de MDA. Por eso los resultados existentes hasta la fecha presentan estas diferencias.

En la presente tesis, decidimos medir los niveles de MDA por considerarlo uno de los marcadores de estrés oxidativo que más estables tras la realización del ejercicio agotador. Los niveles de MDA fueron determinados en el grupo de ratas que entrenó durante seis semanas y que fueron sacrificadas cuarenta y ocho después de una última sesión de ejercicio hasta el agotamiento. Los resultados se muestran en la figura IV.5. En ella se observa que no existen diferencias significativas entre los diferentes grupos. Esto se puede explicar debido al tiempo transcurrido desde que se produce la última sesión de ejercicio y el tiempo en el que se obtuvo la muestra. Consideramos, en este sentido, que las cuarenta y ocho horas transcurridas pueden haber sido excesivas para que los niveles de MDA se mantuviesen elevados. Teniendo en cuenta que el entrenamiento induce una clara mejora en la defensa antioxidante celular (Higuchi, Cartier et al. 1985)(Hollander, Fiebig et al. 1999) la ausencia de diferencias en nuestros resultados podría también explicarse por esta adaptación que comentaremos ampliamente en apartados posteriores de la discusión (Ver apartado 4).

3.- Estudio las adaptaciones neuromusculares al entrenamiento de resistencia. Resultados en animales

El músculo esquelético es un tejido que posee una gran capacidad para adaptarse a situaciones de elevada demanda funcional, pese a tratarse de un órgano con un elevado grado de organización y especialización de sus

componentes. Así, el músculo puede sufrir cambios en su fenotipo por transformación de tipos de fibras (Pette and Staron 1997) o incrementar su tamaño hipertrofiándose (Timson 1990).

La hipertrofia muscular está considerada como el aumento en el área transversal de las fibras existentes. Existen evidencias que sugieren que el aumento en el número de fibras musculares (hiperplasia) es otro componente del agrandamiento muscular, sin embargo, aunque puede ocurrir bajo ciertas condiciones, el efecto sobre el área total transversal y volumen muscular no parece ser muy notable (Abernethy, Jurimae et al. 1994). Esta última posibilidad continúa siendo materia de debate, entre otros motivos por los resultados contradictorios que se obtienen y que posiblemente obedecen a factores como el tipo de ejercicio aplicado, la especie animal estudiada, el tipo de músculo analizado y los distintos métodos empleados para valorar la hiperplasia.

En diferentes modelos experimentales, como son la carrera excéntrica en un tapiz rodante (Darr and Schultz 1987; McCormick and Thomas 1992; Jacobs, Wokke et al. 1995), levantamiento de peso (Tamaki, Akatsuka et al. 1997) y tenotomía de músculos sinergistas (Snow 1990) tiene lugar un aumento en el número de células satélites que podría estar ligada a la formación de nuevas fibras ya que, además, se observan en el intersticio pequeñas células que contienen miofilamentos y miofibrillas inmaduras. Sin embargo, en estos modelos ocurren también lesiones a nivel de las fibras musculares, por lo que la activación de las células satélites podría obedecer a una respuesta adaptativa (Taylor and Wilkinson 1986).

Puesto que el ejercicio puede inducir cambios degenerativos en el músculo que son seguidos de regeneración (Salminen and Vihko 1983), o pequeñas microlesiones (Darr and Schultz 1987), podría ocurrir también la liberación de algún factor difusible generado en el músculo que estimule a la población de células satélites. En este sentido Tamaki (Tamaki,

Akatsuka et al. 1997), sostiene que la lesión de las fibras musculares en ratas sometidas a un ejercicio de levantamiento de peso pone en marcha no sólo la respuesta de activación de las células satélites en las fibras dañadas, sino que estimula las células satélites en fibras aparentemente no dañadas.

La capacidad de neo-formación de fibras en músculos con diferentes fenotipos podría además verse ligada a los factores reguladores de la miogénesis (Myf5, MyoD, miogenina y MRF4). Curiosamente los músculos ,en los que predominan un tipo de fibra roja, acumulan mayores niveles de MyoD mientras que los músculos en los que predomina un tipo de fibra blanca, lo hacen de miogenina (Hughes, Taylor et al. 1993).

Si bien los factores reguladores de la miogénesis no se expresan en células satélites de músculo esquelético adulto normal, sí juegan un papel fundamental en su activación y diferenciación, por lo que se sobreexpresan en procesos como denervación y regeneración confiriendo al músculo un fenotipo embrionario (Buonanno, Cheng et al. 1998). Sin embargo, no se conoce si estarían implicados directa o indirectamente en la diferente capacidad hipertrofica de los músculos con predominio de fibra roja o blanca.

Como ya se ha comentado, los ejercicios de fuerza o excéntricos son los que inducen una mayor hipertrofia en el músculo. Nuestro protocolo de entrenamiento es un protocolo consiste en una modificación del publicado por el grupo de Davies a principios de los años 80 (Davies, Packer et al. 1981). Este protocolo de entrenamiento se diseñó con el objetivo de acentuar las adaptaciones musculares resultado del entrenamiento aeróbico en tapiz rodante. Su diseño, por tanto, no responde a un interés por aumentar la masa muscular. Nuestros resultados confirman la idoneidad del modelo seleccionado ya que como se muestra en las figuras IV.6 y IV7 de los resultados, cuando medimos la expresión por RT-PCR de

estos factores hipertróficos no observamos cambios significativos en ninguno de los grupos. Como hemos comentado el carácter concéntrico de las contracciones musculares unido a la intensidad (75% VO_2max) y al tipo de ejercicio (carrera) explican los resultados obtenidos. Por otra parte es importante tener en cuenta que el mantenimiento en la masa muscular no implica una ausencia en la ganancia de fuerza por parte de nuestros animales. Durante muchos años se supuso que las ganancias de fuerza eran el resultado directo de incrementos en el tamaño muscular. Existe, evidentemente una relación causa-efecto entre el tamaño y la fuerza muscular. No obstante, esta última implica mucho más que el mero tamaño. Un importante componente nervioso explica al menos alguna de las ganancias de fuerza que tienen lugar mediante el entrenamiento contra resistencia. Enoka (Enoka 1988) expresó un convincente razonamiento en el que las ganancias de fuerza pueden lograrse sin cambios estructurales en los músculos pero no sin adaptaciones nerviosas. Por lo tanto, es una propiedad del sistema motor. La movilización de la unidad motora es muy importante para las ganancias de fuerza. Por tanto, se puede considerar que las primeras ganancias de fuerza están influenciadas por factores nerviosos (durante las primeras 8 semanas de entrenamiento de fuerza), pero las ganancias posteriores, son el resultado casi exclusivo de la hipertrofia (Sale 1988).

4.- Efecto de la administración de antioxidantes en la inducción de la defensa antioxidante enzimática por el entrenamiento de resistencia. Resultados en animales.

Los radicales han tenido durante años un papel como protagonistas del daño muscular asociado al ejercicio físico agotador (Davies, Quintanilha et al. 1982). Sin embargo la idea de que el ejercicio genera señales importantes en la fisiología de la célula muscular se ha sospechado desde hace algún tiempo. Distintos grupos de investigación han mostrado el posible papel de los ERO como mediadores en la señalización en la célula muscular. En 2001 Reid (Reid 2001), demostró que los bajos niveles de ERO presentes en condiciones basales son esenciales para una normal producción de fuerza. Dos trabajos pioneros (Salminen and Vihko 1983; Leeuwenburgh, Fiebig et al. 1994) demostraron que el entrenamiento causaba un aumento, en músculo esquelético, en la actividad de enzimas antioxidantes. En esta misma línea y en el año 85, el grupo de Holloszy (Higuchi, Cartier et al. 1985), demostró que tras la realización de un programa de entrenamiento aumentaba la actividad de la MnSOD. En ese mismo año (Kanter, Hamlin et al. 1985) se realizó un estudio en el que en las ratas que se habían sometido a un entrenamiento de natación durante 21 semanas se inducían las actividades SOD, GPx y catalasa en plasma. Posteriormente otro grupo de investigación (Laughlin, Simpson et al. 1990) sometió a las ratas a un protocolo de entrenamiento de doce semanas en tapiz rodante y estudiaron los cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes GPx, SOD y catalasa. La GPx se encontraba aumentada en

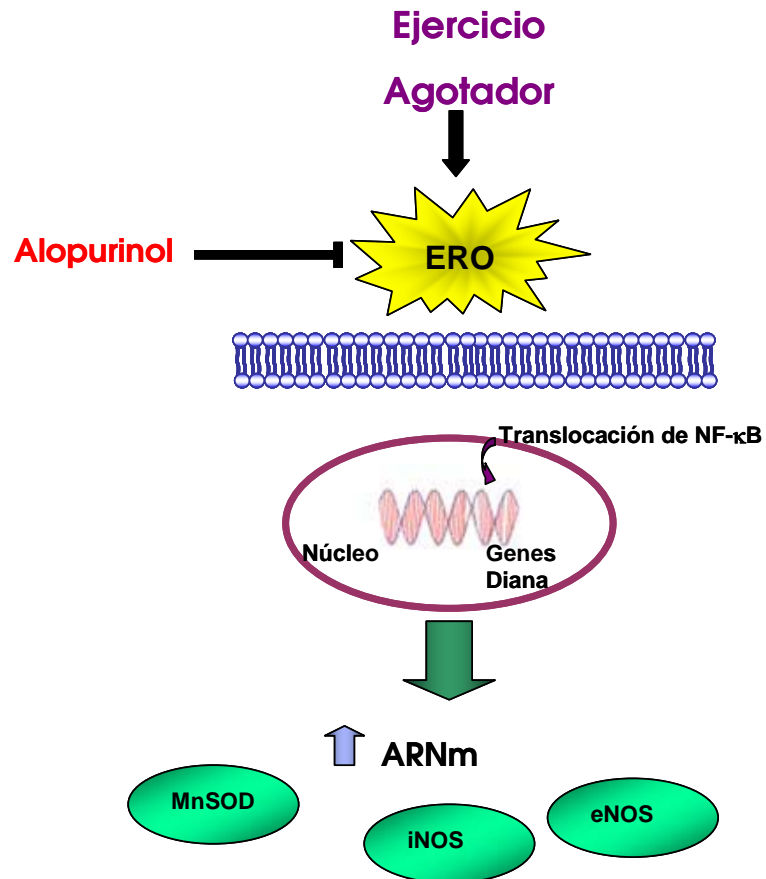
el grupo entrenado, mientras que no observaron cambios ni en la actividad SOD ni en la catalasa. En el año 1997 en un estudio de Ohno (Oh-ishi, Kizaki et al. 1997) se entrenó durante nueve semanas a un grupo de animales y a otro se les realizó un protocolo de ejercicio agudo. Se midieron los niveles de ARNm de las enzimas antioxidantes y todas se encontraron aumentadas en el grupo que había entrenado, mientras que el grupo que había estado sometido a un ejercicio agudo no se encontraron cambios.

El grupo de Ji (Hollander, Fiebig et al. 1999) observó que las adaptaciones en la defensa antioxidante seguían unas pautas fibro-específicas. Estos autores, después de realizar un entrenamiento de diez semanas en sus animales, encontraron la máxima inducción de defensa antioxidante en las fibras tipo IIa, sin modificaciones en los niveles de ARNm. Un año más tarde, sin embargo, (Nakao, Ookawara et al. 2000) se realizó un trabajo en el que se determinaron los niveles de proteínas y de ARNm de las diferentes isoformas de la SOD en varios tejidos. En músculo gastrocnemio se encontraron ambos aumentados.

El efecto de la administración de antioxidantes sobre la expresión de estas enzimas durante el EF ha sido objeto de estudio en investigaciones recientes. Khassaf y colaboradores (Khassaf, McArdle et al. 2003) estudiaron el efecto de la administración de vitamina C en la capacidad antioxidante y en la expresión de proteínas de respuesta a estrés tanto en linfocitos como en biopsias musculares en humanos. En este estudio concluyeron que en los sujetos suplementados, la respuesta adaptativa estaba atenuada tanto en el caso de las enzimas antioxidantes como en el de la expresión de las HSP. Nuestro grupo demostró, en el año 2004, como la administración de alopurinol en animales sometidos a un EF agotador frena la cascada de señalización que desemboca en el aumento

en la expresión de la MnSOD, lo que se traduce en una disminución de la respuesta adaptativa. Ver figura V.1. (Ji, Gomez-Cabrera et al. 2004)

Figura V.1- Expresión de MnSOD, iNOS, y eNOS en músculo gastrocnemio de rata, inducida por el ejercicio agotador. Efecto de la administración de alopurinol.



La siguiente tabla, detalla algunos estudios en los que se relacionan las actividades SOD en diferentes modelos de ejercicio en humanos.

Tabla V.1- Entrenamiento 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 de carrera	Cu,Zn	→
Lukaski y cols., 1990	Nadadores	Eritrocitos	Natación	Cu,Zn	↑↑
Mena y cols., 1991	Ciclistas amateurs Ciclistas profesionales	Eritrocitos	Ciclismo	Cu,Zn	↑ ↑

Nuestros datos referidos a los grupos entrenados durante tres semanas se muestran en las figuras IV.8, IV.10 y IV.11. Como se observa en los resultados, la expresión de la MnSOD se encuentra significativamente aumentada en el grupo entrenado control, mientras que los grupos entrenados tratados con antioxidantes presentaron niveles de ARNm similares al grupo reposo. Cuando medimos la expresión por RT-PCR de GPx obtuvimos un resultado similar, únicamente el grupo entrenado no tratado con antioxidantes presentaba aumentos significativos con respecto al resto de grupos. Del mismo modo, la medida de la actividad de la GPx en músculo esquelético correlacionó con los niveles de ARNm obtenidos para esta enzima en este modelo de entrenamiento. Los resultados obtenidos en el modelo de entrenamiento de seis semanas se muestran en

las figuras IV.9 y IV.12. Como se observa, sólo el grupo entrenado no tratado con antioxidantes presenta un aumento significativo en la actividad GPx y MnSOD con respecto al grupo reposo y al grupo entrenado tratado con vitamina C.

Nuestros resultados se correlacionan con los obtenidos por otros grupos de investigación en los que se señala a los RL como señales para la adaptación del músculo y a la expresión de enzimas antioxidantes (Higuchi, Cartier et al. 1985; Hollander, Fiebig et al. 1999). De hecho, la idea de que el ejercicio genera señales importantes para la fisiología de la célula muscular, como hemos comentado con anterioridad, se ha sospechado desde hace años. Basándonos en el paradigma de que las enzimas antioxidantes suponen la primera línea de defensa frente a los RL, su inducción por el ejercicio se puede considerar un buen sistema de protección contra el estrés oxidativo en un tejido, como es el muscular, con una baja capacidad antioxidante intrínseca.

En la presente tesis demostramos un aumento en dos de los tres sistemas antioxidantes más importantes, después de un periodo de entrenamiento, y como este efecto se ve prevenido por la administración de antioxidantes. Por tanto, se evidencia, que la presencia continua de pequeños estímulos como pequeñas concentraciones de ERO son de hecho capaces de inducir la expresión de enzimas antioxidantes como mecanismos defensivos. Las bases de este fenómeno pueden relacionarse con el concepto de hormesis (Calabrese 2004) que se caracteriza como una particular relación dosis-respuesta en la que una pequeña dosis de una sustancia es estimuladora y una gran dosis es inhibitoria. En este contexto, los RL podrían considerarse beneficiosos cuando actúan como señal para mejorar la defensa antioxidante, y perjudiciales cuando se exponen a las células a altos niveles de ERO.

El término inglés “Physical Fitness” se refiere a un estadio fisiológico de bienestar que permite afrontar con garantías las demandas de la vida diaria (health physical fitness) o que proporciona las bases del rendimiento físico en un deporte en concreto (performance-related physical fitness) o ambos (Warburton, Nicol et al. 2006) Los efectos beneficiosos del ejercicio físico desde el punto de vista de la salud y la prevención de distintos tipos de enfermedades son muy conocidos (Warburton, Nicol et al. 2006). El EF moderado alarga la esperanza de vida y disminuye el deterioro físico en humanos (Myers, Prakash et al. 2002), pero este hecho debe suceder debido a otros hábitos de vida de la población que realiza EF con asiduidad. Esta hipótesis deja de tener validez, tras la observación de que el EF moderado aumenta la vida media y la vida máxima en una población controlada de roedores (Navarro, Gomez et al. 2004). Orr y Sohal (Orr and Sohal 1994) en un artículo publicado en “Science” demostraron que moscas transgénicas *Drosophila* que sobreexpresaban la catalasa y la superóxido dismutasa presentan longevidades significativamente superiores a las de los grupos controles. De este hecho podemos deducir que la mejora del sistema antioxidante celular alarga la esperanza de vida. En la presente tesis mostramos como el entrenamiento provoca un efecto similar que es prevenido con la administración de antioxidantes orales.

5.- Estudio del papel de los radicales libres en la biogénesis mitocondrial inducida por el entrenamiento de resistencia. Resultados en animales.

Una de las adaptaciones más importantes al EF aeróbico es la biogénesis mitocondrial. En los años setenta, el grupo de Holloszy empezó a estudiar el efecto que tenía el entrenamiento en los cambios celulares en el músculo esquelético y la mejora en la capacidad oxidativa del mismo (Terjung, Baldwin et al. 1972; Winder, Baldwin et al. 1975). Este mismo grupo, observó cómo la mejora en el rendimiento del entrenamiento iba acompañada de un aumento en el número de mitocondrias (Holloszy 1973; Booth 1977). Desde entonces, diversos grupos de investigación han tratado de elucidar los mecanismos por los que se produce este fenómeno y las cascadas de señalización que lo llevan a cabo.

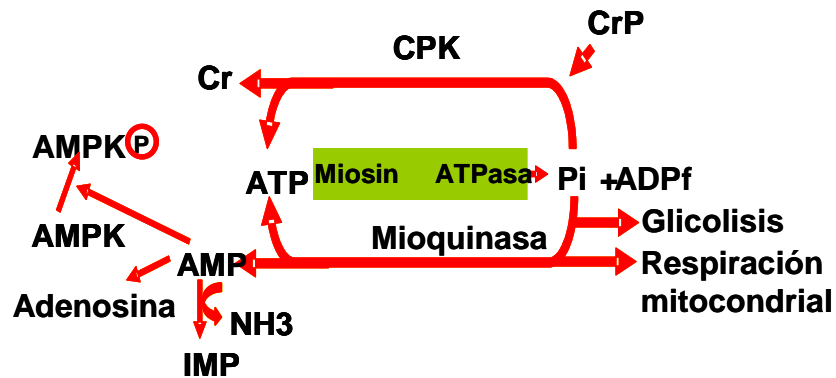
La posible relación entre el estrés oxidativo y la biogénesis mitocondrial inducida por el ejercicio físico se sugirió por primera vez a principios de los años 80 (Davies, Packer et al. 1981) sin embargo se ha avanzado muy poco en esta línea en los últimos 30 años.

5.1.-Activación de AMPK durante el entrenamiento. Efecto de la administración de vitamina C.

Las AMP kinasas (kinasas activadas por AMP) recibieron su nombre al descubrirse una proteína que se activaba en presencia de AMP (Sim and Hardie 1988). En un estudio realizado a finales de los años ochenta (Davies, Carling et al. 1989) se demostró la existencia de esta proteína en músculo, pero no se supo el papel que jugaba en la señalización celular hasta que el grupo de Zinder realizó su estudio en ratas (Winder and Hardie 1996). En este trabajo se descubrió que se activaba durante la contracción muscular, lo que ha sido demostrado posteriormente en estudios realizados en humanos (Fujii, Hayashi et al. 2000).

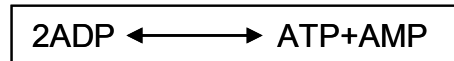
El AMP se produce en varias condiciones fisiológicas, pero la fuente más importante en términos cuantitativos parece ser la reacción de la Adenilato Quinasa (ver figura IV.2) o también llamada mioquinasa debido a su abundancia en el músculo esquelético.

Figura IV.2- Metabolismo de los nucleótidos de Adenina durante el ejercicio agudo. Reacción de la Mioquinasa



En células musculares en reposo el ratio ATP/ADP está mantenido en un nivel alto y el equilibrio de la reacción de la adenilato quinasa está desplazada hacia izquierda (ver figura IV.3), por lo que los niveles de AMP son muy bajos.

Figura IV.3- Reacción de la Adenilato Quinasa



Por el contrario, si se someten las células a un estrés que supone la depleción de los niveles de ATP, la reacción se verá desplazada hacia la derecha, formándose así grandes cantidades de AMP. Estas son las condiciones metabólicas en las que se produce la activación de las AMPK. Existen diversos tratamientos que pueden activar las AMPK, en todos ellos se produce un estrés que interfiere con la producción de ATP como son: venenos metabólicos, pérdidas de glucosa, hipoxia, isquemia (Habinowski, Hirshman et al. 2001), o cualquier situación estresante como por ejemplo el ejercicio en el músculo esquelético (Winder and Hardie 1996). Estas condiciones demuestran que las AMPK actúan como un “sensor intracelular de energía” (Hardie and Hawley 2001). Este concepto se refuerza con la demostración de la inhibición alostérica de las AMPK por concentraciones fisiológicamente relevantes de fosfocreatina (Ponticos, Lu et al. 1998).

La activación de las AMPK en músculo de rata ocurre en respuesta al ejercicio (Winder and Hardie 1996) y a estimulación eléctrica (Hutber, Hardie et al. 1997; Vavvas, Apazidis et al. 1997), y es dependiente de la intensidad del mismo (Rasmussen, Hancock et al. 1998). La actividad

permanece alta durante treinta minutos después tras el reposo (Ponticos, Lu et al. 1998).

La activación de las AMPK por el ejercicio está regulada por el entrenamiento previo. En el año 2002 se demostró que la activación del complejo $\alpha 2$ en cuádriceps se vio altamente reducida en ratas que habían sido sometidas a un entrenamiento previo de siete semanas de duración comparado con ratas control (Durante, Mustard et al. 2002). Un hecho similar ocurrió en un estudio en el que se compararon sujetos sanos y entrenados ($VO_{2max} = 66 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$) con sujetos sanos sedentarios ($VO_{2max} = 46 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$). En él se midió la fosforilación de las AMPK $\alpha 2$ en el vasto externo y se observó una menor activación en el grupo entrenado con respecto al grupo de sedentarios aunque el ejercicio se realizó a la misma intensidad relativa (80% VO_{2max}) (Nielsen, Mustard et al. 2003). ¿A qué se debe la menor activación del complejo $\alpha 2$ en los grupos entrenados? Una posible explicación implica los altos niveles de glucógeno intramuscular que presentan tanto los animales (Durante, Mustard et al. 2002) como los sujetos entrenados (Nielsen, Mustard et al. 2003). La elevación del ratio celular AMP:ATP activa la glucogenólisis y la glucólisis vía regulación alostérica de la fosforilasa y la fosfofructoquinasa sin requerimiento de las AMPK. La relación entre estos mecanismos va a garantizar que si los depósitos de glucógeno están llenos, la glucogenólisis y la glucólisis anaerobia serán utilizadas preferentemente para la síntesis de ATP. Sólo cuando las reservas de glucógeno son bajas, las AMPK serán activadas y la oxidación aeróbica de los hidratos de carbono y/o de los ácidos grasos será utilizada en su lugar. Los mecanismos moleculares por los que los altos niveles de glucógeno reprimen la activación de las AMPK no están del todo claros, aunque se sugiere que está relacionado el dominio de unión del glucógeno en la subunidad β (Hudson, Pan et al. 2003; Polekhina, Gupta et al. 2003). En la enfermedad de McArdle (en la

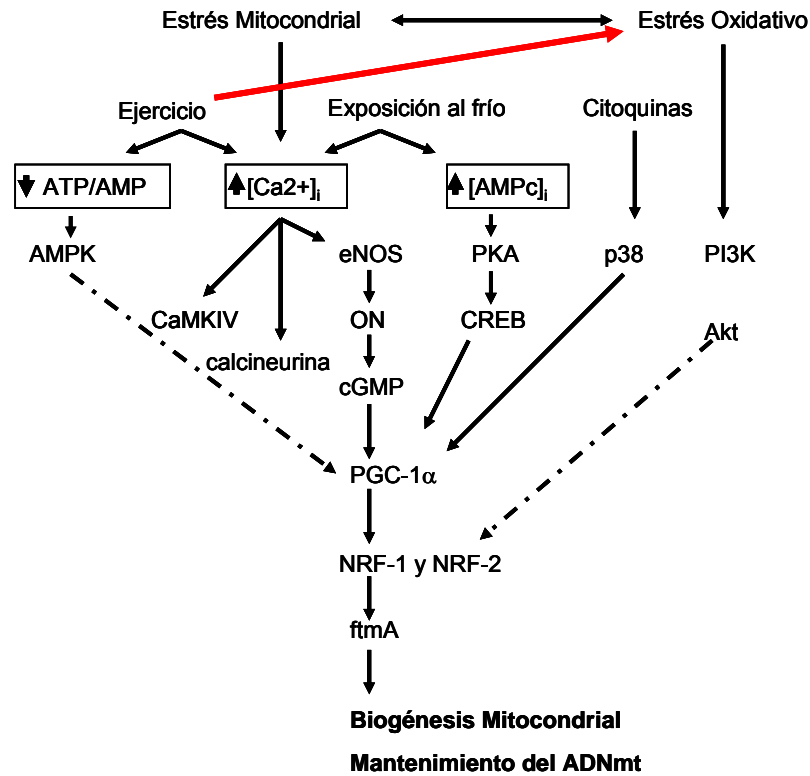
que no se puede movilizar los depósitos de glucógeno del músculo debido a la falta de una fosforilasa muscular y como consecuencia se padece una debilidad en el músculo), las AMPK se encuentran hiperactivadas cuando se realizan bajos niveles de ejercicio, a pesar del contenido de glucógeno (Nielsen, Wojtaszewski et al. 2002). Por lo que parece ser la capacidad para movilizar el glucógeno más que el acúmulo del mismo lo que reprime la activación de las AMPK.

En la presente tesis nos planteamos el estudio de las AMPK por su papel en el proceso de BM. El blanco clásico de estas kinasas es la enzima acetil-CoA carboxilasa- β (ACC-2). Tras la activación de las AMPKs la ACC-2 se fosforila e inactiva lo que acelera la oxidación de ácidos grasos. Esta enzima se expresa en tejidos como el músculo esquelético o cardíaco, muy activos en la oxidación de ácido grasos.

En la presente tesis determinamos la expresión y activación de las AMPK mediante la fosforilación de la subunidad $\alpha 2$. Los resultados se muestran en las figuras IV.13 y IV.14. Éstas no muestran ninguna diferencia significativa entre los diferentes grupos. Creemos que este hecho se produce debido a que los animales fueron sacrificados cuarenta y ocho horas después de realizar la prueba de esfuerzo. En estudios anteriores, y como ya se ha mencionado, la activación de estas quinasas se mantiene por un periodo aproximado de media hora tras la realización del ejercicio por lo que nuestros resultados coinciden con los previamente publicados. Por otra parte el entrenamiento al que sometimos a los animales podría haber influido en el resultado ya que en diversos estudios, mencionados también previamente, se ha demostrado que el entrenamiento disminuye la activación de las AMPKs.

En la siguiente figura mostramos la vía de señalización de la biogénesis mitocondrial en células de mamífero y la posible implicación que tiene el estrés oxidativo en la misma.

Figura V.4– Vía de señalización relacionada con la biogénesis mitocondrial en células de mamíferos

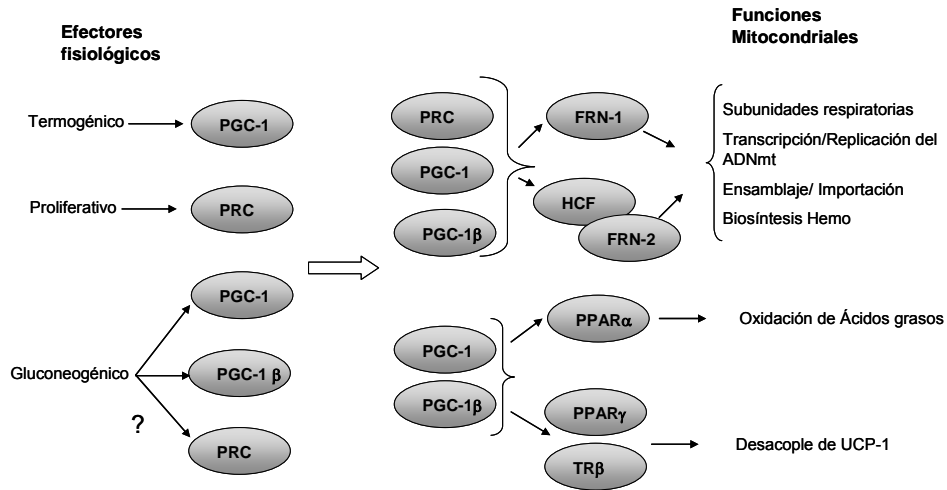


Los niveles intracelulares de Ca^{2+} , AMPc, ON, y el ratio ATP/AMP están modulados por ejercicio, la exposición al frío, el tratamiento con citoquinas y por el estrés mitocondrial. Estas señales moleculares activan proteínas y/o enzimas, que a su vez activan diversas vías metabólicas que afectan a la expresión y/o actividad de PGC-1 α . El aumento en la expresión y/o actividad estimula la biogénesis mitocondrial por activación de factores de transcripción relevantes como son NRF-1, NRF-2 y *ftmA*. El estrés oxidativo se ha demostrado que induce cambios en la masa mitocondrial y en el número de copias de ADNmt. Sin embargo, sigue sin esclarecerse la relación entre las diferentes vías metabólicas con la expresión de PGC-1 α y la biogénesis mitocondrial. (Extraído de (Lee and Wei 2005))

5.2.-Expresión de PGC-1 α durante el entrenamiento. Efecto de la administración de antioxidantes.

Existen dos tipos de proteínas reguladoras de la expresión de genes nucleares. Las primeras, los factores de transcripción, se unen directamente al ADN en las regiones promotoras de los genes e inducen su expresión. La segunda clase de proteínas son los coactivadores transcripcionales. Estas proteínas no se unen directamente al genoma, pero ejercen su acción en la expresión de genes mediante sus interacciones con los factores de transcripción y otros coactivadores. Existen evidencias que indican que la biogénesis mitocondrial se rige por la conjugación de estos dos tipos de factores nucleares (Scarpulla 2002). (Ver figura V.5)

Figura V.5 Control nuclear de las funciones mitocondriales y la biogénesis mitocondrial inducida por activadores y coactivadores transcripcionales.

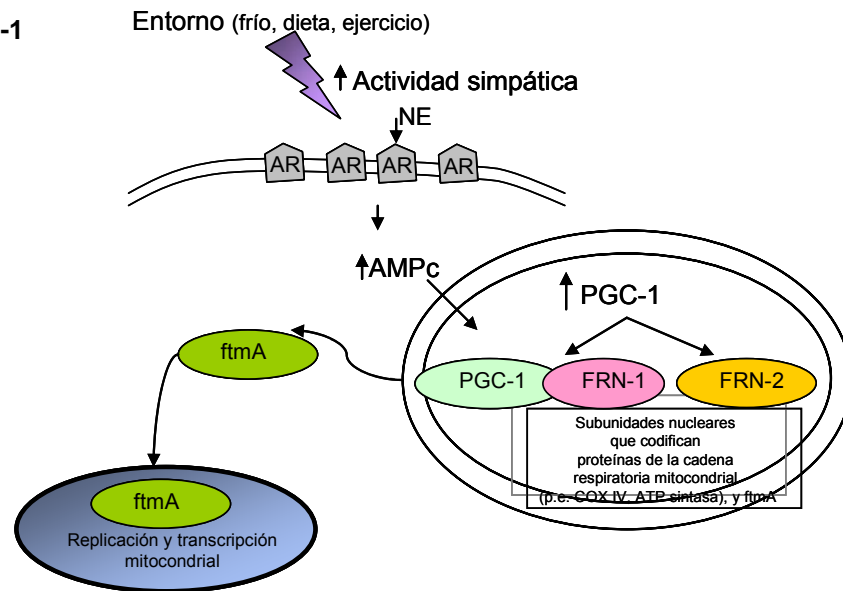


Los miembros de la familia PGC-1 (PGC-1, PGC-1 β , o PRC) pueden ser inducidas por señales termogénicas, proliferativas o gluconeogénicas. Estos coactivadores pueden interactuar con los factores de transcripción que se unen al ADN y que finalmente harán que se expresen genes nucleares necesarios para la función y biogénesis mitocondrial. Las interacciones activador-coactivador pueden ser directas o mediadas por otras proteínas como en el caso de HCF y FRN-2 (GABP). (Extraído de (Scarpulla 2002))

PGC-1 es un coactivador transcripcional, que fue clonado basándose en su habilidad para interactuar con el receptor nuclear del tejido adiposo PPAR γ (Puigserver, Wu et al. 1998). Los niveles de ARNm de PGC-1 se inducen en músculo y en tejido adiposo marrón de ratón tras una exposición al frío (4°C), probablemente debido a la activación del sistema nervioso simpático y respondiendo a receptores β adrenérgicos (Puigserver, Wu et al. 1998) (Ver figura V.6). Cuando se co-expresa PGC-1 conjuntamente con el receptor de la hormona tiroidea o con PPAR γ , PGC-1 aumenta claramente

su actividad transcripcional. Cuando se expresa ectópicamente en cultivos celulares de células adiposas blancas, PGC-1 causa un aumento en el ARNm de UCP-1, y de varios genes relacionados con la fosforilación oxidativa, entre los que se incluyen las subunidades II y IV de la citocromo C oxidasa (COX) y de la ATPsintasa.

Figura V.6-Vía de señalización de la Biogénesis Mitocondrial a través de PGC-1



El frío, la dieta y el ejercicio estimulan el sistema simpático y se libera Norepinefrina (NE). La NE se une a los receptores β -adrenérgicos (AR), lo que hace que aumenten los niveles de AMPc que inducen la expresión de PGC-1. PGC-1 activa la expresión de subunidades de la cadena respiratoria mitocondrial y ftmA vía inducción de los FRNs y la coactivación de FRN-1. FtmA finalmente se trasloca a la mitocondria y directamente activa la transcripción y replicación del ADNmt (Extraído de(Wu, Puigserver et al. 1999))

Se ha demostrado que el entrenamiento aumenta los niveles de ARNm de PGC-1 (Goto, Terada et al. 2000; Terada, Goto et al. 2002; Tunstall,

Mehan et al. 2002), pero la relación de los niveles de ARNm y de expresión de proteína es compleja debido a que PGC-1 sufre un control post-transcripcional que afecta a su estabilidad (Puigserver, Rhee et al. 2001). En un estudio realizado por el grupo de Hood (Irrcher, Adhietty et al. 2003), en el que se estimulaban eléctricamente células musculares, se observó un aumento de los niveles proteicos de PGC-1 α , FRN-1 y ftmA siguiendo un patrón tiempo-dependiente. Los cambios observados representaron un entorno muy favorable para que se produjera la BM en las células musculares, ya que PGC-1 α coactiva FRN-1, que a su vez activa los promotores de varios genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales, entre los que se incluye un factor de transcripción crítico como es ftmA. En esta misma línea y en otros estudios se ha relacionado la expresión PGC-1 α y la actividad de citocromo C Oxidasa (Irrcher, Adhietty et al. 2003). Se ha demostrado que el aumento de los niveles de PGC-1 α y la abundancia de mitocondrias es dependiente de las actividades CAMKIV (Kinasa calmodulina calcio dependiente) (Wu, Delerive et al. 2002) y de las AMP Kinasas (Zong, Ren et al. 2002) que están reguladas por cambios en los niveles intracelulares de calcio y el ratio ATP/AMP respectivamente. Se sabe que el ejercicio modifica ambos. Recientemente una parte considerable de la bibliografía sobre PGC-1 se ha centrado en la posible implicación de los RL en la activación del coactivador.

Como hemos comentado en la introducción de la presente tesis existen varias vías de señalización celular que están mediadas por estrés oxidativo. Tanto AP-1 como NF- κ B son factores de transcripción sensibles al estado redox (Lee, Yin et al. 2000). Se ha demostrado que la estimulación eléctrica de cardiomiocitos induce la expresión de la subunidad Va de la citocromo oxidasa y del citocromo C mediante los efectos de AP-1 vía c-Jun N-terminal Kinasa (JNK) y FRN-1 (Xia, Buja et

al. 1997). Del mismo modo, se ha demostrado que PGC-1 puede ser activado por la fosforilación de p38 MAPK (Puigserver, Rhee et al. 2001). La regulación de la expresión de genes vía p38 MAPK es importante para la inducción de la mitocondriogénesis vía extrínseca como por ejemplo por las citoquinas. Sin embargo, la relación entre la vía p38 MAPK y el estrés oxidativo para inducir BM sigue sin estar demasiado clara. En esta misma línea, la activación vía la fosfatidilinositol 3'-kinasa (PI3K) se ha relacionado con la señalización por RL que lleva a una BM en hígado después de haberse inducido estrés oxidativo gracias a la administración del LPS en ratas (Suliman, Welty-Wolf et al. 2004). Recientemente, el grupo de Nisoli observó que elevados niveles de ON estimulaban BM por sobreexpresión de PGC-1 α vía guanilato ciclasa cíclico dependiente (cGMP) en diferentes líneas celulares (Nisoli, Clementi et al. 2003). Además, si se interrumpe la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) *in vivo* se reduce el volumen mitocondrial (Nisoli, Clementi et al. 2003). Estos resultados sugieren que la vía de señalización que conduce a la BM, representa un mecanismo general regulado por estrés oxidativo en células de mamíferos. En la figura IV.15 de los resultados se muestran los niveles de PGC-1 α en músculo gastrocnemio después de someter a los animales a un entrenamiento de seis semanas. Como se observa, el grupo entrenado control tiene niveles elevados de la proteína, mientras que los grupos reposo y entrenado tratado con vitamina C presentan niveles muy similares. Este resultado, nos indica que PGC-1 α se sobreexpresa durante el entrenamiento, y que es sensible al estrés oxidativo, ya que la administración de vitamina C, inhibe el efecto que sobre su expresión tiene el ejercicio. Además hay que destacar que el grupo entrenado y tratado con vitamina C presenta diferencias significativas comparándolo con el grupo entrenado control, por lo que podemos deducir que PGC-1 α está muy modulado por los RL producidos en la contracción muscular.

5.3.-Expresión de FRN-1 durante el entrenamiento. Efecto de la administración de antioxidantes.

El Factor de respiración nuclear 1 (FRN-1) es un factor de transcripción clave en la biogénesis mitocondrial. Después de iniciarse la actividad contráctil se induce la expresión del ARNm de FRN-1 en cardiomiocitos (Gugneja and Scarpulla 1997). También se ha demostrado (Murakami, Shimomura et al. 1998) que la expresión de FRN-1 aumenta durante el entrenamiento. Los aumentos en los niveles tanto de ARN como de proteínas de FRN-1 van acompañados por una inducción de genes diana para distintas proteínas entre los que se encuentran citocromo C y 5-ALAS. Este hecho se traduce en un aumento general de la densidad mitocondrial. Cuando se produce la depleción de ATP, utilizando distintas sustancias químicas se induce un aumento de los niveles de ARNm de FRN-1 en tan sólo seis horas (Li, Holloszy et al. 1999). Este efecto es análogo al del ejercicio físico intenso. La importancia de la expresión para FRN-1 sobre el control de la función mitocondrial se demostró en un experimento realizado por el grupo de Scarpulla (Huo and Scarpulla 2001). Este grupo trabajó con un modelo de ratón con disrupción de los genes diana de FRN-1. Se eliminaron los exones que codificaban la unión al ADN administrando la droga β -galactosidasa-neomicina. Los animales "knockout" heterocigotos presentaron un fenotipo especial que consistía en un menor tamaño, mayor mortalidad y un defecto en la oxidación de succinato en riñón. Por su parte, animales homocigotos murieron en fase embrionaria. Este estudio demuestra la importancia de FRN-1 en el desarrollo embrionario. En cuanto a la relación entre la producción de RL y la activación de FRN-1, en un estudio reciente en el que se indujo estrés oxidativo utilizando LPS se observó un aumento en la expresión de FRN-1 (Suliman, Welty-Wolf et

al. 2004). El estrés oxidativo produjo daño en el ADNmt, en respuesta al cual se produjo un aumento en la expresión de diversos factores de transcripción relacionados con la BM como son FRN-1, ftmA, y de PCG-1. En un estudio previo *in vitro* en el que se utilizaron células con bajos niveles de ADNmt y en las que existía un estrés oxidativo medido mediante la activación de NF- κ B, se demostró la sobreexpresión de FRN-1 y ftmA (Miranda, Foncea et al. 1999). En estos estudios se comprobó la relación existente entre el estrés oxidativo y la transcripción y regulación de FRN-1 probablemente debido a que las ERO forman parte de las señales reguladoras del proceso de BM. En una reciente revisión de Lee y Wei (Lee and Wei 2005) se señala al estrés oxidativo como factor clave en la BM (Ver figura V.4).

La actuación de FRN-1 en la BM se produce conjuntamente a la de PGC-1. Los dos factores unidos viajan al núcleo y activan la transcripción de genes muy relevantes desde el punto de vista de la BM. En la tabla I.6 de la introducción se encuentran detallados los sitios de reconocimiento que tiene FRN-1 en los genes nucleares. En ella se muestra la relevancia que tiene para la BM, ya que los genes para los que muestra secuencias de unión, son componentes vitales para la respiración y función celular.

En la figura IV.16 se muestra como el entrenamiento induce la expresión de ARNm en músculo gastrocnemio para FRN-1. El incremento es quince veces mayor si lo comparamos con los grupos entrenados tratados con vitamina C y alopurinol. Estos grupos presentan niveles de ARNm similares al grupo reposo. En la figura IV.17 de los resultados, observamos un Western-blot representativo del factor de transcripción. La densitometría muestra un aumento en la expresión de FRN-1 en el grupo entrenado control durante seis semanas mientras que el grupo que ha entrenado suplementado con vitamina C presenta niveles similares al grupo reposo.

Este hecho muestra el papel de los RL en la señalización celular y en la regulación de la respuesta adaptativa al EF.

5.4.-Expresión de ftmA durante el entrenamiento. Efecto de la administración de antioxidantes.

El factor de transcripción ftmA es una proteína de 25 kD que se une al ADNmt y es esencial para el mantenimiento, replicación y transcripción del mismo (Larsson, Wang et al. 1998). La disrupción de ftmA causa citopatía, letalidad embrionaria y diabetes debido a la depleción del ADNmt y la pérdida de la fosforilación oxidativa (Larsson, Wang et al. 1998; Silva, Kohler et al. 2000). Su expresión está bajo el control de los factores de transcripción FRN-1, FRN-2 y Sp1, siendo FRN-1 el que mayor actividad transcripcional presenta (Virbasius and Scarpulla 1994). FtmA es un factor de transcripción codificado nuclearmente, estimula la transcripción de los dos promotores del ADNmt y es el principal activador de la expresión de genes mitocondriales en vertebrados (Virbasius and Scarpulla 1994). Parece ser que ftmA se une a los elementos promotores de la cadena ligera y pesada del ADNmt y es el principal activador de la transcripción del ARN de la polimerasa mitocondrial (Clayton 1992). La modulación de la transcripción es dependiente de la cantidad de ftmA que se encuentre en la mitocondria.

Durante la actividad contráctil del músculo se induce la BM *in vivo* en un periodo aproximado de siete días. La secuencia de acontecimientos se inicia con un aumento de los niveles de ARNm para ftmA, seguido por una mayor tasa de importación de ftmA dentro de la mitocondria y de su unión al material genético mitocondrial. Este fenómeno va seguido de un aumento en niveles de ARNm de COXIII y de la actividad enzimática de la

COX (Gordon, Rungi et al. 2001). FtmA también se ha visto que aumenta los niveles de citocromo C (Freysenet, Connor et al. 1999). Estos datos sugieren que la expresión de ftmA está bien relacionada con alteraciones en la activación transcripcional mitocondrial y de la capacidad oxidativa del músculo. En un reciente estudio (Piantadosi and Suliman 2006) se quiso comprobar el papel de las ERO y su relación con la expresión de ftmA mediada por la activación de FRN-1. Para ello los autores utilizaron células de hepatoma de rata que sobreexpresaban FRN-1. La mayor producción de ERO provocó un aumento en el número de mitocondrias y de los niveles proteicos de ftmA si se comparaba con situaciones basales de producción de ERO. La unión del promotor de ftmA y FRN-1, por tanto está aumentada en condiciones pro-oxidantes.

Como se muestra en la figura IV.18 de los resultados, el entrenamiento durante tres semanas supuso una sobreexpresión de aproximadamente 30 veces en los niveles de ftmA con respecto al grupo reposo, entrenado tratado con vitamina C y entrenado tratado con alopurinol. En la figura IV.19 de los resultados, observamos como los niveles de proteína de ftmA se encuentran aumentados en el grupo entrenado control, mientras que los grupos que entrenaron tomando antioxidantes no sobreexpresan este factor de transcripción. Como hemos comentado con anterioridad, estudios muy recientes *in vitro* han demostrado como el estrés oxidativo modula la BM. Nuestros resultados corroboran los presentados por estos grupos en un modelo *in vivo*.

5.5.-Estudio del contenido mitocondrial por la expresión de citocromo C y citrato sintasa durante el entrenamiento. Efecto de la administración de antioxidantes.

En el año 1967, Holloszy (Holloszy 1967) demostró que los factores mitocondriales jugaban un papel importante en las adaptaciones bioquímicas al entrenamiento de resistencia. El aumento en la capacidad oxidativa del músculo que se produce tras un entrenamiento se debe a un incremento en el número de mitocondrias, en su tamaño y a una alteración de su composición (Holloszy 1967).

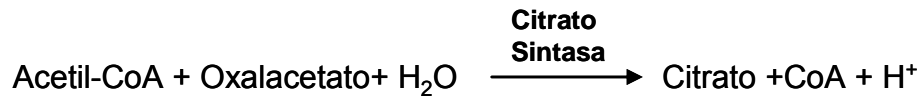
Desde hace mucho tiempo se señala al citocromo C como marcador de contenido mitocondrial, de hecho, existen varios estudios que establecen una relación entre ejercicio y niveles de citocromo C (Holloszy 1967; Booth 1977; Morrison, Montgomery et al. 1987). En 1981 Davies (Davies, Packer et al. 1981) realizó una investigación que corroboró los resultados anteriores, la inducción del citocromo C y otros elementos de la cadena respiratoria mitocondrial con el entrenamiento de resistencia. En ese mismo año y en otro estudio, Hickson (Hickson 1981) señaló al citocromo C como marcador de contenido mitocondrial y apuntó a la mitocondria y a su capacidad oxidativa como orgánulo limitante para el rendimiento en el entrenamiento.

Como ya se ha comentado en la introducción de esta tesis, el gen del citocromo c presenta una secuencia de unión para FRN-1 (Evans and Scarpulla 1989). Existen varios estudios en los que se demuestra que tras la inducción de FRN-1 se produce un aumento en la transcripción y posterior cantidad proteica de citocromo C (Xia, Buja et al. 1997; Xia, Buja et al. 1998), de hecho en estudios en los que la secuencia de unión para

FRN-1 en el gen de citocromo C se encuentra mutado, existe una menor expresión de citocromo C.

Por otra parte, la citrato sintasa también ha sido utilizada como marcadora de contenido mitocondrial (Holloszy 1967; Hood 2001). Esta enzima cataliza la siguiente reacción:

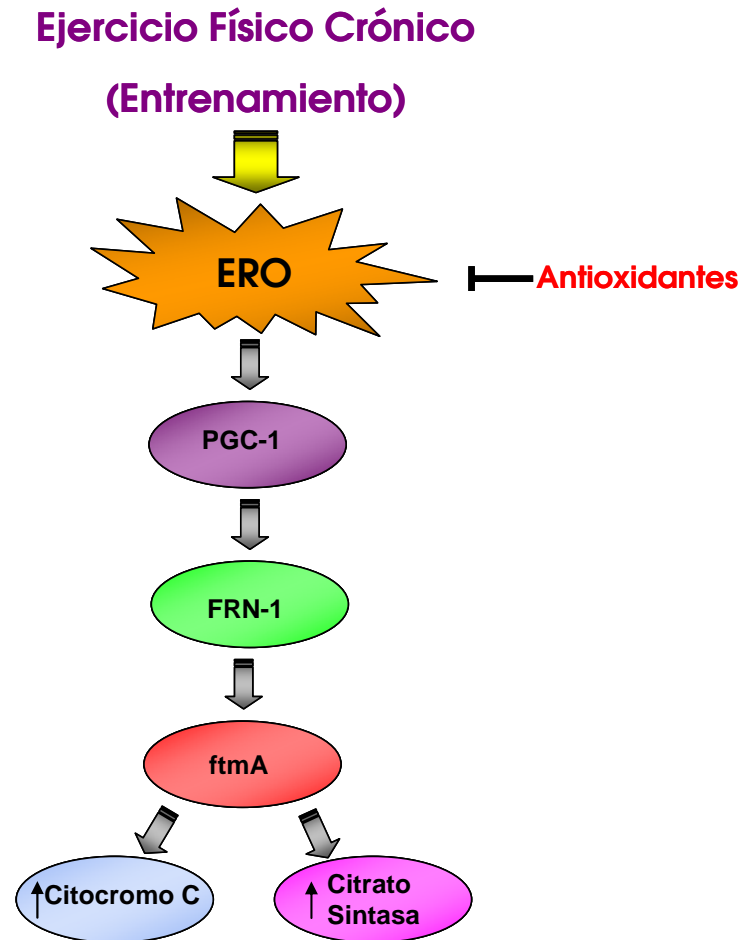
Figura V.7- Reacción de la citrato sintasa



Como se puede observar en la figura IV.20 y IV.21 de los resultados, tanto la expresión de la citrato sintasa, como de citocromo C se encuentran aumentados en el grupo entrenado durante seis semanas, mientras que el grupo entrenado tratado con vitamina C no presenta un aumento significativo en su expresión. Estos resultados concuerdan con todos los presentados en la presente tesis.

La vía mitocondriogénica que hemos estudiado en la presente tesis es la siguiente: PGC-1→FRN-1→ftmA→citrato sintasa/citocromo C. Estos factores se inducen durante el entrenamiento, pero estas adaptaciones se ven bloqueadas debido a la administración de antioxidantes.

Figura V.8- Esquema del proceso de BM. Efecto de la administración de antioxidantes.



6.- Estudio del efecto de la administración de antioxidantes sobre el rendimiento físico en animales y en humanos.

El efecto de la administración de antioxidantes sobre la alteración en el contenido mitocondrial inducido por un período de entrenamiento nos hizo plantearnos la siguiente pregunta: ¿Puede el tratamiento con antioxidantes condicionar negativamente el rendimiento de los deportistas?

6.1.-Efecto del entrenamiento y de la administración de antioxidantes en la resistencia y el rendimiento del entrenamiento. Estudios en animales.

El ejercicio físico agotador está asociado con la producción de RL (Davies, Packer et al. 1981; Jenkins 1988). El daño que se produce debido a ellos es gradual y acumulativo dependiendo de la duración del trabajo (Davies, Packer et al. 1981). La práctica habitual de EF, sin embargo, no está asociado a un incremento del deterioro funcional sino que por el contrario, aporta múltiples beneficios. La adaptación al EF parece minimizar la disrupción de la homeostasis que causa el EF agotador permitiendo al organismo realizar trabajo físico de mayor duración y a la misma intensidad antes de producirse la fatiga (Booth and Thomason 1991). En la década de los 70, se consideraba que el determinante para el rendimiento de un entrenamiento era el acúmulo de glucógeno en músculo (Costill, Sparks et al. 1971). Más tarde, se estableció la relación entre la resistencia y el contenido mitocondrial, y se propuso al metabolismo mitocondrial como un

factor determinante para la resistencia (Davies, Packer et al. 1981). También se ha descubierto que el entrenamiento previene la aparición de los signos que producen los RL en el EF (Alessio and Goldfarb 1988). Como ya se ha comentado anteriormente en la discusión, el entrenamiento aumenta las defensas antioxidantes debido al aumento en la expresión de dos enzimas críticas, la SOD y la GPx (Kanter, Hamlin et al. 1985; Laughlin, Simpson et al. 1990; Hollander, Bejma et al. 2000). Este hecho parece ser crucial a la hora de afrontar un ejercicio muy intenso o uno de larga duración ya que el músculo está provisto de una defensa antioxidante más eficaz. El contenido mitocondrial se ha señalado como el factor limitante a la hora de realizar un ejercicio de resistencia (Davies, Packer et al. 1981). Un mayor número de mitocondrias no sólo aumenta la capacidad oxidativa muscular, sino que tiene otros efectos beneficiosos sobre el rendimiento. Durante el entrenamiento se produce un aumento de la sensibilidad de la respiración mitocondrial al ADP libre (ADPI), lo que supone que una menor concentración de ADPI se acompaña de un mismo nivel de consumo de oxígeno por gramo de músculo (Dudley, Abraham et al. 1982; Constable, Favier et al. 1987) (ver figura 1.12 de la introducción). Este efecto se traduce en una reducción del consumo de creatin fosfato, una atenuación de la glucólisis y de la producción de ácido láctico, una reducción en la formación de AMP y de NH_3 , una mejora en la fracción de energía obtenida de forma aeróbica y una disminución en la activación de las AMPKs. Esto, en definitiva, supone que la cadena de transporte electrónico mitocondrial opere a una fracción menor de su máximo potencial para consumir la misma cantidad de oxígeno.

Son muchos los estudios de investigación en los que se ha evaluado el efecto de la administración de antioxidantes sobre distintos parámetros de estrés oxidativo y sobre el rendimiento en una sesión de ejercicio físico agotador. Sin embargo son muy pocos los estudios en los que se haya evaluado el efecto del tratamiento a largo plazo con antioxidantes sobre el rendimiento físico tanto en animales como en seres humanos.

Los estudios realizados hasta la fecha muestran que tras la aplicación de un protocolo de entrenamiento largo (de más de seis semanas) se observan mejoras muy significativas en el tiempo de carrera y, por tanto, en la capacidad de resistencia (Davies, Packer et al. 1981; Venditti and Di Meo 1997).

Con respecto a los protocolo de ejercicio más agudos, se ha demostrado que la administración de antioxidantes a la hora de realizar un EF agotador previene el daño muscular asociado al mismo, disminuye la fatiga y el estrés oxidativo lo que se traduce en una mejora en el rendimiento obtenido en la prueba realizada. En la siguiente tabla se recogen algunos trabajos que demuestran esta afirmación.

Tabla V.2- Efecto de la suplementación con antioxidantes en el ejercicio físico agotador.

Suplementación	Modelo	Variable	Efecto	Referencia
Alopurinol	Sóleo en rata	Contracciones isométricas	Disminuye la fatiga	(Barclay and Hansel 1991)
Alopurinol	Ratas	Carrera en tapiz rodante	Disminuyen los niveles de GSSG en sangre. Disminuyen niveles de MDA, GOT y CK en plasma	(Vina, Gimeno et al. 2000)
300 mg de alopurinol	Ciclistas profesionales	Tour de Francia	Disminuyen niveles de MDA, GOT y CK en plasma	(Gomez-Cabrera, Pallardo et al. 2003)
Vitamina C 3g/kg día	Ratas deficientes en Vitamina E	Carrera hasta el agotamiento	Sin efecto	(Gohil, Packer et al. 1986)
Inyección muscular de Vitamina E	Ratones	Natación	Mejora la resistencia	(Novelli, Bracciotti et al. 1990)
Vitamina E 1200 UI/día 5 semanas	Corredores	6 días de carrera	Disminuye TBARS, CK	(Itoh, Ohkuwa et al. 2000)

Pero, como hemos comentado con anterioridad, no existen muchos estudios en los que se haya evaluado la administración de antioxidantes, de forma crónica, durante el periodos largos entrenamiento. De hecho, los estudios publicados hasta el momento, no parecen indicar que la suplementación con antioxidantes beneficie al rendimiento del entrenamiento. Por el contrario su efecto parece ser más bien perjudicial (Ver tablas V.3 y V.4). Esta datos resultan muy sorprendentes teniendo en cuenta el uso generalizado que entre la población deportista se hace tanto de las vitaminas como de otras sustancias antioxidantes. En este sentido y, según datos publicados recientemente en la revista American Journal of Clinical Nutrition, se considera que un 70% de la población utiliza suplementos dietéticos al menos de forma ocasional, mientras que un 40% lo hace de forma regular. Uno de los suplementos más utilizados es, sin lugar a dudas, la vitamina C.

Tabla V.3- Efecto de la suplementación con antioxidantes en el rendimiento físico.

Suplementación	Modelo	Variable	Efecto	Referencia
Ubiquinona-10 120 mg 22 días	Humanos	Entrenamiento aeróbico y anaeróbico	Empeora el rendimiento y la recuperación comparado con los placebos	(Malm, Svensson et al. 1997)
Vitamina E y ácido α -lipoico	Músculo de rata	Actividad contráctil	Menor fuerza contráctil	(Coombes, Powers et al. 2001)
Vitamina C 1g 4 semanas	Galgos	Entrenamiento durante cuatro semanas	Empeora el rendimiento del entrenamiento	(Marshall, Scott et all.2002)

Tabla V.4- Efecto de la suplementación con antioxidantes en las adaptaciones al ejercicio físico.

Suplementación	Modelo	Variable	Efecto	Referencia
Vitamina C y N-acetil cisteína	Humanos	Ejercicio excéntrico agudo	Aumenta el estrés oxidativo	(Childs, Jacobs et al. 2001)
Vitamina C	Linfocitos humanos y biopsia muscular	Entrenamiento aeróbico	Menor actividad enzimas antioxidantes y HSP	(Khassaf, McArdle et al. 2003)
Vitamina C y α -tocoferol 28 días	Biopsia muscular y plasma humano	Ejercicio agudo	Inhibición de la liberación de IL-6 del músculo a plasma	(Fischer, Hiscock et al. 2004)

El debate sobre los efectos de la suplementación con antioxidantes a largo plazo se ha hecho extensivo al ámbito de la clínica. Tradicionalmente se ha considerado que la administración de vitaminas antioxidantes podían considerarse un tratamiento efectivo en aquellas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo tales como el cáncer y la enfermedad cardiovascular. Sin embargo son cada vez más las publicaciones en la que se demuestra que no sólo no mejoran, sino que empeora, tanto la incidencia como la mortalidad de los pacientes que las padecen y a los que se les suplementan con distintas sustancias antioxidantes (Ver tabla V.5)

Tabla V.5- Efectos negativos de la suplementación con antioxidantes.

Suplementación	Modelo	Variable	Efecto	Referencia
Vitamina A y Vitamina E	Estudios en humanos	Pacientes con enfermedades cardiovasculares	Aumenta la mortalidad	(Vivekananthan, Penn et al. 2003)
Vitaminas antioxidantes	Estudios en humanos	Pacientes con cáncer gastrointestinal	Empeora	(Bjelakovic, Nikolova et al. 2004)

En la figura IV.22 se muestra una mejora en el tiempo de carrera de un 200% (100 minutos antes del entrenamiento, frente a 300 minutos tras 6 semanas de ejercicio físico continuado) del grupo entrenado control. El grupo entrenado tratado con vitamina C, sin embargo, no mostró una mejora significativa en el tiempo de carrera (100 minutos antes de entrenamiento, frente a 120 minutos tras 6 semanas de ejercicio).

Éste hecho concuerda con todos los resultados recogidos en la presente tesis, en la que demostramos que la administración de vitamina C frena la cascada de señalización que desemboca en el proceso de biogénesis mitocondrial. Como hemos comentado con anterioridad diversos grupos de investigación señalan a la biogénesis y a la mejora en la capacidad oxidativa como el principal condicionante de la capacidad de resistencia en un EF aeróbico. Nuestros datos demuestran el papel que juegan los radicales libres como mediadores de adaptaciones críticas desde el punto de vista del rendimiento físico. Por tanto, cuestionamos, la tan extendida práctica del uso de antioxidantes orales durante los periodos de entrenamiento.

6.2.-Efecto del entrenamiento y de la administración de antioxidantes en el consumo máximo de oxígeno. Estudios en humanos.

Cuando se realiza ejercicio físico cambian rápidamente las necesidades energéticas y por tanto metabólicas y se produce una adaptación corporal dependiente de la intensidad del esfuerzo y del estado funcional del sujeto. El sistema de transporte de oxígeno (O_2) es el principal encargado de satisfacer esas demandas energéticas. El VO_2 máx se considera una expresión directa de las necesidades metabólicas del organismo y el mejor determinante del nivel metabólico alcanzado en un esfuerzo (Astrand and Rodahl, 1977).

El VO_2 máx. depende de múltiples factores como son: la herencia, la edad, el sexo, el peso y el grado de entrenamiento. La genética es un determinante importante de la condición aeróbica pudiendo condicionar hasta el 60% del VO_2 máx (Astrand and Rodahl, 1977).

Si no intervienen otras variables, la capacidad oxidativa de los tejidos (y en especial, la del músculo) va a ser la limitante del VO_2 máx (Davies, Packer et al. 1981). En el año 1981 Davies (Davies, Packer et al. 1981) realizó un estudio en el que sometió a un grupo de ratas a un entrenamiento aeróbico de diez semanas y en las que determinó el contenido mitocondrial, la capacidad oxidativa del músculo, el VO_2 máx y la resistencia. Los resultados mostraron una mejora de la capacidad oxidativa muscular de un 100% frente a un 14% de mejora en el VO_2 máx. Los autores concluyeron que diversos factores “controladores” (sistémicos o locales) intervienen para prevenir la completa utilización de la capacidad oxidativa del músculo y que, por tanto ésta, no era el factor limitante para el VO_2 máx. Este mismo grupo de investigación encontró una elevada

correlación entre el VO_2 máx ($r=0,92$) con la máxima velocidad que alcanzaron los animales en un protocolo de agotamiento de intensidad creciente, por lo que dedujeron que el VO_2 máx está directamente relacionado con la capacidad aeróbica (la habilidad para poder realizar trabajo aeróbico de alta intensidad). En definitiva, aunque el consumo máximo de oxígeno está indirectamente relacionado con la resistencia, no se puede considerar un predictor real de la misma. Esta afirmación explica las sutiles mejoras en el consumo máximo de oxígeno asociadas al entrenamiento (15-25%) y que contrastan con las significativas modificaciones del contenido mitocondrial del músculo esquelético.

Uno de los factores que más influyen en el VO_2 máx es el gasto cardíaco y éste es proporcional a la fuerza que tiene el corazón para bombear la sangre. En la introducción se ha comentado que muchos polimorfismos en el ADNmt pueden tener como consecuencia modificaciones en el VO_2 máx (Murakami, Soma et al. 2001; Acuna, Escames et al. 2002) y están asociados a problemas en la capacidad para realizar ejercicio (Murakami, Shimomura et al. 1998). Uno de las características distintivas de una miopatía mitocondrial es la reducción del VO_2 máx (Taivassalo, Jensen et al. 2003) Ésta puede deberse a que el corazón no tenga la suficiente fuerza para bombear la sangre necesaria debido a alteraciones en la maquinaria mitocondrial tanto de corazón como de músculos. Cuando se somete a un entrenamiento a personas que tienen enfermedades mitocondriales (Taivassalo, Shoudbridge et al. 2001) se observa una mejora en el la capacidad de utilizar el oxígeno en un 20% de los pacientes. Y ésta viene acompañada de una BM que se encuentra aumentada con respecto a pacientes sanos que realizan el mismo tipo de ejercicio. Lo que nos indican estos datos, es que la BM puede jugar un papel importante en la modulación del VO_2 máx.

Nuestros datos (ver figura IV.21 de los resultados) reflejan que los grupos en los que se produce una BM (grupo entrenado sin tomar antioxidantes) presentan una mejora significativa del VO_2 máx tras el entrenamiento. Sin embargo en el grupo de sujetos que habían sido tratados con vitamina C (1 gramo diario) durante el periodo de entrenamiento, no se manifestó esta mejora. Estos resultados en humanos encajan con los obtenidos en animales de experimentación en los que demostramos el efecto negativo de la administración de antioxidantes orales sobre el tiempo de carrera y la biogénesis mitocondrial.

VI-CONCLUSIONES

VI-CONCLUSIONES

A la luz de los resultados obtenidos, podemos extraer las conclusiones que se enumeran a continuación:

1.- El ejercicio físico se puede considerar un antioxidante ya que el entrenamiento aumenta tanto la expresión como la actividad de dos de las enzimas antioxidantes MnSOD y Gpx. En la presente tesis mostramos evidencias de que la continua presencia de un pequeño estímulo, como son las ERO, es capaz de inducir los mecanismos de defensa antioxidante.

2.- La suplementación con antioxidantes orales durante el entrenamiento disminuye la mejora de la defensa antioxidante inducida por el ejercicio. Por lo tanto, los bajos niveles de radicales libres producidos durante el entrenamiento aeróbico modulan la sobreexpresión del sistema de defensa antioxidante.

3.- Las especies reactivas del oxígeno producidas durante el entrenamiento actúan como señales que regulan procesos moleculares importantes en el fenómeno de biogénesis mitocondrial. El ejercicio físico induce la activación de la siguiente cascada de señalización:

PGC-1→FRN-1→ftmA→Citrato Sintasa/Citocromo C.

4.- La prevención del estrés oxidativo asociado al ejercicio físico, con la administración de antioxidantes orales, puede llegar a ser perjudicial al condicionar el aumento en la densidad mitocondrial en músculo esquelético asociada al ejercicio.

5.- La suplementación con vitamina C disminuye la eficiencia del entrenamiento tanto en seres humanos como en animales. En sujetos sedentarios la administración de 1 gramo diario de vitamina C minimiza los incrementos en el consumo máximo de oxígeno inducidos tras 8 semanas de entrenamiento aeróbico. En animales la administración de 500mg/kg peso de vitamina C disminuye muy significativamente la mejora en el tiempo de carrera inducida tras un entrenamiento de 6 semanas.

6.- Los radicales libres generados durante un protocolo de entrenamiento moderado en tapiz rodante actúan como señales que modulan la respuesta adaptativa al ejercicio físico. Los antioxidantes orales, aunque recomendables antes de la competición deportiva, cuando el ejercicio se espera sea realizado hasta el agotamiento, pueden no ser tan apropiados durante los periodos de entrenamiento.

VI-BIBLIOGRAFÍA

VII- BIBLIOGRAFÍA

- Abernethy, P. J., J. Jurimae, et al. (1994). "Acute and chronic response of skeletal muscle to resistance exercise." Sports Med **17**(1): 22-38.
- Abu-Shakra, S. R., A. J. Cole, et al. (1993). "Nerve stimulation and denervation induce differential patterns of immediate early gene mRNA expression in skeletal muscle." Brain Res Mol Brain Res **18**(3): 216-20.
- Acuna, C. D., G. Escames, et al. (2002). "Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases." Curr Top Med Chem **2**(2): 133-51.
- Aleman, V. and P. Handler (1967). "Dihydroorotate dehydrogenase. I. General properties." J Biol Chem **242**(18): 4087-96.
- Alessio, H. M. and A. H. Goldfarb (1988). "Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training." J Appl Physiol **64**(4): 1333-6.
- Allen, D. L., S. R. Monke, et al. (1995). "Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers." J Appl Physiol **78**(5): 1969-76.
- Andreu, A. L., M. G. Hanna, et al. (1999). "Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA." N Engl J Med **341**(14): 1037-44.
- Annex, B. H. and R. S. Williams (1990). "Mitochondrial DNA structure and expression in specialized subtypes of mammalian striated muscle." Mol Cell Biol **10**(11): 5671-8.
- Antonicka, H., A. Mattman, et al. (2003). "Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy." Am J Hum Genet **72**(1): 101-14.
- Arabadjis, P. G., P. C. Tullson, et al. (1993). "Purine nucleoside formation in rat skeletal muscle fiber types." Am J Physiol **264**(5 Pt 1): C1246-51.
- Asensi, M., J. Sastre, et al. (1994). "Determination of oxidized glutathione in blood: high-performance liquid chromatography." Methods Enzymol **234**: 367-71.
- Aust, S. D., C. F. Chignell, et al. (1993). "Free radicals in toxicology." Toxicol Appl Pharmacol **120**(2): 168-78.
- Bailey, D. M., I. S. Young, et al. (2004). "Regulation of free radical outflow from an isolated muscle bed in exercising humans." Am J Physiol Heart Circ Physiol **287**(4): H1689-99.

- Balnave, C. D. and M. W. Thompson (1993). "Effect of training on eccentric exercise-induced muscle damage." J Appl Physiol **75**(4): 1545-51.
- Barclay, J. K. and M. Hansel (1991). "Free radicals may contribute to oxidative skeletal muscle fatigue." Can J Physiol Pharmacol **69**(2): 279-84.
- Beckman, J. S., J. Chen, et al. (1994). "Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration." Prog Brain Res **103**: 371-80.
- Bell, C., J. M. Carson, et al. (2005). "Ascorbic acid does not affect the age-associated reduction in maximal cardiac output and oxygen consumption in healthy adults." J Appl Physiol **98**(3): 845-9.
- Berard, A., G. Bravo, et al. (1997). "Meta-analysis of the effectiveness of physical activity for the prevention of bone loss in postmenopausal women." Osteoporos Int **7**(4): 331-7.
- Bereiter-Hahn, J. (1990). "Behavior of mitochondria in the living cell." Int Rev Cytol **122**: 1-63.
- Billat, V. L., B. Flechet, et al. (1999). "Interval training at VO₂max: effects on aerobic performance and overtraining markers." Med Sci Sports Exerc **31**(1): 156-63.
- Bohr, V. A., T. Stevnsner, et al. (2002). "Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells." Gene **286**(1): 127-34.
- Booth, F. (1977). "Effects of endurance exercise on cytochrome C turnover in skeletal muscle." Ann N Y Acad Sci **301**: 431-9.
- Booth, F. W. and D. B. Thomason (1991). "Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models." Physiol Rev **71**(2): 541-85.
- Bourgeron, T., P. Rustin, et al. (1995). "Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency." Nat Genet **11**(2): 144-9.
- Boveris, A. and B. Chance (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." Biochem J **134**(3): 707-16.
- Boveris, A., N. Oshino, et al. (1972). "The cellular production of hydrogen peroxide." Biochem J **128**(3): 617-30.
- Bredt, D. S., C. E. Glatt, 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**(4): 615-24.
- Bua, E. A., S. H. McKiernan, et al. (2002). "Mitochondrial abnormalities are more frequent in muscles undergoing sarcopenia." J Appl Physiol **92**(6): 2617-24.
- Buonanno, A., J. Cheng, et al. (1998). "Activity-dependent regulation of muscle genes: repressive and stimulatory effects of innervation." Acta Physiol Scand **163**(3): S17-26.

- Cabric, M. and N. T. James (1983). "Morphometric analyses on the muscles of exercise trained and untrained dogs." Am J Anat **166**(3): 359-68.
- Cacic, M., E. Wilichowski, et al. (2001). "Cytochrome c oxidase partial deficiency-associated Leigh disease presenting as an extrapyramidal syndrome." J Child Neurol **16**(8): 616-9.
- Cakatay, U., A. Telci, et al. (2003). "Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle." Clin Biochem **36**(1): 51-5.
- Calabrese, E. J. (2004). "Hormesis: from marginalization to mainstream: a case for hormesis as the default dose-response model in risk assessment." Toxicol Appl Pharmacol **197**(2): 125-36.
- Capdevila, J., N. Chacos, et al. (1981). "Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(9): 5362-6.
- Clayton, D. A. (1992). "Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs." Int Rev Cytol **141**: 217-32.
- Cogswell, A. M., R. J. Stevens, et al. (1993). "Properties of skeletal muscle mitochondria isolated from subsarcolemmal and intermyofibrillar regions." Am J Physiol **264**(2 Pt 1): C383-9.
- Connor, M. K., O. Bezborodova, et al. (2000). "Effect of contractile activity on protein turnover in skeletal muscle mitochondrial subfractions." J Appl Physiol **88**(5): 1601-6.
- Connor, M. K., M. Takahashi, et al. (1996). "Tissue-specific stability of nuclear- and mitochondrially encoded mRNAs." Arch Biochem Biophys **333**(1): 103-8.
- Constable, S. H., R. J. Favier, et al. (1987). "Energy metabolism in contracting rat skeletal muscle: adaptation to exercise training." Am J Physiol **253**(2 Pt 1): C316-22.
- Cortopassi, G. A., D. Shibata, et al. (1992). "A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(16): 7370-4.
- Costill, D. L., K. Sparks, et al. (1971). "Muscle glycogen utilization during exhaustive running." J Appl Physiol **31**(3): 353-6.
- Craig, E. E., A. Chesley, et al. (1998). "Thyroid hormone modifies mitochondrial phenotype by increasing protein import without altering degradation." Am J Physiol **275**(6 Pt 1): C1508-15.
- Cresci, S., L. D. Wright, et al. (1996). "Activation of a novel metabolic gene regulatory pathway by chronic stimulation of skeletal muscle." Am J Physiol **270**(5 Pt 1): C1413-20.
- Chance, B., H. Sies, et al. (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." Physiol Rev **59**(3): 527-605.
- Chinnery, P. F., D. Howel, et al. (2003). "Clinical progression of mitochondrial myopathy is associated with the random accumulation

- of cytochrome c oxidase negative skeletal muscle fibres." J Neurol Sci **211**(1-2): 63-6.
- Chrzanowska-Lightowlers, Z. M., T. Preiss, et al. (1994). "Inhibition of mitochondrial protein synthesis promotes increased stability of nuclear-encoded respiratory gene transcripts." J Biol Chem **269**(44): 27322-8.
- Darr, K. C. and E. Schultz (1987). "Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle." J Appl Physiol **63**(5): 1816-21.
- Darr, K. C. and E. Schultz (1989). "Hindlimb suspension suppresses muscle growth and satellite cell proliferation." J Appl Physiol **67**(5): 1827-34.
- Davies, K. J., L. Packer, et al. (1981). "Biochemical adaptation of mitochondria, muscle, and whole-animal respiration to endurance training." Arch Biochem Biophys **209**(2): 539-54.
- Davies, K. J., A. T. Quintanilha, et al. (1982). "Free radicals and tissue damage produced by exercise." Biochem Biophys Res Commun **107**(4): 1198-205.
- Davies, S. P., D. Carling, et al. (1989). "Tissue distribution of the AMP-activated protein kinase, and lack of activation by cyclic-AMP-dependent protein kinase, studied using a specific and sensitive peptide assay." Eur J Biochem **186**(1-2): 123-8.
- Dudley, G. A., W. M. Abraham, et al. (1982). "Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle." J Appl Physiol **53**(4): 844-50.
- Dupont-Versteegden, E. E., R. J. McCarter, et al. (1994). "Voluntary exercise decreases progression of muscular dystrophy in diaphragm of mdx mice." J Appl Physiol **77**(4): 1736-41.
- Durante, P. E., K. J. Mustard, et al. (2002). "Effects of endurance training on activity and expression of AMP-activated protein kinase isoforms in rat muscles." Am J Physiol Endocrinol Metab **283**(1): E178-86.
- Eftimie, R., H. R. Brenner, et al. (1991). "Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(4): 1349-53.
- Eilers, M., T. Endo, et al. (1989). "Adriamycin, a drug interacting with acidic phospholipids, blocks import of precursor proteins by isolated yeast mitochondria." J Biol Chem **264**(5): 2945-50.
- Elion, G. B., A. Kovensky, et al. (1966). "Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase." Biochem Pharmacol **15**(7): 863-80.
- Enoka, R. M. (1988). "Muscle strength and its development. New perspectives." Sports Med **6**(3): 146-68.
- Eppley, Z. A., J. Kim, et al. (1993). "A myogenic regulatory gene, qmf1, is expressed by adult myonuclei after injury." Am J Physiol **265**(2 Pt 1): C397-405.

- Esterbauer, H., G. Striegl, et al. (1989). "Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein." Free Radic Res Commun **6**(1): 67-75.
- Evans, M. J. and R. C. Scarpulla (1988). "Both upstream and intron sequence elements are required for elevated expression of the rat somatic cytochrome c gene in COS-1 cells." Mol Cell Biol **8**(1): 35-41.
- Evans, M. J. and R. C. Scarpulla (1989). "Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences." J Biol Chem **264**(24): 14361-8.
- Fischel-Ghodsian, N. (2003). "Mitochondrial deafness." Ear Hear **24**(4): 303-13.
- Fitts, R. H., F. W. Booth, et al. (1975). "Skeletal muscle respiratory capacity, endurance, and glycogen utilization." Am J Physiol **228**(4): 1029-33.
- Fitts, R. H., W. W. Winder, et al. (1980). "Contractile, biochemical, and histochemical properties of thyrotoxic rat soleus muscle." Am J Physiol **238**(1): C14-20.
- Frei, B., R. Stocker, et al. (1988). "Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(24): 9748-52.
- Freyssenet, D., M. K. Connor, et al. (1999). "Cytochrome c transcriptional activation and mRNA stability during contractile activity in skeletal muscle." Am J Physiol **277**(1 Pt 1): E26-32.
- Fridovich, I. (1978). "Oxygen free radicals and tissue damage: chairman's introduction." Ciba Found Symp(65): 1-4.
- Fridovich, I. (1986). "Biological effects of the superoxide radical." Arch Biochem Biophys **247**(1): 1-11.
- Friedenreich, C. M., K. S. Courneya, et al. (1998). "The lifetime total physical activity questionnaire: development and reliability." Med Sci Sports Exerc **30**(2): 266-74.
- Fujii, N., T. Hayashi, et al. (2000). "Exercise induces isoform-specific increase in 5'AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle." Biochem Biophys Res Commun **273**(3): 1150-5.
- Gerbitz, K. D., J. M. van den Ouweland, et al. (1995). "Mitochondrial diabetes mellitus: a review." Biochim Biophys Acta **1271**(1): 253-60.
- Gilbert, H. F. (1984). "Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange." Methods Enzymol **107**: 330-51.
- Giulivi, C. and E. Cadenas (1998). "The role of mitochondrial glutathione in DNA base oxidation." Biochim Biophys Acta **1366**(3): 265-74.
- Glick, B. S. (1995). "Can Hsp70 proteins act as force-generating motors?" Cell **80**(1): 11-4.

- Gohil, K., C. Viguie, et al. (1988). "Blood glutathione oxidation during human exercise." J Appl Physiol **64**(1): 115-9.
- Gollnick, P. D. and D. W. King (1969). "Effect of exercise and training on mitochondria of rat skeletal muscle." Am J Physiol **216**(6): 1502-9.
- Gomez-Cabrera, M. C., C. Borrás, et al. (2005). "Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats." J Physiol **567**(Pt 1): 113-20.
- Gomez-Cabrera, M. C., F. V. Pallardo, et al. (2003). "Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France." Jama **289**(19): 2503-4.
- Gopalakrishnan, L. and R. C. Scarpulla (1994). "Differential regulation of respiratory chain subunits by a CREB-dependent signal transduction pathway. Role of cyclic AMP in cytochrome c and COXIV gene expression." J Biol Chem **269**(1): 105-13.
- Gordon, J. W., A. A. Rungi, et al. (2001). "Effects of contractile activity on mitochondrial transcription factor A expression in skeletal muscle." J Appl Physiol **90**(1): 389-96.
- Gore, M., R. Fiebig, et al. (1998). "Endurance training alters antioxidant enzyme gene expression in rat skeletal muscle." Can J Physiol Pharmacol **76**(12): 1139-45.
- Goto, M., S. Terada, et al. (2000). "cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats." Biochem Biophys Res Commun **274**(2): 350-4.
- Goto, Y., I. Nonaka, et al. (1990). "A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies." Nature **348**(6302): 651-3.
- Granger, D. N., M. A. Perry, et al. (1981). "Interstitial-to-blood movement of macromolecules in the absorbing small intestine." Am J Physiol **241**(1): G31-6.
- Grey, J. Y., M. K. Connor, et al. (2000). "Tom20-mediated mitochondrial protein import in muscle cells during differentiation." Am J Physiol Cell Physiol **279**(5): C1393-400.
- Griendling, K. K., C. A. Minieri, et al. (1994). "Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells." Circ Res **74**(6): 1141-8.
- Grisotto, P. C., A. C. dos Santos, 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): 1-6.
- Grounds, M. D., K. L. Garrett, et al. (1992). "Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes." Cell Tissue Res **267**(1): 99-104.
- Grounds, M. D. and Z. Yablonka-Reuveni (1993). "Molecular and cell biology of skeletal muscle regeneration." Mol Cell Biol Hum Dis Ser **3**: 210-56.

- Gugneja, S. and R. C. Scarpulla (1997). "Serine phosphorylation within a concise amino-terminal domain in nuclear respiratory factor 1 enhances DNA binding." J Biol Chem **272**(30): 18732-9.
- Habinowski, S. A., M. Hirshman, et al. (2001). "Malonyl-CoA decarboxylase is not a substrate of AMP-activated protein kinase in rat fast-twitch skeletal muscle or an islet cell line." Arch Biochem Biophys **396**(1): 71-9.
- Halliwell, B. and S. Chirico (1993). "Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance." Am J Clin Nutr **57**(5 Suppl): 715S-724S; discussion 724S-725S.
- Hardie, D. G. and S. A. Hawley (2001). "AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited." Bioessays **23**(12): 1112-9.
- Hathcock, J. N., A. Azzi, et al. (2005). "Vitamins E and C are safe across a broad range of intakes." Am J Clin Nutr **81**(4): 736-45.
- Hayes, A. and D. A. Williams (1996). "Beneficial effects of voluntary wheel running on the properties of dystrophic mouse muscle." J Appl Physiol **80**(2): 670-9.
- Heddi, A., P. Lestienne, et al. (1993). "Mitochondrial DNA expression in mitochondrial myopathies and coordinated expression of nuclear genes involved in ATP production." J Biol Chem **268**(16): 12156-63.
- Hellsten-Westing, Y. (1993). "Immunohistochemical localization of xanthine oxidase in human cardiac and skeletal muscle." Histochemistry **100**(3): 215-22.
- Hellsten-Westing, Y., L. Kaijser, et al. (1994). "Exchange of purines in human liver and skeletal muscle with short-term exhaustive exercise." Am J Physiol **266**(1 Pt 2): R81-6.
- Hellsten-Westing, Y., A. Sollevi, 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**(5): 380-4.
- Hellsten, Y. (1994). "Xanthine dehydrogenase and purine metabolism in man. With special reference to exercise." Acta Physiol Scand Suppl **621**: 1-73.
- Hellsten, Y., U. Frandsen, et al. (1997). "Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation." J Physiol **498** (Pt 1): 239-48.
- Henriksson, J. and J. S. Reitman (1977). "Time course of changes in human skeletal muscle succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities and maximal oxygen uptake with physical activity and inactivity." Acta Physiol Scand **99**(1): 91-7.
- Hickson, R. C. (1981). "Skeletal muscle cytochrome c and myoglobin, endurance, and frequency of training." J Appl Physiol **51**(3): 746-9.

- Higuchi, M., L. J. Cartier, et al. (1985). "Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise." J Gerontol **40**(3): 281-6.
- Hoffman-Goetz, L. (1998). "Influence of physical activity and exercise on innate immunity." Nutr Rev **56**(1 Pt 2): S126-30.
- Hollander, J., J. Bejma, et al. (2000). "Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific effect of age." Mech Ageing Dev **116**(1): 33-45.
- Hollander, J., R. Fiebig, et al. (1999). "Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific adaptation to endurance training." Am J Physiol **277**(3 Pt 2): R856-62.
- Hollander, J., R. Fiebig, et al. (2001). "Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle." Pflugers Arch **442**(3): 426-34.
- Holloszy, J. O. (1967). "Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle." J Biol Chem **242**(9): 2278-82.
- Holloszy, J. O. (1973). "Biochemical adaptations to exercise: aerobic metabolism." Exerc Sport Sci Rev **1**: 45-71.
- Hood, D. A. (2001). "Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle." J Appl Physiol **90**(3): 1137-57.
- Hood, D. A., R. Kelton, et al. (1992). "Mitochondrial adaptations to chronic muscle use: effect of iron deficiency." Comp Biochem Physiol Comp Physiol **101**(3): 597-605.
- Hudson, E. R., D. A. Pan, et al. (2003). "A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias." Curr Biol **13**(10): 861-6.
- Hughes, S. M., M. Cho, et al. (1993). "Three slow myosin heavy chains sequentially expressed in developing mammalian skeletal muscle." Dev Biol **158**(1): 183-99.
- Hughes, S. M., K. Koishi, et al. (1997). "MyoD protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents." Mech Dev **61**(1-2): 151-63.
- Hughes, S. M., J. M. Taylor, et al. (1993). "Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones." Development **118**(4): 1137-47.
- Huo, L. and R. C. Scarpulla (2001). "Mitochondrial DNA instability and peri-implantation lethality associated with targeted disruption of nuclear respiratory factor 1 in mice." Mol Cell Biol **21**(2): 644-54.
- Hutber, C. A., D. G. Hardie, et al. (1997). "Electrical stimulation inactivates muscle acetyl-CoA carboxylase and increases AMP-activated protein kinase." Am J Physiol **272**(2 Pt 1): E262-6.

- Irrcher, I., P. J. Adhietty, et al. (2003). "PPARgamma coactivator-1alpha expression during thyroid hormone- and contractile activity-induced mitochondrial adaptations." Am J Physiol Cell Physiol **284**(6): C1669-77.
- Jackson, M. J., R. H. Edwards, et al. (1985). "Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle." Biochim Biophys Acta **847**(2): 185-90.
- Jacobs-Ei, J., M. Y. Zhou, et al. (1995). "MRF4, Myf-5, and myogenin mRNAs in the adaptive responses of mature rat muscle." Am J Physiol **268**(4 Pt 1): C1045-52.
- Jacobs, S. C., J. H. Wokke, et al. (1995). "Satellite cell activation after muscle damage in young and adult rats." Anat Rec **242**(3): 329-36.
- Jenkins, R. R. (1988). "Free radical chemistry. Relationship to exercise." Sports Med **5**(3): 156-70.
- Ji, L. L., M. C. Gomez-Cabrera, et al. (2004). "Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle." Faseb J **18**(13): 1499-506.
- Ji, L. L., C. Leeuwenburgh, et al. (1998). "Oxidative stress and aging. Role of exercise and its influences on antioxidant systems." Ann N Y Acad Sci **854**: 102-17.
- Johns, D. R., M. J. Neufeld, et al. (1992). "An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy." Biochem Biophys Res Commun **187**(3): 1551-7.
- Johnson, M. A., D. M. Turnbull, et al. (1983). "A partial deficiency of cytochrome c oxidase in chronic progressive external ophthalmoplegia." J Neurol Sci **60**(1): 31-53.
- Kadambi, A. and T. C. Skalak (2000). "Role of leukocytes and tissue-derived oxidants in short-term skeletal muscle ischemia-reperfusion injury." Am J Physiol Heart Circ Physiol **278**(2): H435-43.
- Kahara, T., T. Takamura, et al. (2002). "Prediction of exercise-mediated changes in metabolic markers by gene polymorphism." Diabetes Res Clin Pract **57**(2): 105-10.
- Kanofsky, J. R. (1989). "Singlet oxygen production by biological systems." Chem Biol Interact **70**(1-2): 1-28.
- Kanter, M. M., R. L. Hamlin, et al. (1985). "Effect of exercise training on antioxidant enzymes and cardiotoxicity of doxorubicin." J Appl Physiol **59**(4): 1298-303.
- Kanter, M. M., L. A. Nolte, et al. (1993). "Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise." J Appl Physiol **74**(2): 965-9.
- Kasai, H., H. Tanooka, et al. (1984). "Formation of 8-hydroxyguanine residues in DNA by X-irradiation." Gann **75**(12): 1037-9.

- Kasper, C. E., T. P. White, et al. (1990). "Running during recovery from hindlimb suspension induces transient muscle injury." J Appl Physiol **68**(2): 533-9.
- Kaur, H. and B. Halliwell (1994). "Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients." FEBS Lett **350**(1): 9-12.
- Kennedy, E. D., P. Maechler, et al. (1998). "Effects of depletion of mitochondrial DNA in metabolism secretion coupling in INS-1 cells." Diabetes **47**(3): 374-80.
- Khassaf, M., A. McArdle, et al. (2003). "Effect of vitamin C supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle." J Physiol **549**(Pt 2): 645-52.
- Khrapko, K., E. Nekhaeva, et al. (2003). "Clonal expansions of mitochondrial genomes: implications for in vivo mutational spectra." Mutat Res **522**(1-2): 13-9.
- Kihlstrom, M. (1990). "Protection effect of endurance training against reoxygenation-induced injuries in rat heart." J Appl Physiol **68**(4): 1672-8.
- Koehler, C. M., D. Leuenberger, et al. (1999). "Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2141-6.
- Koishi, K., M. Zhang, et al. (1995). "MyoD protein accumulates in satellite cells and is neurally regulated in regenerating myotubes and skeletal muscle fibers." Dev Dyn **202**(3): 244-54.
- Krinsky, N. I. (1995). "Plant carotenoids and related molecules: important dietary antioxidants." Biochem Soc Symp **61**: 117-26.
- Laaksonen, D. E., M. Atalay, et al. (1996). "Increased resting and exercise-induced oxidative stress in young IDDM men." Diabetes Care **19**(6): 569-74.
- Lai, M. M. and F. W. Booth (1990). "Cytochrome c mRNA and alpha-actin mRNA in muscles of rats fed beta-GPA." J Appl Physiol **69**(3): 843-8.
- Lamas, S., P. A. Marsden, 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**(14): 6348-52.
- Land, J. M., J. A. Morgan-Hughes, et al. (1981). "Mitochondrial myopathy. Biochemical studies revealing a deficiency of NADH--cytochrome b reductase activity." J Neurol Sci **50**(1): 1-13.
- Larsson, N. G., J. Wang, et al. (1998). "Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice." Nat Genet **18**(3): 231-6.
- Laughlin, M. H., C. C. Hale, et al. (1991). "Biochemical characterization of exercise-trained porcine myocardium." J Appl Physiol **71**(1): 229-35.

- Laughlin, M. H., T. Simpson, et al. (1990). "Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training." J Appl Physiol **68**(6): 2337-43.
- Lee, C. and E. Okabe (1995). "Hydroxyl radical-mediated reduction of Ca(2+)-ATPase activity of masseter muscle sarcoplasmic reticulum." Jpn J Pharmacol **67**(1): 21-8.
- Lee, H. C. and Y. H. Wei (2005). "Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress." Int J Biochem Cell Biol **37**(4): 822-34.
- Lee, H. C., P. H. Yin, et al. (2000). "Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells." Biochem J **348 Pt 2**: 425-32.
- Leeuwenburgh, C., R. Fiebig, et al. (1994). "Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems." Am J Physiol **267**(2 Pt 2): R439-45.
- Lehman, J. J., P. M. Barger, et al. (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis." J Clin Invest **106**(7): 847-56.
- Lenka, N., C. Vijayasarathy, et al. (1998). "Structural organization and transcription regulation of nuclear genes encoding the mammalian cytochrome c oxidase complex." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **61**: 309-44.
- Lestienne, P. and G. Ponsot (1988). "Kearns-Sayre syndrome with muscle mitochondrial DNA deletion." Lancet **1**(8590): 885.
- Lew, H., S. Pyke, et al. (1985). "Changes in the glutathione status of plasma, liver and muscle following exhaustive exercise in rats." FEBS Lett **185**(2): 262-6.
- Lezza, A. M., D. Boffoli, et al. (1994). "Correlation between mitochondrial DNA 4977-bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles." Biochem Biophys Res Commun **205**(1): 772-9.
- Li, B., J. O. Holloszy, et al. (1999). "Respiratory uncoupling induces delta-aminolevulinic synthase expression through a nuclear respiratory factor-1-dependent mechanism in HeLa cells." J Biol Chem **274**(25): 17534-40.
- Li, J., C. A. Bombeck, et al. (1999). "Nitric oxide suppresses apoptosis via interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultured hepatocytes." J Biol Chem **274**(24): 17325-33.
- Li, K., P. D. Neuffer, et al. (1995). "Nuclear responses to depletion of mitochondrial DNA in human cells." Am J Physiol **269**(5 Pt 1): C1265-70.
- Lieber, R. L., C. B. Johansson, et al. (1986). "Long-term effects of spinal cord transection on fast and slow rat skeletal muscle. I. Contractile properties." Exp Neurol **91**(3): 423-34.

- Lin, J., H. Wu, et al. (2002). "Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres." Nature **418**(6899): 797-801.
- Linder, N., J. Rapola, et al. (1999). "Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues." Lab Invest **79**(8): 967-74.
- Linnane, A. W., S. Marzuki, et al. (1989). "Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases." Lancet **1**(8639): 642-5.
- Liochev, S. I. and I. Fridovich (1994). "The role of O₂·- in the production of HO·: in vitro and in vivo." Free Radic Biol Med **16**(1): 29-33.
- Lithgow, T. (2000). "Targeting of proteins to mitochondria." FEBS Lett **476**(1-2): 22-6.
- Loeffen, J. L., J. A. Smeitink, et al. (2000). "Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects." Hum Mutat **15**(2): 123-34.
- Luthi, J. M., H. Howald, et al. (1986). "Structural changes in skeletal muscle tissue with heavy-resistance exercise." Int J Sports Med **7**(3): 123-7.
- MacDougall, J. D., D. G. Sale, et al. (1979). "Mitochondrial volume density in human skeletal muscle following heavy resistance training." Med Sci Sports **11**(2): 164-6.
- Madsen, K., P. Erbjerg, et al. (1996). "Calcium content and respiratory control index of skeletal muscle mitochondria during exercise and recovery." Am J Physiol **271**(6 Pt 1): E1044-50.
- Malm, C., M. Svensson, et al. (1997). "Effects of ubiquinone-10 supplementation and high intensity training on physical performance in humans." Acta Physiol Scand **161**(3): 379-84.
- Marshall, R. J., K. C. Scott, et al. (2002). "Supplemental vitamin C appears to slow racing greyhounds." J Nutr **132**(6 Suppl 2): 1616S-21S.
- Marusich, M. F., B. H. Robinson, et al. (1997). "Expression of mtDNA and nDNA encoded respiratory chain proteins in chemically and genetically-derived Rho0 human fibroblasts: a comparison of subunit proteins in normal fibroblasts treated with ethidium bromide and fibroblasts from a patient with mtDNA depletion syndrome." Biochim Biophys Acta **1362**(2-3): 145-59.
- Massey, V., H. Komai, et al. (1970). "On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by allopurinol and other pyrazolo[3,4-d]pyrimidines." J Biol Chem **245**(11): 2837-44.
- Maughan, R. J., A. E. Donnelly, et al. (1989). "Delayed-onset muscle damage and lipid peroxidation in man after a downhill run." Muscle Nerve **12**(4): 332-6.
- McBride, J. M., W. J. Kraemer, et al. (1998). "Effect of resistance exercise on free radical production." Med Sci Sports Exerc **30**(1): 67-72.

- McCord, J. M. (1974). "Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase." Science **185**(150): 529-31.
- McCord, J. M. and I. Fridovich (1969). "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein)." J Biol Chem **244**(22): 6049-55.
- McCormick, K. M. and D. P. Thomas (1992). "Exercise-induced satellite cell activation in senescent soleus muscle." J Appl Physiol **72**(3): 888-93.
- McShane, M. A., S. R. Hamman, et al. (1991). "Pearson syndrome and mitochondrial encephalomyopathy in a patient with a deletion of mtDNA." Am J Hum Genet **48**(1): 39-42.
- McTiernan, A., R. S. Schwartz, et al. (1999). "Exercise clinical trials in cancer prevention research: a call to action." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **8**(3): 201-7.
- Meister, A. and M. E. Anderson (1983). "Glutathione." Annu Rev Biochem **52**: 711-60.
- Melov, S., J. M. Shoffner, et al. (1995). "Marked increase in the number and variety of mitochondrial DNA rearrangements in aging human skeletal muscle." Nucleic Acids Res **23**(20): 4122-6.
- Merry, P., M. Grootveld, 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**(1 Suppl): 362S-369S.
- Meydani, M., W. J. Evans, et al. (1993). "Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults." Am J Physiol **264**(5 Pt 2): R992-8.
- Michel, J. B., G. A. Ordway, et al. (1994). "Biphasic induction of immediate early gene expression accompanies activity-dependent angiogenesis and myofiber remodeling of rabbit skeletal muscle." J Clin Invest **94**(1): 277-85.
- Mihara, K. and T. Omura (1996). "Cytoplasmic chaperones in precursor targeting to mitochondria: the role of MSF and hsp 70." Trends Cell Biol **6**(3): 104-8.
- Miles, A. M., D. S. Bohle, et al. (1996). "Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide." J Biol Chem **271**(1): 40-7.
- Miranda, S., R. Foncea, et al. (1999). "Oxidative stress and upregulation of mitochondrial biogenesis genes in mitochondrial DNA-depleted HeLa cells." Biochem Biophys Res Commun **258**(1): 44-9.
- Moore, R. L., E. M. Thacker, et al. (1987). "Effect of training/detraining on submaximal exercise responses in humans." J Appl Physiol **63**(5): 1719-24.
- Moorhouse, P. C., M. Grootveld, et al. (1987). "Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers." FEBS Lett **213**(1): 23-8.

- Moraes, C. T., S. DiMauro, et al. (1989). "Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome." N Engl J Med **320**(20): 1293-9.
- Morrison, P. R., J. A. Montgomery, et al. (1987). "Cytochrome c protein-synthesis rates and mRNA contents during atrophy and recovery in skeletal muscle." Biochem J **241**(1): 257-63.
- Murakami, T., Y. Shimomura, et al. (1998). "Induction of nuclear respiratory factor-1 expression by an acute bout of exercise in rat muscle." Biochim Biophys Acta **1381**(1): 113-22.
- Myers, J., M. Prakash, et al. (2002). "Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing." N Engl J Med **346**(11): 793-801.
- Nakao, C., T. Ookawara, et al. (2000). "Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues." J Appl Physiol **88**(2): 649-54.
- Navarro, A., C. Gomez, et al. (2004). "Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **286**(3): R505-11.
- Nelson, B. D., K. Luciakova, et al. (1995). "The role of thyroid hormone and promoter diversity in the regulation of nuclear encoded mitochondrial proteins." Biochim Biophys Acta **1271**(1): 85-91.
- Nethery, D., D. Stofan, et al. (1999). "Formation of reactive oxygen species by the contracting diaphragm is PLA(2) dependent." J Appl Physiol **87**(2): 792-800.
- Nevo, Y., D. Soffer, et al. (2002). "Clinical characteristics and muscle pathology in myopathic mitochondrial DNA depletion." J Child Neurol **17**(7): 499-504.
- Nicholls, D. G. and S. L. Budd (2000). "Mitochondria and neuronal survival." Physiol Rev **80**(1): 315-60.
- Nielsen, J. N., K. J. Mustard, et al. (2003). "5'-AMP-activated protein kinase activity and subunit expression in exercise-trained human skeletal muscle." J Appl Physiol **94**(2): 631-41.
- Nielsen, J. N., J. F. Wojtaszewski, et al. (2002). "Role of 5'AMP-activated protein kinase in glycogen synthase activity and glucose utilization: insights from patients with McArdle's disease." J Physiol **541**(Pt 3): 979-89.
- Nijtmans, L. G., N. S. Henderson, et al. (2001). "Impaired ATP synthase assembly associated with a mutation in the human ATP synthase subunit 6 gene." J Biol Chem **276**(9): 6755-62.
- Nishino, I., A. Spinazzola, et al. (1999). "Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder." Science **283**(5402): 689-92.

- Nisoli, E., E. Clementi, et al. (2003). "Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide." Science **299**(5608): 896-9.
- Oh-ishi, S., T. Kizaki, et al. (1997). "Effects of endurance training on superoxide dismutase activity, content and mRNA expression in rat muscle." Clin Exp Pharmacol Physiol **24**(5): 326-32.
- Olson, E. N. and W. H. Klein (1994). "bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out." Genes Dev **8**(1): 1-8.
- Orr, W. C. and R. S. Sohal (1994). "Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*." Science **263**(5150): 1128-30.
- Ortenblad, N., K. Madsen, et al. (1997). "Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans." Am J Physiol **272**(4 Pt 2): R1258-63.
- Papa, S., F. Guerrieri, et al. (1997). "A possible role of slips in cytochrome C oxidase in the antioxygen defense system of the cell." Biosci Rep **17**(1): 23-31.
- Papadopoulou, L. C., C. M. Sue, et al. (1999). "Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene." Nat Genet **23**(3): 333-7.
- Patti, M. E., A. J. Butte, et al. (2003). "Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8466-71.
- Petersen, K. F., D. Befroy, et al. (2003). "Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance." Science **300**(5622): 1140-2.
- Pette, D. and R. S. Staron (1997). "Mammalian skeletal muscle fiber type transitions." Int Rev Cytol **170**: 143-223.
- Pfanner, N. and M. Meijer (1997). "The Tom and Tim machine." Curr Biol **7**(2): R100-3.
- Piantadosi, C. A. and H. B. Suliman (2006). "Mitochondrial transcription factor A induction by redox activation of nuclear respiratory factor 1." J Biol Chem **281**(1): 324-33.
- Pica, A. J. and G. A. Brooks (1982). "Effects of training and age on VO₂max in laboratory rats." Med Sci Sports Exerc **14**(3): 249-52.
- Pincemail, J., G. Camus, et al. (1990). "Exercise induces pentane production and neutrophil activation in humans. Effect of propranolol." Eur J Appl Physiol Occup Physiol **61**(3-4): 319-22.
- Polekhina, G., A. Gupta, et al. (2003). "AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen." Curr Biol **13**(10): 867-71.
- Ponticos, M., Q. L. Lu, et al. (1998). "Dual regulation of the AMP-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle." Embo J **17**(6): 1688-99.

- Postlethwait, E. M., S. D. Langford, et al. (1995). "NO₂ reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids." Free Radic Biol Med **19**(5): 553-63.
- Poulton, J., K. Morten, et al. (1994). "Deficiency of the human mitochondrial transcription factor h-mtTFA in infantile mitochondrial myopathy is associated with mtDNA depletion." Hum Mol Genet **3**(10): 1763-9.
- Puigserver, P., J. Rhee, et al. (2001). "Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1." Mol Cell **8**(5): 971-82.
- Puigserver, P., Z. Wu, et al. (1998). "A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis." Cell **92**(6): 829-39.
- Rabinowitz, M. and R. Zak (1975). "Mitochondria and cardiac hypertrophy." Circ Res **36**(3): 367-76.
- Rasmussen, B. B., C. R. Hancock, et al. (1998). "Postexercise recovery of skeletal muscle malonyl-CoA, acetyl-CoA carboxylase, and AMP-activated protein kinase." J Appl Physiol **85**(5): 1629-34.
- Reed, D. J., J. R. Babson, et al. (1980). "High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides." Anal Biochem **106**(1): 55-62.
- Reid, M. B. (2001). "Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction." Med Sci Sports Exerc **33**(3): 371-6.
- Reid, M. B., T. Shoji, et al. (1992). "Reactive oxygen in skeletal muscle. II. Extracellular release of free radicals." J Appl Physiol **73**(5): 1805-9.
- Reid, M. B., D. S. Stokic, et al. (1994). "N-acetylcysteine inhibits muscle fatigue in humans." J Clin Invest **94**(6): 2468-74.
- Robinson, B. H. (1993). "Lacticacidemia." Biochim Biophys Acta **1182**(3): 231-44.
- Rosenblatt, J. D., D. Yong, et al. (1994). "Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat muscle." Muscle Nerve **17**(6): 608-13.
- Roy, R. R., R. J. Talmadge, et al. (1998). "Training effects on soleus of cats spinal cord transected (T12-13) as adults." Muscle Nerve **21**(1): 63-71.
- Saada, A., A. Shaag, et al. (2001). "Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy." Nat Genet **29**(3): 342-4.
- Sacheck, J. M., P. E. Milbury, 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**(12): 1575-88.
- Sahlin, K. (1991). "Control of energetic processes in contracting human skeletal muscle." Biochem Soc Trans **19**(2): 353-8.
- Sahlin, K., S. Broberg, et al. (1989). "Formation of inosine monophosphate (IMP) in human skeletal muscle during incremental dynamic exercise." Acta Physiol Scand **136**(2): 193-8.

- Sahlin, K., K. Ekberg, et al. (1991). "Changes in plasma hypoxanthine and free radical markers during exercise in man." Acta Physiol Scand **142**(2): 275-81.
- Sale, D. G. (1988). "Neural adaptation to resistance training." Med Sci Sports Exerc **20**(5 Suppl): S135-45.
- Salminen, A. and V. Vihko (1983). "Endurance training reduces the susceptibility of mouse skeletal muscle to lipid peroxidation in vitro." Acta Physiol Scand **117**(1): 109-13.
- Salminen, A. and V. Vihko (1983). "Susceptibility of mouse skeletal muscles to exercise injuries." Muscle Nerve **6**(8): 596-601.
- Saltin, B. and L. B. Rowell (1980). "Functional adaptations to physical activity and inactivity." Fed Proc **39**(5): 1506-13.
- Sastre, J., M. Asensi, et al. (1992). "Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration." Am J Physiol **263**(5 Pt 2): R992-5.
- Scarpulla, R. C. (1997). "Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells." J Bioenerg Biomembr **29**(2): 109-19.
- Scarpulla, R. C. (2002). "Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis." Biochim Biophys Acta **1576**(1-2): 1-14.
- Scarpulla, R. C. (2002). "Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells." Gene **286**(1): 81-9.
- Schmid, P., M. Simmler, et al. (1983). "Mitochondrial reaction in skeletal muscle to induced activity." Int J Sports Med **4**(2): 116-8.
- Schrauwen, P. and M. K. Hesselink (2004). "Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes." Diabetes **53**(6): 1412-7.
- Schuler, M. J. and D. Pette (1998). "Quantification of thyroid hormone receptor isoforms, 9-cis retinoic acid receptor gamma, and nuclear receptor co-repressor by reverse-transcriptase PCR in maturing and adult skeletal muscles of rat." Eur J Biochem **257**(3): 607-14.
- Sen, C. K., M. Atalay, et al. (1994). "Exercise-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency." J Appl Physiol **77**(5): 2177-87.
- Sen, C. K., E. Marin, et al. (1992). "Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization." J Appl Physiol **73**(4): 1265-72.
- Sen, C. K., T. Rankinen, et al. (1994). "Oxidative stress after human exercise: effect of N-acetylcysteine supplementation." J Appl Physiol **76**(6): 2570-7.
- Seyama, A. (1993). "The role of oxygen-derived free radicals and the effect of free radical scavengers on skeletal muscle ischemia/reperfusion injury." Surg Today **23**(12): 1060-7.

- Shen, C. C., W. Wertelecki, et al. (1995). "Repair of mitochondrial DNA damage induced by bleomycin in human cells." Mutat Res **337**(1): 19-23.
- Sherwood, D. J., S. D. Dufresne, et al. (1999). "Differential regulation of MAP kinase, p70(S6K), and Akt by contraction and insulin in rat skeletal muscle." Am J Physiol **276**(5 Pt 1): E870-8.
- Shigenaga, M. K., T. M. Hagen, et al. (1994). "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 10771-8.
- Shoubridge, E. A. (2001). "Cytochrome c oxidase deficiency." Am J Med Genet **106**(1): 46-52.
- Sies, H. and R. Mehlhorn (1986). "Mutagenicity of nitroxide-free radicals." Arch Biochem Biophys **251**(1): 393-6.
- Silva, J. P., M. Kohler, et al. (2000). "Impaired insulin secretion and beta-cell loss in tissue-specific knockout mice with mitochondrial diabetes." Nat Genet **26**(3): 336-40.
- Sim, A. T. and D. G. Hardie (1988). "The low activity of acetyl-CoA carboxylase in basal and glucagon-stimulated hepatocytes is due to phosphorylation by the AMP-activated protein kinase and not cyclic AMP-dependent protein kinase." FEBS Lett **233**(2): 294-8.
- Snow, M. H. (1990). "Satellite cell response in rat soleus muscle undergoing hypertrophy due to surgical ablation of synergists." Anat Rec **227**(4): 437-46.
- Sogl, B., G. Gellissen, et al. (2000). "Biogenesis of giant mitochondria during insect flight muscle development in the locust, *Locusta migratoria* (L.). Transcription, translation and copy number of mitochondrial DNA." Eur J Biochem **267**(1): 11-7.
- Spelbrink, J. N., F. Y. Li, et al. (2001). "Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria." Nat Genet **28**(3): 223-31.
- Stofan, D. A., L. A. Callahan, et al. (2000). "Modulation of release of reactive oxygen species by the contracting diaphragm." Am J Respir Crit Care Med **161**(3 Pt 1): 891-8.
- Suliman, H. B., K. E. Welty-Wolf, et al. (2004). "Lipopolysaccharide induces oxidative cardiac mitochondrial damage and biogenesis." Cardiovasc Res **64**(2): 279-88.
- Supinski, G. (1998). "Free radical induced respiratory muscle dysfunction." Mol Cell Biochem **179**(1-2): 99-110.
- Suter, M. and C. Richter (1999). "Fragmented mitochondrial DNA is the predominant carrier of oxidized DNA bases." Biochemistry **38**(1): 459-64.

- Taivassalo, T., T. D. Jensen, et al. (2003). "The spectrum of exercise tolerance in mitochondrial myopathies: a study of 40 patients." Brain **126**(Pt 2): 413-23.
- Taivassalo, T., E. A. Shoubridge, et al. (2001). "Aerobic conditioning in patients with mitochondrial myopathies: physiological, biochemical, and genetic effects." Ann Neurol **50**(2): 133-41.
- Takahashi, M. and D. A. Hood (1993). "Chronic stimulation-induced changes in mitochondria and performance in rat skeletal muscle." J Appl Physiol **74**(2): 934-41.
- Tamaki, T., A. Akatsuka, et al. (1997). "Morphological and biochemical evidence of muscle hyperplasia following weight-lifting exercise in rats." Am J Physiol **273**(1 Pt 1): C246-56.
- Tanaka, H., K. D. Monahan, et al. (2001). "Age-predicted maximal heart rate revisited." J Am Coll Cardiol **37**(1): 153-6.
- Taylor, N. A. and J. G. Wilkinson (1986). "Exercise-induced skeletal muscle growth. Hypertrophy or hyperplasia?" Sports Med **3**(3): 190-200.
- Terada, S., M. Goto, et al. (2002). "Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle." Biochem Biophys Res Commun **296**(2): 350-4.
- Terjung, R. L., K. M. Baldwin, et al. (1972). "Effect of running to exhaustion on skeletal muscle mitochondria: a biochemical study." Am J Physiol **223**(3): 549-54.
- Timson, B. F. (1990). "Evaluation of animal models for the study of exercise-induced muscle enlargement." J Appl Physiol **69**(6): 1935-45.
- Tiranti, V., K. Hoernagel, et al. (1998). "Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency." Am J Hum Genet **63**(6): 1609-21.
- Tolbert, N. E. and E. Essner (1981). "Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes." J Cell Biol **91**(3 Pt 2): 271s-283s.
- Tonkonogi, M., B. Harris, 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 K. Sahlin (2002). "Physical exercise and mitochondrial function in human skeletal muscle." Exerc Sport Sci Rev **30**(3): 129-37.
- Tonkonogi, M., B. Walsh, et al. (1999). "Mitochondrial function in human skeletal muscle is not impaired by high intensity exercise." Pflugers Arch **437**(4): 562-8.
- Tunstall, R. J., K. A. Mehan, et al. (2002). "Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle." Am J Physiol Endocrinol Metab **283**(1): E66-72.

- Valnot, I., J. C. von Kleist-Retzow, et al. (2000). "A mutation in the human heme A:farnesyltransferase gene (COX10) causes cytochrome c oxidase deficiency." Hum Mol Genet **9**(8): 1245-9.
- Van der Meulen, J. H., H. Kuipers, et al. (1991). "Relationship between exercise-induced muscle damage and enzyme release in rats." J Appl Physiol **71**(3): 999-1004.
- Van Goethem, G., B. Dermaut, et al. (2001). "Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions." Nat Genet **28**(3): 211-2.
- Vavvas, D., A. Apazidis, et al. (1997). "Contraction-induced changes in acetyl-CoA carboxylase and 5'-AMP-activated kinase in skeletal muscle." J Biol Chem **272**(20): 13255-61.
- Vega, R. B., J. M. Huss, et al. (2000). "The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes." Mol Cell Biol **20**(5): 1868-76.
- Venditti, P. and S. Di Meo (1997). "Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats." Int J Sports Med **18**(7): 497-502.
- Vina, J., A. Gimeno, 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**(6): 539-44.
- Vina, J., J. Sastre, et al. (1995). "Assay of blood glutathione oxidation during physical exercise." Methods Enzymol **251**: 237-43.
- Vina, J. R., P. Blay, et al. (1990). "Inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase decreases amino acid uptake in human keratinocytes in culture." FEBS Lett **269**(1): 86-8.
- Virbasius, J. V. and R. C. Scarpulla (1994). "Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(4): 1309-13.
- Voytik, S. L., M. Przyborski, et al. (1993). "Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscles." Dev Dyn **198**(3): 214-24.
- Walsh, B., M. Tonkonogi, et al. (2001). "Effect of eccentric exercise on muscle oxidative metabolism in humans." Med Sci Sports Exerc **33**(3): 436-41.
- Warburton, D. E., C. W. Nicol, et al. (2006). "Health benefits of physical activity: the evidence." Cmaj **174**(6): 801-9.
- Warner, B. B., L. Stuart, et al. (1996). "Redox regulation of manganese superoxide dismutase." Am J Physiol **271**(1 Pt 1): L150-8.

- Wicks, K. L. and D. A. Hood (1991). "Mitochondrial adaptations in denervated muscle: relationship to muscle performance." Am J Physiol **260**(4 Pt 1): C841-50.
- Williams, R. S. (1986). "Mitochondrial gene expression in mammalian striated muscle. Evidence that variation in gene dosage is the major regulatory event." J Biol Chem **261**(26): 12390-4.
- Williams, R. S., M. Garcia-Moll, et al. (1987). "Adaptation of skeletal muscle to increased contractile activity. Expression nuclear genes encoding mitochondrial proteins." J Biol Chem **262**(6): 2764-7.
- Williams, R. S., S. Salmons, et al. (1986). "Regulation of nuclear and mitochondrial gene expression by contractile activity in skeletal muscle." J Biol Chem **261**(1): 376-80.
- Willis, W. T. and M. R. Jackman (1994). "Mitochondrial function during heavy exercise." Med Sci Sports Exerc **26**(11): 1347-53.
- Winder, W. W., K. M. Baldwin, et al. (1975). "Exercise-induced increase in the capacity of rat skeletal muscle to oxidize ketones." Can J Physiol Pharmacol **53**(1): 86-91.
- Winder, W. W. and D. G. Hardie (1996). "Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise." Am J Physiol **270**(2 Pt 1): E299-304.
- Wong, S. H., J. A. Knight, et al. (1987). "Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct." Clin Chem **33**(2 Pt 1): 214-20.
- Wu, Y., P. Delerive, et al. (2002). "Requirement of helix 1 and the AF-2 domain of the thyroid hormone receptor for coactivation by PGC-1." J Biol Chem **277**(11): 8898-905.
- Wu, Z., P. Puigserver, et al. (1999). "Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1." Cell **98**(1): 115-24.
- Xia, Y., L. M. Buja, et al. (1998). "Activation of the cytochrome c gene by electrical stimulation in neonatal rat cardiac myocytes. Role of NRF-1 and c-Jun." J Biol Chem **273**(20): 12593-8.
- Xia, Y., L. M. Buja, et al. (1997). "Electrical stimulation of neonatal cardiomyocytes results in the sequential activation of nuclear genes governing mitochondrial proliferation and differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11399-404.
- Yan, Z., S. Salmons, et al. (1996). "Increased contractile activity decreases RNA-protein interaction in the 3'-UTR of cytochrome c mRNA." Am J Physiol **271**(4 Pt 1): C1157-66.
- Zong, H., J. M. Ren, et al. (2002). "AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 15983-7.

