

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

EFECTOS MUSCULARES Y HEMATOLÓGICOS DEL USO DE rHuEpo EN COMBINACIÓN CON EL ENTRENAMIENTO FÍSICO. IMPLICACIONES DE LA DEMOSPRESINA Y LA HIPOXIA EN EL DOPAJE SANGUÍNEO. ESTUDIOS *IN VIVO* E *IN VITRO*.

VLADIMIR ESSAU MARTÍNEZ BELLO

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 5 de maig de 2011 davant un tribunal format per:

- Dr. Juan Sastre Belloch
- Dra. Ylva Hellsten
- Dr. Jose Antonio López Calbet
- Dr. Josep Antoni Tur Marí
- Dra. Consuelo Borrás Blasco

Va ser dirigida per:

Dr. José Viña Ribes

Dr. Federico V. Pallardó Calatayud

Dra. M^a Carmen Gómez Cabrera

©Copyright: Servei de Publicacions
Vladimir Essau Martínez Bello

Dipòsit legal: V-478-2012

I.S.B.N.: 978-84-370-8203-5

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Fisiología



**EFFECTOS MUSCULARES Y HEMATOLÓGICOS
DEL USO DE rHuEpo EN COMBINACIÓN CON
ENTRENAMIENTO FÍSICO. IMPLICACIONES DE
LA DESMOPRESINA Y LA HIPOXIA EN EL
DOPAJE SANGUÍNEO. ESTUDIOS *IN VIVO* E *IN
VITRO*.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Vladimir Essau Martínez Bello

Dirigida por:

Prof. D. José Viña Ribes
Prof. D. Federico Pallardó Calatayud
Prof. Dña. Mari Carmen Gómez Cabrera

Valencia, 2011

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación obtenida de los siguientes proyectos:

- Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2007-65 803/BFI)
- Consejo Superior de Deportes (24/UPB20/07 y 35/UPB20/08)
- Instituto de Salud Carlos III (ISCIII2006-RED13-027)
- Ayuda para la Formación de Personal Investigador de carácter Predoctoral Programa “V Segles” Modalitat V Segles - Empresa. Universidad de Valencia.

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

Prof. **D. Federico Pallardó Calatayud**, 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 Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que D. Vladimir Essau Martínez Bello, Profesional en Cultura Física, Deporte y Recreación por la Universidad Santo Tomás, Bucaramanga (Título homologado por el MEC al de Licenciado en Ciencias de la Actividad Física y del Deporte), ha realizado bajo su dirección la presente tesis titulada:

EFFECTOS MUSCULARES Y HEMATOLÓGICOS DEL USO DE rHuEpo EN COMBINACIÓN CON ENTRENAMIENTO FÍSICO. IMPLICACIONES DE LA DESMOPRESINA Y LA HIPOXIA EN EL DOPAJE SANGUÍNEO. ESTUDIOS *IN VIVO* E *IN VITRO*.

para la obtención del título de Doctor.

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

Valencia, a 10 de Enero de 2011

Fdo. Prof. D. José Viña Ribes

Fdo. Federico Pallardó Calatayud

Fdo. Prof. Dña. Mari Carmen Gómez Cabrera

***A MIS PADRES,
JOSÉ MARÍA Y MARÍA ZORAYDA***

AGRADECIMIENTOS

“No me llames extranjero, ni pienses de donde vengo, mejor saber dónde vamos, a donde nos lleva el tiempo”.

Alberto Cortez.

Siempre he creído que los Agradecimientos son la parte más importante de una Tesis. Y ésta no es la excepción. En ésta se materializa que el resultado no ha sido solo el fruto de mi trabajo, sino de las pequeñas grandes contribuciones de todos aquellos que han compartido conmigo estos cinco años. Nunca en todo este tiempo las personas y los pasillos del Departamento de Fisiología me han hecho sentir extranjero, por eso, gracias a todos.

En especial, quiero agradecer a los directores de esta Tesis, al Dr. José Viña, al Dr. Federico Pallardó y a la Dra. Mari Carmen Gómez por haber dirigido y acompañado este proceso de formación.

Al **Dr. Viña**, gracias por haberme dado la oportunidad de ser parte de un equipo serio y comprometido con la búsqueda de la verdad. La claridad de las hipótesis y eso de “qué pregunta le hago hoy a la naturaleza” es una forma bonita y correcta de enseñar a investigar.

Al **Dr. Pallardó**, por estar atento a la colaboración con la financiación y los trámites administrativos de mí beca. El apoyo en todas las fases de la Tesis ha sido inmejorable.

A **Mery**, gracias infinitas. Eres la científica más importante que he conocido. Le has dado un vuelco total a mi formación. Has sido una maestra, una guía. Seriedad, rigor y entereza han sido los factores comunes del día a día en el laboratorio. Para mí te has convertido en el ejemplo perfecto a seguir y en la clara demostración que nuestra carrera está aún más vigente que nunca. Me has abrigado durante estos cinco años, me has abierto las puertas de tu casa y aún recuerdo con mucha pero mucha alegría la primera cena de grupo en tu hogar. A partir de ahí, mi vida cambió.

Al **Dr. Sastre**, por haber sido un ejemplo de dedicación a la investigación en los primeros años de mi Tesis. A los dos **Javi** y a **Pain** por los buenos momentos en el laboratorio. A **Alex** por los consejos puntuales sobre ciencia; algún día de estos te daré el autógrafo de ya sabes quién.

Al **Dr. Antonio Alberola**, a quien cuando hace ya 5 años le pregunté que había venido a España a hacer investigación, me dijo que había dos sitios para hacerlo, y obviamente recomendó el mejor. La palabra tutor para usted Dr. Alberola, queda pequeña comparada con la correcta y amigable forma de orientar mi formación dentro y fuera de la Universidad. Aún estoy preguntando qué es eso de hacer la pelota, algún día lo sabré.

Quiero agradecer de forma especial a la **Universidad de Valencia** quien ha permitido materializar mi formación educativa llenando un vacío intelectual. Especialmente al **Patronat Sur-Nord de la Fundació General de la Universidad de Valencia** por el importante apoyo económico recibido al inicio del Doctorado. Al **Vicerrectorado de Cultura de la Universidad de**

Valencia y al **Colegio Mayor Luis Vives**, quienes rescataron mi esperanza en julio de 2006 cuando me notificaron que había sido beneficiario de una beca para estudiantes de países en vía de desarrollo. Gracias al Colegio Mayor Luis Vives por haber sido mi hogar durante esos 9 meses. Al **Vicerrectorado de Política Científica**, quien financió mi beca predoctoral, y sin la cual hubiese sido muy difícil haber terminado esta bonita etapa.

A **Alejandro Aznar** y a **EPICA** (Empresa de Productos de Investigación y Ciencias Aplicadas) por haber colaborado con la financiación de mi beca predoctoral durante este tiempo. Alejandro, eres una buena persona y muy trabajadora. Personas y Empresas como la tuya son orgullo de pocos.

I would like to thank to the **Department of Exercise and Sport Sciences of University of Copenhagen** for the kind treatment during my three months there. Specially, I want to thank to **Dra. Ylva Hellsten** for teach me a different way to do experimental research. During this time in your lab You have changed my mind. Thanks **Dr. Pilegaard** for your collaboration in the experiments performed. I would like to thank to **Karina** and **Gemma** for showing me all skeletal muscle cell culture and PCR. Thanks **Anne** for let me stay in your home during this time.

A **Lele** gracias, que desde el primer momento cuando el Dr. Alberola te dijo que me cuidarás lo hiciste sin dudar. Lele, para mí fue muy importante que me hubieses abierto las puertas de tu casa, involucrándome como uno más de los tuyos. Las cenas en tu piso para paliar la primera soledad del 2006 se borraron con tu cariño y cercanía. Las bases de mi formación experimental las diste tú, qué

afortunado he sido. A **Victor**, Letrado, por ser de tan gran corazón como tu esposa. A los dos gracias.

A **Fabian**. Compañero de banco, compañero de silla, compañero de congresos, de coche, de viajes, etc, pero sobre todo, amigo. Son tantas cosas en estos años que sería imposible recordarlas todas. Xátiva y Rovereto fueron una muestra de ello. Que gracioso y que bien lo pasamos. Seguro hay que repetirlo. Las charlas de cómo falla el “Sistema del deporte” han sido supremamente agradables. Si me preguntan durante este tiempo con quien he creado una amistad fuerte y duradera, ésta ha sido contigo. Tienes el corazón más grande de España. La financiación de mi beca fue fruto de tu gestión, gracias.

A **Anita**, compartimos tantas cosas. Vivimos procesos algo similares. Fuera de casa, lejos de los nuestros, pero al final lo logramos. Fuimos capaces, lo hicimos. Las horas de entrenamiento, el piso compartido, el viaje a Sevilla, los cafés, todo. Eres una buena profesional y estupenda madre. Estamos para comernos el mundo.

A **Marco**, has sido uno de los primeros en demostrar que nuestra carrera vale. Gracias por compartir tu amistad conmigo durante este tiempo.

A los franceses “cocineros” y compañeros de piso, **Jean Louis** y **Thomas. Frederic**, eres el futuro de la investigación; Robespierre estaría orgulloso. Recuerda que mantengo el título de campeón en baloncesto y creo que no me lo arrebatarás. Los tios del bar “pero eres negro tio”, la de la “mezcla” de marineros portugueses, que bueno fue eso; “Cristiania” y la facilidad de maniobrar la bici desde Radmusplasen hasta el piso, nos dieron el doctorado. Spetses fue la cima. Gracias por ser

transparente, no sabes eso como se agradece. A **Thomas**, el último compañero de piso en la elaboración de esta Tesis. Estoy pensando apuntarme a como se llame lo que practicas los martes y jueves por la noche. Ahora en serio, eres un buen chaval; inicias con ánimo y eso es más que suficiente al emprender esta carrera. A los “Tigers”, **Ernesto** y **Enrique** por haber puesto un pedacito del Caribe en tierras lejanas. A la nueva generación del grupo, **Sandrita**, **Rebeca**, **Beatriz** y **Helios**. Cagigal seguro estaría muy orgulloso de todos ustedes. Son el presente y el futuro de la demostración que nuestra carrera está colmada de gente lista y trabajadora. A **Sandrita**, mira que te conocí en cuarto año y ya estás que terminas el Master. Sabes que cuentas conmigo y ánimo, mucho ánimo que el futuro se construye aquí y ahora. Recuerda que somos más que saltar, nadar y correr, y eso lo es todo.

A **Chelo**, por la presencia cercana y amable que has tenido conmigo en todo este tiempo. A **Juan**, colaborador innato, esto en ciencia se agradece mucho. Gracias por las risas diarias. A **Raúl**, por haber compartido alegrías durante este tiempo. Iniciamos casi al mismo tiempo y terminamos casi igual. Somos contemporáneos y el mundo se nos abre. Vamos por él. A **Ruben**, por los buenos momentos en los primeros años. A **Gloria**, **Mariya**, **Khira**, **Mar** y **Vicent**, porque la presencia de ustedes hace más amenas las tardes en el laboratorio.

A **Consuelo**, gracias por tu colaboración en el proceso experimental y por tu constante cercanía durante todo este tiempo.

A **Jose Luis**, que haces ver la bioquímica mucho más fácil de lo que es. A tu lado se aprende mucho. Contar

con tu amistad es agradable. A **Carme**, gracias por las risas y los buenos momentos. A todo el Ciberer, **Amparo, Ana, Gemma e Isabel**, que lo juro, todo lo que nos prestan lo devolvemos.

A **Ángel Ortega**, gracias porque sin ti no hubiese sobrevivido esos tres meses en Dinamarca. Eres muy majo. La fiesta del primero de mayo y el paseo del Tivoli parecen que hubiese sido ayer.

A los miembros del **Animalario** gracias porque la diligencia por hacer las cosas mejor día a día se vio reflejado en el trabajo experimental. A **Ana e Inma**, que me enseñaron con el ejemplo que otro trato a los animales es posible.

A **Ana, Jelena y Nancy** por la compañía en este proceso. A **Esther**, la última incorporación, por los buenos consejos en la última fase de esta Tesis.

Al **Dr. Such**, y su grupo, **Luis, Germán, Laia y Manolo**. Más de una sonrisa hemos compartido durante este tiempo. Al **Dr. Argimiro Rodríguez** porque sin la creación del Programa de Doctorado que dirige, el cuál llamó mi atención hace 6 años, no me hubiese decidido venir a Valencia a iniciar mi carrera investigadora. Al **Dr. Antonio Iradi**, gracias no solo por el compromiso en el aprendizaje de la Estadística, el trato amable en los pasillos del Departamento, sino también por la colaboración que recibí durante este tiempo de parte del Servicio de Educación Física y Deporte que dirige. A **Eva, Elena y Mari**, porque el significado etimológico de la palabra burocracia, buro: escritorio y cracia: poder, lo han ejercido en el buen sentido de la palabra: El poder desde el escritorio para hacer las cosas más fáciles en cada momento. La

información, la claridad y la colaboración durante este tiempo han hecho el trabajo más fácil. A **Inma**, porque tus charlas matutinas rompieron el esquema diario tradicional, qué amable eres. A los demás **miembros del Departamento de Fisiología**, gracias.

Al **Colegio de Árbitros de Voleibol de Valencia** por haberme dado la oportunidad de trabajar cuando lo necesité en 2006. Quiero agradecer a la sociedad Española y en especial a la sociedad Valenciana por haberme recibido con trato digno y elegante.

A la Rea, **Diego**, mano, estamos fuertes como siempre y si las cuentas me cuadran, somos amigos desde los trece años y eso es más que la mitad de nuestras vidas. Al Ingeniero, **Alexis**, hemos compartido grandes cosas, ojalá nuestra amistad siga siendo fuerte.

A mi Hermosa, **Ángela**, mi compañera de viaje de siempre. Desde la distancia y desde el último año aquí en Valencia has vivido conmigo cada instante del desarrollo de este trabajo. Te has vuelto una experta en ver manchitas, sabes de hipoxia tanto como yo y me has puesto tu hombro en los momentos más difíciles. Cuando me dijiste en el Café hace cinco años que nunca estaría sólo, era verdad Hermosa, nunca lo he estado, tú has estado ahí. Seguimos juntos y lo estaremos por siempre. Este viaje no ha hecho sino empezar. Eres la mujer de mi vida y tienes mi alma.

A **Dany**, mi hermano, esta Tesis tiene mucho de ti. Si no hubiese sido por tu ejemplo no me habría involucrado con la investigación. Este triunfo es tan mío como tuyo. Cuando estabas en Hasselt también estabas aquí, motivándome, empujándome. Te quiero Dany y como

dices, cuando el mundo empiece a acabarse nosotros estaremos de vuelta. A **Olga** y **Sarita**, un beso fuerte.

A **Tatis**, mi hermanita, hemos vivido experiencias distintas pero significativas. Desde el segundo año eres el apoyo cercano de la familia. Nuestras vidas han mejorado en estos últimos años, ahora todo es distinto y es un triunfo, todo mejora. Te quiero Tatis, y ahí estamos, y vamos por buen camino. A **Raúl**, estoy pensando en mejorar los regalos de navidad, pero no te aseguro mucho. Un abrazo.

Y quiero agradecer con el corazón en la mano a dos personas muy importantes en mi vida: Mi Papi **José María** y mi Mami **María Zorayda**. Ustedes han sido los artífices de que este sueño, el sueño de convertirme en Doctor se haga realidad. Este sueño ha sido posible a la disciplina, al hábito, a la entrega, a la responsabilidad, y a la búsqueda constante del cariño de hacer siempre aquello que se quiere y que me gusta, pero sobre todo al haber creado y estructurado en mí, un proyecto de vida. Hoy es el día más importante de mi vida, y ustedes dos sólitos, como cuando empezaron desde cero, lo lograron. Los amo, un abrazo rompe huesos y nos amamos.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

I. Introducción.....	1-86
1. El papel fisiológico de la eritropoyetina.....	1-10
1.1 El gen de la eritropoyetina.....	1
1.2. Papel de la Epo en células no eritroides.....	4
1.3. Acciones biológicas de la Epo en el músculo esquelético.....	5
1.4. Administración de eritropoyetina recombinante (rHuEpo) y aumento de la capacidad de transporte de oxígeno.....	7
1.5. Tratamiento con rHuEpo, aumento del hematocrito y viscosidad de la sangre.....	8
2. Regulación de la biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético.....	11-20
2.1 PGC-1 α : Coactivador 1 α del receptor γ activado por proliferación del peroxisoma.....	12
2.2 PGC-1 α y su papel en la regulación de la defensa antioxidante.....	13
2.3 Factor respiratorio nuclear 1 (NRF-1).....	16
2.4 Factor de transcripción mitocondrial A. Expresión del DNA mitocondrial.....	17
2.5 Citocromo C.....	19

3. Factores reguladores miogénicos.....	20-21
4. Hipoxia.....	22-42
4.1 Definición.....	22
4.2 Factor inducible por hipoxia: HIF-1.....	23
4.2.1 Genes regulados en respuesta a la reducción de oxígeno disponible.....	25
4.2.2 Piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK-1)...	27
4.3 PGC-1 α y HIF-1 α	28
4.4 Hipoxia y ejercicio físico.....	29
4.4.1 Hipoxia y adaptaciones hematológicas en roedores.....	29
4.4.2 Uso de sistemas de altitud en el deporte. La hipoxia orientada a mejorar el rendimiento físico.....	30
5. Uso de sustancias y métodos prohibidos por la Agencia Mundial Antidopaje (AMA).....	43-55
5.1 La lista de sustancias y métodos prohibidos en el deporte.....	43
5.2 El Sistema Mundial Antidopaje y la lucha contra el dopaje sanguíneo.....	44
5.2.1 Métodos directos e indirectos de detección del dopaje sanguíneo.....	45
5.2.2 El pasaporte biológico.....	48
5.2.3 Expansores de volumen plasmático.....	51
5.2.4 La hormona antidiurética (ADH) y la desmopresina.....	52

6. Radicales libres.....	56-70
6.1 Concepto de radical libre.....	56
6.2 Clases de radicales libres.....	57
6.3 Génesis de las ERO.....	58
6.3.1 Fuentes exógenas.....	59
6.3.2 Fuentes endógenas.....	60
6.3.2.1 La cadena de transporte electrónico mitocondrial.....	60
6.3.2.2 Reacción de Fenton-Haber-Weiss.....	64
6.4 Estrés oxidativo.....	66
6.4.1 Concepto de estrés oxidativo.....	66
6.4.2 Estrés oxidativo y daño a biomoléculas.....	66
6.4.2.1 Daño oxidativo a lípidos.....	67
6.4.2.2 Daño oxidativo a proteínas.....	69
6.4.2.3 Daño oxidativo al ADN.....	70
7. Antioxidantes.....	71-86
7.1 Concepto de antioxidante.....	71
7.2 Antioxidantes enzimáticos.....	72
7.2.1 Superóxido dismutasa.....	72
7.2.2 Glutación peroxidasa.....	73
7.2.3 Catalasa.....	74
7.3 Hipoxia y estrés oxidativo.....	75
7.3.1 Posibles mecanismos responsables del incremento en la producción de radicales libres con relación a la hipoxia.....	76
7.3.1.1 Ejercicio físico.....	76

7.3.1.2 Rayos ultravioleta.....	76
7.3.1.3 Ausencia de dieta antioxidante.....	77
7.3.1.4 Fuentes endógenas de producción de radicales libres en situaciones de hipoxia.....	77
7.3.1.4.1 Mitocondria.....	77
7.3.1.4.2 Fenómeno de isquemia – reperfusión..	78
7.3.1.4.3 Xantina oxidasa.....	79
7.4 Efecto de la exposición a la hipoxia en diferentes marcadores de daño oxidativo.....	80
7.4.1 Estudios en animales.....	80
7.4.2 Estudios en seres humanos.....	82
II. Objetivos.....	87-88
III. Materiales y Métodos.....	89-135
1. Materiales.....	89-114
1.1. Estudios en animales de experimentación.....	90
1.1.1. Estudio sobre el efecto de un tratamiento con rHuEpo en diversas adaptaciones musculares y hematológicas en animales de experimentación.....	90
1.1.1.1 Animales de experimentación.....	90
1.1.1.2 Diseño experimental del tratamiento con rHuEpo.....	90
1.1.1.3 Extracción de muestras de sangre y tejidos.....	91

1.1.2 Estudio sobre el efecto de un protocolo de hipoxia intermitente normobárica, en combinación con entrenamiento anaeróbico, sobre diversos parámetros hematológicos, musculares y de rendimiento físico en animales de experimentación.....	92
1.1.2.1 Animales de experimentación.....	92
1.1.2.2 Protocolo de hipoxia intermitente normobárica.....	93
1.1.2.3 Estudio sobre el efecto del entrenamiento anaeróbico en la capacidad máxima aeróbica.....	93
1.1.2.4 Extracción de muestras de sangre y tejidos.....	94
1.1.2.5 Sacrificio de los animales.....	95
1.1.3 Estudio sobre el efecto de dos tratamientos con rHuEpo, y un protocolo de hipoxia intermitente normobárica, sobre las adaptaciones hematológicas en animales de experimentación.....	96
1.1.3.1 Animales de experimentación.....	96
1.1.3.2 Protocolo de hipoxia intermitente normobárica y tratamientos con rHuEpo....	96
1.1.4 Estudio sobre el efecto de un protocolo de hipoxia intermitente normobárica en parámetros hematológicos después de la	

administración de rHuEpo en animales de experimentación.....	97
1.1.4.1 Animales de experimentación.....	97
1.1.4.2 Tratamiento con rHuEpo y posterior protocolo de hipoxia intermitente normobárica	98
1.1.4.3 Muestras de sangre.....	99
1.1.4.4 Sacrificio de los animales.....	101
1.2 Estudio en seres humanos.....	101
1.2.1 Estudio del efecto de un tratamiento con desmopresina sobre los parámetros hematológicos utilizados para detectar el dopaje sanguíneo.....	101
1.2.1.1 Seres humanos.....	101
1.2.1.2 Diseño experimental.....	102
1.3 Estudio <i>in vitro</i> . Papel de las especies reactivas del oxígeno y PGC-1 α en la regulación por contracción de la inducción de MnSOD en músculo esquelético de ratón.....	104
1.3.1 Ratones.....	104
1.3.2 Aislamiento y cultivo primario de células musculares de ratón.....	105
1.3.3 Protocolo de estimulación eléctrica.....	106
1.3.4 Protocolo agudo de electroestimulación en presencia o ausencia de antioxidantes....	106

1.3.5	Protocolo de electroestimulación repetida en presencia o ausencia de antioxidantes....	107
1.4	Aparatos.....	107
1.5	Reactivos.....	111
2.	Métodos.....	114-135
2.1	Protocolo para determinar la capacidad máxima aeróbica en ratas.....	114
2.2	Determinación de Eritropoyetina.....	115
2.2.1	Fundamento.....	115
2.2.2	Preparación de la muestra.....	116
2.2.3	Procedimientos y cálculos.....	116
2.3	Determinación de hemoglobina, hematocrito y % reticulocitos.....	117
2.4	Determinación del índice de estimulación eritrocitario.....	117
2.5	Determinación de creatinina, albúmina, proteínas totales y glucosa.....	118
2.6	Extracción de proteínas a partir de tejido muscular.....	118
2.6.1	Fundamento.....	118
2.6.2	Protocolo.....	119
2.6.3	Cuantificación.....	120
2.7	Método para determinar la concentración de proteínas: método de Lowry.....	120
2.7.1	Fundamento.....	120
2.7.2	Reactivos.....	121
2.7.3	Procedimiento.....	121

2.7.4 Cálculos.....	121
2.8 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) y posterior Western Blotting.....	122
2.8.1 Fundamento.....	122
2.8.2 Condiciones del gel y transferencia.....	123
2.8.3 Visualización.....	124
2.9 Determinación de la actividad citrato sintasa (E.C. 2.3.3.1).....	126
2.9.1 Reactivos.....	126
2.9.2 Procedimiento de homogenización.....	127
2.9.3 Medición de la actividad.....	127
2.9.4 Cálculos.....	128
2.10 Aislamiento de RNA de las células de músculo esquelético de ratón.....	128
2.10.1 Procedimiento.....	129
2.10.2 Cuantificación de la concentración de RNA.....	129
2.10.3 Síntesis de cDNA: Retrotranscripción (RT).....	130
2.10.4 Amplificación cuantitativa del RNA (RT-PCR en tiempo real).....	131
2.11 Determinación extracelular de especies reactivas del oxígeno en células musculares de ratón en cultivo.....	133
3. Análisis estadístico de los resultados.....	134-135

IV. Resultados.....	136-187
1. Estudio sobre el efecto de un tratamiento con rHuEpo, durante dos semanas, en diversas adaptaciones musculares y hematológicas en animales de experimentación.....	136-149
1.1 Adaptaciones hematológicas en animales de experimentación.....	137
1.2 Expresión de proteínas relacionadas con la biogénesis mitocondrial en músculo esquelético de rata.....	141
1.2.1 Efecto de un tratamiento con rHuEpo durante dos semanas en la expresión de PGC-1 α , NRF-1 y mTFA en músculo sóleo de rata.....	142
1.2.2 Efecto de un tratamiento con rHuEpo durante dos semanas en la expresión de citocromo C en músculo sóleo de rata.....	143
1.3 Expresión del factor de crecimiento vascular endotelial en músculo esquelético de ratas....	144
1.4 Expresión de factores reguladores miogénicos en músculo esquelético de ratas.....	146
1.4.1 Efecto de un tratamiento con rHuEpo durante dos semanas en la expresión de MyoD y Myf5 en músculo gastrocnemio y sóleo de rata.....	146

1.5	Velocidad máxima aeróbica en animales de experimentación.....	148
2.	Estudio del efecto de un protocolo de hipoxia intermitente normobárica, en combinación con entrenamiento anaeróbico, sobre diversos parámetros hematológicos, musculares y de rendimiento físico en animales de experimentación.....	149-163
2.1	Adaptaciones hematológicas en animales de experimentación.....	150
2.2	Adaptaciones en músculo esquelético, en animales de experimentación.....	153
2.2.1	Expresión de PDK-1 en músculo gastrocnemio rojo de rata.....	154
2.2.2	Inducción de la defensa antioxidante enzimática y de las proteínas de respuesta a estrés en animales de experimentación.....	155
2.2.2.1	Expresión de Hsp70 en músculo gastrocnemio rojo de rata.....	156
2.2.2.2	Expresión de MnSOD en músculo gastrocnemio rojo y blanco de rata.....	157
2.2.3	Inducción de proteínas relacionadas con el proceso de biogénesis mitocondrial.....	159
2.2.3.1	Expresión de PGC-1 α en músculo	

gastrocnemio rojo y blanco de rata.....	159
2.2.3.2 Expresión de citocromo C en músculo de rata.....	160
2.2.3.3 Actividad de la enzima citrato sintasa en músculo gastrocnemio rojo de rata.....	162
2.2.4 Velocidad máxima aeróbica.....	163
3. Estudio comparativo del efecto de dos tratamientos con rHuEpo (300 UI y 500 UI), frente a un protocolo de hipoxia intermitente normobárica, sobre diversas adaptaciones hematológicas en animales de experimentación.....	164-167
3.1 Adaptaciones hematológicas con los distintos tratamientos	165
4. Estudio del efecto de un protocolo de hipoxia intermitente normobárica, sobre diversos parámetros hematológicos, tras la administración de rHuEpo en animales de experimentación.....	168-175
4.1 Adaptaciones hematológicas en animales de experimentación.....	169
4.2 Niveles de Epo en suero e índice de estimulación eritrocitario (OFF-Hr Score) tras la administración de rHuEpo.....	173

5. Estudio del efecto de un tratamiento con desmopresina (DDAVP) sobre los parámetros hematológicos utilizados para detectar el dopaje sanguíneo.....	176-181
5.1 Efecto de la administración de DDAVP, en las variables hematológicas monitorizadas por las autoridades antidopaje.....	177
5.2 Efecto del tratamiento con DDAVP en la concentración plasmática de albumina, proteínas totales, creatinina y glucosa.....	179
6. Estudio <i>in vitro</i>. Papel de las especies reactivas del oxígeno y PGC-1α en la regulación por contracción de la inducción de MnSOD en músculo esquelético de ratón.....	182-187
6.1 Efecto de la estimulación eléctrica en la oxidación extracelular de DCFH.....	182
6.2 Efecto de la estimulación eléctrica, y el tratamiento antioxidante, en la expresión de PGC-1 α y MnSOD.....	184
6.3 Efecto de la estimulación eléctrica repetida, y el tratamiento antioxidante, en la expresión a nivel de proteína de MnSOD.....	186

V. Discusión.....	188-234
Justificación del Estudio.....	188
1. Estudio del efecto de un tratamiento con rHuEpo en diversas adaptaciones musculares y hematológicas en animales de experimentación.....	192-202
2. Estudio del efecto de un protocolo de hipoxia intermitente normobárica en combinación con entrenamiento anaeróbico en diversos parámetros hematológicos, musculares y de rendimiento físico en animales de experimentación.....	202-210
3. Estudio del efecto de dos tratamientos con rHuEpo y un protocolo de hipoxia intermitente normobárica sobre las adaptaciones hematológicas en animales de experimentación.....	210-215
4. Estudio del efecto de un protocolo de hipoxia intermitente normobárica, en parámetros hematológicos, tras la administración de rHuEpo en animales de	

experimentación.....	216-222
5. Estudio del efecto de un tratamiento con desmopresina sobre los parámetros hematológicos utilizados para detectar el dopaje sanguíneo.....	222-227
6. Estudio <i>in vitro</i> . Papel de las especies reactivas del oxígeno y PGC-1 α en la regulación por contracción de la inducción de MnSOD en músculo esquelético de ratón.....	228-234
VI. Summary of Results and Discussion.....	235-288
Justification of the Study.....	235
1. Study of the effect of rHuEpo treatment on skeletal muscle adaptations in experimental animals.....	239-249
2. Study of the effect of intermittent normobaric hypoxia in combination with sprint interval training, on different hematological and skeletal muscle adaptations, in experimental animals.....	249-260

3. Study of the hematological modifications induced by two treatments with rHuEpo and comparison of both outcomes with a intermittent hypoxic protocol.....	260-265
4. Effect of intermittent hypoxia on hematological parameters after rHuEpo administration in an animal model...	266-273
5. Desmopressin, hemodilution and blood doping in sports. Study in humans.....	274-280
6. Role of reactive oxygen species and PGC-1α in the contraction induced expression of MnSOD in primary mouse skeletal muscle cell.....	281-288
VII. Conclusiones.....	289-293
VIII. Bibliografía.....	294-336

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

I. Introducción

Figura I.1. Estructura de la eritropoyetina.....4

III. Materiales y Métodos

Figura III.1. Diseño experimental del estudio.....100

Figura III.2 Cámara hipóxica normobárica marca Colorado
Altitude Training.....110

IV. Resultados

Figura IV.1. Volumen corpuscular medio (Panel A) y
amplitud de distribución de hematíes (Panel B) en ratas
tratadas con una dosis de 300 UI de rHuEpo durante dos
semanas.....139

Figura IV.2. Hhemoglobina corpuscular media en ratas
tratadas con una dosis de 300 UI de rHuEpo durante dos
semanas140

Figura IV.3. Niveles de concentración media de hemoglobina corpuscular en ratas tratadas con una dosis de 300 UI de rHuEpo durante dos semanas.....	141
Figura IV.4. Western Blot de PGC1- α , NRF-1 y mTFA en el músculo sóleo de rata después de dos semanas de tratamiento con rHuEpo.....	143
Figura IV.5. Western Blot de citocromo C en el músculo sóleo de rata después de dos semanas de tratamiento con rHuEpo.....	144
Figura IV.6. Western Blot de VEGF en músculo sóleo de rata después de dos semanas de tratamiento con rHuEpo.....	145
Figura IV.7. Western Blot de VEGF en músculo gastrocnemio de rata después de dos semanas de tratamiento con rHuEpo.....	145
Figura IV.8. Western Blot de Myf5, MyoD en músculo sóleo (A) y gastrocnemio (B) de rata después de dos semanas de tratamiento con rHuEpo.....	147
Figura IV.9. Efecto de un tratamiento con rHuEpo durante dos semanas en la velocidad máxima aeróbica.....	149

Figura IV.10. Concentración de hemoglobina en animales mantenidos en hipoxia o normoxia y entrenados durante un periodo de veintiún días.....	151
Figura IV.11. Valores de hematocrito en animales mantenidos en hipoxia o normoxia y entrenados durante un periodo de veintiún días.....	152
Figura IV.12. Niveles de Epo en plasma (mU/mL) en animales mantenidos en hipoxia o normoxia y entrenados durante un periodo de veintiún días.....	153
Figura IV.13. Western Blot de PDK-1 en músculo gastrocnemio rojo en animales mantenidos en hipoxia o normoxia y entrenados durante un periodo de veintiún días.....	155
Figure IV.14. Western Blot de Hsp70 en músculo gastrocnemio rojo en animales mantenidos en hipoxia o normoxia y entrenados durante un periodo de veintiún días.....	156
Figure IV.15. Western Blot de Mn-SOD en músculo gastrocnemio rojo y blanco en animales mantenidos en hipoxia o normoxia y entrenados durante un periodo de veintiún días.....	158
Figure IV.16. Western Blot de PGC1- α en músculo gastrocnemio rojo en animales mantenidos en hipoxia o	

normoxia y entrenados durante un periodo de veintiún días.....	160
Figure IV.17. Western Blot de citocromo C en músculo gastrocnemio rojo (A) y blanco (B) en animales mantenidos en hipoxia o normoxia y entrenados durante un periodo de veintiún días.....	161
Figure IV.18. Actividad citrato sintasa en músculo gastrocnemio rojo en animales mantenidos en hipoxia o normoxia y entrenados durante un periodo de veintiún días.....	162
Figura IV.19. Concentración de hemoglobina, perfiles individuales (A), medias (B) en grupos tratados con rHuEpo (300 UI y 500 UI) e hipoxia durante un periodo de quince días.....	165
Figura IV.20. Valores de hematocrito, perfiles individuales(A), medias (B) en grupos tratados con rHuEpo (300 UI y 500 UI) e hipoxia durante un periodo de quince días.....	166
Figura IV.21. Porcentaje de reticulocitos en grupos tratados con rHuEpo (300 UI y 500 UI) e hipoxia durante un periodo de quince días.....	167

- Figura IV.22. Concentración de hemoglobina en animales sometidos a hipoxia o normoxia y previamente tratados con rHuEpo durante un periodo de dos semanas.....170
- Figura IV.23. Valores de hematocrito en animales sometidos a hipoxia o normoxia previamente tratados con rHuEpo durante un periodo de dos semanas.....171
- Figura IV.24. Porcentaje de reticulocitos en animales sometidos a hipoxia o normoxia previamente tratados con rHuEpo durante un periodo de dos semanas.....172
- Figura IV.25. Niveles de eritropoyetina (mU/mL) en animales sometidos a hipoxia o normoxia y previamente tratados con rHuEpo durante un periodo de dos semanas.....173
- Figura IV.26. Creatinina, proteínas totales, albúmina y glucosa plasmática en grupos Agua y Agua + DDAVP.....181
- Figura IV.27. Niveles de fluorescencia de DCF en cultivo primario de células de músculo esquelético obtenidas de ratones silvestres y KO PGC-1 α184
- Figura IV.28. RT-PCR de PGC-1 α en cultivo primario de células de músculo esquelético obtenidas de ratones silvestres.....185

Figura IV.29. RT-PCR de MnSOD en cultivo primario de células de músculo esquelético obtenidas de ratones silvestres.....186

Figura IV.30. Efecto de la electroestimulación repetida durante cuatro días en la expresión a nivel de proteína de MnSOD en células de músculo esquelético obtenidas de ratones silvestres y KO PGC-1 α187

V. Discusión

Figura V.1. Factores que influyen en el aumento del volumen eritrocitario: Altitud, número de horas y frecuencia.....214

Figura V.2. Acción de la vasopresina, retención de líquidos y aumento del volumen sanguíneo.....227

VI. Summary of Results and Discussion

Figure VI.1. Western blot analysis of PGC-1 α , NRF-1, mTFA and cytochrome C in soleus muscle in rHuEpo treated rats.....240

Figure VI.2. Western blot analysis of VEGF in soleus (A) and gastrocnemius (B) muscle in rHuEpo treated rats.....
.....243

Figure VI.3. Western blot analysis of Myf5 and MyoD in soleus (A) and gastrocnemius muscle (B) in rHuEpo treated rats.....	245
Figure VI.4. Maximal aerobic velocity before and after rHuEpo treatment.....	247
Figure VI.5. Citrate synthase activity (C) and western blotting analysis of PGC-1 α (A) and cytochrome C (B) in the red gastrocnemius muscle in hypoxic and normoxic groups of rats trained for twenty-one.....	252
Figure VI.6. Western blotting analysis of PDK-1 in red gastrocnemius muscle in hypoxic and normoxic groups of rats trained for twenty-one days.....	254
Figure VI.7. Western blotting analysis of Hsp70 (A) and MnSOD (B) in red gastrocnemius muscle in hypoxic and normoxic groups of rats trained for twenty-one days.....	256
Figure VI.8. Western blotting analysis of cytochrome C (A) and MnSOD (B) in white gastrocnemius muscle in hypoxic and normoxic groups of rats trained for twenty-one days	257
Figure VI.9. Effect of living at high altitude in combination with sea level sprint training on hematological adaptations.....	259
Figure VI.10. Hemoglobin and hematocrit concentration in hypoxic and rHuEpo treated groups.....	263
Figure VI.11. Percentage of reticulocytes in hypoxic and rHuEpo treated groups.....	264

Figure VI.12. Hemoglobin concentration in hypoxic and normoxic groups of rats previously treated with rHuEpo during a period of two weeks	270
Figure VI.13. Percentage of reticulocytes in a hypoxic and a normoxic groups of rats previously treated with rHuEpo during a two weeks period.....	271
Figure VI.14. Hematocrit in hypoxic and normoxic groups of rats previously treated with rHuEpo during a period of two weeks.....	271
Figure VI.15. Serum Epo levels (mU/mL) in hypoxic and normoxic groups of rats previously treated with rHuEpo during a two weeks period.....	272
Figure VI.16. Plasma creatinine, albumin, proteins and glucose in Water and Water + DDAVP groups.....	280
Figure VI.17. DCF fluorescence in primary mouse skeletal muscle cells obtained from skeletal muscle of wild type (WT) and PGC-1 α knock-out (KO) mice.....	284
Figure VI.18. PGC-1 α and MnSOD mRNA content in primary mouse skeletal muscle cells obtained from WT animals.....	285
Figure VI.19. The effect of repeated electrostimulation during four days on MnSOD protein content in skeletal muscle cells isolated from WT and PGC-1 α KO mice.....	287

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

I. Introducción

Tabla I.1. Genes diana de HIF-1.....	26
Tabla I.2. Distintos protocolos de hipoxia intermitente. Efecto sobre diversas variables hematológicas y sobre el rendimiento.....	33
Tabla I.3. Pasaporte Biológico.....	50
Tabla I.4. Principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.....	58
Tabla I.5. Tipos de superóxido dismutasa.....	73

III. Materiales y Métodos

Tabla III.1. Diseño experimental. Número de animales por grupo.....	93
Tabla III.2. Protocolo de entrenamiento anaeróbico..	94
Tabla III.3. Diseño experimental. Número de animales por grupo.....	96

Tabla III.4. Características de los sujetos.....	103
Tabla III.5. Prueba para determinar la capacidad máxima aeróbica.....	115
Tabla III.6. Relación de Anticuerpos utilizados en la técnica de Western-Blot.....	125
Tabla III.7. Secuencia de los oligos y sondas TaqMan utilizados en la RT-PCR.....	133

IV. Resultados

Tabla IV.1. Concentración de hemoglobina y porcentaje de reticulocitos antes y después de dos semanas de tratamiento con rHuEpo.....	138
Tabla IV.2. Velocidad máxima aeróbica en animales mantenidos en hipoxia o normoxia y entrenados durante un periodo de veintiún días.....	163
Tabla IV.3. Índice de estimulación eritrocitario (OFF-Hr Score) en animales sometidos a hipoxia o normoxia previamente tratadas con rHuEpo durante un periodo de dos semanas.....	175
Tabla IV.4. Concentración de hemoglobina, valores de hematocrito, porcentaje de reticulocitos e índice OFF-Hr en grupos Agua y Agua + DDAVP.....	178

VI. Summary of Results and Discussion

Table VI.1. Hemoglobin concentration and percentage of reticulocyte before and after two weeks of rHuEpo treatment.....	246
Table VI.2. Maximal aerobic velocity before and after an intermittent normobaric hypoxic protocol combined with sprint interval training.....	251
Table VI.3. Effect of intermittent hypoxia and normoxia on the OFF-Hr Score.....	269
Table VI.4. Hemoglobin, hematocrit, reticulocyte and values of the OFF-Hr Score in Water and Water + DDAVP groups.....	278

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADH: Amplitud de distribución de los hematíes

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADP: Adenosín-5'-difosfato.

ADPI: Adenosín difosfato libre

AH₂: Aceptor reducido

AMA: Agencia Mundial Antidopaje

AMP: Adenosín-5'-monofosfato.

AMPc: Adenosín-5'-monofosfato cíclico

ANOVA: Análisis de la varianza

AQP2: Acuaporinas tipo 2.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ATP: Adenosín-5'-trifosfato.

BM: Biogénesis mitocondrial

BSA: Albúmina de Suero Bovino.

CINa: Cloruro sódico

CK: Creatin quinasa.

Cit C: Citocromo C

CoA: Coenzima A

Complejo TIM: Complejo receptor Translocasa de la membrana Interna mitocondrial

Complejo TOM: Complejo receptor Translocasa de la membrana Externa mitocondrial

COX: Citocromo oxidasa.

CR: Cociente respiratorio

CS: Citrato Sintasa.

Cu,Zn-SOD: Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc.

DCF: Diclorofluoresceína fluorescente

DCFH: Diclorofluoresceína no fluorescente

DCFH-DA: Diclorofluoresceína diacetato no fluorescente

DDAVP: 1 – Desamino – 8 - D-arginine vasopressin (Desmopresina)

DEPC: Dietil pirocarbonato

DNA: Ácido desoxirribonucleíco

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

DTT: DL-Ditiotreitol.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EIHN: Exposición a hipoxia intermitente normobárica

EIHH: Exposición a hipoxia intermitente hipobárica

Epo: Eritropoyetina

ERN: Especies Reactivas de Nitrógeno.

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno.

EVP: Expansores de volumen plasmático

FAD: Flavín adenín dinucleótido.

FDNB: 1-fluor-2,4-dinitrobenceno.

Fe⁺²: Ion ferroso

Fe⁺³: Ion férrico

Fe-SOD: Superóxido dismutasas dependientes de hierro.

mtDNA: Ácido desoxirribonucleíco mitocondrial

mTFA: Factor de transcripción mitocondrial A

NRF-1: Factor de respiración Nuclear 1

NRF-2: Factor de respiración Nuclear 2

GAPDH: Gliceraldehído-3-Fosfato deshidrogenasa.

GPx: Glutación peroxidasa.

GSH: Glutación reducido.

GSSG: Glutación oxidado.

HAD: Hormona antidiurética

Hb: Hemoglobina

Hcto: Hematocrito

HDL: High Density Lipoprotein

HIF-1: Factor Inducible por Hipoxia 1

HRE: Elemento de respuesta a hipoxia

Hsp70: Proteína de choque térmico 70

IU: International Units

KO: Knock-out (Deficiente).

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LDL: Low Density Lipoprotein

LHTL: Living high-training low

LHTLN: Living high-training-low normobaric

LHTHN: Living high-training-high normobaric

LHTH: Living high-training high

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

LPS: Lipopolisacárido.

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos.

MAV: Maximal aerobic velocity

MCAD: Acil CoA-deshidrogenasa de cadena media

MDA: Malondialdehído.

MET: Metabolic equivalent tasks.

mmHg: Milímetros de mercurio.

MnSOD: Superóxido dismutasa dependiente de manganeso

MOPS: Ácido propano sulfónico.

MRFs: Factores reguladores de la miogénesis

mtDNA: DNA mitocondrial.

mtRNA: RNA mitocondrial

NAC: N-acetilcisteína.

NAD: Nictotinamida adenin dinucleótido.

NEM: N-etilmaleimida.

NESP: Nueva proteína estimuladora de la eritropoyesis

NO•: Óxido nítrico.

NO₂•: Radical nitrógeno dióxido

NOS: Óxido nítrico sintasa (eNOS, NOS endotelial; iNOS, NOS inducible; nNOS, NOS neuronal)

NPII: Neurofisina

O₂: Oxígeno singlete.

O₂^{-•}: Anión superóxido.

OFF-Hr Score: índice de estimulación eritrocitario

OH•: Radical hidroxilo.

ONOO⁻: Peroxinitrito.

OR: Óxidoreductasa.

8oxodG: 8-hidroxi-2' deoxiguanosina:

p/v: peso/volumen.

PBS: Tampón fosfato salino.

PDK-1: Piruvato deshidrogenasa quinasa 1

PC: Fosfocreatina.

PDH: Piruvato deshidrogenasa

PDTC: Pirrolidin ditiocarbamato.

PI3K: fosfatidilinositol 3'quinasa

PFK: Fosfofructoquinasa.

PCG-1 α : Coactivador-1 α del receptor- γ activado por proliferación del peroxisoma, PPAR γ

PKC: Protein Kinasa C.

PHD: Prolilhidroxilasa

PLA2: Fosfolipasa A2.

PMSF: Fenil metil sulfonil fluoride.

PO₂: Presión parcial de Oxígeno.

Pol- γ : Polimerasa- γ

Ret: Reticulocitos

RL: Radicales libres.

rHuEpo: Eritropoyetina recombinante humana

R-COOH: Peróxido lipídico

ROO \bullet : Radical peroxilo.

RPE: Resonancia Paramagnética de electrones.

Rpm: Revoluciones por minuto.

RT: Retrotranscripción

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

SDS: Sodio dodecil sulfato

Se: Selenio.

Ser: Serina.

sGC: Guanilato ciclasa soluble

SOD: Superóxido dismutasa.

Sp1: Factor de transcripción selectivo del promotor 1

TADS: Dominios de transactivación

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

UCI: Unión Ciclista Internacional

UI: Unidades internacionales.

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

VM: Volumen minuto

VMA: Velocidad máxima aeróbica

v/v: volumen/volumen

VCM: Volumen corpuscular medio

VO_{2máx}: Consumo máximo de oxígeno.

VHL: Von Hippel Lindau

W: Watios.

WADA: World Antidoping Agency

XDH: Xantina deshidrogenasa.

XO: Xantina oxidasa.

XOR: Xantina oxidoreductasa.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. El papel fisiológico de la eritropoyetina

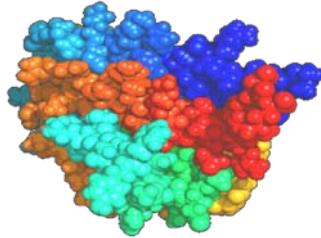
1.1 El gen de la eritropoyetina

Los fundamentos de nuestra comprensión actual de la función hormonal de la Epo fueron establecidos por una serie científicos franceses que visitaron América del Sur durante la segunda mitad del siglo XIX. Paul Bert y su colaborador Denis Jourdanet, mostraron que los efectos fisiológicos de los gases dependen de su presión parcial, y establecieron la relación entre la hipoxia tisular y la producción de eritrocitos. Se dieron cuenta de que los síntomas del mal de montaña que experimentaban los escaladores en los Andes y, de la anemia que sufrían los pacientes de Jourdanet en París, podrían atribuirse a la hipoxemia. En una visita a Perú en 1890, Viault extrajo muestras de sangre de sí mismo al nivel del mar en Lima, y, unas semanas más tarde, después de subir 5000m a Morococha, encontró un aumento sustancial en el recuento de células rojas. Más de un siglo antes, en 1774, Joseph Priestley había demostrado que el oxígeno es requerido tanto para el mantenimiento de la vida, como para la combustión, en su famoso experimento “ratón y

vela en una campana de vidrio". Posteriormente, hacia finales del siglo XIX, Louis Pasteur demostró un aumento importante en el consumo de hidratos de carbono a baja tensión de oxígeno. En este contexto y en concurrencia con el interés por los efectos de las hormonas, Carnot y Deflandre hipotetizaron en 1906 que un factor circulatorio, la hemopoyetina, era responsable de la producción de glóbulos rojos y que su concentración en la sangre aumentaba en respuesta a la anemia o a la altitud. El alusivo nombre hemopoyetina fue sustituido en 1948 por el término eritropoyetina (Epo). La Epo se produce en el riñón de adultos y en el hígado del feto en respuesta a la hipoxia (Jelkmann 1992; Maloyan, Eli-Berchoer y cols. 2005). Aunque sólo está presente en el plasma en concentraciones picomolar, la Epo regula la producción de aproximadamente 2.3 millones de células por segundo. El aislamiento de la Epo fue realizada por el grupo de Goldwasser en la Universidad de Chicago en 1977, siendo el resultado de un continuo esfuerzo que tuvo una duración de unos 20 años (Miyake, Kung y cols. 1977). Este notable logro allanó el camino para la clonación del gen de la Epo y la posterior producción de Epo para el tratamiento de pacientes con anemia por deficiencia de esta hormona. Esta investigación también proporcionó las herramientas necesarias para explorar la estructura de la molécula de Epo y su gama de funciones.

La eritropoyetina es una glucoproteína con un peso molecular de 30.4 kilodaltons. El 39% de su masa son hidratos de carbono. El gen de la Epo codifica una proteína precursora de 193 aminoácidos. La eliminación de una secuencia de 27 aminoácidos de carácter hidrofóbico produce una proteína madura que sufre N-glicosilación en tres residuos de asparagina en las posiciones de los aminoácidos 24, 38 y 83, y O-glicosilación a un residuo serina en la posición del aminoácido 126. La arginina del extremo C-terminal se retira, posiblemente por una carboxipeptidasa intracelular, para producir la forma final en circulación de 165 aminoácidos. La estructura terciaria de la Epo está compuesta por cuatro hélices α antiparalelas de lazos vecinos. Moléculas sencillas intactas se unen a dos receptores de eritropoyetina (EpoR) adyacentes en la membrana de las células diana y desencadenan una cascada de señalización intracelular que regula la supervivencia celular, la proliferación y la diferenciación.

Figura I.1. Estructura de la eritropoyetina



Una de las adaptaciones que mejora el rendimiento físico sobre el nivel del mar es un aumento en la capacidad de la sangre de transportar oxígeno a los tejidos, mediado por la regulación del gen de la eritropoyetina. No obstante en los últimos años, además de su potencial en la diferenciación de células eritroides también se han demostrado nuevas funciones relacionadas con el descubrimiento de EpoR en distintos tejidos.

1.2 Papel de la Epo en células no eritroides

Durante muchos años se pensó que la Epo actuaba exclusivamente en células eritroides progenitoras estimulando su crecimiento, previniendo su apoptosis e induciendo su diferenciación (Jelkmann 1992). Años más tarde, se detectaron EpoR por inmunohistoquímica en un amplio número de células entre las cuales se incluyen neuronas, astrocitos, microglia, corazón, diferentes líneas cancerígenas, y recientemente, en el músculo esquelético (Morishita, Masuda y cols. 1997; Acs y cols. 2001; Lundby, Hellsten y cols. 2008). Debido a su potencial

papel en diferentes escenarios, recientemente han aumentado las evidencias acerca de las distintas opciones terapéuticas de la Epo para optimizar el tratamiento de diversas patologías tales como: cáncer, infarto de miocardio y accidente cerebro-vascular entre otros (Lappin, Maxwell y cols. 2002; Rotter, Menshykova y cols. 2008).

1.3 Acciones biológicas de la Epo en el músculo esquelético

En un trabajo publicado en el año 2008 se demostró que la administración aguda de Epo recombinante aumentó la expresión a nivel de mRNA de la mioglobina, el factor regulador miogénico 4 (MRF4), así como el receptor de transferrina. Sin embargo, la administración crónica de la hormona no tuvo un efecto aparente ni en la capilarización, ni en la hipertrofia de fibras musculares (Lundby, Hellsten y cols. 2008). Por otro lado, se ha sugerido que la habilidad de la Epo para inducir la proliferación de células satélite en presencia de condiciones diferenciadoras, podría representar una novedosa herramienta para reparar el daño muscular (Scoppetta y Grassi 2004).

En este sentido se especula con la posibilidad de que la Epo recombinante, en el modelo animal, pueda jugar un papel importante en el tratamiento de distintas patologías. En 2009, Xiong y cols., demostraron que la administración de Epo recombinante mejoraba variables histológicas y funcionales después de una lesión cerebral (Xiong, Mahmood y cols. 2009). La hipótesis de este trabajo consistió en que el tratamiento con Epo tendría efectos beneficiosos incluso en ausencia de EpoR en neuronas. Se ha sugerido, tanto en el modelo animal como en el humano, que la administración continua de Epo recombinante genera un aumento de las variables hematológicas (Juel, Thomsen y cols. 2007; Sanchis-Gomar, Martínez-Bello y cols. 2009). De esta forma, el aumento de la capacidad de transporte y utilización de oxígeno podría jugar un papel relevante en los efectos beneficios del tratamiento con esta hormona. Sin embargo, recientemente Zhang y cols., encontraron que los efectos terapéuticos, a nivel histológico y funcional, de la administración de Epo recombinante, tras una lesión traumática cerebral en ratas, era independiente del incremento del hematocrito, sugiriendo de esta forma que el aumento en la capacidad de transporte de O_2 , al menos en neuronas no tendría efecto alguno (Zhang, Xiong y cols. 2009).

1.4 Administración de eritropoyetina recombinante (rHuEpo) y aumento de la capacidad de transporte de oxígeno

Existe suficiente evidencia de que el tratamiento con Epo aumenta distintos parámetros hematológicos tanto en roedores (Verbrugge y Goodnough 1994; Cayla, Maire y cols. 2008) como en humanos (Lundby, Thomsen y cols. 2007).

En los últimos años se ha sugerido que el aumento en la capacidad de transporte de oxígeno por la sangre, es un factor determinante para incrementar el rendimiento físico. En este proceso, la administración de rHuEpo juega un papel importante al aumentar el hematocrito (Lundby, Thomsen y cols. 2007). De hecho se ha demostrado que, en sujetos sanos, la administración de rHuEpo incrementa el consumo máximo de oxígeno (Lundby, Robach y cols. 2008). Similar observación había sido reportada con roedores sometidos a hipoxia durante catorce días (Fryers 1952; Garcia 1957) y en humanos tras ascender a grandes alturas (Pugh 1964).

Por otra parte, desde el punto de vista médico, a finales de la década de los 80, se demostró que la administración de Epo recombinante generaba beneficios terapéuticos en el tratamiento de ciertas anemias (Winearls, Oliver y cols.

1986; Bommer, Muller-Buhl y cols. 1987; Eschbach, Haley y cols. 1989) y que su administración en este tipo de pacientes resultaba en un aumento de la capacidad para realizar ejercicio (Mayer, Thum y cols. 1988). Berglund y cols., encontraron que la administración de rHuEpo durante seis semanas aumentaba los niveles de hemoglobina y hematocrito, sin aumentar la presión arterial sistólica y diastólica en condiciones de reposo. No obstante, observaron un importante aumento en la presión arterial sistólica en respuesta a un ejercicio submáximo (Berglund y Ekblom 1991).

1.5 Tratamiento con rHuEpo, aumento del hematocrito y viscosidad de la sangre

El uso de esta hormona en el campo deportivo ha tenido como objetivo aumentar el rendimiento físico de los deportistas. Sin embargo, a pesar del efecto positivo sobre el rendimiento, tratamientos crónicos de rHuEpo tienen riesgos para la salud. Se ha encontrado que aumenta la viscosidad de la sangre, genera trombosis e hipertensión (Raine 1988). Por esta razón, en 1990 el Comité Olímpico Internacional introduce la administración de la rHuEpo, dentro de la lista de sustancias prohibidas y por tanto perseguidas dentro de la cultura del juego

limpio, saludable y la ética deportiva. Sin embargo, a pesar de su prohibición, existe la creencia general popular que el aumento del hematocrito es un método valioso para incrementar el consumo máximo de oxígeno (Lundby, Robach y cols. 2008).

En 1994, Verbrugge y cols., encontraron que animales tratados durante cinco semanas con una dosis de 600 UI de Epo recombinante aumentaron el hematocrito y los niveles de hemoglobina (Verbrugge y Goodnough 1994). Sin embargo, y en contra de la idea *a priori* establecida, de que un incremento de la capacidad de transporte de oxígeno aumenta el rendimiento físico, este grupo de investigación demostró que los cambios en el hematocrito comparados con el cambio en el tiempo de carrera hasta el agotamiento mostraban una relación inversa. Estos resultados indican que una mayor policitemia puede generar una disminución en el rendimiento físico. El aumento de la viscosidad de la sangre parece que podría aumentar la resistencia vascular limitando el consumo máximo de oxígeno debido a una disminución del gasto cardiaco (Connes, Yalcin y cols. 2006). A finales de la década de los 60, se introdujo por primera vez en la literatura científica, el concepto de “hematocrito óptimo” (Crowell y Smith 1967). Éste se determina en base al ratio hematocrito/viscosidad de la sangre (Nemeth, Alexy y

cols. 2009). Se considera que el sistema circulatorio es capaz de aumentar el transporte de oxígeno cuando el hematocrito está incrementado y, por tanto, el ratio hematocrito /viscosidad se encuentra aumentado (Crowell y Smith 1967). Más capacidad de transporte, pero menos viscosidad, sería la alternativa para aumentar la capacidad teórica del flujo sanguíneo y generar la máxima disponibilidad de oxígeno a los tejidos. Esta premisa ha sido puesta en escena con relación al aumento del rendimiento físico. Desde que se ha demostrado que el rendimiento físico depende de la capacidad de transporte de oxígeno al músculo en contracción, el papel que desempeña un hematocrito óptimo es fundamental (Schuler, Arras y cols. 2009). Debido al efecto policitémico y multifactorial de la administración de rHuEpo, cada vez son más los estudios interesados en demostrar el nuevo papel que tiene el aumento de la capacidad de transporte de oxígeno en variables relacionadas con el rendimiento físico.

2. Regulación de la biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético

Hace relativamente pocos años que se sabe que el tamaño de las mitocondrias, el número y el volumen, varía en respuesta a estímulos fisiológicos (Holloszy 1967). 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.

Estas modificaciones son especialmente evidentes en el músculo esquelético blanco que parte de un contenido mitocondrial inicial de solamente 1% - 3% del total del volumen celular (Hoppeler 1986).

Cambios en la plasticidad mitocondrial producida por el ejercicio son resultado de múltiples eventos moleculares (Hood 2001). El mecanismo está parcialmente adscrito a la activación y unión de factores de transcripción a secuencias específicas de DNA en las que se encuentran genes que codifican proteínas mitocondriales (Hood 2001). Algunos de estos factores han sido identificados, tales como, el factor de transcripción mitocondrial A (mTFA), el factor de respiración nuclear 1 y 2 (NRF-1 y NRF-2), y el coactivador 1α del receptor γ activado por proliferación del peroxisoma (PGC- 1α) (Hood 2001).

2.1 PGC-1 α : Coactivador 1 α del receptor γ activado por proliferación del peroxisoma

PGC-1 α regula la expresión de genes mitocondriales y la biogénesis debido a su habilidad para activar transcripcionalmente una variedad de factores de transcripción y también un creciente listado de proteínas que están relacionadas con la regulación de su propia actividad (Hood, Irrcher y cols. 2006). Eso incluye proteínas que alteran la actividad transcripcional de PGC-1 α por medio de modificaciones post-translacionales o interacciones proteínas-proteínas.

El factor de transcripción PGC-1 α juega además un papel muy importante en el metabolismo de la glucosa, en la especialización de las fibras musculares y en la adaptación a la termogénesis (Lin, Wu y cols. 2002). En el músculo esquelético, el aumento de PGC-1 α aumenta el número de copias de DNA mitocondrial (mtDNA) y estimula la proliferación de mitocondrias. Un aumento en la expresión de PGC-1 α induce, morfológicamente, un aumento de los índices de contenido mitocondrial así como la expresión de genes nucleares en células musculares incluyendo NRF-1, NRF-2, mTFA, UCP-2, así como subunidades nucleares y mitocondriales que codifican la enzima citocromo C oxidasa y citocromo C.

2.2 PGC-1 α y su papel en la regulación de la defensa antioxidante

Como hemos comentado en el apartado anterior, la relación de PGC-1 α con la biogénesis mitocondrial está muy descrita (Lin, Wu y cols. 2004; Lin, Handschin y cols. 2005). Sin embargo, más recientemente, también se ha demostrado que PGC-1 α estimula un amplio programa de defensa frente a los radicales libres a través de la inducción de enzimas antioxidantes como la manganeso superóxido dismutasa (St-Pierre, Lin y cols. 2003; Valle, Alvarez-Barrientos y cols. 2005; St-Pierre, Drori y cols. 2006). Por otra parte, se ha demostrado que la actividad aguda contráctil del músculo esquelético aumenta la expresión de PGC-1 α y de muchas otras proteínas que, con episodios repetidos de contracción, se cree que en última instancia, inducirán adaptaciones celulares y fisiológicas (Pilegaard, Ordway y cols. 2000). Se ha sugerido que el aumento de la expresión de PGC-1 α por contracción depende de las especies reactivas del oxígeno (ERO). Las células de músculo esquelético producen ERO y su formación aumenta bajo contracción, tanto a nivel intracelular como extracelular (Davies, Quintanilha y cols. 1982; Silveira, Pereira-Da-Silva y cols. 2003; Gomez-Cabrera, Close y cols. 2009). Además, el tratamiento antioxidante de las células de músculo

esquelético, previo a la contracción, se sabe que puede alterar los niveles de RNA mensajero (mRNA) de varios genes en animales y humanos, lo que confirmaría el papel regulador de las ERO en la expresión génica (Silveira, Pereira-Da-Silva y cols. 2003; Silveira, Pilegaard y cols. 2006; Hellsten, Nielsen y cols. 2007; Gomez-Cabrera, Close y cols. 2009).

Las células han desarrollado complejos sistemas antioxidantes para evitar la acumulación excesiva de ERO y el consiguiente proceso de daño celular. Como será reseñado más adelante, la defensa antioxidante está compuesta por antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que reaccionan con las ERO. Importantes enzimas antioxidantes incluyen las superóxido dismutasas (SODs), la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (Cat). Como se mencionó en párrafos anteriores, se ha demostrado que PGC-1 α regula la defensa antioxidante. St-Pierre y cols., demostraron *in vitro* que neuronas KO de PGC-1 α eran más sensibles a efectos neurodegenerativos y que PGC-1 α es necesario para la inducción de diversas enzimas antioxidantes como es el caso de la superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD). A su vez, demostraron que aumentando los niveles de PGC-1 α , las neuronas se protegían frente a la muerte celular asociada al estrés oxidativo (St-Pierre, Drori y cols. 2006).

Similar observación, utilizando otro modelo celular, fue descrita por Valle y cols., (2005). Estos autores encontraron que células vasculares endoteliales que sobreexpresaban PGC-1 α , mostraron menor acumulación de ERO. De igual forma, encontraron que regulando a la baja los niveles de PGC-1 α disminuía la expresión de MnSOD, demostrando una novedosa vía reguladora del sistema antioxidante a través de PGC-1 α (Valle, Alvarez-Barrientos y cols. 2005).

Acerca del papel protector de PGC-1 α frente al estrés oxidativo la literatura es variada debido a la existencia de distintos modelos celulares. Por ejemplo, se ha demostrado que fibroblastos KO de PGC-1 α tienen una expresión reducida del programa de defensa antioxidante, una mayor producción de ERO en condiciones basales y una mayor sensibilidad al estrés oxidativo (St-Pierre, Drori y cols. 2006). Por el contrario, Adhietty y cols., han encontrado que, mitocondrias subsarcolémicas e intermiofibrilares aisladas de músculo esquelético de animales silvestres y KO de PGC-1 α , muestran similar producción de ERO (Adhietty, Ugucioni y cols. 2009). Por el contrario, Leick y cols., encontraron que el músculo cuádriceps de ratones KO de PGC-1 α muestra un descenso del 30% en la expresión a nivel de mRNA de MnSOD (Leick, Wojtaszewski y cols. 2008). En

conclusión, el novedoso papel que desempeñaría PGC-1 α regulando la defensa antioxidante merece continuar siendo investigado debido a su potencial función para disminuir el daño oxidativo asociado a ciertos procesos fisiopatológicos.

2.3 Factor respiratorio nuclear 1 (NRF-1)

NRF-1 es uno de los factores reguladores que coordinan la expresión de genes nucleares y mitocondriales para la biogénesis mitocondrial. Las primeras publicaciones demostrando los mecanismos de regulación de las proteínas mitocondriales se relacionan con la identificación de NRF-1 y NRF-2 por Scarpulla (Scarpulla 2002).

NRF-1 se une y activa los promotores de varios genes nucleares que codifican componentes de la cadena respiratoria en la mitocondria así como factores requeridos para la transcripción y replicación del DNA mitocondrial (Scarpulla 2002). Los embriones de animales KO de NRF-1 mueren en la fase temprana del desarrollo (entre los días 3.5-6.5 del período embrionario) (Huo y Scarpulla 2001). Estos datos sugieren que NRF-1 juega un papel crucial en el mantenimiento del mtDNA y en la

función de la cadena respiratoria en las primeras fases de la vida.

2.4 Factor de transcripción mitocondrial A. Expresión del DNA mitocondrial

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

Los genes del mtDNA de mamíferos están distribuidos de modo dispar en las cadenas pesadas y ligeras del genoma circular (Melov, Shoffner y cols. 1995). El mtDNA contribuye a la expresión de proteínas vitales para la función de la cadena respiratoria mitocondrial. Deleciones o mutaciones en el mtDNA 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 y cols. 1995). Éstas son enfermedades tejido-específicas localizadas en órganos con alta demanda energética, como por ejemplo cerebro, corazón y músculo. Una anomalía en el mtDNA en el

músculo esquelético puede tener como consecuencias: una intolerancia al ejercicio físico (Andreu, Hanna y cols. 1999), fatiga, y una producción exagerada de ácido láctico (Robinson 1993).

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

mTFA se ha estudiado mucho y es el factor de transcripción más importante en mamíferos para transcribir el mtDNA. El nivel de mTFA se correlaciona bien con la abundancia de mtDNA, y su pérdida, bien sea en pacientes con miopatías mitocondriales (Poulton, Morten y cols. 1994; Larsson, Wang y cols. 1998) o bien experimentalmente suprimiendo el gen de mTFA (Larsson, Wang y cols. 1998), hará que finalmente se produzca una parcial o total depleción del mtDNA. Los animales knock-out homocigotos de mTFA mueren antes del décimo día embrionario y están caracterizados por una mitocondria anormal y por tener abolida la fosforilación oxidativa (Larsson, Wang y cols. 1998). Los

animales que presentan alteraciones en mTFA, tanto en corazón como en músculo, tienen niveles reducidos de mtDNA y de ARN mitocondrial (mtRNA) aunque muestran pequeños cambios en las actividades de las enzimas de la cadena respiratoria en el músculo esquelético, (posiblemente debido a la renovación del mtRNA en este tejido) (Connor, Takahashi y cols. 1996; Larsson, Wang y cols. 1998).

2.5 Citocromo C

Esta proteína ha sido utilizada durante 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 y cols. 1987). Evans y Scarpulla (Evans y 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 NRF-1 junto con un segundo sitio independiente que se localiza en la sección I (Evans y 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 y Scarpulla 1989), y tiene elementos de respuesta a AMPc (CRE)

pero sólo son activos en tejidos específicos (Gopalakrishnan y Scarpulla 1994).

3. Factores reguladores miogénicos

Los factores reguladores miogénicos (MRFs) 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 muscular.

Las células satélites musculares son esenciales en la regeneración muscular. Durante el proceso de regeneración, las células satélites se dividen y se diferencian, y la inducción de MRFs es crucial para ese proceso (Charge y Rudnicki 2004). Los MRFs son una familia de 4 factores de transcripción: Myf5, MyoD, Miogenina y MRF4 que regulan la expresión de genes musculares específicos durante las varias etapas de diferenciación del tejido muscular. Los cuatro MRFs, están relacionados con la expresión, músculo-específica, de determinados genes durante la embriogénesis (Olson y Klein 1994). Su papel en el desarrollo del músculo está ampliamente estudiado, pero está menos claro el papel que juegan los MRFs en el adulto. Éstos ejercen su función por dimerización con la proteína E, permitiendo su

unión al DNA e iniciando la transcripción de genes musculares específicos. Es posible, por tanto, que alteraciones en la expresión de los MRFs o en su actividad puedan influir en el deterioro muscular durante el envejecimiento. Myf5 y MyoD se expresan en mioblastos proliferativos antes de iniciarse la diferenciación, mientras que la Miogenina y MRF4 se expresan únicamente en células diferenciadas. Los MRF se inducen en músculo esquelético del adulto por denervación (Eftimie, Brenner y cols. 1991), estimulación eléctrica (Jacobs-El, Zhou y cols. 1995), ejercicio físico (Psilander, Damsgaard y cols. 2003; Yang, Creer and cols. 2004) y daño (Eppley, Kim y cols. 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 y cols. 1992; Koishi, Zhang y cols. 1995).

En un adulto normal los valores de mRNA en el músculo esquelético de MRFs son bajos; sin embargo, Myf5 y MRF4 se expresan al mismo nivel en músculos con diferentes tipos de fibras, mientras que MyoD y Miogenina presentan diferentes expresiones entre músculos (Hughes, Cho y cols. 1993; Voytik, Przyborski y cols. 1993; Hughes, Koishi y cols. 1997

4. Hipoxia

4.1 Definición

El término hipoxia se utiliza en fisiología y en la clínica médica para hacer referencia a una pO_2 inferior a la normal en aire inspirado (pIO_2), en sangre arterial (paO_2) o a nivel celular. Sin embargo estos usos del concepto no son totalmente precisos ya que diversos mecanismos homeostáticos minimizan la influencia de la pIO_2 y de la paO_2 en la pO_2 celular. En este sentido marcadas disminuciones de la pIO_2 y de la paO_2 no siempre conllevan una caída suficiente de la pO_2 intracelular como para limitar la fosforilación oxidativa. Teniendo esto en cuenta se considera que el término hipoxia debe seguir haciendo referencia a una pIO_2 inferior a la normal. El término hipoxemia debe ser utilizado para denotar una paO_2 inferior a la normal y, finalmente disoxia debe ser utilizado en referencia a una pO_2 intracelular suficientemente baja como para limitar la fosforilación oxidativa (Connett, Honig y cols. 1990). La adaptación de los vertebrados a un ambiente rico en oxígeno requiere una serie de mecanismos que respondan a los cambios en la concentración de oxígeno. La hipoxia intermitente ha sido definida como “episodios repetidos de hipoxia combinados con episodios de normoxia” (Hahn, Gore y cols. 2001; Neubauer 2001). Son muchos los efectos

fisiológicos potenciales de la hipoxia intermitente que han sido objeto de estudio: 1) aclimatación a la altitud (ventilación, respuesta ventilatoria a la hipoxia; 2) efectos sobre el rendimiento físico, especialmente incremento del $VO_{2m\acute{a}x}$; y 3) respuestas y adaptaciones hematológicas (Powell y Garcia 2000).

4.2 Factor inducible por hipoxia: HIF-1

El factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1) se considera un factor regulador clave en la homeostasis del oxígeno, toda vez que es el responsable de la inducción de genes que facilitan la adaptación y supervivencia de las células a una situación de hipoxia (Wang, Jiang y cols. 1995). Este factor de transcripción, perteneciente a la familia de proteínas que contienen un dominio bHLH (basic helix-loop-helix) y un dominio PAS (Per-Arnt-Sim) está compuesto por dos subunidades, una subunidad HIF-1 β conocida también como receptor nuclear translocador hidrocarbonado (TRNH), que se encuentra constitutivamente expresada, y una subunidad HIF-1 α cuya expresión y actividad transcripcional está regulada por la concentración de oxígeno celular (Wang, Jiang y cols. 1995). La regulación por oxígeno está mediada por las subunidades α (HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α).

Principalmente la regulación de la actividad de HIF-1 es determinada por la estabilidad de la proteína HIF-1 α (Huang, Arany y cols. 1996). Esta subunidad está constituida por dos dominios de transactivación (TADS), y un dominio de degradación dependiente de oxígeno, que se modifican dependiendo de la disponibilidad de oxígeno. Estas modificaciones permiten la unión de la proteína VHL (Von Hippel Lindau) a los sitios hidroxilados de HIF-1 α formando parte del complejo E3 ubiquin-ligasa (Cockman, Masson y cols. 2000), provocando así su ubiquitinación y degradación por el proteosoma (Huang, Arany y cols. 1996; Salceda and Caro 1997). Este proceso es inhibido en condiciones de hipoxia (Sutter, Laughner y cols. 2000). Durante la hipoxia HIF-1 α es fosforilado y translocado al núcleo autónomamente, gracias a la presencia de una señal de localización celular o nuclear. Una vez en el núcleo se heterodimeriza con HIF1 β , formando así el complejo HIF-1 que se une a elementos de respuesta a hipoxia (HRE) y a co-activadores (como por ejemplo, CBP/p300), permitiendo la transactivación e inducción de genes. La vida media de este factor de transcripción es extremadamente corta, en condiciones de normoxia, pero se prolongada significativamente durante la estimulación hipóxica (Huang, Arany y cols. 1996). En normoxia, HIF-1 α sufre modificaciones post-traduccionales por parte de diversas hidroxilasas (PHD1, PHD2, PHD3) que utilizan

oxígeno como sustrato previendo una base molecular sensible a oxígeno. La prolilhidroxilación requiere 2-oxoglutarato y hierro como cofactores. Cada isoforma de PHD difiere de manera relativa en la abundancia de su ARNm, pero las tres muestran un modelo de ubiquitinización de la expresión. Estudios *in vitro* han indicado que cada una de las tres prolilhidroxilasas tienen potencial para hidroxilar la subunidad α de HIF-1 (Bruick y McKnight 2001).

4.2.1 Genes regulados en respuesta a la reducción de oxígeno disponible

HIF-1 α activa la transcripción de genes codificantes de proteínas que regulan las respuestas adaptativas a la reducción de oxígeno disponible. Se han encontrado alrededor de 70 genes regulados que participan en procesos como, la angiogénesis, el metabolismo de la glucosa, la proliferación celular, la eritropoyesis y la homeostasis del hierro. En la tabla I.1 se muestran algunos genes regulados por HIF-1:

Tabla I.1. Genes diana de HIF-1

Producto génico	Referencias
Adenilatoquinasa 3	(Wood, Wilson y cols. 1998)
Adrenomedulina	(Akhter, Eckhart y cols. 1999)
Aldolasa A	(Iyer, Kotch y cols. 1998)
Aldolasa C	(Iyer, Kotch y cols. 1998)
Endotelina 1	(Hu, Discher y cols. 1998)
Enolasa 1	(Iyer, Kotch y cols. 1998)
Eritropoyetina	(Jiang, Semenza y cols. 1996)
Transportador de glucosa 1	(Rolfs, Kvietikova y cols. 1997; Iyer, Kotch y cols. 1998)
Transportador de glucosa 3	(Rolfs, Kvietikova y cols. 1997)
Heme oxigenasa 1	(Lee, Jiang y cols. 1997)
Hexoquinasa 1	(Iyer, Kotch y cols. 1998)
Hexoquinasa 2	(Iyer, Kotch y cols. 1998)
Factor de crecimiento insulínico 2	(Feldser, Agani y cols. 1999)
Lactato deshidrogenasa A	(Rolfs, Kvietikova y cols. 1997; Iyer, Kotch y cols. 1998)
Oxido nítrico sintasa inducible (NOS2)	(Melillo, Musso y cols. 1995; Palmer y Johns 1998; Palmer LA, 1998)
Fosfofructoquinasa L	(Iyer, Kotch y cols. 1998)
Fosfoglicerato quinasa 1	(Rolfs, Kvietikova y cols. 1997; Carmeliet, Dor y cols. 1998; Iyer, Kotch y cols. 1998)
Piruvato quinasa M	(Iyer, Kotch y cols. 1998)
Piruvato deshidrogenada quinasa	(Kim, Tchernyshyov y cols. 2006)
Transferrina	(Rolfs, Kvietikova y cols. 1997)
Receptor de transferrina	(Lok y Ponka 1999)
Factor de crecimiento vascular endotelial	(Rolfs, Kvietikova y cols. 1997; Carmeliet, Dor y cols. 1998; Iyer, Kotch y cols. 1998)

Datos reunidos por el autor.

4.2.2 Piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK-1)

La piruvato deshidrogenasa (PDH) controla la entrada de piruvato en el ciclo oxidativo y es una enzima limitante en el metabolismo de los carbohidratos. La PDH es controlada por la actividad de una quinasa (PDK-1, inhibidora) y una fosfatasa (estimuladora). Se ha sugerido que un incremento de la actividad de PDK-1 contribuye a la reducción de la actividad de PDH y la oxidación de carbohidratos en el ejercicio prolongado, sugiriendo que una disminución de este proceso podría aumentar la actividad de la ruta metabólica anaeróbica ampliamente utilizada en el entrenamiento con intervalos de alta intensidad (Saubert, Armstrong y cols. 1973). HIF-1 α regula la expresión de PDK-1 (Kim, Tchernyshyov y cols. 2006). Por tanto, la activación de HIF-1 α en músculo esquelético, como respuesta a protocolos de hipoxia, podría estar condicionada de manera positiva el incremento de PDK-1. Se ha sugerido que el estímulo hipóxico contribuiría a aumentar la expresión de genes que condicionan el metabolismo anaeróbico.

4.3 PGC-1 α y HIF-1 α

Como hemos comentado en apartados anteriores, PGC-1 α es considerado el regulador por excelencia del proceso de biogénesis mitocondrial (Hood 2001). Este proceso está acompañado por el incremento en los niveles de proteína de un marcador de contenido mitocondrial como es citocromo C (Gomez-Cabrera, Domenech y cols. 2008). De igual forma, como fue descrito anteriormente, en situaciones fisiológicas donde disminuye la concentración de oxígeno se estabiliza el factor inducible por hipoxia, regulando la expresión de genes como es el caso de la eritropoyetina. Sin embargo, en 2009, fue demostrada, en un estudio *in vitro*, la relación entre HIF-1 y PGC1- α . Se demostró que la activación de la actividad mitocondrial a través de PGC-1 α resultaba en la estabilización de HIF-1. HIF-1 regula la expresión de genes relacionados no sólo con la eritropoyesis sino con la angiogénesis, resultando en un incremento de la formación de vasos y la producción de glóbulos rojos. La actuación conjunta de estos factores resultará en un óptimo flujo sanguíneo y entrega de oxígeno (O'Hagan, Cocchiglia y cols. 2009).

4.4 Hipoxia y ejercicio físico

4.4.1 Hipoxia y adaptaciones hematológicas en roedores

A finales de la década de los 50 se desarrollaron diversos estudios sobre el efecto de la exposición a distintos protocolos de hipoxia en la producción de eritropoyetina en roedores (Garcia 1957; Zivny, Travnicek y cols. 1971). En un interesante trabajo publicado en 1957, se demostró que el hematocrito y la hemoglobina de ratas aumentaban de forma significativa después de ser sometidas a 6 horas de hipoxia (6000m) durante 14 días. Sin embargo, este resultado solamente fue observado en animales mayores de 2 meses, debido, seguramente, a una activación por sí sola de la eritropoyesis como consecuencia de la gran demanda del cuerpo en crecimiento (Garcia 1957). El volumen plasmático estaba disminuido en todos los grupos que aumentaron los parámetros hematológicos.

Por otra parte, la vida media de un eritrocito de rata en distintas cepas es de aproximadamente 60 días (Van Putten 1958; Belcher y Harriss 1959; Derelanko 1987), mientras que la vida media de una célula roja humana es de 120 días (Shemin y Rittenberg 1946). El reticulocito es el inmediato precursor de los eritrocitos. A las 24 horas de haber sido liberado a la circulación se diferencia en una

eritrocito maduro. En animales sometidos a hipoxia aproximadamente a los 5 días de hipoxia continua aumenta el porcentaje de reticulocitos (Mylrea y Abbrecht 1970; Hill, Sardella y cols. 1987).

4.4.2 Uso de sistemas de altitud en el deporte. La hipoxia orientada a mejorar el rendimiento físico

Existen pocos lugares en el mundo donde el entrenamiento en altura sea práctico de realizar. Este problema ha sido superado con la construcción, sobre el nivel del mar, de instalaciones que simulan altitudes deseadas y que permiten reproducir las adaptaciones propias que se dan en condiciones de altitud real.

De las alternativas utilizadas para aumentar el rendimiento físico, el “descanso en altura y el entrenamiento sobre el nivel del mar o altura moderada (“living high-training low”), se ha convertido en una importante estrategia (Levine y Stray-Gundersen 1992). Esta alternativa de entrenamiento en altura puede ser materializada a través de dos formas:

1. Hipoxia normobárica. Consiste en disminuir la concentración de oxígeno dentro de la cámara a través de un mecanismo de extracción y mezcla de gases. No se

modifica la presión atmosférica.

2. Hipoxia hipobárica. Consiste en disminuir la presión atmosférica, disminuyendo especialmente la presión del oxígeno inspirado.

El entrenamiento en altitud para mejorar el rendimiento ha sido realizado modificando la duración del ciclo, número de episodios y número de días (Neubauer 2001). Sin embargo, sobre este tema se ha desarrollado un intenso debate, especialmente alrededor del cumplimiento del paradigma eritropoyético. Su base reside en que únicamente puede existir un aumento en el rendimiento físico, como consecuencia de la participación en un protocolo de hipoxia intermitente, cuando aumenta el volumen eritrocitario (Levine y Stray-Gundersen 2005). La tabla I.2 está dividida en tres grandes bloques de acuerdo a la duración (horas) del estímulo hipóxico: Hipoxia intermitente de corta duración (entendida como una exposición no superior a las 3 horas); hipoxia intermitente de larga duración (12 horas de exposición diaria) (Living high – training low) y, por último, exposición a hipoxia continua (“Living high - training high”). El objetivo de los datos consignados en la tabla hace referencia a la necesidad especial de dilucidar en la literatura actual la relación entre la exposición a diferentes protocolos de

hipoxia, su relación con la respuesta sobre las variables hematológicas y su efecto en el rendimiento.

Se presentan a continuación las siguientes abreviaturas para hacer más comprensible la tabla I.2:

LHTL: Protocolo “Living high-training low” en altitud natural

LHTLN: Protocolo “Living high-training-low” en cámara normobárica.

LHTHN: Protocolo “Living high-training high” en cámara normobárica.

LHTHN: Protocolo “Living high-training high” en cámara hipobárica.

EHIN: Exposición a hipoxia intermitente normobárica

EHIH: Exposición a hipoxia intermitente hipobárica

Hb: Hemoglobina

Hcto: Hematocrito

Ret: Reticulocitos

Tabla I.2. Distintos protocolos de hipoxia intermitente. Efecto sobre diversas variables hematológicas y sobre el rendimiento

• **Exposición a hipoxia intermitente (Corta duración)**

Autores y año	Trabajo	Hipoxia	Duración	Rendimiento físico	Cambio en el grupo Hipoxia Entrenado	Cambio en el grupo Normoxia Entrenado	Variable	Cambio en la Variable Hematológica	Altitud alcanzada
(Hamlin y Hellemans 2007)	Varios deportes	EHIN	5:5-min Hipoxia - normoxia 90 min, 5 días/ 3 semanas	Tiempo en carrera 3-km	↑	=	No se sabe	No se sabe	3000 – 4000 m
(Julian, Gore y cols. 2004)	Corredores de larga distancia	EHIN	5:5-min Hipoxia - normoxia durante 70 min, 5 veces por semana/ 4 semanas	VO _{2máx} 3,000-m Rendimiento Tiempo de prueba	= =	= =	Hb Hcto Ret	= = =	4500 m
(Tadibert y cols. 2007)	Corredores de resistencia	EHIN	6 veces durante 6 min, seguido de 4 min en hipoxia	VO _{2máx} Pico de potencia en prueba anaeróbica de Wingate	= =	= =	Hb Hcto Eritro Epo	= = = =	5200 m
(Hamlin, Hinckson y cols. 2008)	Rugby	EHIN	6 min /4 min / 60 min al día/ 15 días	Máxima velocidad de carrera 20-m Tiempo de sprint Pico de potencia	Incier to Incier to Incier to		Hb Hct Ret	= = =	1550 m
(Hinckson, Hopkins y cols.)	Remeros	EHIN	6-min periodos, Alternando	Rendimiento en tiempo de	↑ (Leve comparado)	=	Hcto	=	2500-5000 m

2006)			con periodos de 4-min de hipoxia durante 90 min durante 3 semanas	prueba 5000-m Promedio de potencia en prueba de 500-m	con grupo control) ↓	=			
(Dufour, Ponsot y cols. 2006)	Corredores	EHIN	24-40 min en entrenamiento	VO _{2máx} No grupo control reposo	↑		Hb	=	3000 m
(Morton and Cable 2005)	Deportes de equipo	EHIN	30min/3 días/4 semanas	VO _{2máx} Prueba anaeróbica de Wingate	↑ ↑	↑ ↑	Hb Hcto	= =	2750 m
(Katayama, Sato y cols. 2007)	Corredores	EIHH	1h/1 semana	VO _{2máx} (En Hipoxia)	=		No medido		2500 m
(Katayama, Matsu o y cols. 2003)	Corredores	EHIN	90min/3 días/3 semanas	3000m Tiempo de carrera hasta el agotamiento VO _{2máx}	↓ ↑ ↑	No se sabe	Hb	=	4500 m
(Rodríguez, Ventura y cols. 2000)	Físicamente activos	EHIH	90m/3 días/3 semanas	Tiempo de ejercicio (min) VO _{2máx}	= =	No grupo Normoxia	Hb	↑	4000-5500 m
(Hamlin, Marshall y cols. 2009)	Ciclistas resistencia	EHIH	90 min/ (solo por el entrenamiento)	20 km Promedio de potencia (Prueba 30 s) 2 días después y 9 días después	↑ (Ligero) ↑ (Mejor) a los 2 días	↑ ↑	Hb Hcto Ret	↑ (2) ↑ 2 y 9) ↑ 2 y 9)	3200 – 4400 m
(Beidleman, Muza y cols.	Ciclistas resistencia	EHIN	2h + 25 min (Solo	Resistencia (En	=	=	Hb	=	4300 m

2009)			entrena miento)	hipoxia) Resiste ncia (Normo xia)	=	=			
(Lundb y, Nielse n y cols. 2005)	Entrenad os	EHIH	2h/ 14 días	VO ₂ (L min ⁻¹) durante ejercici o submáx imo (15 min) y ejercici o máximo en normox ia	=	No grupo control	Hb Hcto Ret Epo	= = = =	4100 m
(Gore, Rodrig uez y cols. 2006)	Corredore sNadador es	EHIH	3h/ 5 días / 4 seman as	No			Epo Eritro Hb Ret	↑ = = =	4000- 5000 m
(Rodri guez, Casas y cols. 1999)	Escalador es	EHIH	3-5 h (reposo o entrena miento)	VO ₂ máx (Normo xia) Prueba incred ental máxima	= ↑	No tienen grupo normox ia entrena do	Hb Hct	↑ ↑	4000 – 5500 m
(Truije ns, Rodrig uez y cols. 2008)	Corredore s y nadadore s	EHIH	3h/ 5 días / 4 seman as	Econo mía de carrera VO ₂ máx	= = =	= = =	Eritro Masa de Hb Ret	= ↑ =	4000 – 5000 m
(Katay ama, Sato y cols. 2004)	Corredore s de resistenci a	EHIH	3h/ 14 días	Tiempo en prueba de 3000 m VO ₂ potenci a Econo mía de la carrera	↑ (0.06) = ↑	= = =	Hb Hcto Eritro Ret Epo	= = = =	4000 m
(Rodri guez, Truijen s y cols. 2007)	Corredore s y nadadore s	EHIH	3h/ 5 días/ 4 seman as	Tiempo en prueba de 3000 m Tiempo de prueba	= = =	= = =	Hb Epo	= ↑	5000 m

				100 – 400 m VO _{2máx} corridos VO _{2máx} nadados	= ↑	= ↑			
(Beidleman, Muza y cols. 2008)	Ciclistas de resistencia	EHIH	4h para el entrenamiento	Tiempo en la prueba (Hipoxia). En dos % de ejercicio (40% y 70%)	↑	No tienen grupo control en normoxia	Saturación arterial O ₂	=	4300 m
(Beidleman, Muza y cols. 2003)	Ciclistas	EHIH	4 h/5 días/ 3 semanas	Tiempo en la prueba cicloergómetro (Hipoxia) VO _{2máx}	↑ ↑	=	Hb	=	4300 m

- **Descanso en la altura y entrenamiento a baja o mediana altura (Living high-training low)**

Autores y año	Trabajo	Hipoxia	Duración	Rendimiento físico	Cambio en el grupo Hipoxia Entrenado	Cambio en el grupo Normoxia Entrenado	Variables	Cambio en la Variable Hematológica	Altitud alcanzada
(Ashenden, Gore y cols. 1999)	Múltiples deportes	LHTLN	8-10h/ 23 días	No miden		No grupo entrenado en normoxia	Masa de Hb	=	3000 m
(Ashenden, Gore y cols. 1999)	Mujeres ciclistas de ruta	LHTLN	8-10h/ 12 días	No miden			Masa de Hb Ret	= =	2650 m
(Bassey, Joannisse y cols. 2006)	Esquiadores a campo traviesa	LHTLN	8h/ 2 días/ 3 semanas	VO _{2máx} Prueba de Wingate Tiempo hasta el agotamiento	= = =	= = =	Hb Hcto Eritro Epo	↑ ↑ ↑ ↑	3636 m

(Gore, Hahn y cols. 2001)	Múltiples deportes	LHTL N	9h/ 23 días	Ejercicio submáximo VO _{2máx}	↑ =	= =	Masa de Hb Ret	= =	4000 m
(Ashenden, Gore y cols. 2000)	Corredores	LHTL	9h/ 5 días Hipoxia 3 días Normox 3 veces	No miden			Epo Ret Hb	↑ = =	2650 m
(Saunders, Telford y cols. 2009)	Corredores	LHTL N	9h/ 5 días/ 46 días	VO _{2máx} Submáximo VO _{2máx}	↑ =	= =	Total Hb mass	↑	2680 m
(Robach, Schmitt y cols. 2006)	Esquiadores nórdicos	LHTL N	11h/ 18 días	VO _{2máx} Tiempo hasta el agotamiento a VO _{2máx}	= =	= =	Hb (A 12 días a 3000 m) Hct (A 12 días a 3000 m) Eritro (Aumenta con su valor Pre, pero no difiere con el control) Ret Epo (A 12 días a 3000 m y a 18 días a 3500 m)	↑ ↑ ↑ Incierto ↑	2500 – 3500 m
(Saunders, Telford y cols. 2004)	Corredores de élite	LHTL N	9-12h/ 5 días/ 20 días 2 días de descanso en el protocolo de hipoxia	Economía de carrera	↑	No	Masa de Hb	=	2000-3100 m
(Hahn, Gore y cols. 2001)	Múltiples deportes	LHTL N	8-11h/ 11 – 23 días	VO _{2máx}	=	=	Total Hb mass	=	2800 m

(Ney a, Enoki y cols. 2007)	Corredores de resistencia	LHTL N	10-12h/ 29 días	VO _{2máx} (Normoxia) Economía de carrera	= ↑ (Leve)	= =	Total Hb mass	=	3000 m
(Piehl Aulin, Svedenham y cols. 1998)	Corredores de resistencia	LHTL N	12h/ 10 días	VO _{2máx} (Normoxia)	= (En grupos 2000 m y 2700 m)	=	Hb y Hcto (A los 10 días) Hb y Hcto (A los 2 días) Ret (1, 2 y 7 días) Epo 2000 m (1 a 3)	= ↓ ↑ ↑	2000 y 2700 m
(Dehnert, Hutler y cols. 2002)	Triatletas	LHTL	13 h/ 14 días	VO _{2máx} Velocidad máxima de carrera	= (0.07) =	= =	Hb Hcto Eritro Ret Epo	= = = = (Tiende) ↑ (A los 2 días)	1956 m
(Brugniaux, Schmitt y cols. 2006)	Corredores de élite	LHTL N	14h/ 18 días 6 días a 2500 m y 12 días a 3000 m	VO _{2máx}	↑ Frente a basal ↑ (Quince días después)	=	Hb Hcto Epo Ret	= ↑ (Al final de los 6 días a 2500 m) = Al final Tendencia a aumentar	2500 – 3000 m
(Nummela y Rusko 2000)	400 m	LHTL N	16h/ 10 días	400 m Velocidad máxima de carrera (Normoxia)	↑ ↑	↑ ↑	No miden		2200 m
(Mounier, Pialoux y cols.)	Nadadores	LHTL N	16h/ 13 días	VO _{2máx}	↑	↑	Hb Hcto Eritro	= =	2500 – 3000 m

(2006)							nHb	↑	
(Robach, Schmitt y cols. 2006)	Nadadores	LHTL N	16h/ 13 días	VO _{2máx} Tiempo de ejercicio de Resistencia en prueba de 2000 m	= =	= ↑	Hb Hcto nHb Eritro Ret	= = ↑ ↑ =	2500 – 3000 m
(Brugniaux, Schmitt y cols. 2006)	Corredores de resistencia	LHTL	Nadadores 16h/ 18 días Esquiadores (11h/ 18 días) Corredores (14h/ 18 días)	VO _{2máx} Nadadores VO _{2máx} Esquiadores a campo traviesa VO _{2máx} Corredores	= = ↑	= = =	Hb y Hcto Eritro Hb y Hcto Eritro Hb y Hcto Eritro	= ↑ = = =	2500 – 3500 m
(Wehrlin, Zuest y cols. 2006)	Corredores de resistencia	LHTL	18h/ 24 días Entrenamiento (1800 m)	Tiempo prueba de 5000 m VO _{2máx} Tiempo hasta el agotamiento	↑ ↑ ↑	No grupo control entrenado en normoxia	Masa de Hb Eritro Hct Epo (24h)	↑ ↑ ↑ ↑	2456 m
(Levine y Stray-Gundersen 1997)	Corredores de distancia	LHTL	20h/ 5 días/ 4 semanas (30 m) para ir a entrenar	5000 m VO _{2máx} Capacidad anaeróbica Economía de carrera	↑ (No HiHi) ↑ (También el grupo HiHi) = =	= = =	Hb Eritro	↑ ↑ También en el grupo HiHi	2500 m
(Stray-)	Corredores de	LHTL	Similar Levine	3.000m (Nivel)	↑	No grupo	Hb	↑	2000–3000

(Gundersen, Chapman y cols. 2001)	distancia		1997 4 semanas	del mar) VO _{2máx}	↑	control entrena do en normox ia			m
(Wehrin and Marti 2006)	Corredores de resistencia	LHTL	18 h	Tiempo en prueba de 5000 m	↑	No grupo control entrena do en normox ia	Masa de Hb Hb Eritro	↑ ↑ =	2456 m Vivien do a 1800 m
(Xiao xia Li 2004)	Estudiantes	LHTL	12 h	VO _{2máx} Tiempo en prueba de 3000 m	↑ ↑	No grupo control entrena do en normox ia	Hb Hcto Eritro	↑ ↑ ↑	2500 m
(Miyazaki and Sakai 2000)	Resistencia. Roedores.	LHTL CH	23h/ 7 días/ 6 semanas	VO _{2máx}	↑	↑	Hcto	↑	2500 m
(Favret, Henderson y cols. 2003)	Resistencia. Roedores	LHTL H	1h/ 5 días/ 4 semanas	VO _{2máx}	↑ (Mayor)	↑	Hb	↑	3000 m
(Abdelmaliki, Fimbel y cols. 1996)	Resistencia. Roedores	LHTL H	90min/ 5 días/ 9 semanas 3 grupos	VO _{2máx} Tiempo hasta el agotamiento	↑ ↑	↑ ↑	Hcto (Toman medidas al final del experimento)	↑	37

- **Descanso y entrenamiento en altura (Living high-training high)**

Autores y año	Trabajo	Hipoxia	Duración	Rendimiento físico	Cambio en el grupo Hipoxia Entrenado	Cambio en el grupo Normoxia Entrenado	Variables	Cambio en la Variable Hematológica	Altitud alcanzada
(Henderson, Clancy y cols. 2001)	Resistencia. Roedores	LHT HH	1h/ 5 días/ 10 semanas	VO ₂ max	↑	↑	Hb	↑	2600 m
(Reboul, Tanguy y cols. 2005)	Resistencia. Roedores	LHT HH	1h/ 5 días/ 5 semanas	MAV (Normoxia e Hipoxia)	↑	↑	Hb	↑	2800 m
(Galbes, Goret y cols. 2008)	Resistencia. Roedores	LHT HH	1h/ 5 días/ 5 semanas	MAV (Normoxia e Hipoxia)	↑	↑	Hb	↑	4000 m
(Cazorla, Ait Mou y cols. 2006)	Resistencia. Roedores	LHT HH	45m/ 5 días/ 5 semanas	MAV (Normoxia e Hipoxia)	↑	↑	No miden		4000 m
(Reboul, Tanguy y cols. 2005)	Resistencia. Roedores	LHT HH	20m- 1h/ 5 días / 5 semanas	MAV (Normoxia e Hipoxia)	↑	↑	Hb	↑	2800 m
(Reboul, Tanguy y cols. 2005)	Resistencia. Roedores	LHT HH	20m- 1h/ 5 días/ 5 semanas	MAV (Normoxia e Hipoxia)	↑	↑	Hb	↑	2800 m
(Koistinen, Rusko y cols. 2000)	Control	LHT HN y LHTLN	12h /7 días o continuos durante 12 días	No			Hb Hcto Ret Epo	= = ↑ (En 5 y 7 días) ↑ (En los dos grupos)	2500 m
(Gore, Hahn y cols. 1998)	Ciclistas	LHT HH	29 días continuos	VO ₂ max	=	=	Masa de Hb	=	2690 m

Tabla elaborada por el autor.

Como se observa, la duración del estímulo, la frecuencia de la exposición y la altitud alcanzada son factores claves a la hora de decantarse por un efecto positivo de la exposición a hipoxia, sea natural o artificial, sobre el rendimiento físico. A su vez, la combinación de la hipoxia con distintos tipos de entrenamiento, la forma de evaluar el rendimiento físico, la ausencia de grupos control en los diseños experimentales, si el entrenamiento es desarrollado en hipoxia o normoxia y especialmente, la inferencia que de los datos se realiza a través de las técnicas estadísticas son factores que influyen en el apoyo o rechazo del paradigma planteado por Levine y Stray-Gundersen en 2005. En la constante búsqueda por aumentar el rendimiento los resultados son muchas veces controvertidos. Los atletas invierten grandes recursos para entrenar en altura, natural o artificial, porque el estímulo hipóxico parece estar relacionado con el aumento de adaptaciones hematológicas y musculares. Sin embargo, existe también evidencia, tanto en seres como en roedores, que el entrenamiento en altura no provee ninguna ventaja más allá de la conseguida con similar entrenamiento sin participar en un protocolo de hipoxia.

5. Sustancias y métodos prohibidos por la Agencia Mundial Antidopaje (AMA)

5.1 La lista de sustancias y métodos prohibidos en el deporte

De conformidad con el Código Mundial Antidopaje, los métodos y sustancias prohibidas son aquellos métodos o sustancias descritos como tales en la lista elaborada y revisada cada año por la AMA. La Lista está dividida en los siguientes apartados: 1. Sustancias y métodos prohibidos en todo momento (dentro y fuera de competición); 2. Sustancias y métodos prohibidos en competición; 3. Sustancias prohibidas en deportes específicos; y por último, un nuevo apartado de sustancias prohibidas durante todo momento que no han recibido la aprobación de las autoridades gubernamentales para uso terapéutico humano. La lucha contra el dopaje ha evolucionado sobre la vigilancia de las sustancias no sólo en competición, sino por su potencial en aumentar el rendimiento en competiciones futuras o por su potencial enmascarador.

Según el Código Mundial Antidopaje la lista de sustancias y métodos prohibidos puede identificar las sustancias específicas que son particularmente susceptibles de entrañar una violación no intencionada de las reglas antidopaje, teniendo en cuenta su presencia frecuente en

los medicamentos o si ellas fueran menos susceptibles de que su utilización abusiva como agentes dopantes tuviera éxito. Según el artículo 4.3.1.3 del Código Mundial Antidopaje, una sustancia o método, para ser incluido dentro del listado, debe cumplir con dos de los siguientes requisitos: 1. Que tenga el potencial de mejorar el rendimiento deportivo; 2. Que plantee un riesgo real o potencial para la salud del deportista; 3. Que vulnere el espíritu del deporte. A su vez, el artículo 4.3.2 estipula que será igualmente incluido en la lista si se determina que la sustancia o método tiene el potencial de enmascarar el uso de otras sustancias o métodos prohibidos.

5.2 El Sistema Mundial Antidopaje y la lucha contra el dopaje sanguíneo

La lista de sustancias prohibidas y métodos prohibidos es una de las estrategias del Programa Mundial Antidopaje para la erradicación del dopaje en el deporte. La Agencia Mundial Antidopaje, como institución rectora de la política internacional de lucha contra el dopaje, determina cada año que sustancias o métodos deben ser introducidos en la lista. Antes de la creación de la Agencia, en 1999, el Comité Olímpico Internacional era el encargado en prohibir este tipo de elementos.

Ciertas estrategias que incrementan de forma artificial la capacidad de transporte de oxígeno, están prohibidas en el deporte. Dentro de ellas, se incluye el uso de sangre propia o ajena, o de células rojas sanguíneas de cualquier origen, perfluorocarbonos, efaproxiral o hemoglobinas modificadas. De igual forma, está prohibido el uso de distintas hormonas y sustancias relacionadas, incluyendo la Epo, que forman parte de las lista de sustancias y métodos prohibidos (AMA, 2010). Ha sido y seguirá siendo un reto difícil y costoso para el Sistema Mundial Antidopaje detectar el uso de algunos de estos métodos o sustancias.

En 1980, se prohibió oficialmente el uso de rHuEpo y desde entonces los organismos nacionales e internacionales se han puesto en marcha en la creación de sistemas directos e indirectos de detección del abuso de esta sustancia. Sin embargo, su detección es difícil en la medida en que la síntesis de la Epo ocurre de forma natural en el organismo.

5.2.1 Métodos directos e indirectos de detección del dopaje sanguíneo

Actualmente, siguiendo los alineamientos de la AMA, algunas federaciones internacionales, como la Unión Ciclista Internacional y la Federación Internacional de

Esqui utilizan dos métodos para detectar el uso indebido de rHuEpo (Lasne, Picard y cols. 1984; Lasney de Ceaurriz 2000).

El primero, a través de la detección de Epo exógena en orina cuyo objetivo es diferenciar a través de patrones isoeléctricos la hormona natural de la sintética. No obstante, en el proceso de diferenciación del patrón isoeléctrico respecto al de la hormona natural, se han venido utilizando más criterios empíricos que aquellos elaborados desde un enfoque estadístico racional, como ha sido planteado por distintos autores (Lippi y Guidi 2000; Lasne, Thioulouse y cols. 2007). Recientemente, este método ha recibido serias críticas debido a la falta de lineamientos similares en dos distintos laboratorios acreditados por la AMA (Beullens, Delanghe y cols. 2006; Lippi 2008; Lundby, Achman-Andersen y cols. 2008). Además, la literatura demuestra que ocasionalmente las pruebas antidopaje generan falsos positivos en la detección de rHuEpo. Por ejemplo, Beullens y cols., demostraron la inespecificidad de un anticuerpo de eritropoyetina (epoetin- β) en muestras de orina recogidas inmediatamente después de un ejercicio físico intenso, generando un resultado falso-positivo en la detección de esta sustancia prohibida (Beullens, Delanghe y cols. 2006).

Esta es la razón por la cual las autoridades antidopaje realizan diferentes análisis con el objetivo de detectar el uso de algunos de los métodos anteriormente descritos. Las estrategias utilizadas por los diferentes organismos internacionales que luchan contra el dopaje son diferentes dependiendo del ámbito de aplicación. Para los objetivos de esta Tesis Doctoral nos referiremos a la regulación normativa de la Unión Ciclista Internacional (UCI) que, entre otras, es quien ha abanderado la lucha contra el dopaje en los últimos años. Por ejemplo, en la sección de pruebas sanguíneas del Código Antidopaje de la UCI (13.1.062/13.1.063) se establece que los atletas deben someterse a análisis para determinar los siguientes valores sanguíneos: hematocrito, hemoglobina y reticulocitos. Si los análisis sanguíneos muestran valores atípicos, el deportista es considerado “no apto” para la competición y no puede participar en la prueba deportiva. Los valores sanguíneos atípicos bajo esa regulación son (para hombres): hematocrito por encima del 50% (con hemoglobina por encima de 17g/dL); reticulocitos inferiores al 0.2% (aquellos valores por encima del 2.4% justificarán un seguimiento del deportista) y un índice de estimulación eritrocitario por encima de 133 (aquellos índices entre 125 y 133 justifican igualmente el seguimiento del deportista). Principalmente, el método indirecto de detección de uso indebido de rHuEpo está

basado en el cálculo del índice de estimulación eritrocitaria, también llamado OFF-Hr Score. Consiste en la aplicación de un modelo estadístico que usa dos parámetros hematológicos: el porcentaje de reticulocitos y la concentración de hemoglobina. Ambos se encuentran modificados después de un periodo de administración de rHuEpo (Lasney de Ceaurriz 2000; Sharpe, Hopkins y cols. 2002; Gore, Parisotto y cols. 2003; Sharpe, Ashenden y cols. 2006). Poco después de que un tratamiento con rHuEpo ha cesado, la expresión endógena de Epo se encuentra regulada a la baja. Esto permite una inhibición de la eritropoyesis y una fuerte caída en el porcentaje de reticulocitos que se refleja en el índice de estimulación eritrocitaria (Robinson, Giraud y cols. 2006). El índice de estimulación es calculado con los valores de hemoglobina (en g/L) y reticulocitos (en porcentaje), en el modelo OFF- Hr Score:

$$= Hb \left(\text{en } \frac{g}{L} \right) - 60\sqrt{Ret\%}$$

5.2.2 El pasaporte biológico

La Unión Ciclista Internacional, como muchas otras Federaciones Internacionales, ha creado una gran variedad de pruebas antidopaje para determinar las infracciones por violación de sus normas. Entre ellas se

destacan la detección directa que tiene como objetivo determinar si una sustancia o método ha sido utilizado; la vigilancia, que consiste en que a pesar de la inexistencia de la violación de una norma antidopaje en la muestra biológica extraída es necesario que los corredores sean monitorizados y una tercera que pasamos a explicar a continuación.

Con el objetivo de establecer una estrategia más efectiva de control de las variables hematológicas para los atletas Malcovati y cols., estudiaron la posibilidad de crear, en un estudio longitudinal, unos rangos de referencia intrasujeto que pudiesen distinguir entre las variaciones fisiológicas y las anormales, en distintos parámetros hematológicos. De esta forma se concluyó, que las determinaciones secuenciales de ciertas variables hematológicas, pueden establecer rangos de referencia intrasujeto para dichas variables (Malcovati, Pascutto y cols. 2003). De esta forma, se sugirió el establecimiento de perfiles individuales, conocido como pasaporte biológico, en el cual estos perfiles podrían contribuir a la determinación de supuestas violaciones a las normas antidopaje. El pasaporte biológico es un documento electrónico individual. En la tabla I.3 se muestran los elementos que lo componen:

Tabla I.3. Pasaporte Biológico

Pasaporte Biológico =	<p>1. Resultados de las pruebas hematológicas u hormonales. En sangre: Hemoglobina, reticulocitos, hematocrito, entre otros. En orina: Testosterona, epitestosterona, dehidroepiandrosterona, entre otros.</p>
	<p>2. Construcción del perfil hematológico (sangre): Hemoglobina, reticulocitos (%), OFF-Hr Score, ABPS (Perfil anormal sanguíneo), entre otros.</p>
	<p>3. Construcción del perfil esteroideo (orina): Testosterona, epitestosterona, androsterona, etiocolanona dehidroepiandrosterona, entre otros.</p>

Así como ha sido propuesto en otras determinaciones, la consideración de perfiles longitudinales sanguíneos junto con factores heterogéneos (edad, sexo, origen étnico, altitud), entre otras variables externas, produce un modelo con mayor sensibilidad para detectar el dopaje sanguíneo (Sottas, Baume y cols. 2007). De esta forma, se considera que disminuiría la existencia de falsos positivos. Diversos autores consideran que el pasaporte biológico, debería ser utilizado dentro de una estrategia global para luchar contra el dopaje (Robinson, Sottas y cols. 2010; Sottas, Robinson y cols. 2007). Además, el pasaporte podría ser utilizado para excluir de las competiciones a aquellos deportistas que muestren incrementos, no fisiológicos, de

las variables analizadas. Esta última estrategia vino a completar el grupo de métodos indirectos de detección, que junto con el índice de estimulación eritrocitaria, se han convertido en importantes elementos de la lucha antidopaje.

5.2.3 Expansores de volumen plasmático

Cuando un deportista, con unos valores hematológicos elevados, desea mantener los niveles dentro de valores fisiológicos, un sistema rápido para disminuirlos es el uso de expansores de volumen plasmático (EVP). Entre ellos se encuentra la albúmina, el dextrano y hidroxietilalmidón, que desde el año 2000 fueron incluidos en la lista de sustancias y métodos prohibidos en el apartado específico de agentes enmarascadores (AMA, 2008). Los EVP son usualmente administrados en casos de shocks hipovolémicos, pero en 1998 la prensa reportó su uso indebido en el deporte de resistencia (Thevis, Opfermann y cols. 2000).

5.2.4 La hormona antidiurética (HAD) y la desmopresina

La desmopresina, 1-desamino-8-D-arginine-vasopresina (DDAVP), es un análogo sintético de la HAD con un efecto antidiurético incrementado y una actividad presora disminuida (Robinson 1976).

La hormona antidiurética o arginina-vasopresina (AVP) es un nonapéptido que se sintetiza como prohormona, al igual que la oxitocina, en las neuronas magnocelulares de los núcleos supra ópticos y paraventriculares del hipotálamo. Esta prohormona se sintetiza junto con una proteína, denominada neurofisina, con la cual es transportada a lo largo de los axones y almacenada en gránulos secretores de las terminaciones nerviosas en la hipófisis posterior. La HAD y su neurofisina (NPII) se sintetizan en una sola cadena proteica, en los gránulos secretores de la neurona, antes de su secreción en la neurohipófisis.

La ADH que pasa a circulación se distribuye por todo el espacio extracelular, no ligada a proteínas, y por su peso molecular relativamente bajo, atraviesa con facilidad a los capilares periféricos y glomerulares. Su principal función consiste en la regulación osmótica del plasma dentro de un estrecho margen entre 285-295 mosm/kg de agua. Un

ligero aumento de un 1% en la osmolaridad es capaz de estimular los receptores localizados en la lámina terminalis haciendo que se libere ADH. También puede responder en menor grado a cambios de volumen plasmático gracias a los receptores localizados en las venas pulmonares, el cayado aórtico, la aurícula izquierda y el seno carotídeo; se requiere una caída de por lo menos un 10-15 % de la presión arterial para que ocasione liberación de HDA.

La HDA ejerce su acción uniéndose a tres tipos de receptores: $V1\alpha$, que se hallan en el tejido muscular liso, asociados al sistema fosfocálcico, receptores $V2$, situados en las membranas de las células de los túbulos colectores renales, y receptores $V3$ o $V1\beta$, expresados por células de la hipófisis anterior.

A través de los receptores $V1$ la HAD ejerce su acción presora, disminuyendo el gasto y la frecuencia cardíaca, a través de una acción directa y potenciando los reflejos barorreceptores. Por los receptores $V2$ la HAD ejerce su principal acción, la de conservar el agua corporal, estimulando la reabsorción de agua a nivel de los túbulos colectores renales. Éstos están acoplados a una proteína G estimuladora del sistema adenilciclasa, que al aumentar el AMPc intracelular, permite la síntesis de proteínas que forman canales o poros en la superficie de las células

tubulares, que aumentan su permeabilidad osmótica al agua. Estas proteínas se conocen como acuaporinas. En los túbulos colectores renales se hallan las acuaporinas tipo 2 (AQP2).

La secreción de hormona antidiurética está regulada por el sistema nervioso y depende de los cambios de concentración osmótica efectiva del líquido extracelular, de las modificaciones en el volumen del líquido extracelular o del compartimento plasmático y de estímulos exteroceptivos y psíquicos

El descenso de la osmolaridad del plasma es uno de los factores que inhiben la producción y liberación de ADH; esto sucede por ejemplo, cuando se toman grandes cantidades de agua o por infusión de soluciones hipotónicas de ClNa o isotónicas de glucosa.

Entre los factores que estimulan la secreción de la hormona antidiurética (y por lo tanto disminuyen la diuresis) se encuentran la privación de agua y la deshidratación, que aumentan la osmolaridad del plasma y activan los osmorreceptores del hipotálamo.

También como consecuencia de la disminución del volumen plasmático y, por consiguiente, de la estimulación de los receptores de volumen de la aurícula izquierda y de la actividad barorreceptora del seno

carotídeo, la secreción de HAD aumenta aún más. Asimismo el dolor y el estrés emocional incrementan la liberación de HAD. Lo mismo se observa por acción de diversas drogas que actúan sobre el sistema hipotálamo-neurohipofisario; entre ellas se incluyen la nicotina, la acetilcolina, la morfina y los anestésicos.

La función de la DDAVP consiste en limitar la cantidad de agua que es eliminada por la orina. La DDAVP se une a receptores V₂ en los conductos colectores renales, incrementando la reabsorción de agua. La DDVAP se degrada más lentamente que la vasopresina y, por tanto, requiere una menor frecuencia de administración (Levy 2008). Puede ser administrada oralmente, por vía intranasal o parenteral. La DDAVP es mucho más potente y, con una actividad más duradera, que la vasopresina y ha sido utilizada para prevenir o controlar la poliuria, polidipsia y la deshidratación en pacientes con diabetes insípida (Robinson 1976; Kim, Malattia y cols. 2004). El medicamento también es usado en el manejo primario de la enuresis nocturna (Dimson 1977) especialmente en pacientes ancianos (Donahue y Lowenthal 1997). En la lista de sustancias prohibidas elaborada por la AMA para el año 2010 la desmopresina no se encuentra incluida. Por otra parte, el Centro Canadiense para la Ética en el Deporte recomienda su uso como antidiarréico.

6. Radicales libres

6.1 Concepto de radical libre

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

Estas moléculas o átomos tremendamente reactivos, se encuentran implicados en el inicio y desarrollo de diversas enfermedades (Gutteridge 1993). La evidencia del papel patológico de estos compuestos ha dado lugar a numerosas vías de investigación con el fin de desarrollar captadores, inhibidores enzimáticos o moduladores de los mismos. En el medio biológico, los radicales libres son compuestos generalmente oxigenados y se les llaman especies reactivas de oxígeno (ERO). Debido a que los organismos existen y se desarrollan en presencia de oxígeno, están asociados con la generación de estas ERO, que son tóxicas y se consideran responsables del daño oxidativo de macromoléculas biológicas como el DNA, lípidos, carbohidratos y proteínas (Halliwell y Gutteridge 1989; Sies 1993; Halliwell 1996). Se han visto implicadas en muchos procesos patológicos como algunos cánceres, diabetes (Okamoto 1985; Reardon,

Ross y cols. 1992), patologías cardiovasculares (Byers 1993), procesos reumáticos (Wolf, Gamer y cols. 1986), patologías gastroentéricas y afecciones broncopulmonares (Slade, Crissman y cols. 1993), así como en procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (Cross, Slater y cols. 1987). También están implicados en procesos fisiológicos como en el envejecimiento (Pacifi y Davies 1991; Bondy 1992), el daño causado por el ejercicio físico agotador (Sastre, Asensi y cols. 1992), la apoptosis (Agostini, Di Marco, Nocentini y col. 2002) y otros.

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

6.2 Clases de radicales libres

Existen muchas clases de radicales libres, tanto ERO como ERN. Algunos de los radicales libres más importantes están listados en la tabla siguiente:

Tabla I.4. Principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

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

6.3 Génesis de las ERO

Todos los radicales libres descritos anteriormente corresponden a especies cuya formación es endógena, pero el organismo también está expuesto a radicales libres procedentes de fuentes externas. Con la dieta son ingeridos muchos compuestos de naturaleza prooxidante, el humo del tabaco da lugar a radicales libres, así como la contaminación ambiental, el ozono, etc. (Ames 1983; Pryor, Squadrito y cols. 1995; Rock, Jacob y cols. 1996). Las especies reactivas del oxígeno pueden tener un origen endógeno o exógeno (Freeman y Crapo 1982; Frei 1994). Algunas de ellas surgen como “accidentes químicos”, es

decir, reacciones secundarias no deseadas entre las biomoléculas o en la detoxificación de xenobióticos, pero otras especies activadas de oxígeno se generan *in vivo* con un fin determinado, como en el caso de los fagocitos activados, que producen $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 (Halliwell 1991).

6.3.1 Fuentes exógenas

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

- Agentes antineoplásicos tales como la adriamicina, bleomicina, daunorrubicina y algunos antibióticos (Doroshov y Davies, 1983) que dependen de grupos quinoides o de unión a metales para su actividad. Algunos de los efectos de estas drogas se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.
- La irradiación de los organismos debido a las radiaciones electromagnéticas (rayos X y γ) o debido a radiaciones de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas α y β) (Von Sonntag, 1994).

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

6.3.2 Fuentes endógenas

6.3.2.1 La cadena de transporte electrónico mitocondrial

La cadena de transporte electrónico mitocondrial 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.

• Producción de radicales libres en los distintos estados mitocondriales

Se calcula que el 0.15% de los electrones transportados por la cadena de transporte electrónico mitocondrial en estado 4 (cuando todo el ADP está en forma de ATP) no llegan al complejo IV y producen reducciones parciales

del oxígeno (St-Pierre, Buckingham y cols. 2002). Debido a las propiedades del oxígeno, su reducción tetravalente requiere la transferencia sucesiva de 4 electrones al orbital antienlazante.

El citocromo a_3 del complejo IV de la cadena respiratoria es capaz de mantener estrechamente unidas a su centro activo todas las especies parcialmente reducidas del oxígeno hasta que se completa la transferencia de 4 electrones y 4 protones al O_2 y con ello la formación de H_2O (Benzi y Moretti 1995). Por tanto, la citocromo C oxidasa perteneciente al complejo IV de la cadena respiratoria no produce este radical. Además, exhibe cierta actividad superóxido dismutasa. Sin embargo, otros elementos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial tienen la capacidad de transferir un electrón directamente al O_2 , pero por el contrario no son capaces de retener el ión superóxido formado (Benzi y Moretti 1995). Así pues, se produce $O_2^{\cdot-}$, que puede dismutar a su vez generando peróxido de hidrógeno, el cual es capaz de atravesar las membranas y salir al citoplasma, donde puede reaccionar con otras especies formando diversos tipos de radicales libres (Boveris, Oshino y cols. 1972). La producción mitocondrial del peróxido de hidrógeno fue inicialmente descrita por Jensen en 1966 (Jensen 1966). Estudios posteriores demostraron que la mayor parte

procede de la dismutación del radical superóxido (Boveris y cols. 1975).

Se ha estimado que se producen del orden de 10^{10} moléculas de $O_2^{\cdot-}$ por célula y por día (Ames, Shigenaga y cols. 1993).

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

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

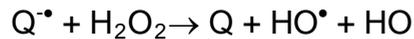
El estado 3 de la cadena de respiración mitocondrial se define como el consumo de oxígeno en presencia de sustrato y ADP, es decir, cuando tiene lugar el transporte de electrones y la síntesis de ATP. El estado 4 se alcanza cuando el ADP ha sido consumido, y el gradiente electroquímico generado por la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

algún daño, se desacopla el transporte de electrones y la síntesis de ATP. Las mitocondrias que consumen la misma cantidad de oxígeno en estado 3 que en estado 4 están desacopladas (Rickwood y cols. 1987).

La producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno aumenta cuando el aporte de sustratos a la cadena de transporte electrónico mitocondrial excede la demanda energética, es decir, en condiciones cercanas al estado 4, en las cuales el cociente ATP/ADP es elevado. En estas condiciones, aumentan la presión parcial de O_2 y el grado de reducción de los transportadores redox de los complejos I, II, y III, con el consiguiente incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno. Así pues, el estado reducido de los elementos redox de los complejos I y III también contribuye al aumento de la velocidad de generación de $O_2^{\bullet-}$ (Skulachev 1996). Puesto que se postula que las mitocondrias se encuentran en un estadio intermedio entre el estado 3 y el estado 4 (Brand y Murphy 1987), la generación de especies reactivas de oxígeno por los complejos I y III puede ser de gran importancia en el envejecimiento mitocondrial.

Experiencias *in vitro* demuestran que formas solubles de la semiquinona son capaces de producir $O_2^{\bullet-}$ por autooxidación en medios oxigenados, por lo que se propuso que la ubisemiquinona mitocondrial era una de las fuentes de ion superóxido (Cadenas y cols. 1977). Sin

embargo, consideraciones termodinámicas descartan un papel directo de la dismutación de la ubisemiquinona en la producción de este radical *in vivo*, porque el ciclo redox de la ubiquinona tiene lugar enteramente en la fase apolar de la membrana, y en tales condiciones la autooxidación de las quinonas se ve desfavorecida (Benzi y Moretti, 1995). La ubisemiquinona, en cambio, podría estar implicada en la formación de HO• a partir de H₂O₂. Puesto que el peróxido de hidrógeno puede atravesar fácilmente las membranas biológicas, entrar en contacto con la ubisemiquinona y producirse la reacción siguiente (Benzi y Moretti, 1995):



6.3.2.2 Reacción de Fenton-Haber-Weiss

Consiste en la reducción del H₂O₂ por iones de metales de transición, sobre todo el ion ferroso (Fe⁺²) y, en menor medida, el cuproso (Cu⁺) y otros iones. El peróxido de hidrógeno o agua oxigenada (H₂O₂) es una molécula relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Fenton (Fenton 1894) descubrió, a finales del siglo pasado, que se podían oxidar moléculas orgánicas por mezclas de peróxido de hidrógeno y Fe⁺² (reactivo de Fenton). Fueron Haber y

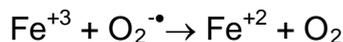
Weiss quien dieron una primera explicación del mecanismo de reacción: el Fe^{+2} reduce al H_2O_2 , que a su vez se descompone en el radical hidroxilo y el ion hidroxilo (Haber y Weiss 1932). Esto puede representarse como sigue:



Y en general,



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



Aún no ha podido explicarse claramente cómo los iones metálicos son capaces de actuar como catalizadores redox en sistemas biológicos en las reacciones de Fenton

y Haber-Weiss, es decir, la reducción del H_2O_2 catalizada por metales. Los procesos de captación y distribución del hierro y de los iones metálicos en general están muy finamente regulados en los mamíferos. Hay un gran número de proteínas de unión a metales (ferritina, transferrina, ceruloplasmina...) que actúan como reserva de iones metálicos y que, además, impiden que estos iones participen en reacciones redox (Halliwell 1991; Rouault y Klausner 1996).

6.4 Estrés oxidativo

6.4.1 Concepto de estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies 1985). Puede ser originado por un exceso de sustancias prooxidantes, una deficiencia de sustancias antioxidantes, o por ambos factores a la vez.

6.4.2 Estrés oxidativo y daño a biomoléculas

La formación de cierta tasa de radicales libres es un proceso normal e inevitable (Slater 1984), ya que son producto de infinidad de reacciones químicas

imprescindibles para la vida celular. Estas especies tan reactivas, no causan daño oxidativo en condiciones normales debido a que la célula está provista de gran cantidad de mecanismos antioxidantes. Sin embargo, cuando la capacidad de los mecanismos antioxidante se ve superada por las agresiones oxidativas, nos encontramos ante un estrés oxidativo. En estas circunstancias, para disminuir el daño que los prooxidantes pueden causar en el organismo, está indicado protegerlo incrementando su capacidad antioxidante. Uno de los modos en que se puede conseguir esto, consiste en la administración de antioxidantes bien como fármacos, bien como complemento dietético (Ames 1983).

6.4.2.1 Daño oxidativo a lípidos

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

El proceso de ataque oxidativo a los lípidos, denominado peroxidación lipídica, comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido

graso, se desprende un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico (Frei 1994; Halliwell y Gutteridge 1995). Esta reacción se produce preferentemente en los carbonos contiguos a enlaces dobles de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que los radicales formados se pueden estabilizar por resonancia con el enlace doble. Este radical centrado en un átomo de carbono reacciona con el O_2 y forma un radical peróxido, $R-COO\bullet$. Los radicales peróxido pueden reaccionar con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes, se forma un radical alquílico ($R'-CH\bullet$) y un peróxido lipídico ($R-COOH$), con lo que se propaga la reacción en cadena radicalaria (Halliwell y Gutteridge 1995).

La peroxidación lipídica se considera como un factor muy importante en el envejecimiento de células aeróbicas (Lippman 1985). El daño oxidativo a los lípidos de membrana constituye, muy probablemente, un factor importante en la disminución de la fluidez de las membranas (Shigenaga, Hagen y cols. 1994). La peroxidación lipídica se puede determinar por diferentes parámetros; TBARS, hidroperóxidos lipídicos, etano y pentano en aire expirado y malondialdehído (MDA). El MDA es un producto formado a partir de la hidrólisis ácida, a $100^\circ C$, de los lipoperóxidos siguiendo el método de Wong (Wong, Knight y cols. 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. Es un parámetro que presenta una elevada estabilidad en el plasma de animales y ha sido ampliamente utilizado en estudios de ejercicio físico (Sacheck, Milbury y cols. 2003; Higuchi, Cartier y cols. 1985).

6.4.2.2 Daño oxidativo a proteínas

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

6.4.2.3 Daño oxidativo al DNA

El DNA 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 DNA formándose radical peroxil. Las posteriores reacciones de estas especies radicalarias en el DNA dan lugar a un gran número de productos.

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

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

Cuyo radical libre ataca a una desoxirribosa del DNA, generalmente produce un ruptura de la hebra. Sin embargo, la hebra intacta puede mantener juntos los dos extremos de la hebra dañada hasta que actúen las enzimas reparadoras, por lo que este tipo de daño no es usualmente crítico para la célula a no ser que haya una rotura cercana en las dos cadenas (Breen y Murphy 1995).

7. ANTIOXIDANTES

7.1 Concepto de antioxidante

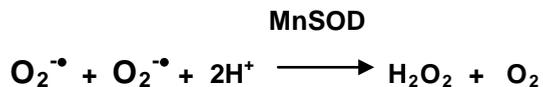
El organismo posee una serie de sistemas de naturaleza enzimática y no enzimática diseñados para protegerse de la acción de los radicales libres por él generados: se denominan antioxidantes. Halliwell y Gutteridge (1995) definieron antioxidante como “cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato” (Chance, Sies y cols. 1979; Halliwell y Gutteridge 1995). Pueden actuar de las siguientes formas:

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

7.2 Antioxidantes enzimáticos

7.2.1 Superóxido dismutasa

Bajo este nombre se incluye a una familia de metaloproteínas ampliamente distribuida en la naturaleza, presente en todas las células que utilizan en su metabolismo el oxígeno, e incluso en algunas bacterias anaeróbicas estrictas y facultativas (Hassan 1989). Su actividad fue descrita por primera vez por McCord y Fridovich en 1969 (McCord y Fridovich 1969). La superóxido dismutasa (SOD) transforma el radical superóxido en peróxido de hidrógeno, constituyendo el primer medio natural de defensa (McCord 1974; Fridovich 1978).



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

Hay descritas cuatro formas diferentes de superóxido dismutasas (Fridovich 1974), según el grupo prostético metálico ligado al enzima. Se observan en la Tabla I.5:

Tabla I.5. Tipos de superóxido dismutasa

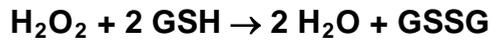
Enzima	Grupopros tético	Localización Celular
Cu-Zinc MnSOD	Cu, Zn	-Citosol -Núcleo
MnSOD	Mn	-Matriz mitochondrial - Citosol
MnSOD	Mn	Bacterias
Fe-MnSOD	Fe	Bacterias

7.2.2 Glutación peroxidasa

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

- Glutación peroxidasa selenio dependiente: es una proteína tetramérica, con cuatro átomos de selenio, que

cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos (Ketterer 1986). Su centro activo contiene una cisteína en la que el azufre ha sido sustituido por selenio (Forstrom, Zakowski y cols. 1978). Su actividad se ve muy afectada por el contenido en selenio de la dieta (Ketterer 1986).



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

7.2.3 Catalasa

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



También es capaz de catalizar ciertas reacciones de peroxidación en presencia de H_2O_2 , actuando sobre

algunos alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos como sustratos (Aruoma, Halliwell y cols. 1989).



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

7.3 Hipoxia y estrés oxidativo

La exposición a ambientes donde la disponibilidad de oxígeno es limitada incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno por diversas fuentes (Askew 2002). El ejercicio físico, la luz ultravioleta, una dieta deficiente en antioxidantes, las catecolaminas, entre otros, han sido descritos como situaciones que pueden producir estrés oxidativo en altura. A continuación reseñamos cada uno de estos mecanismos.

7.3.1 Posibles mecanismos responsables del incremento en la producción de radicales libres con relación a la hipoxia

7.3.1.1 Ejercicio físico

Existe suficiente evidencia para asegurar que el ejercicio muscular intenso genera un aumento en la producción de radicales libres (Davies, Packer y cols. 1982). Al mismo tiempo, se ha sugerido que los radicales libres producidos por el músculo esquelético durante hipoxia contribuyen a la posterior disminución en la producción de fuerza (Mohanraj, Merola y cols. 1998; Askew 2002). En definitiva, este mecanismo que en situación de normoxia puede contribuir a la formación de radicales libres bajo condiciones de disminución de la concentración de oxígeno puede ser incluso más importante (Wozniak, Drewa y cols. 2001).

7.3.1.2 Rayos ultravioleta

Los rayos ultravioleta puede favorecer la liberación de radicales de oxígeno que puede atacar los ácidos grasos insaturados de las membranas indicando peroxidación lipídica y producir daño oxidativo en el área expuesta a intensos rayos solares (Askew 2002).

7.3.1.3 Ausencia de dieta antioxidante

Se ha postulado que uno de los factores que aumentan el estrés oxidativo asociado a la exposición a la altura, sobre todo de aquellos que trabajan bajo estas condiciones es que la administración regular de antioxidantes en la dieta alimenticia no es óptima y que el aumento de elementos pro-oxidantes podría disminuir la defensa antioxidante bajo esta situación. Algunos trabajos sugieren que los mecanismos de defensa antioxidante podrían verse afectados por el trabajo a gran altura (Rokitzki, Logemann y cols. 1994; Bailey y Davies 2001). Rokitzki y cols., han sugerido que uno de los factores que incrementa la peroxidación lipídica además del incremento en la producción de radicales libres por exposición a gran altura, es la insuficiente suplementación de antioxidantes en la dieta (Rokitzki, Logemann y cols. 1994).

7.3.1.4 Fuentes endógenas de producción de radicales libres en situaciones de hipoxia

7.3.1.4.1 Mitocondria

Chandel y cols. postularon en el modelo *in vitro* que la hipoxia estimula la generación de radicales libres en el

complejo III de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Chandel, McClintock y cols. 2000).

Se ha demostrado que la producción de estos radicales activan cascadas de señalización que generan diversas adaptaciones celulares en ambientes reducidos de oxígeno.

Una de esas cascadas de señalización resulta en una activación de HIF-1 para inducir programas transcripcionales a través de la producción de especies reactivas del oxígeno por hipoxia.

7.3.1.4.2 Fenómeno de isquemia – reperfusión

A diferencia de la hipoxia crónica (ininterrumpida), en la hipoxia intermitente se generan especies reactivas de oxígeno, especialmente en las fases de reoxigenación. Este proceso cíclico de anoxia – reoxigenación es similar en la generación de radicales libres a el fenómeno de isquemia reperfusión, que ocurre durante la restricción del flujo sanguíneo a los tejidos (Gutteridge 1994); (Mohanraj, Merola y cols. 1998). Algunos autores han estudiado el estrés oxidativo inducido por la hipoxia-reoxigenación en cultivos de células endoteliales; sin embargo, en estudios en humanos son pocos los estudios sobre los efectos de condiciones hipóxicas en la defensa celular antioxidante.

En el modelo animal, también se ha estudiado el estrés oxidativo asociado a un protocolo de hipoxia intermitente (4000m, cuatro semanas) con ejercicio físico, dando como resultado un incremento en la carbonilación de proteínas en el músculo esquelético, así como un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes como la MnSOD (Radak, Asano y cols. 1997). La exposición a la altura modifica la eficiencia del sistema antioxidante y debido a un incremento en la producción de ERO puede producir daño oxidativo (Radak, Asano y cols. 1998).

7.3.1.4.3 Xantina oxidasa

Durante el ejercicio físico grandes cantidades de ATP son utilizadas por la contracción muscular para producir ADP y AMP, quienes son normalmente regenerados a ATP a través de la fosforilación oxidativa. El efecto combinado de altas tasas de utilización de ATP y ausencia de oxígeno para la regeneración de ATP durante el ejercicio conduce a una acumulación de xantina e hipoxantina (Hellsten 1994). La xantina es convertida a ácido úrico por la xantina oxidasa dando lugar a formación de superóxido. Este proceso podría estar aumentado en situación de hipoxia.



7.4 Efecto de la exposición a la hipoxia en diferentes marcadores de daño oxidativo

7.4.1 Estudios en animales

Uno de los primeros estudios realizados para determinar el efecto de la exposición a ambientes reducidos de oxígeno fue desarrollado a principios de la década de los 80. Yoshikawa y cols., encontraron que ratas sometidas durante dos semanas a una concentración reducida de oxígeno (15%), aumentaron de forma significativa los niveles de peróxidos lipídicos en plasma, cerebro e hígado (Yoshikawa, Furukawa y cols. 1982).

El entrenamiento en altitud, por otra parte, se sabe que incrementa la generación de radicales libres (Radak, Asano y cols. 1997). En este sentido se ha demostrado un incremento en el daño oxidativo a las proteínas y a los lípidos (niveles de malondialdehído) tanto en el plasma como en el músculo esquelético de ratas expuestas a hipoxia y/o en combinación con entrenamiento (Radak, Asano y cols. 1997; Radak, Lee y cols. 1994). Del mismo modo se han encontrado incrementos en los niveles de MDA, en plasma de ratas mantenidas diariamente, durante 6 horas, a 7576m de altura (Kumar, Bansal y cols. 1999). Esta peroxidación lipídica se ha confirmado en otros estudios siguiendo otros protocolos de hipoxia

(Nakanishi, Tajima y cols. 1995; Maiti, Singh y cols. 2006) y en diversos tejidos (corazón, pulmón, riñón e hígado). Elevaciones significativas en los valores de GSSG en cerebro también se han demostrado en exposiciones a grandes alturas (Maiti, Singh y cols. 2006).

En un trabajo publicado recientemente, los autores expusieron a un grupo de animales, durante dos horas, a una altitud de 3000m, durante 9 semanas. Un grupo, por otra parte, entrenó durante cinco minutos cada día, a lo largo de las nueve semanas. Los niveles de peroxidación lipídica en corazón, pulmón y músculo tibial anterior, no se modificaron como respuesta a la exposición a la hipoxia. Sin embargo, los animales entrenados en combinación con el protocolo de hipoxia, mostraron incrementos en este marcador comparado con el grupo control. Estos datos sugieren que las exposiciones a bajas alturas, no son suficientes, al menos en este tipo de tejidos, para generar estrés oxidativo (Altan, Atukeren y cols. 2009).

En un interesante trabajo publicado en 2005, Ashay cols., demostraron que, en animales sometidos a hipoxia intermitente (5700m y 6300m durante noventa minutos), la fragilidad osmótica del eritrocito se encontraba incrementada por un aumento de la peroxidación lipídica en la membrana celular (Asha Devi, Subramanyam y cols. 2005). Dos años más tarde, el mismo grupo encontró que

animales sometidos a idéntico diseño experimental que el anterior, pero suplementados con antioxidantes orales (vitamina C y vitamina E) se prevenía la hemólisis asociada a la exposición a la hipoxia así como el estrés oxidativo comparado con el grupo placebo (Devi, Vani y cols. 2007). En conclusión, bajo condiciones de normoxia, los radicales libres generados son neutralizados por antioxidantes intracelulares. Sin embargo, bajo condiciones de hipoxia, la autooxidación de la hemoglobina se encuentra facilitada y un aumento en el flujo de radicales superóxido ocurre (Rifkind, Zhang y cols. 1991), alterando la fluidez, el potencial de membrana, la permeabilidad a diferentes iones y finalmente la ruptura de la membrana generando la liberación de sus organelos contenidos (Sato, Kamo y cols. 1995).

7.4.2 Estudios en seres humanos

El efecto del daño oxidativo asociado a la exposición a ambientes reducidos de concentración de oxígeno, en humanos, ha sido un tema bastante estudiado especialmente con relación a la capacidad de mantener un trabajo para aquellos sujetos que lo desarrollan en estas condiciones (personal del ejército, escaladores, entre otros), sobre todo para estudiar la patogénesis vinculada al mal agudo de montaña. Se ha sugerido que

la excesiva producción de especies reactivas del oxígeno como consecuencia de la exposición a la gran altura podría jugar un papel importante en la patogénesis de la enfermedad aguda de montaña y que el tratamiento con antioxidantes sugeriría que los radicales libres estarían involucrados en el desarrollo de esta enfermedad (Bailey y Davies 2001). A continuación exponemos algunos estudios relevantes sobre el efecto de la exposición a la altura en el daño oxidativo en humanos.

De igual forma que en el modelo animal, en humanos, el efecto de la hipoxia depende en gran parte de si la exposición es aguda o crónica y de la altitud alcanzada. En un estudio reciente se encontró que una aguda exposición a hipoxia hipobárica durante cuatro horas a 5500 m aumentaba los niveles de glutatión oxidado en plasma comparado con el grupo control (Magalhaes, Ascensao y cols. 2004). Respecto a otros indicadores de daño oxidativo, Joanny y cols., encontraron que la exposición simulada a 6000m (hipoxia hipobárica) y 8848m durante treinta y un días aumentaba de forma significativa la lipoperoxidación en sangre y disminuía el rendimiento motor y mental comparado con el grupo control (Joanny, Steinberg y cols. 2001). Respecto al daño oxidativo al DNA, Moller y cols., encontraron que el ejercicio físico desarrollado en condiciones de altura

(4560m) aumentaba en orina la excreción de 8-oxo-7,8-dihidro-desoxi-guanina (8-oxodG) (Moller, Loft y cols. 2001).

Como se observará más adelante una de las alternativas de la utilización de la hipoxia para aumentar el rendimiento físico ha sido el régimen “living high-training low”, debido al potente papel inductor de adaptaciones fisiológicas sin disminuir la intensidad y el volumen de entrenamiento (Brugniaux, Schmitt y cols. 2006). No obstante, los efectos de la exposición a la hipoxia no desaparecen y en los últimos años han venido aumentando los estudios que tienen como objetivo dilucidar el efecto de este régimen en el estrés oxidativo. De igual forma, se ha hipotetizado que este tipo de régimen podría alterar el balance prooxidante/antioxidante. Un grupo en Francia se ha interesado por este fenómeno. En un primer trabajo, (Pialoux, Mounier y cols. 2009) encontraron que diez y ocho días de un régimen de “living high–training low” en atletas de resistencia aumentaba los niveles de MDA en plasma. No obstante, este mismo incremento fue observado en el grupo normoxia entrenado. Respecto a la capacidad antioxidante, encontraron que todos los marcadores (alfa-tocoferol, beta-caroteno, ácido lipóico) disminuyeron sólo en el grupo “living high–training low”,

cambio no observado en el grupo normoxia entrenado. Por tanto, la combinación de estos dos factores, la hipoxia y el entrenamiento produce una disminución del estado antioxidante en atletas de resistencia.

Sin embargo, el efecto de este régimen en otras modalidades deportivas no ha encontrado desequilibrio en el estado antioxidante. Éste grupo encontró (Pialoux, Mounier y cols. 2009) que el mismo régimen pero durante menor tiempo (trece días) en condiciones de reposo no aumenta los niveles de MDA en plasma respecto a los valores alcanzados en el primer día. No obstante, los niveles de productos avanzados de proteínas oxidadas en plasma sí aumentaron respecto a los valores basales antes de iniciar el experimento. Sin embargo, en respuesta a una prueba de agotamiento a 4800m, el grupo “living high-training low” no aumentó los niveles de MDA ni las proteínas oxidadas comparado con el grupo control al finalizar esta prueba, sugiriendo un efecto protector del entrenamiento. A su vez, midiendo similares parámetros de la capacidad antioxidante no observaron diferencias después de trece días de LHTL en nadadores. La causa de los resultados contrarios apunta según ellos a la corta duración del régimen (trece días vs diez y ocho días) y a la diferencia de tiempo entrenando a la máxima intensidad.

En conclusión, estudios tanto en animales como en humanos son ampliamente consistentes en que la exposición, bien a la altura o bien a condiciones de disminución de la concentración de oxígeno, se encuentra asociado con daño oxidativo a lípidos, proteínas y DNA. Este daño puede ser debido a un incremento en la producción de radicales libres y/o a una disminución de la capacidad antioxidante.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente Tesis consiste en el estudio (a nivel funcional y molecular) de las adaptaciones hematológicas y musculares inducidas por el entrenamiento físico y su combinación con el tratamiento con Epo e/o hipoxia intermitente normobárica. Del mismo modo nos planteamos el estudio de distintas estrategias de manipulación de variables hematológicas y su implicación en el dopaje sanguíneo.

Objetivos específicos:

Los objetivos específicos son:

1. Estudiar el efecto del tratamiento con rHuEpo en el músculo esquelético en animales de experimentación.
2. Estudiar el efecto de un protocolo de hipoxia intermitente normobárica, en combinación con entrenamiento anaeróbico, sobre diversos parámetros hematológicos, musculares y de rendimiento físico en animales de experimentación.
3. Estudiar el papel de la hipoxia como método enmascarador de dopaje en animales de

experimentación:

- 3.1. Comparando el efecto, sobre diversas variables hematológicas, de dos tratamientos con rHuEpo con un protocolo de hipoxia intermitente normobárica.
- 3.2. Estudiando el efecto de un protocolo de hipoxia intermitente normobárica, tras la administración de rHuEpo, en las variables hematológicas determinadas por las autoridades antidopaje.
4. Estudiar el papel de la desmopresina como método enmascarador de dopaje sanguíneo en seres humanos.
5. Estudiar los mecanismos moleculares implicados en las principales adaptaciones musculares estudiadas en los objetivos anteriores (PGC-1 α y MnSOD) en un modelo *in vitro* de cultivo primario de células musculares.

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. Estudios en animales de experimentación

Todos los protocolos experimentales que describimos en este apartado fueron realizados de acuerdo con lo establecido en el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE 21 de octubre de 2005). El Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universitat de València aprobó todos los diseños experimentales de la presente Tesis Doctoral.

1.1.1 Estudio sobre el efecto de un tratamiento con rHuEpo en diversas adaptaciones musculares y hematológicas en animales de experimentación

1.1.1.1 Animales de experimentación

Catorce ratas Wistar macho (~3 meses de edad y ~230 gramos de peso) fueron divididas al azar en dos grupos experimentales: grupo control (n=7) y grupo tratado con rHuEpo (n=7). Las ratas se estabularon en el animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universitat de València, bajo condiciones constantes de temperatura ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$), humedad relativa (60%) y ciclos de luz y oscuridad 12h-12h. El acceso al agua y a la comida fue libre. Los animales se alimentaron con una dieta estándar para roedores (2014 Harlan Teklad Global diet ®). El contenido de hierro en la dieta fue de $196 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

1.1.1.2 Diseño experimental del tratamiento con rHuEpo

El grupo tratado con Epo (ProSpec-Tany TechnoGene) recibió una dosis subcutánea de 300 UI tres veces por semana durante dos semanas. El grupo vehículo recibió

de forma subcutánea similar volumen de NaCl a una concentración de 0.9%, el mismo número de días y durante el mismo periodo.

1.1.1.3 Extracción de muestras de sangre y tejidos

Dos muestras de sangre de cola (0.4 mL cada una) fueron recogidas en tubos con EDTA, a diferentes tiempos durante todo el experimento: Muestra basal (Inicio) y muestra final (dos semanas después). Todas las muestras fueron recogidas por la mañana a la misma hora para controlar las variaciones diurnas. En la última extracción, además de la sangre obtenida para las determinaciones hematológicas (tubo con EDTA), se extrajo sangre adicional por punción en vena cava inferior para recolección de suero (tubo seco). Una vez que la sangre coaguló a temperatura ambiente (~25°C) las muestras fueron centrifugadas a 760 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. El suero fue rápidamente recogido y guardado a -20°C. El músculo gastrocnemio (incluyendo porciones blanca y roja) y el músculo sóleo fueron extraídos rápidamente, siendo recogidos con la técnica del “freeze-clamping”. Para esta técnica se utilizan unas pinzas previamente sumergidas en nitrógeno líquido, se aplasta el tejido y se congela en nitrógeno preservando todas sus características bioquímicas. Los animales

fueron sacrificados, tras la administración de una sobredosis de pentotal sódico 50 mg.kg^{-1} , al finalizar las extracciones.

1.1.2 Estudio sobre el efecto de un protocolo de hipoxia intermitente normobárica, en combinación con entrenamiento anaeróbico, sobre diversos parámetros hematológicos, musculares y de rendimiento físico en animales de experimentación

1.1.2.1 Animales de experimentación

Veintidós ratas Wistar macho (~3 meses de edad y ~250 gramos de peso) fueron divididas al azar en cuatro grupos experimentales: grupo normoxia reposo, normoxia entrenado, hipoxia reposo (12h pO_2 del 21% /12h pO_2 del 12%) e hipoxia entrenado (12h pO_2 21% /12h pO_2 12 %). Las ratas se estabularon en el animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universitat de València en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior.

1.1.2.2 Protocolo de hipoxia intermitente normobárica

Los grupos normoxia estuvieron 24 horas a una pO_2 del 21% durante 21 días. Los grupos hipoxia fueron mantenidos 12 horas (9.00-21.00) a una pO_2 del 21% y 12 horas (21.00-9.00) a una pO_2 del 12% (~4000m) durante el mismo periodo de tiempo. El tratamiento hipóxico fue realizado con una cámara de hipoxia normobárica “Colorado Altitude Training” (modelo: CAT- 430™ Walk-In Tent).

Tabla III.1. Diseño experimental. Número de animales por grupo

	Normoxia Reposo	Normoxia Entrenado	Hipoxia Reposo	Hipoxia Entrenado
Número de animales	5	5	6	6

1.1.2.3 Estudio sobre el efecto del entrenamiento anaeróbico en la capacidad máxima aeróbica

Los animales fueron entrenados en un tapiz rodante (Columbus Instruments; Model 1050 LS Exer 3/6) con una inclinación de 15%, 5 días a la semana durante 21 días, siguiendo una modificación del método de Ogura y cols., (Ogura, Naito y cols. 2005). El entrenamiento fue

realizado en condiciones de normoxia. La velocidad inicial fue de 30-45 m.min⁻¹ en la primera semana y se incrementó de forma gradual hasta alcanzar la velocidad de 50-58 m.min⁻¹. Cada sesión de entrenamiento consistió en series de 10 repeticiones y cada serie fue separada por 2 minutos de descanso. El tiempo, velocidades y frecuencia se detallan a continuación:

Tabla III.2. Protocolo de entrenamiento anaeróbico

Semana	Familiarización	1	2	3
Velocidad (m.min ⁻¹)	10-30	30-45	42-50	50-58
Duración del intervalo (min)	1	1	1	1
Periodo descanso (min)	2	2	2	2
Repeticiones (min)	10	10	10	10

1.1.2.4 Extracción de muestras de sangre y tejidos

Dos muestras de sangre de cola (0.4 mL cada una) se colocaron en tubos con EDTA, a diferentes tiempos durante todo el experimento para las determinaciones hematológicas: muestra basal (Inicio) y día 21 (Finalización del experimento). En la última extracción, se recogió una muestra extra de sangre de la vena cava inferior. Ésta se colocó en un tubo con EDTA para ser centrifugada a 760 x g durante 20 minutos a temperatura

ambiente. El plasma resultante fue recogido y almacenado a -20°C para posteriormente realizar medición espectrofotométrica de la eritropoyetina. Tanto la porción blanca, como la roja, del músculo gastrocnemio fueron extraídas con rapidez mediante la técnica del “freeze-clamping”, como se detalla en el apartado anterior.

1.1.2.5 Sacrificio de los animales

Todos los animales fueron sacrificados un día después de la última prueba para determinar la velocidad máxima aeróbica. Las ratas fueron anestesiadas con una dosis de pentotal sódico 50 mg.kg^{-1} . Durante la anestesia se abrió la cavidad abdominal y se accedió a la vena cava inferior con una jeringa de 10 mL para obtener la sangre como fue explicado anteriormente.

1.1.3 Estudio sobre el efecto de dos tratamientos con rHuEpo y un protocolo de hipoxia intermitente normobárica sobre las adaptaciones hematológicas en animales de experimentación

1.1.3.1 Animales de experimentación

Se emplearon veintitrés ratas Wistar macho (3 meses de edad y ~230 gramos de peso). Las ratas se estabularon en las condiciones descritas en los apartados anteriores.

Tabla III.3. Diseño experimental. Número de animales por grupo

	Hipoxia intermitente normobárica	Tratamiento 300 UI de rHuEpo	Tratamiento 500 UI de rHuEpo
Número de animales	6	7	10

1.1.3.2 Protocolo de hipoxia intermitente normobárica y tratamientos con rHuEpo

El grupo hipoxia fue mantenido durante 12 horas por día (9.00-21.00) a 21% pO₂ y 12 horas por día (21.00-9.00) a 12% pO₂ (~4000m) durante un periodo de dos semanas.

El tratamiento hipóxico fue realizado con el sistema “Colorado Altitude Training” chamber (model: CAT-430™ Walk-In Tent). El segundo grupo fue tratado tres veces por semana durante dos semanas con una dosis subcutánea de 300 UI de rHuEpo (ProSpec-Tany TechnoGene). El tercer grupo, fue tratado con una dosis subcutánea de 500 UI de rHuEpo (ProSpec-Tany TechnoGene), tres veces por semana, durante dos semanas. Todos los animales fueron sacrificados al finalizar las dos semanas, utilizando una sobredosis del anestésico (pentotal sódico). Durante la anestesia se abrió la cavidad abdominal y se accedió a la vena cava inferior con una jeringa de 10 mL para obtener la sangre como fue explicado anteriormente.

1.1.4 Estudio sobre el efecto de un protocolo de hipoxia intermitente normobárica en parámetros hematológicos después de la administración de rHuEpo en animales de experimentación

1.1.4.1 Animales de experimentación

Se utilizaron diez ratas Wistar macho (3 meses de edad y ~230 gramos de peso). Los animales fueron tratados tres

veces por semana durante dos semanas con una dosis subcutánea de 500 UI de rHuEpo. Después del tratamiento los animales fueron divididos al azar en dos grupos: Un grupo normoxia (n=5) y un grupo hipoxia (n=5). Las ratas se estabularon en las condiciones descritas en los apartados anteriores.

1.1.4.2 Tratamiento con rHuEpo y posterior protocolo de hipoxia intermitente normobárica

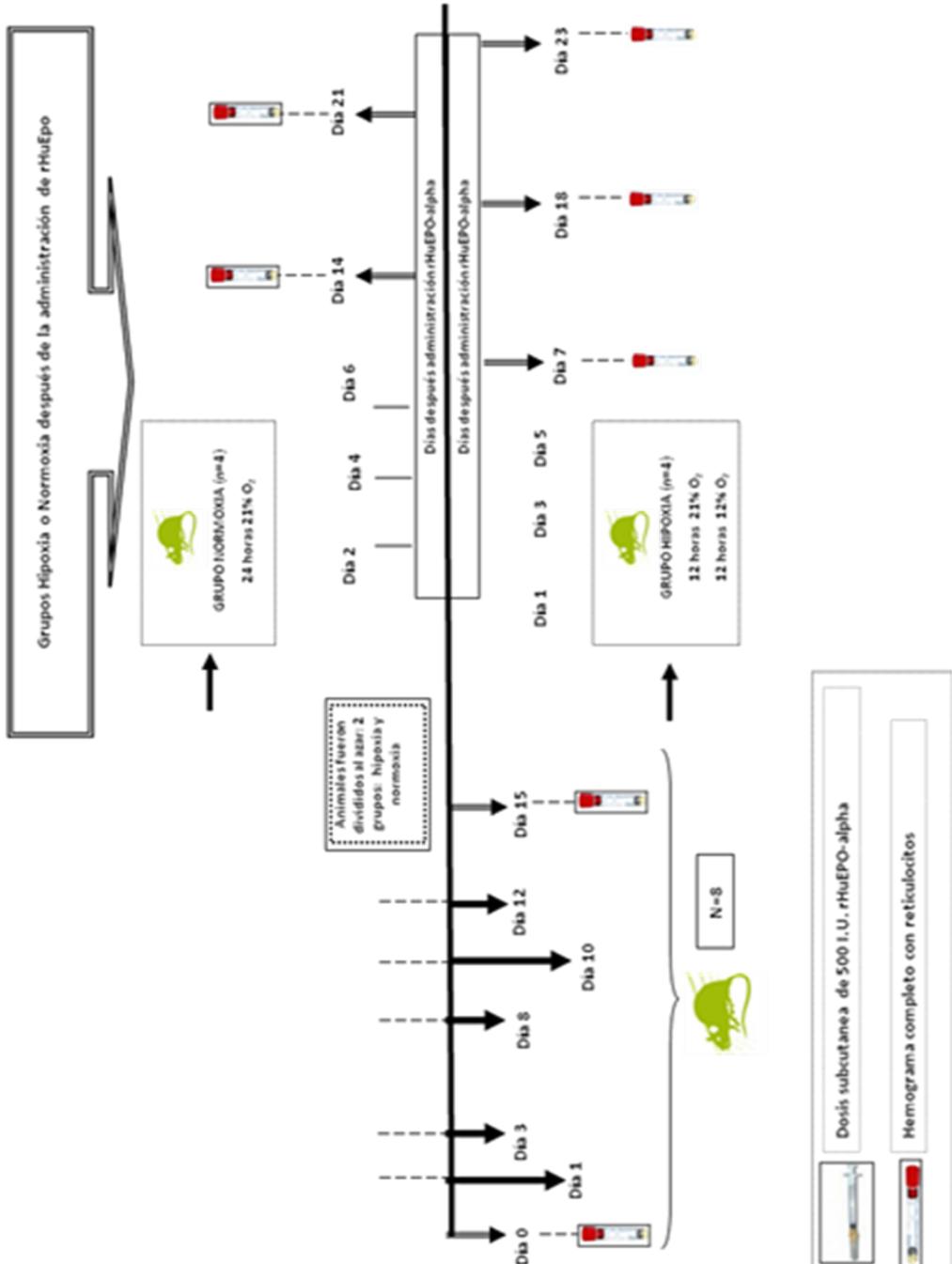
Al inicio del experimento todos los animales recibieron una dosis subcutánea de Epo de 500 UI (ProSpec-Tany TechnoGene) tres veces por semana durante dos semanas. El grupo normoxia, después de las dos semanas de tratamiento con rHuEpo, fue mantenido durante veintitrés días a 21% pO₂. El grupo hipoxia después de las dos semanas de tratamiento con rHuEpo fue mantenido durante doce horas por día (9.00-21.00) a 21% pO₂ y doce horas por día (21.00-9.00) a 12% pO₂ (~4000m) durante el mismo periodo de tiempo (veintitrés días). El tratamiento hipóxico fue realizado con el sistema “Colorado Altitude Training” chamber (model: CAT-430™ Walk-In Tent).

1.1.4.3 Muestras de sangre

Siete muestras de sangre de cola (0.4 mL cada una) se colocaron en tubos con EDTA, a diferentes tiempos durante todo el experimento: muestra basal (día 0), tres días después de la finalización del tratamiento con rHuEpo (día 15), siete (día 22), catorce (día 29), dieciocho (día 33), veintiún (Día 36) y veintitrés días (día 38) después del comienzo del protocolo de hipoxia intermitente normobárica (Ver Figura III.1).

En la última extracción, se obtuvo una muestra de sangre de la vena cava inferior que se colocó en un tubo sin anticoagulante. Después de que todas las muestras coagularan a temperatura ambiente (20-25 °C), fueron centrifugadas a 760xg durante 20 minutos a temperatura ambiente. El suero fue recogido rápidamente y guardado a -20°C para posterior medición de Epo mediante técnica de inmunoensayo.

Figura III.1. Diseño experimental del estudio



1.4.4.4 Sacrificio de los animales

Todos los animales fueron sacrificados al día veintitrés después de la finalización del tratamiento con rHuEpo, utilizando una sobredosis del anestésico (pentotal sódico). Durante la anestesia se abrió la cavidad abdominal y se accedió a la vena cava inferior con una jeringa de 10 mL para obtener la sangre como fue explicado anteriormente.

1.2. Estudio en seres humanos

1.2.1 Estudio del efecto de un tratamiento con desmopresina sobre los parámetros hematológicos utilizados para detectar el dopaje sanguíneo

1.2.1.1 Seres humanos

Ocho voluntarios (hombres) físicamente activos (26 ± 4 años, 173 ± 3 cm. 70 ± 4 Kg) participaron en el estudio. Todos los sujetos eran no fumadores y no padecían ninguna enfermedad conocida. Los sujetos fueron informados por escrito de la naturaleza del estudio, incluyendo los riesgos potenciales. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación en Humanos de la Universitat de València.

1.2.1.2 Diseño experimental

Para el desarrollo de este estudio aplicamos un modelo cruzado intra-sujeto. Todos los sujetos fueron requeridos para visitar el laboratorio en dos ocasiones con un intervalo de un mes. En ambas ocasiones determinamos su estatura, peso y el $VO_{2\text{máx}}$. Un resumen de las características de los sujetos puede observarse en la Tabla III.4. Los sujetos fueron instruidos para seguir la misma rutina de dieta y ejercicio una semana antes de cada análisis y evitar ejercicio físico extenuante cuatro días antes de cada análisis.

En la primera visita al laboratorio, los sujetos permanecieron en una silla durante 30 minutos y las muestras de sangre fueron extraídas en esta posición. Inmediatamente después de la extracción, los sujetos recibieron una dosis oral de 4.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de DDAVP (Desmopressin acetate-Minurin®) e ingirieron 1.5 L de agua mineral (contenido de sodio, 13.2 mg/L) 15 minutos después de recibir la dosis con DDAVP y durante 15 minutos. Tres horas después de la ingesta de agua una segunda muestra de sangre fue obtenida. Los sujetos siguieron idéntico protocolo durante la segunda visita al laboratorio. Sin embargo, en esta ocasión sólo ingirieron 1.5 L de agua mineral (contenido de sodio, 13.2 mg/L). Tres de los sujetos no cumplieron los requerimientos

expuestos en el párrafo anterior (dieta y ejercicio) y fueron excluidos del estudio.

Todas las muestras de sangre fueron recogidas en la mañana y a la misma hora en la vena superficial de la fosa cubital anterior. Utilizamos: un tubo con EDTA para el análisis de hemoglobina, hematocrito y reticulocitos; otro tubo con heparina para los análisis en el plasma de creatina, albúmina, proteínas totales y glucosa; y un tercer tubo seco para el análisis de Epo en suero.

Las muestra para el análisis del plasma y suero fueron centrifugadas a 760 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. El plasma y el suero fueron recogidos en una alícuota y almacenados a -20°C para posterior medición de la concentración de eritropoyetina mediante técnica de inmunoensayo.

Tabla III.4. Características de los sujetos

	Primera visita al laboratorio (n=8)	Segunda visita al laboratori o (n=5)
Edad (años)	27.0 ± 3.0	26.0 ± 4.0
Estatura (cm)	173.0 ± 2.0	173.5 ± 3.4
Peso (Kg)	69.5 ± 3.0	70.0 ± 4.0
VO _{2máx} (mL·Kg ⁻¹ ·min ⁻¹)	59.9 ± 2.9	60.2 ± 3.3

Valores expresados como media ± desviación estándar (n=5).

1.3. Estudio *in vitro*. Papel de las especies reactivas del oxígeno y PGC-1 α en la regulación por contracción de la inducción de MnSOD en músculo esquelético de ratón

Los experimentos *in vitro* realizados en el Departamento de Ciencias del Deporte y del Ejercicio, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Copenhague, Dinamarca, fueron aprobados por la Inspección Danesa de Experimentación con Animales y cumplieron con la “Convención Europea sobre Protección de Animales Vertebrados Utilizados para Experimentos y otros fines científicos” (Consejo de Europa, no. 123, Estrasburgo, Francia, 1985).

1.3.1 Ratones

Se utilizaron ratones deficientes (KO) de PGC-1 α en una cepa de ratón C57BL/6J y ratones silvestres C57BL/6J. Los ratones se estabularon en el animalario de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Copenhague, bajo condiciones constantes de temperatura ($23\pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa (60%) y ciclos de luz y oscuridad 12h-

12h. Los animales recibieron una dieta estándar para roedores (Altromin no. 1324; Chr. Pedersen, Ringsted, Dinamarca). Una vez alcanzados los 2-3 meses de edad, el músculo esquelético de las extremidades inferiores y superiores, fue extraído para el aislamiento de células satélite.

1.3.2 Aislamiento y cultivo primario de células musculares de ratón

El músculo esquelético de las extremidades inferiores y superiores fue extraído rápidamente. Se aislaron del mismo la células satélite siguiente el protocolo descrito por Lynge y colaboradores (Lynge, Juel y cols. 2001). Las células fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera con 8% CO₂. Durante los dos primeros días, las células fueron cultivadas con medio de cultivo primario que contenía DMEM con 20% de suero bovino fetal, 1% de antibióticos y posteriormente con medio de fusión que contenía DMEM con 10% de suero de caballo y 1% de antibióticos. Al tercer día de la siembra, los miocitos comienzan a diferenciarse formando miotubos multinucleados. Las células fueron utilizadas al día 7 y 8 cuando los miotubos fueron catalogados como maduros morfológicamente.

1.3.3 Protocolo de estimulación eléctrica

Diez y seis horas antes de la estimulación eléctrica, el medio fue cambiado por medio DMEM con 0.1% de albúmina de suero bovino (BSA) y 1% de antibióticos. Las células de músculo esquelético fueron electroestimuladas en placas de 35 mm con el uso de electrodos de platino como fue descrito por Jensen y cols., en 2004 (Jensen, Schjerling y cols. 2004). Las células fueron estimuladas durante 120 minutos a 20 V, 50 Hz, con series de 0.5 s y pausas de 0.5 s entre cada serie. El estímulo consistió en 1 ms de cadencia de duración en intervalos de serie con 0.02 ms de intervalo de cadencia.

1.3.4 Protocolo agudo de electroestimulación en presencia o ausencia de antioxidantes

Siete días después de la siembra y un día antes del protocolo de estimulación eléctrica, los cultivos celulares de músculo esquelético fueron tratados con DMEM 0.1% BSA (control) o con DMEM 0.1% BSA y una combinación de antioxidantes con la siguiente composición: SOD ($30 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), CAT ($300 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), GPX ($5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) y GSH (0.5 mM). Después de 24 horas de incubación, el medio fue reemplazado conservando las mismas condiciones. Una

hora después, las células fueron electroestimuladas durante 120 minutos. Las células fueron recogidas en Trizol 2 horas después de la finalización del protocolo de estimulación eléctrica para la determinación del contenido de mRNA para PGC-1 α y MnSOD.

1.3.5 Protocolo de electroestimulación repetida en presencia o ausencia de antioxidantes

Siete días después de la siembra, las células fueron tratadas con medio de fusión con penicilina 0.1% como control, o con la misma combinación antioxidante descrita anteriormente para el experimento agudo. Al día siguiente, las células fueron electroestimuladas durante 120 minutos cada 24 horas. El medio fue reemplazado cada 48 horas y 24 horas después del cuarto día de estimulación, las células fueron recogidas con DPBS (pH: 7.4) y guardadas para la determinación de la expresión a nivel de proteína de la MnSOD.

1.4. Aparatos

• Espectrofotómetro

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

- **Autoclave**

Marca SELECTA, model Autester-G.

- **Agitador magnético**

Marca Selecta, modelo Agimatic-S

- **pHmetro**

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

- **Baño termostatzado**

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

- **Fluorímetro**

Marca Perkin Elmer, modelo LS 50B.

- **Balanzas**

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

- **Sistema de purificación de agua**

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

- **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.

- **Dispositivo fotográfico**

Sistema fotográfico marca Polaroid, modelo MP 4+.

- **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 .

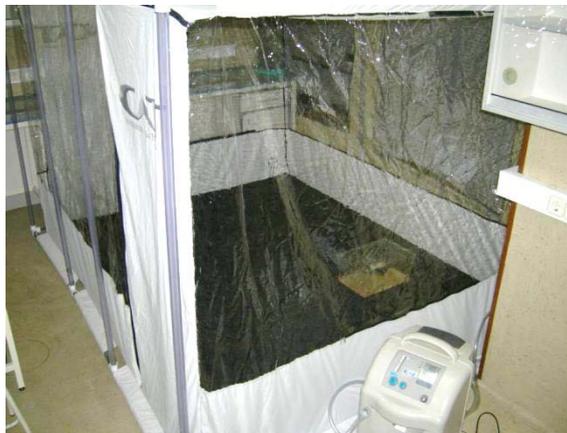
- **Hemocue**

Se utilizó el sistema Hemocue Hb 201 +.

- **Cámara hipóxica normobárica**

Se utilizó la cámara hipóxica marca Colorado Altitude Training - 430™ Walk-In Tent (Figura III.2).

Figura III.2 Cámara hipóxica normobárica marca Colorado Altitude Training



- **Determinaciones hematológicas**

Para el análisis de las principales variables hematológicas (Hemoglobina, hematocrito, % reticulocitos, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración media de hemoglobina corpuscular y amplitud de distribución de los hematíes) se utilizó el equipo SYSMEX XT 2000i (Roche Diagnostics).

- **Tapiz rodante**

Para someter a las ratas al protocolo de entrenamiento anaeróbico y a la prueba de determinación de la velocidad máxima aeróbica se utilizó un tapiz rodante Treadmill 3R 6 y el modelo de tapiz Quinton para roedores.

- **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.

1.5. Reactivos

- **Determinación de proteínas**

En los extractos citosólicos se utilizó el “Protein ASSAY Kit” de la firma Sigma- Aldrich Química. Este kit contiene

el reactivo de Lowry y el reactivo de Folin (Lowry y cols., 1951). En condiciones alcalinas el cobre se une a las proteínas. Cuando el reactivo fenólico de Folin se añade éste también se une a ellas. El reactivo unido es lentamente reducido y cambia su color de amarillo a azul. El método se describe con más detalle en la página 119 de la presente Tesis.

- **Determinación de eritropoyetina en plasma y suero**

Para medir la concentración de Epo en plasma y suero se utilizó el “Quantikine Kit Mouse/Rat Erythropoietin” de la firma R y D Systems.

- **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.

- **Enzimas**

Glutación reductasa, Glutación-S-transferasa (Boehringer Mannheim). Xantina oxidasa y peroxidasa de rábano (SIGMA).

• Materiales para cultivo celular

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, suero bovino fetal y suero de caballo fue obtenido de Gibco (Alemania). Colagenasa II, tripsina y penicilina/estreptomocina fue obtenida de Boehringer Mannheim (Germany). DNase, Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), glutatión reducido (GSH), glutatión peroxidasa (GPX, EC 1.11.1.9), catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) y superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), fue obtenido de Sigma (MO, USA). DCFH-DA (2,7-dichlorofluorescein-diacetate/2,7-dichlorofluorescein) fue obtenido de Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Trizol fue obtenido de Invitrogen (Invitrogen, CA, USA) mientras que el resto de reactivos para el aislamiento del RNA fue comprado de Sigma (MO, USA). Superscript fue obtenida de Invitrogen, oligos y sondas Tag Copenhagen (Denmark) y la master-mix de la PCR de Applied Biosystems (CA, USA).

• Otros reactivos

Fosfato potásico, CDNB, cloruro sódico, EDTA, EGTA, MOPS, HEPES, tris, glicina, acrilamida, bisacrilamida, ácido acético, sacarosa, ácido clorhídrico, SDS, azul de bromofenol, azul comassie, alopurinol, DMSO, mercaptoetanol, TEMED, BSA, CSPD, APS, DTT, PMSF, aprotinina, leupeptina, pepstatina, metanol, ácido bórico, ácido maleico, Tween 20.

2. Métodos

2.1. Protocolo para determinar la capacidad máxima aeróbica en ratas

Los animales que fueron sometidos a la prueba incremental en tapiz rodante (Columbus Instruments; Model 1050 LS Exer 3/6) para determinar la velocidad máxima aeróbica, siempre realizaron los test bajo condiciones de normoxia (21% pO₂). Después de los seis minutos iniciales a una velocidad de 15 m/min y con 15% de inclinación, la velocidad fue incrementando cada dos minutos hasta que el animal no pudo mantener la intensidad del ejercicio (Tabla III.5). La fatiga fue definida como la tercera vez en que el animal no pudo mantener la velocidad y se mantuvo más de dos segundos en la sección del tapiz en la que se produce la descarga eléctrica. La máxima velocidad de carrera fue considerada como la capacidad máxima de trabajo aeróbico (Davies, Packer y cols. 1982). La capacidad máxima aeróbica es definida como la máxima velocidad a la cual el consumo máximo de oxígeno es alcanzado (John-Alder y Bennett 1981; Taylor, Maloiy y cols. 1981).

Tabla III.5. Prueba para determinar la capacidad máxima aeróbica

Tiempo	Velocidad	Inclinación
0-6´	15.0 m/min	15%
6´-8´	20.1 m/min	15%
8´- 10´	26.8 m/min	15%
10´- 12´	33.5 m/min	15%
12´- 14´	40.2 m/min	15%
14´- 16´	46.9 m/min	15%
16´- 18´	53.6 m/min	15%
18´- 20´	60.3 m/min	15%
20´-22´	67.0 m/min	15%

2.2. Determinación de Eritropoyetina

2.2.1. Fundamento

Se utilizó un ELISA para la determinación de esta hormona en las muestras de nuestros animales. El método se basa en la detección de un anticuerpo monoclonal específico para Epo de rata que directamente genera un producto al cual se le determina su densidad óptica. La intensidad del color medido está en proporción con la cantidad de Epo en el plasma o suero analizado. Los valores de la muestras se relacionan con una curva estándar.

2.2.2. Preparación de la muestra

Se recoge la muestra de plasma en un tubo con EDTA o el suero usando un tubo seco. Se centrifuga durante 20 minutos $1000\times g$ a temperatura ambiente, se hacen alícuotas y se guarda -20°C .

2.2.3. Procedimientos y cálculos

Se preparan todos los reactivos, la curva estándar y las muestras. Se añaden $50\ \mu\text{L}$ del diluyente RD1-38 en cada recipiente. Se añaden ~~50~~ de muestra y se deja incubando por dos horas a temperatura ambiente en un agitador. Luego, se añaden $400\ \mu\text{L}$ del tampón de lavado por cuatro veces y se aspira el exceso. Se añaden $100\ \mu\text{L}$ de la Epo conjugada en cada recipiente. Se tapa y se incuba durante dos horas a temperatura ambiente en un agitador. Se repite el lavado. Se añaden $100\ \mu\text{L}$ de la solución sustrato en cada recipiente, se incuba por treinta minutos en oscuridad. Luego se añaden $100\ \mu\text{L}$ de la solución que detiene la reacción. La medición se realiza a $450\ \text{nm}$.

El cálculo se obtiene del promedio de las lecturas duplicadas para cada muestra. Se construye una curva estándar trazando la absorbancia para cada concentración conocida. Los datos son comparados

trazando el registro de las concentraciones de eritropoyetina contra el registro de las concentraciones conocidas. Se determina la pendiente usando el ajuste de regresión lineal.

2.3. Determinación de hemoglobina, hematocrito y % reticulocitos

La medición directa realizada por SYSMEX XT2000i en la serie roja incluye: eritrocitos, hemoglobina, hematocrito y porcentaje de reticulocitos. De igual forma, se incorpora al análisis el volumen corpuscular medio, la hemoglobina corpuscular media, la concentración de hemoglobina corpuscular media.

2.4. Determinación del índice de estimulación eritrocitario

El índice de estimulación es calculado con los valores de hemoglobina (en g/L) y reticulocitos (%), en el modelo OFF- Hr Score:

$$= Hb \left(\text{en } \frac{g}{L} \right) - 60\sqrt{Ret\%}$$

2.5. Determinación de creatinina, albúmina, proteínas totales y glucosa

En el estudio en humanos, la creatinina, albúmina, proteínas totales y glucosa fueron analizados dentro de las tres horas posteriores a la extracción. La creatinina fue determinada por el método enzimático de Jaffe (Jaffe, 1886), la albúmina fue determinada por el método BCP violeta de bromocresol (Hill, 1985), las proteínas totales fueron determinadas por el método de Biuret (Biuret, 1953), mientras que la glucosa fue determinada por el método enzimático de la hexoquinasa (Widdowson y cols., 1972).

2.6. Extracción de proteínas a partir de tejido muscular

2.6.1. Fundamento

Para llevar a cabo la valoración de la expresión de las proteínas (Ver Tabla III.6) por la técnica del Western Blotting, es necesaria la obtención de extractos de proteínas citoplasmáticas.

2.6.2. 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; Sacarosa 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 transfiere 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 homogenado se pasa a tubos de microcentrífuga y se centrifuga durante 15 minutos a 12000 xg a 4°C.
- 6.- El sobrenadante que contiene extractos proteicos citoplasmáticos es alicuotado y almacenado a -80°C hasta su valoración y utilización.

2.6.3. Cuantificación

En los extractos citoplasmáticos los valores de concentración de proteínas fueron obtenidos por el método de Lowry (Lowry, Rosebrough y cols. 1951).

2.7. Método para determinar la concentración de proteínas: método de Lowry

2.7.1. Fundamento

Se utilizó el Protein Assay Kit, basado en una modificación de Peterson del método de Lowry (Lowry, Rosebrough y cols. 1951) (Total Protein Kit Micro Lowry - Peterson's Modification Ref. L3540, Sigma). El reactivo de Lowry contiene dodecilsulfato sódico, que facilita la disolución de las proteínas parcialmente insolubles y tartrato cúprico alcalino, que se une a las proteínas. Por su parte el reactivo de Folin contiene fenol, que al interaccionar con el tartrato da lugar a un compuesto de color azul (Lowry, Rosebrough y cols. 1951).

El método de Lowry es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se le añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer.

2.7.2. Reactivos

- Agua Bidestilada
- Reactivo de Lowry
- Reactivo Folin-Ciocalteu
- Homogenado de tejido (muestra problema)
- Solución patrón de BSA (Albúmina de suero bovino) de concentración conocida.

2.7.3. Procedimiento

- Pipetear las mismas cantidades de agua, solución patrón de albúmina y solución problema.
- Pipetear el reactivo de Lowry. Mezclar el contenido de cada tubo y dejarlo reposar 10 minutos en oscuridad.
- A continuación añadir a todos los tubos el reactivo de Folin (diluido 1/4), mezclando bien. Dejar reposar 20 minutos en oscuridad para que se desarrolle completamente la reacción.
- Leer las absorbancias a 660 nm.

2.7.4. Cálculos

Los cálculos consisten en realizar una recta patrón de concentración de proteínas realizadas 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:

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

2.8. 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 (dodecilsulfato sódico, 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.

2.8.2. Condiciones del gel y transferencia

Para detectar la expresión de proteínas (Tabla III.6) se cargaron 50 μg 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 tres lavados de cinco 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.6)

4.- Se realizan tres lavados de cinco minutos con 15 mL de TBS-T.

5.-Las membranas son incubadas sesenta minutos con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, anti-IgG de conejo.

6.- Se realizan tres lavados de cinco minutos con 15 mL de TBS-T.

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

Tabla III.6. Relación de Anticuerpos utilizados en la técnica de Western-Blot

Anticuerpo	Pm (kDa)
Hsp70 (Assay Designs, Inc)	70
PDK-1 (Assay Designs, Inc)	45
Citocromo C (Santa Cruz)	15
Actina (Cell Signaling)	50
PGC-1 α (Cell Signaling)	75
MnSOD (Assay Designs, Inc)	25
NRF-1 (Santa Cruz)	70
mTFA (Santa Cruz)	25
VEGF (Santa Cruz)	25
MyoD (Santa Cruz)	33
Myf5 (Santa Cruz)	37
MnSOD (Cell Signaling)	25

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 musculares.

En el caso del control de carga de la expresión de MnSOD en las células de músculo esquelético de ratón,

éste fue verificado con el kit de tinción “MemCode™ Reversible Protein (Pierce, Rockford, IL, USA)”.

2.9. Determinación de la actividad citrato sintasa (E.C. 2.3.3.1)

La citrato sintasa es una enzima del ciclo de Krebs que forma citrato a partir del oxaloacetato y del acetyl coenzima A (acetyl-CoA). El Coenzima A (CoA) reducido (CoA-SH), formado durante la reacción, reacciona con el ácido 5,5' ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) para formar TNB que absorbe específicamente a 412 nm. Se mide así la actividad por el aumento de la absorbancia a 412 nm. El ensayo fue realizado siguiendo el método de Srere (Srere 1969). Los resultados son expresados en $\text{nmol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína. Esta actividad ha sido utilizada ampliamente en la literatura para evaluar el contenido mitocondrial en el músculo esquelético.

2.9.1. Reactivos

Tampón Tris 1M pH a 7.4.

DTNB 10mM.

Acetyl Co-A 30 mM.

Acido oxaloacético 10mM.

- Solución A : 284 mg Na_2HPO_4 + 14.8 mg EDTA en

20 mL de agua bidestilada

- Solución B : 55.2 mg NaH_2PO_4 + 3 mg EDTA en 20 mL de agua bidestilada
- Añadir 15 mL de solución A y ajustar el pH a 7.4 con la solución B

2.9.2. Procedimiento de homogenización

1. Añadir 20 mg de músculo esquelético en un eppendorf de 1.5 mL
2. Anadir 1 mL de tampón de extracción
3. Homogenizar
4. Sonicar el homogenado 3 x 10 s en hielo y dejar las muestras 20 min en el hielo
5. Centrifugar 13 min a 1500xg / 4°C
6. Recoger el sobrenadante para hacer 3 alícuotas y medir la concentración de proteínas
7. Conservar los alícuotas a - 80°C
8. Medir proteínas por el método Lowry

2.9.3. Medición de la actividad

- Descongelar las muestras y preparar 20 μl de cada muestra con 40 μg de proteína
- La actividad se mide a una temperatura de 37°C.
- Preparar la solución A contiene 20 μl de DTNB, 30

μl de AcetilCoA, 95 μl de TRIS 1M y 795 μl de agua bidestilada.

- Añadimos los 930 μl de solución A. Añadimos los 20 μl de muestras y esperamos 2 min que el valor de absorbancia se estabilice.
- Añadimos 50 μl de ácido oxaloacético.
- Se apunta cada 20 s durante 3 minutos el valor de la absorbancia.

2.9.4. Cálculos

La actividad de la CS se mide en nmol de producto formado por min⁻¹ y por mg de proteínas.

$$U = \frac{\Delta 412 \frac{nm}{min} \times 25000}{\epsilon(13.9)}$$

2.10. Aislamiento de RNA de las células de músculo esquelético de ratón

El aislamiento de RNA a partir de del cultivo de células de músculo esquelético de ratón 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.

2.10.1 Procedimiento

- 1-Las células se recogen con Trizol
- 2-Se deja a temperatura ambiente durante 5 min
- 3-Se añaden 200 μ L de cloroformo y se agita vigorosamente durante 15 s
- 4-Se deja reposar durante 3 min
- 5-Se centrifuga a 12000xg durante 10 min a 4°C
- 6-Se recoge la fase acuosa superior y se lleva a un tubo estéril. Se añaden 0.5 mL de isopropil alcohol para precipitar el RNA y se agita. Se deja reposar durante 10 min a T^a ambiente
- 7-Se centrifuga durante 10 min a 12000xg
- 8-Se elimina el alcohol y el precipitado restante se lava con etanol 75°, se vortea para mezclar.
- 9-Se centrifuga a 7500xg durante 5 min.
- 10-Se elimina el etanol y se añaden 50 μ l de agua DEPC
- 11-Se calienta a 65°C para disolver el RNA
- 12-Se hacen alícuotas
- 13-Se congela a -80°C para así evitar degradaciones

2.10.2 Cuantificación de la concentración de RNA

Se utiliza el GeneQuant, que actúa como espectrofotómetro, y capilares de cuarzo. Inicialmente se determina el blanco con H₂O libre de nucleasas y posteriormente se introduce un capilar con la muestra. Los cálculos de la concentración de RNA, los realiza el aparato automáticamente siguiendo el siguiente procedimiento:

Se mide la absorbancia a 260 nm y después a 280nm, la pureza del RNA 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 RNA de buena calidad. Además de las medidas de absorbancia, y con el fin de asegurar la integridad del RNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa.

2.10.3 Síntesis de cDNA: Retrotranscripción (RT)

Consiste en la obtención de un DNA copia (cDNA) a partir de un RNA mensajero (mRNA), el proceso inverso de la transcripción. Para ello son necesarias unas DNA polimerasas particulares, llamadas transcriptasas inversas o retrotranscriptasas. Las enzimas utilizadas proceden de algunos retrovirus, que son virus que presentan RNA como genoma, en vez de DNA. La transcripción reversa

fue realizada utilizando Superscript II RNase H-system (Invitrogen) siendo diluida en agua libre de nucleasas.

2.10.4 Amplificación cuantitativa del RNA (RT-PCR en tiempo real)

La PCR a tiempo real fue realizada con el sistema de detección ABI 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de segmentos específicos para PGC-1 α y MnSOD (Tabla III.7) fueron diseñados utilizando una base de datos específica para ratón (Ensembl) y Primer Express (Applied Biosystems). Para cada uno de los genes, la búsqueda reveló que la secuencia obtenida era sólo para los genes estudiados. Los oligos fueron obtenidos de Tag Copenhagen (Dinamarca). Las sondas para PGC-1 α y MnSOD fueron designadas 5'-6-carboxyfluorescein (FAM) y 3'-6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine (TAMRA). La RT-PCR fue realizada por triplicado en un volumen total de reacción de 10 μ L usando una Universal mastermix (Applied Biosystems). El ciclo umbral (cycle threshold) (ct) se convirtió a una cantidad relativa a través del uso de una curva estándar construida de muestras agrupadas. La fórmula logarítmica utilizada para transformar los valores de ct tanto para los genes estudiados y el control endógeno fue:

$$Expo = \left(\frac{Ct \text{ muestra} - \text{Intercepto}}{\text{Pendiente}} \right)$$

Por cada muestra, la cantidad del mRNA del gen diana fue normalizado con el contenido de mRNA de GAPDH. El efecto de las condiciones experimentales en los niveles de mRNA para GAPDH fue determinado estadísticamente y no se encontró un efecto del genotipo, del tratamiento antioxidante o de la electroestimulación, en su contenido. 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.

Tabla III.7. Secuencia de los oligos y sondas TaqMan utilizados en la RT-PCR

Gen	Cebadores sentido	Cebadores antisentido	Sonda
PGC-1 α	5' AACCACACCCACAGGAT CAGA-3'	5' TCTTCGCTTTATTGCTCCAT GA-3'	5' CAAACCCCTGCCATTGTAAAGACCGAGAA -3'
MnSOD	5' GTGGTGGAGAACCCAAA GGA-3'	5' AACCTTGACTCCCACAGAC A-3'	5' AGTTGCTGGAGGCTATCAAGCGTGACTT T-3'
GAPDH	5' TGTGTCCGTCGTGGATCT GA-3'	5' CCTGCTTCACCACCTTCTTG A-3'	5' CCGCCTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3'

2.11 Determinación de especies reactivas del oxígeno en células musculares de ratón en cultivo

La diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) ha sido utilizada como una herramienta para la medición de la producción de especies reactivas del oxígeno en diferentes tipos celulares (Bass, Parce y cols. 1983; Burow y Valet 1987). La DCFH-DA atraviesa fácilmente la membrana celular y una vez dentro de la célula es hidrolizada por esterasas para formar diclorofluoresceína (DCFH) no fluorescente. La DCFH rápidamente reacciona con oxidantes intracelulares (H_2O_2) y es convertida a diclorofluoresceína fluorescente (DCF). La intensidad de emisión de la fluorescencia está directamente relacionada con la producción de ERO (LeBel, Ischiropoulos y cols. 1992; Royall and Ischiropoulos 1993; Silveira, Pereira-Da-

Silva y cols. 2003). Ésta fue medida con un lector de microplacas de fluorescencia, con una longitud de onda de emisión establecida de 480 nm y una onda de excitación fija de 520 nm.

La determinación de la fluorescencia de DCF fue utilizada en las células de músculo esquelético en cultivo. Una hora antes del protocolo de estimulación eléctrica, el medio de fusión fue cambiado con DPBS (pH 7.4) con o sin antioxidantes. La sonda fluorescente sensible a ERO (2,7-dichlorofluorescein-diacetate/2,7-dichlorofluorescein) (DCFH) (10 μ M) fue añadida 2 minutos antes de iniciar el protocolo de estimulación eléctrica. Las células fueron estimuladas eléctricamente durante 30 minutos y 50 μ l del medio extracelular fue recogido antes y después de la estimulación y la intensidad de la fluorescencia fue determinada. Los antioxidantes fueron añadidos inmediatamente antes de la estimulación eléctrica, y todos los experimentos fueron desarrollados a 37°C y en una habitación oscura para evitar la oxidación inespecífica de DCFH.

3. Análisis estadístico de los resultados

Para el análisis estadístico se muestra la media como medida de tendencia central y la desviación estándar como medida de dispersión. La normalidad de la

distribución fue evaluada con la prueba Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza con la prueba de Levene.

Cuando fue necesario analizar los resultados de las variables entre cuatro grupos al final del experimento, o bien observar el efecto del transcurso del tiempo, un análisis de la varianza de dos o tres factores con medidas repetidas en el factor tiempo fueron utilizados. Cuando se encontró un efecto en la interacción, la prueba *post hoc* de Tukey fue realizada para determinar donde se encontraba la diferencia. Para observar las diferencias entre dos grupos a través del tiempo, se utilizó un análisis de modelo lineal mixto. En el análisis de las variables al comparar solo dos grupos en un tiempo determinado, se utilizó la prueba T de Student para muestras pareadas y no pareadas. Los datos que no cumplieron con la distribución normal fueron analizados con la prueba no paramétrica Mann-Whitney U y Wilcoxon para muestras no pareadas y pareadas, respectivamente.

Los niveles de alfa para la significación estadística fueron $p < 0.05$. Se utilizaron los programas Sigma Stat 3.5, SPSS 14 y "R" para los análisis estadísticos.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. Estudio sobre el efecto de un tratamiento con rHuEpo, durante dos semanas, en diversas adaptaciones musculares y hematológicas en animales de experimentación

Una de las estrategias más utilizadas en el campo deportivo para aumentar el rendimiento físico es incrementar la capacidad de transporte de oxígeno a los tejidos (Levine y Stray-Gundersen 2005). Se desarrolla a través de medios permitidos, bien naturales (altitud natural) o artificiales (cámaras hipóxicas) (Gaudard, Varlet-Marie y cols. 2003; Richalet y Gore 2008), o bien a través de medios prohibidos como las transfusiones sanguíneas o la administración de eritropoyetina recombinante. En cualquier caso, el mecanismo consiste en la inducción de la diferenciación de células precursoras eritropoyéticas generando un aumento del número de eritrocitos. No obstante, en los últimos años el papel que desempeña la eritropoyetina ha ampliado su campo de acción. El descubrimiento de la existencia de receptores de eritropoyetina (EpoR) en diversos tejidos, siendo uno

de ellos el músculo esquelético (Lundby, Hellsten y cols. 2008), ha sugerido que esta puede jugar también un papel importante en el desarrollo y reparación del tejido muscular en ciertos desórdenes musculares (Lappin, Maxwell y cols. 2002). Por tanto, en este apartado de la Tesis nos hemos planteado estudiar el efecto que genera un tratamiento con eritropoyetina recombinante (300 UI, tres veces por semana durante dos semanas) en la expresión de proteínas relacionadas con la biogénesis mitocondrial, con el proceso miogénico y en la angiogénesis, en el músculo esquelético de animales de experimentación. Del mismo modo hemos estudiado diversas adaptaciones hematológicas y un parámetro de rendimiento físico como resultado de este mismo tratamiento.

1.1 Adaptaciones hematológicas en animales de experimentación

La administración de eritropoyetina recombinante genera un aumento del volumen eritrocitario, dependiendo de la duración, intensidad y dosis utilizada. Con el objetivo de demostrar un efecto fisiológico típico de la administración de rHuEpo decidimos evaluar la concentración de hemoglobina así como el porcentaje de reticulocitos en

nuestros animales. En la tabla IV.1, observamos un incremento significativo en la concentración de hemoglobina como resultado de dos semanas de tratamiento con rHuEpo, sugiriendo la efectividad del tratamiento. Respecto al porcentaje de reticulocitos, en la misma tabla se observa un incremento significativo en el grupo tratado con rHuEpo al finalizar el tratamiento.

Tabla IV.1. Concentración de hemoglobina y porcentaje de reticulocitos antes y después de dos semanas de tratamiento con rHuEpo

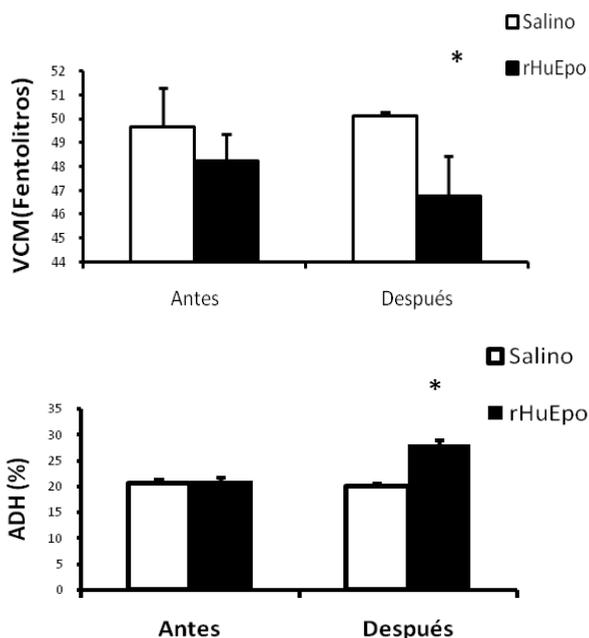
	HEMOGLOBINA (g/dL)		RETICULOCITOS (%)	
	Antes	Después	Antes	Después
Control	15.2± 0.9	14.7± 0.8	2.8± 0.4	2.9 ± 0.3
Tratamiento con rHuEpo	16.4± 0.7	18.4± 0.7 (**)	3.8± 1.0	6.2± 0.4 (**)

Valores expresados como media \pm desviación estándar (n=6). ANOVA de medidas repetidas. Post-Hoc Tukey. La significación estadística se expresa como (**) $P < 0.01$ frente al grupo rHuEpo antes del tratamiento.

En la figura IV.1, observamos los valores de la variable volumen corpuscular medio (VCM), utilizada como indicador del tamaño de los eritrocitos. Dos semanas después de un tratamiento con rHuEpo se observa una disminución significativa en los valores de VCM cuando

los comparamos con los obtenidos en el grupo control. Por el contrario, comparando el índice de variabilidad del tamaño de los eritrocitos, conocido como la amplitud de distribución de hematíes (ADH), se observan valores significativamente mayores en el grupo tratado con rHuEpo al final del experimento.

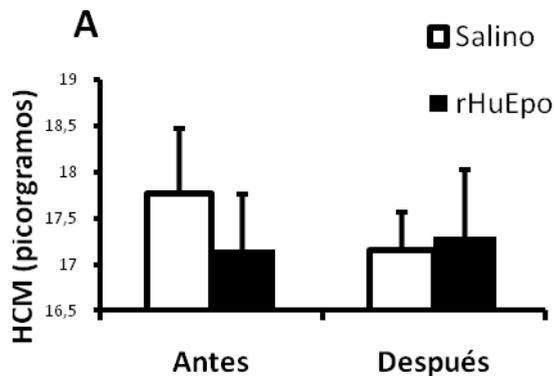
Figura IV.1. Volumen corpuscular medio (Panel A) y amplitud de distribución de hematíes (Panel B) en ratas tratadas con una dosis de 300 UI de rHuEpo durante dos semanas



Valores expresados como media \pm desviación estándar (n=6). ANOVA de medidas repetidas. Post-Hoc Tukey. La significación estadística se expresa como (*) $P < 0.05$ frente al grupo Control al final del experimento.

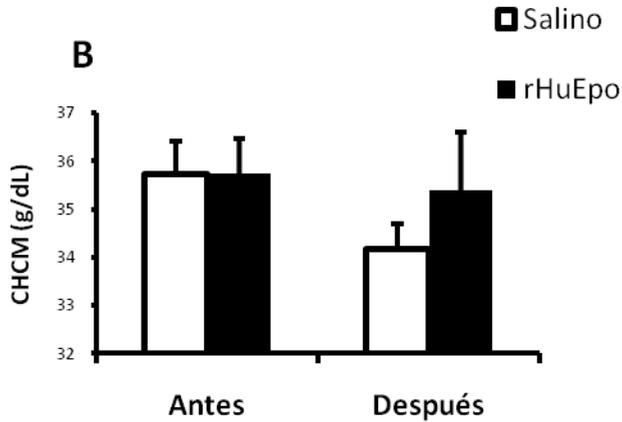
La cantidad de hemoglobina por eritrocito puede ser analizada observando los indicadores de hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM). En la figuras IV.2 y IV.3, se observa que tras dos semanas de tratamiento con rHuEpo no se modificaron estos niveles sugiriendo que la cantidad de hemoglobina por eritrocito no sufre modificación por el tratamiento. Del mismo modo no se observaron cambios en el grupo control al finalizar el estudio.

Figura IV.2. Hemoglobina corpuscular media en ratas tratadas con una dosis de 300 UI de rHuEpo durante dos semanas



Valores expresados como media \pm desviación estándar ($n=6$).

Figura IV.3. Concentración de hemoglobina corpuscular media en ratas tratadas con una dosis de 300 UI de rHuEpo durante dos semanas



Valores expresados como media \pm desviación estándar ($n=6$).

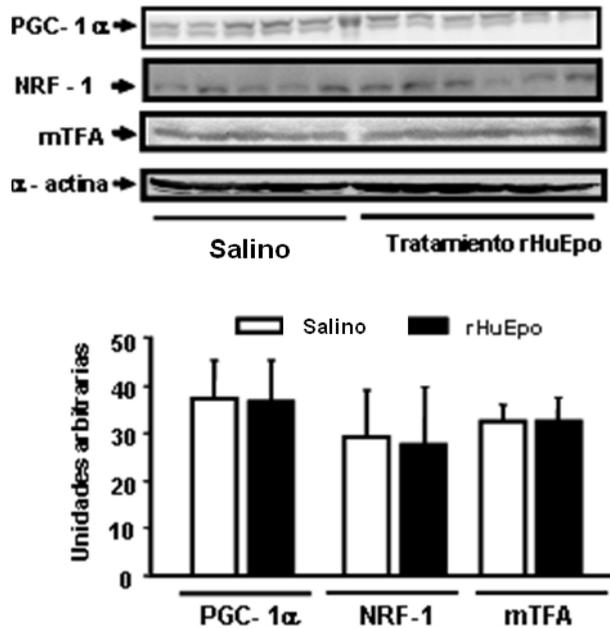
1.2 Expresión de proteínas relacionadas con la biogénesis mitocondrial en músculo esquelético de rata

Receptores de eritropoyetina han sido descubiertos recientemente en el músculo esquelético. El tratamiento con rHuEpo incrementa los niveles hematológicos aumentando el transporte de oxígeno al músculo esquelético. Sin embargo, no existe evidencia del papel que desempeña el incremento de eritropoyetina exógena en la biogénesis mitocondrial en músculo esquelético.

1.2.1 Efecto de un tratamiento con rHuEpo durante dos semanas en la expresión de PGC-1 α , NRF-1 y mTFA en músculo sóleo de rata

El músculo sóleo, presenta como principales características, una mayor distribución de fibras tipo I, mayor capacidad oxidativa y mayor contenido mitocondrial (Pette y Staron 1990). A su vez, PGC-1 α es un coactivador transcripcional relacionado con el proceso de biogénesis mitocondrial (Wu, Puigserver y cols. 1999). NRF-1 es un factor de transcripción clave en la biogénesis mitocondrial ya que es éste el que activa junto a PGC-1 α la transcripción de mTFA, siendo esta última una proteína de 25 kDa considerada el factor de transcripción clave para la replicación, mantenimiento y transcripción del ADNmt (Larsson, Wang y cols. 1998). En la figura IV.4, no se observan diferencias significativas en la expresión de PGC-1 α , NRF-1 y de mTFA después de un tratamiento con rHuEpo durante dos semanas

Figura IV.4. Western Blot de PGC1- α , NRF-1 y mTFA en el músculo sóleo de rata después de dos semanas de tratamiento con rHuEpo

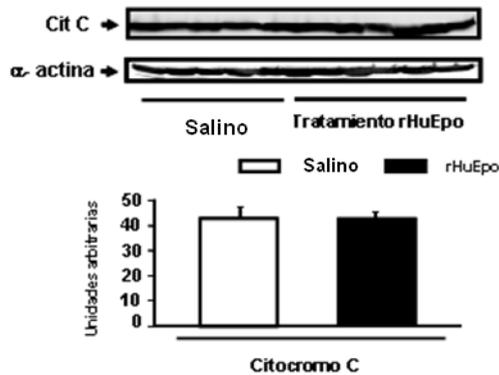


Valores expresados como media \pm desviación estándar ($n=6$).

1.2.2 Efecto de un tratamiento con rHuEpo durante dos semanas en la expresión de citocromo C en músculo sóleo de rata

El citocromo C es una proteína utilizada como marcador de contenido mitocondrial (Hood 2001). En nuestro modelo de dos semanas de tratamiento con rHuEpo (Figura IV.5) no se observan diferencias en los niveles de esta proteína cuando se compara con el grupo control.

Figura IV.5. Western Blot de citocromo C en el músculo sóleo de rata después de dos semanas de tratamiento con rHuEpo



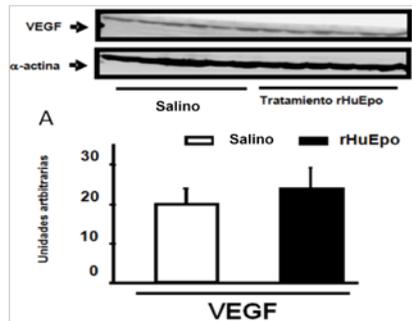
Valores expresados como media \pm desviación estándar ($n=6$).

1.3 Expresión del factor de crecimiento vascular endotelial en músculo esquelético de ratas

Recientemente se ha sugerido el papel potencial de la eritropoyetina como opción terapéutica en el tratamiento de diversas patologías (Kao, Xenocostas y cols. 2007; Rotter, Menshykova y cols. 2008). De igual manera ha sido sugerido el posible efecto del tratamiento con rHuEpo sobre la angiogénesis en el músculo esquelético (Rotter, Menshykova y cols. 2008). En las figuras IV.6 y IV.7, no encontramos diferencias en los niveles de VEGF en el músculo sóleo y gastrocnemio después de dos semanas

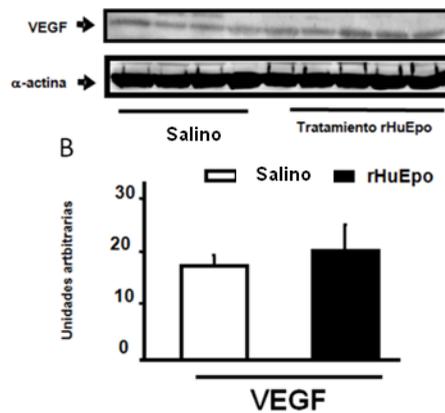
de tratamiento con rHuEpo cuando se compara con el grupo control.

Figura IV.6. Western Blot de VEGF en músculo sóleo de rata después de dos semanas de tratamiento con rHuEpo



Valores expresados como media \pm desviación estándar ($n=6$).

Figura IV.7. Western Blot de VEGF en músculo gastrocnemio de rata después de dos semanas de tratamiento con rHuEpo



Valores expresados como media \pm desviación estándar ($n=6$).

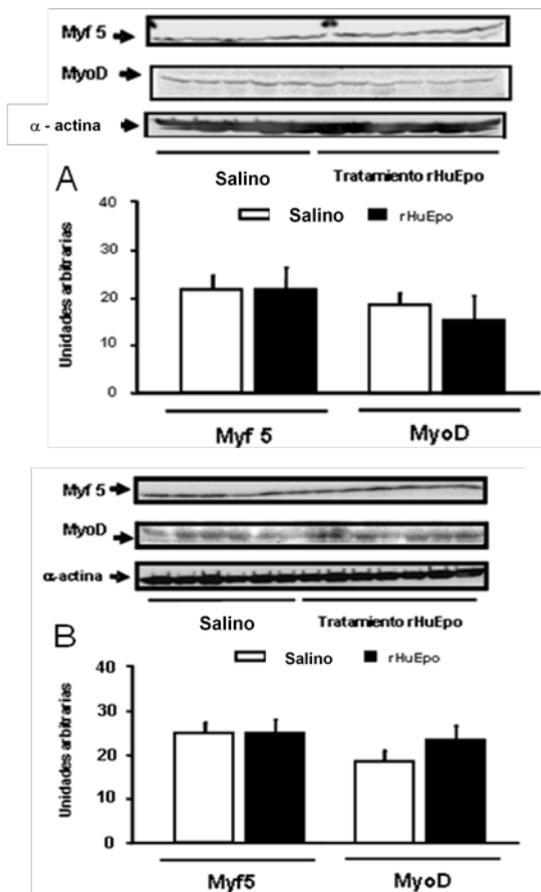
1.4 Expresión de factores reguladores miogénicos en músculo esquelético de ratas

En estudios *in vitro*, el tratamiento con rHuEpo aumenta la proliferación de células satélite y mioblastos (Ogilvie, Yu y cols. 2000). Por esa razón, en este apartado hemos centrado la atención en determinar el efecto del tratamiento con rHuEpo en la inducción de factores reguladores de la miogénesis, como son MyoD y Myf5.

1.4.1 Efecto de un tratamiento con rHuEpo durante dos semanas en la expresión de MyoD y Myf5 en músculo gastrocnemio y sóleo de rata

MyoD y Myf5 son factores de transcripción que regulan la formación de mioblastos a partir de las células satélite (Rudnicki, Schnegelsberg y cols. 1993). Ambos pertenecen a la familia de los factores reguladores miogénicos (MRFs). Como se observa en la figura IV.8 en músculo gastrocnemio y músculo sóleo, el tratamiento con rHuEpo durante dos semanas no tiene efecto sobre la expresión de ninguno de estos factores cuando se compara con el grupo control.

Figura IV.8. Western Blot de Myf5, MyoD en músculo sóleo (A) y gastrocnemio (B) de rata después de dos semanas de tratamiento con rHuEpo

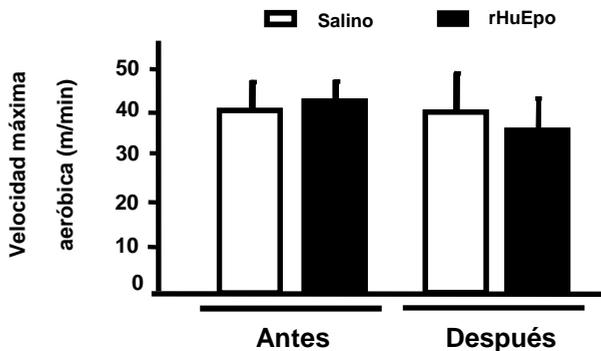


Valores expresados como media \pm desviación estándar ($n=6$).

1.5 Velocidad máxima aeróbica en animales de experimentación

En las últimas décadas se ha sugerido que el aumento de la capacidad de transporte de oxígeno es un factor determinante para incrementar el rendimiento físico. El tratamiento con rHuEpo incrementa el volumen eritrocitario y disminuye el volumen plasmático (Lundby, Thomsen y cols. 2007). Por esta razón, en la presente Tesis Doctoral quisimos determinar el efecto de la administración continua, durante dos semanas, de rHuEpo sobre una prueba incremental de velocidad máxima aeróbica en animales de experimentación. Esta prueba fue realizada antes y después del tratamiento. En la figura IV.9 se observa que no existieron diferencias significativas entre los grupos después de dos semanas de tratamiento con rHuEpo.

Figura IV.9. Efecto de un tratamiento con rHuEpo durante dos semanas en la velocidad máxima aeróbica



Valores expresados como media \pm desviación estándar ($n=6$).

2. Estudio del efecto de un protocolo de hipoxia intermitente normobárica, en combinación con entrenamiento anaeróbico, sobre diversos parámetros hematológicos, musculares y de rendimiento físico en animales de experimentación

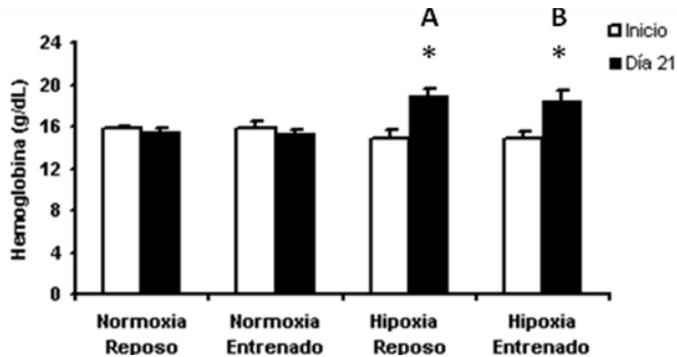
Los resultados obtenidos en el primer estudio planteado en la presente Tesis Doctoral en los que no observamos ningún efecto sobre el rendimiento físico en animales tratados con rHuEpo, a pesar de encontrar un aumento significativo en las diversas variables hematológicas determinadas, nos llevó a plantear un segundo estudio.

En éste, pretendimos estudiar el efecto de la hipoxia intermitente normobárica, en combinación con entrenamiento anaeróbico, sobre diversos parámetros hematológicos, musculares y de rendimiento físico en animales de experimentación.

2.1 Adaptaciones hematológicas en animales de experimentación

La figura IV.10 muestra un incremento significativo en los niveles de hemoglobina de los animales sometidos a hipoxia intermitente normobárica (12h pO₂ 12% /12h pO₂ 21%) durante veintiún días, independientemente del protocolo de entrenamiento. Estos dos grupos difieren significativamente cuando se comparan con los grupos normoxia (reposo y entrenado, 24h pO₂ 21%), que no muestran incremento alguno en la concentración de hemoglobina.

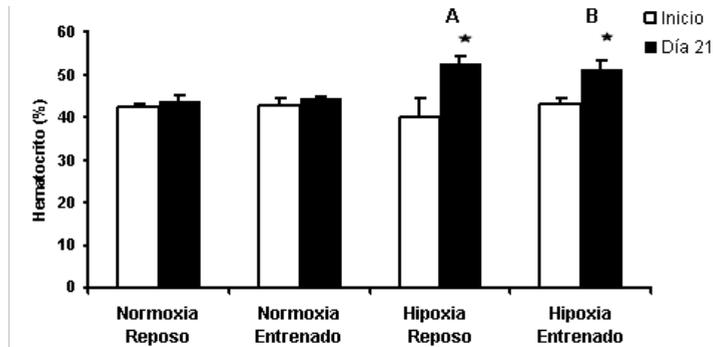
Figura IV.10. Concentración de hemoglobina en animales mantenidos en hipoxia o normoxia y entrenados durante un periodo de veintidós días



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar ($n=6$). ANOVA de medidas repetidas. Post-Hoc Tukey. La significación estadística se expresa como (*) $p<0.05$ frente a Inicio. (A) $p<0.05$ frente a grupos Normoxia Reposo y Normoxia Entrenado. (B) $p<0.05$ frente a grupos Normoxia Reposo y Normoxia Entrenado.

La figura IV.11 muestra un incremento significativo en los niveles de hematocrito de los animales sometidos a hipoxia intermitente normobárica durante dos semanas, independiente del protocolo de entrenamiento. Estos dos grupos difieren significativamente cuando se comparan con los grupos normoxia que no muestran incremento alguno en los niveles de hematocrito.

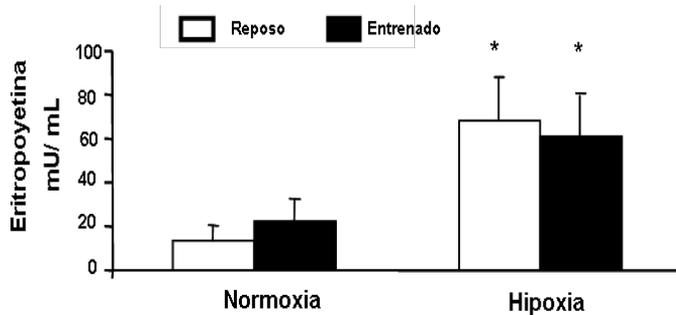
Figura IV.11. Valores de hematocrito en animales mantenidos en hipoxia o normoxia y entrenados durante un periodo de veintidós días



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar ($n=6$). ANOVA de medidas repetidas. Post-Hoc Tukey. La significación estadística se expresa como (*) $p<0.05$ frente a Inicio. (A) $p<0.05$ frente a grupos Normoxia Reposo y Normoxia Entrenado. (B) $p<0.05$ frente a grupos Normoxia Reposo y Normoxia Entrenado.

La concentración de eritropoyetina en plasma fue determinada tras el sacrificio de nuestros animales. La figura IV.12 muestra que la media de la Epo en los grupos sometidos a hipoxia intermitente normobárica (reposo y entrenados) fue de 64.8 ± 18.0 mU/mL y 61.2 ± 19.1 mU/mL, respectivamente; mientras que la media de los grupos normoxia (reposo y entrenados) fue significativamente menor: 18.3 ± 2.4 mU/mL y 21.5 ± 10.1 mU/mL. Se encontró una diferencia significativa entre los grupos hipoxia frente a los grupos normoxia independiente de la combinación con entrenamiento anaeróbico en tapiz rodante.

Figura IV.12. Niveles de eritropoyetina en plasma (mU/mL) en animales mantenidos en hipoxia o normoxia y entrenados durante un periodo de veintidós días



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar ($n=6$). ANOVA de dos factores (Entrenamiento vs. Protocolo). Post-Hoc Tukey. (*) $p < 0.05$ frente a grupos Normoxia Reposo y Normoxia Entrenado.

2.2 Adaptaciones en músculo esquelético, en animales de experimentación

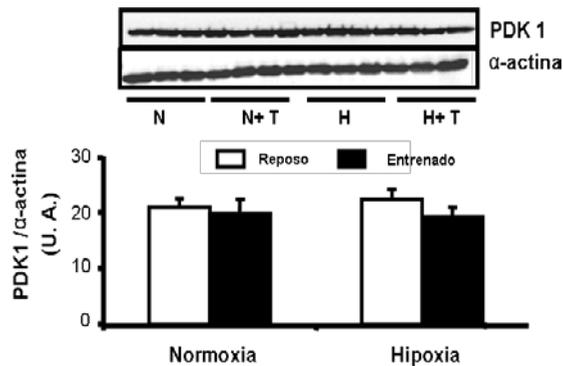
Diversos autores consideran que el aumento del rendimiento físico, tras la participación en un protocolo de hipoxia natural o artificial, depende de adaptaciones “no hematológicas” (Gore, Clark y cols. 2007). Entre ellas destacan las adaptaciones que se producen a nivel del músculo esquelético en las enzimas reguladas por la exposición a la hipoxia y relacionadas con la defensa antioxidante y con el proceso de biogénesis mitocondrial.

Utilizamos la porción roja del músculo gastrocnemio por el mayor % de fibras tipo I que presenta esta sección muscular. A continuación detallamos los resultados encontrados en la presente Tesis Doctoral en relación al efecto de un protocolo de hipoxia intermitente normobárica sobre dichas adaptaciones.

2.2.1 Expresión de PDK-1 en músculo gastrocnemio rojo de rata

Piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK-1) es un gen diana de HIF-1 α , un factor de transcripción especialmente sensible a la hipoxia y cuyo papel hemos detallado en la Introducción de la presente Tesis. En nuestro modelo de veintiún días de un protocolo de hipoxia intermitente normobárica no encontramos cambios significativos en la expresión de esta proteína en músculo gastrocnemio rojo de rata en ningún grupo experimental (Figura IV.13).

Figure IV.13. Western Blot de PDK-1 en músculo gastrocnemio rojo en animales mantenidos en hipoxia o normoxia y entrenados durante un periodo de veintidós días



Valores expresados como media \pm desviación estándar (n=6).

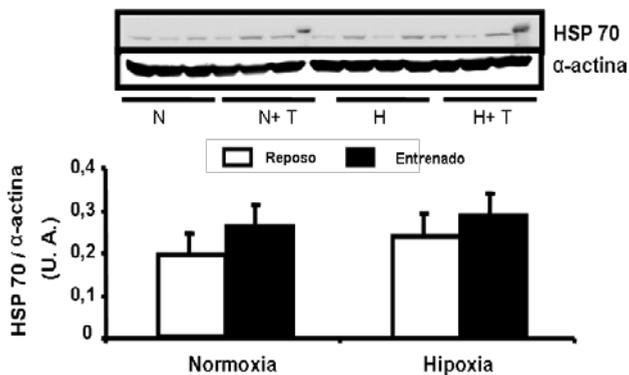
2.2.2 Inducción de la defensa antioxidante enzimática y de las proteínas de respuesta a estrés en animales de experimentación

Debido a que la exposición a hipoxia durante dos semanas produce un aumento de daño oxidativo, en este apartado nos planteamos determinar el posible efecto inductor que el ejercicio físico, bien en combinación con hipoxia intermitente normobárica o no, podría generar en la defensa antioxidante.

2.2.2.1 Expresión de Hsp70 en músculo gastrocnemio rojo de rata

Hsp70 ha sido descrita como una proteína que aumenta su expresión, tanto por el entrenamiento físico como por la exposición a hipoxia. En nuestro modelo de dos semanas de entrenamiento, como se observa en la figura IV.14, no encontramos efecto alguno en la expresión de Hsp70 en músculo gastrocnemio.

Figure IV.14. Western Blot de Hsp70 en músculo gastrocnemio rojo en animales mantenidos en hipoxia o normoxia y entrenados durante un periodo de veintidós días

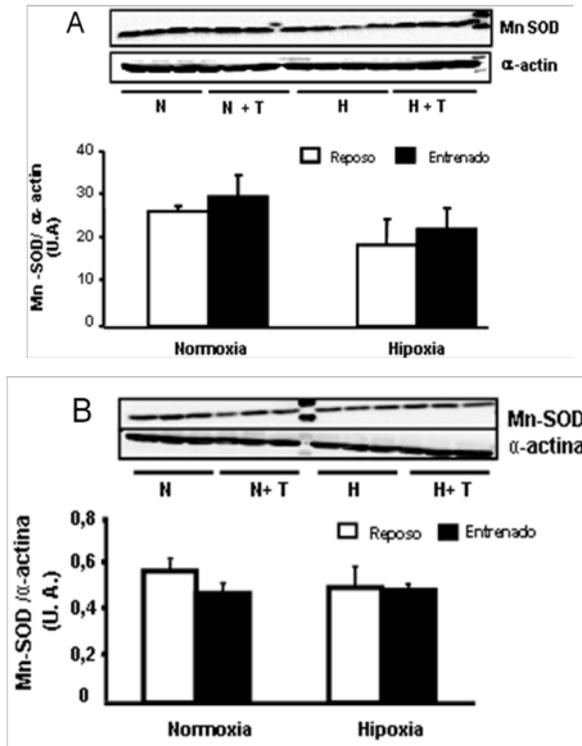


Valores expresados como media \pm desviación estándar ($n=6$).

2.2.2.2 Expresión de MnSOD en músculo gastrocnemio rojo y blanco de rata

La superóxido dismutasa 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 (Mn-SOD) y una enzima citosólica, dependiente de cobre y zinc (Cu-Zn SOD). Se ha demostrado que la exposición a ambientes reducidos de oxígeno induce la expresión de Mn-SOD en el músculo esquelético (Radak, Asano y cols. 1997). En la presente Tesis Doctoral hemos medido en el músculo esquelético la expresión de la proteína superóxido dismutasa mitocondrial. En la figura IV.15, se aprecia que en músculo gastrocnemio rojo y blanco no existen cambios en la expresión de la proteína después de veintiún días de la combinación de un protocolo de hipoxia intermitente normobárica con entrenamiento anaeróbico. De igual forma, no se observa un efecto de forma aislada de la hipoxia intermitente normobárica ni del entrenamiento anaeróbico.

Figure IV.15. Western Blot de MnSOD en músculo gastrocnemio rojo (Panel A) y blanco (Panel B) en animales mantenidos en hipoxia o normoxia y entrenados durante un periodo de veintidós días



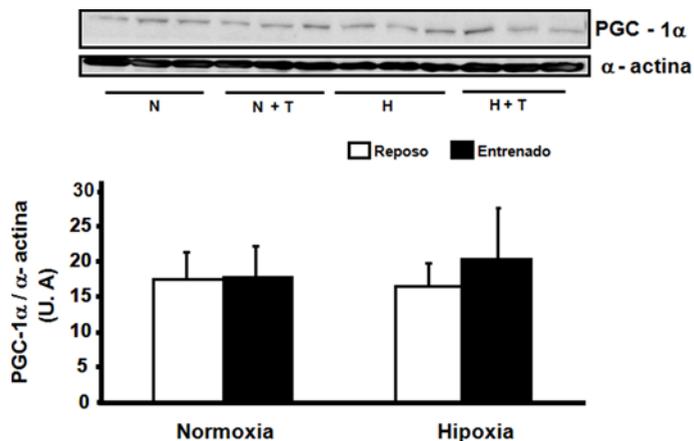
Valores expresados como media \pm desviación estándar ($n=6$).

2.2.3 Inducción de proteínas relacionadas con el proceso de biogénesis mitocondrial

2.2.3.1 Expresión de PGC-1 α en músculo gastrocnemio rojo y blanco de rata

PGC-1 α es considerado el regulador maestro, por excelencia, del contenido mitocondrial en tejidos de mamíferos. A su vez, ha sido implicado en la regulación de enzimas antioxidantes, principalmente MnSOD y UCP-3 (Silveira, Pilegaard y cols. 2006). En la figura IV.16, se observa que veintiún días de un protocolo de hipoxia intermitente normobárica, en combinación con entrenamiento anaeróbico, no produce un aumento en la expresión de PGC-1 α . De igual forma, el entrenamiento anaeróbico, realizado en condiciones de normoxia, no produce modificación en la expresión a nivel de proteína de este coactivador transcripcional.

Figure IV.16. Western Blot de PGC1- α en músculo gastrocnemio rojo en animales mantenidos en hipoxia o normoxia y entrenados durante un periodo de veintidós días



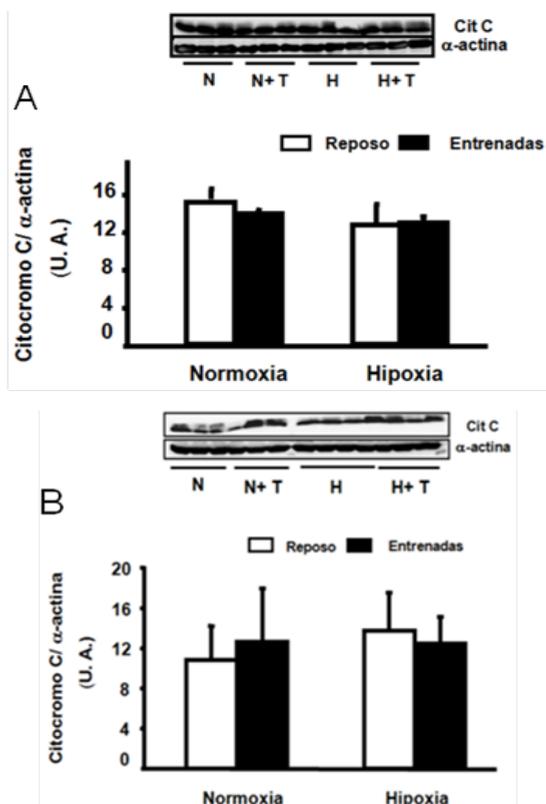
Valores expresados como media \pm desviación estándar ($n=6$).

2.2.3.2 Expresión de citocromo C en músculo de rata

El citocromo C es una proteína 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 mitocondrias. De esta forma se considera que el contenido mitocondrial puede ser estimado por el cambio en sus niveles en un determinado tejido (Davies, Packer y cols. 1982; Hood 2001). En nuestro modelo, no encontramos cambios significativos en la expresión de citocromo C en músculo gastrocnemio rojo y blanco de

ratas como resultado de la exposición durante veintidós días a un protocolo de hipoxia intermitente normobárica en combinación con entrenamiento anaeróbico (Figura IV.17). Del mismo modo no se observa un efecto del entrenamiento anaeróbico en el grupo normoxia.

Figure IV.17. Western Blot de citocromo C en músculo gastrocnemio rojo (A) y blanco (B) en animales mantenidos en hipoxia o normoxia y entrenados durante un periodo de veintidós días

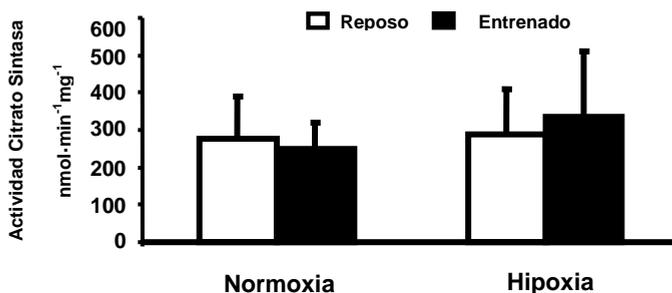


Valores expresados como media \pm desviación estándar ($n=6$).

2.2.3.3 Actividad de la enzima citrato sintasa en músculo gastrocnemio rojo de rata

La enzima citrato sintasa cataliza la primera reacción del ciclo de Krebs en la que se une el oxalacetato y el acetil coenzima A (acetil-CoA) para obtener citrato y Coenzima A. La determinación de esta enzima se utiliza como marcador clásico de contenido mitocondrial. En la figura IV.18 observamos que la actividad de esta enzima no se modifica por la hipoxia intermitente normobárica, por el entrenamiento anaeróbico o por la combinación de ambos factores.

Figure IV.18. Actividad citrato sintasa en músculo gastrocnemio rojo en animales mantenidos en hipoxia o normoxia y entrenados durante un periodo de veintidós días



Valores expresados como media \pm desviación estándar ($n=6$).

2.2.4 Velocidad máxima aeróbica

Todos los animales fueron sometidos antes y después del periodo de entrenamiento a una prueba incremental en tapiz rodante para determinar la velocidad máxima aeróbica en condiciones de normoxia. Como ha sido publicado previamente, la máxima velocidad alcanzada en una prueba incremental en tapiz rodante es considerada la máxima capacidad aeróbica de un animal (Brooks y White 1978; Gleeson y Baldwin 1981; Davies, Packer y cols. 1982; Hoydal, Wisloff y cols. 2007). En la Tabla IV.2 se observa un aumento significativo en la velocidad máxima aeróbica en los grupos entrenados (Normoxia e Hipoxia) al finalizar el periodo de veintiún días. De igual forma, no existen diferencias en la velocidad máxima aeróbica (VMA) entre los dos grupos entrenados.

Tabla IV.2. Velocidad máxima aeróbica en animales mantenidos en hipoxia o normoxia y entrenados durante un periodo de veintiún días

	Normoxia				Hipoxia			
	Reposo		Entrenado		Reposo		Entrenado	
	Basal	21 días Después	Basal	21 días Después	Basal	21 días Después	Basal	21 días Después
VMA (m·m in ⁻¹)	44.7 ± 4	49.1 ± 7	45.0 ± 3	64.8 ± 4 (*)	49.5 ± 6	56.3 ± 9	52.4 ± 5	66.8 ± 5 (*)

Valores expresados como media ± desviación estándar (n=6). ANOVA de medidas repetidas. Post-Hoc Tukey. La significación estadística se expresa como () $p < 0.05$ frente a grupos Normoxia Entrenado e Hipoxia Entrenado veintiún días después.*

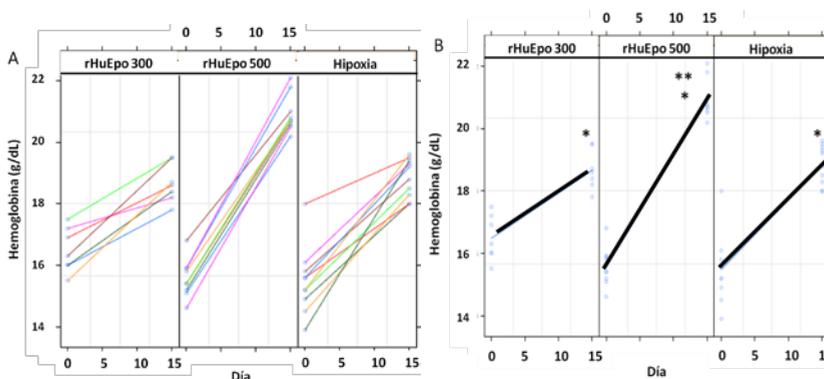
3. Estudio comparativo del efecto de dos tratamientos con rHuEpo (300 UI y 500 UI) frente a un protocolo de hipoxia intermitente normobárica, sobre diversas adaptaciones hematológicas en animales de experimentación

En los dos anteriores apartados de esta Tesis Doctoral se ha observado que la administración de rHuEpo y la participación en un protocolo de hipoxia intermitente normobárica, producen modificaciones significativas y muy similares en diversos parámetros hematológicos. Por esta razón, en esta sección de la Tesis hemos querido evaluar si el efecto en el aumento de las variables hematológicas generado por la administración de dos dosis de rHuEpo (300 UI o 500 UI tres días a la semana, durante dos semanas) es comparable a las modificaciones que se observan en estas variables con un protocolo de hipoxia intermitente normobárica (12h pO₂ 12% /12h pO₂ 21% durante dos semanas).

3.1 Adaptaciones hematológicas con los distintos tratamientos

En la figura IV.19 (Panel B), observamos una diferencia estadísticamente significativa en la concentración de hemoglobina en los tres grupos experimentales al finalizar el periodo de dos semanas de tratamiento. De igual forma, el grupo de animales que fueron tratados con una dosis de 500 UI de rHuEpo mostraron niveles de hemoglobina significativamente mayores cuando los comparamos con los otros dos grupos experimentales al finalizar el experimento.

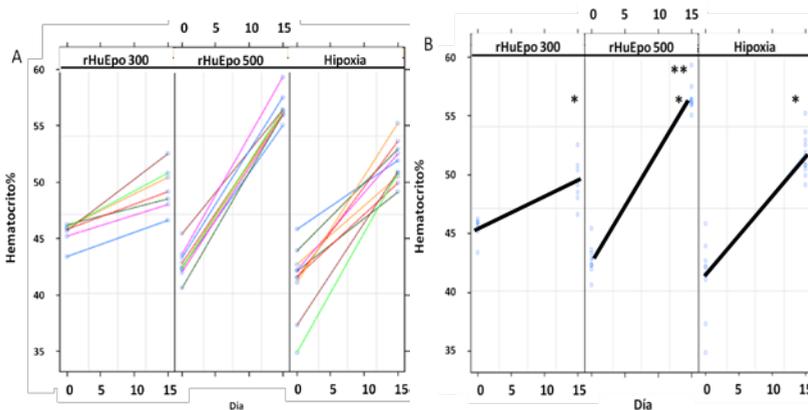
Figura IV.19. Concentración de hemoglobina, perfiles individuales (A), medias (B) en grupos tratados con rHuEpo (300 UI y 500 UI) e hipoxia durante un periodo de quince días



Análisis de modelo lineal mixto. Post-Hoc T student con corrección de Bonferroni. La significación estadística se expresa como () $p < 0.05$ frente al día 0 en el mismo grupo. (**) $p < 0.05$ frente a grupos rHuEpo 300 e Hipoxia al día 15.*

En la figura IV.20 (Panel B), observamos una diferencia estadísticamente significativa en el hematocrito en los tres grupos experimentales al finalizar el periodo de tratamiento. El grupo de animales que fue tratado con una dosis de 500 UI de rHuEpo mostró un hematocrito significativamente mayor cuando se comparó con los niveles alcanzados por el grupo rHuEpo 300 al finalizar el periodo de dos semanas. Del mismo modo se observó una tendencia al aumento del hematocrito en el grupo rHuEpo 500 cuando se comparó con el grupo hipoxia, no siendo estadísticamente significativa esta diferencia.

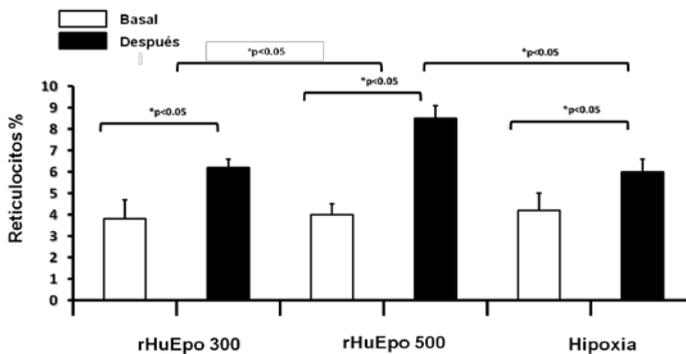
Figura IV.20. Valores de hematocrito, perfiles individuales (A), medias (B) en grupos tratados con rHuEpo (300 UI y 500 UI) e hipoxia durante un periodo de quince días



Análisis de modelo lineal mixto. Post-Hoc T student con corrección de Bonferroni. La significación estadística se expresa como () $p < 0.05$ frente al día 0 en el mismo grupo. (**) $p < 0.05$ frente a grupo rHuEpo 300 al día 15.*

En la figura IV.21, observamos una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de reticulocitos en los tres grupos experimentales al finalizar el periodo de dos semanas. De igual forma, el grupo de animales que fueron tratados con una dosis de 500 UI de rHuEpo mostraron significativamente mayor porcentaje de reticulocitos comparado con los otros dos grupos experimentales al finalizar el experimento.

Figura IV.21. Porcentaje de reticulocitos en grupos tratados con rHuEpo (300 UI y 500 UI) e hipoxia durante un periodo de quince días



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Análisis de modelo lineal mixto. Post-Hoc T student con corrección de Bonferroni. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$.

4. Estudio del efecto de un protocolo de hipoxia intermitente normobárica, sobre diversos parámetros hematológicos, tras la administración de rHuEpo en animales de experimentación

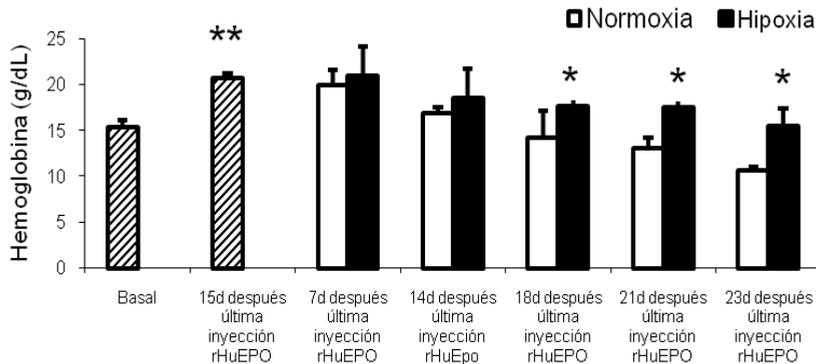
En los últimos años ha aumentado el interés, de la comunidad científica y de las autoridades antidopaje, en determinar si los sistemas simuladores de altitud deberían incluirse en la lista de sustancias y métodos prohibidos por la Agencia Mundial Antidopaje (AMA) (Loland y Murray 2007; Wilber 2007; WADA 2009; WADA 2010). Los motivos para incluir una sustancia o método dentro de la lista de sustancias y métodos prohibidos por la AMA requiere del cumplimiento de dos de los siguientes tres requisitos: 1) Aumento del rendimiento deportivo; 2) Poner en riesgo real o potencial la salud del deportista; y 3) Atentar contra el espíritu del deporte. A su vez, una sustancia o método será incluido en la lista si existe evidencia científica que la sustancia o método tiene el potencial de enmascarar el uso de otras sustancias o métodos prohibidos. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio anterior y con los que comprobamos que el tratamiento con una dosis de Epo (300 UI) tiene unos efectos similares, sobre variables hematológicas relevantes, a la exposición a la hipoxia, en

esta Tesis Doctoral evaluamos si un protocolo de hipoxia intermitente normobárica (12h pO₂ 12% /12h pO₂ 21%) durante veintitrés días, tras la administración de rHuEpo (500 UI, tres veces por semana durante dos semanas) podría modificar las variables hematológicas que son monitorizadas continuamente por las autoridades antidopaje. Los resultados se presentan a continuación.

4.1 Adaptaciones hematológicas en animales de experimentación

La figura IV.22 muestra un incremento en los niveles de hemoglobina de los animales tratados con rHuEpo durante un periodo de dos semanas. Al finalizar el tratamiento, ambos grupos muestran un descenso gradual en los niveles de hemoglobina a medida que transcurre el tiempo. Sin embargo, a partir del día dieciocho después del tratamiento, encontramos una diferencia significativa entre los grupos normoxia e hipoxia que se mantiene hasta el día veintitrés. En este sentido, veintitrés días después del tratamiento los animales del grupo normoxia muestran un descenso del 45% en sus niveles de hemoglobina cuando los comparamos con los animales que estuvieron sometidos diariamente a doce horas de hipoxia.

Figura IV.22. Concentración de hemoglobina en animales sometidos a hipoxia o normoxia y previamente tratados con rHuEpo durante un periodo de dos semanas

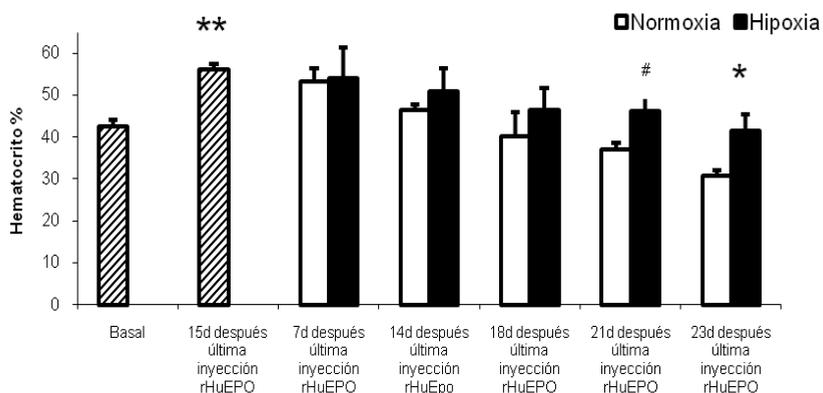


Los valores se expresan como mediana (rango intercuartílico) ($n=5$). Análisis de modelo lineal mixto. Post-Hoc *T* student con corrección de Bonferroni. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente al grupo Normoxia. (**) $p < 0.05$ frente a Basal.

La figura IV.23 muestra un incremento en los niveles de hematocrito de los animales tratados con rHuEpo durante dos semanas. Al finalizar el tratamiento, ambos grupos muestran un descenso gradual en los niveles de hematocrito. Sin embargo, el grupo normoxia muestra un descenso más marcado a medida que pasa el tiempo. La diferencia entre los grupos normoxia e hipoxia es significativa a partir del día veintiuno tras la finalización del tratamiento, siendo más evidente en las siguientes extracciones. Los animales sometidos a hipoxia

intermitente normobárica no muestran un descenso tan dramático en el hematocrito como el observado en el grupo normoxia. Al finalizar el estudio (día veintitrés) el grupo normoxia muestra un descenso de un 35% en sus valores de hematocrito comparado con los animales sometidos diariamente a 12 horas de hipoxia.

Figura IV.23. Valores de hematocrito en animales sometidos a hipoxia o normoxia previamente tratados con rHuEpo durante un periodo de dos semanas

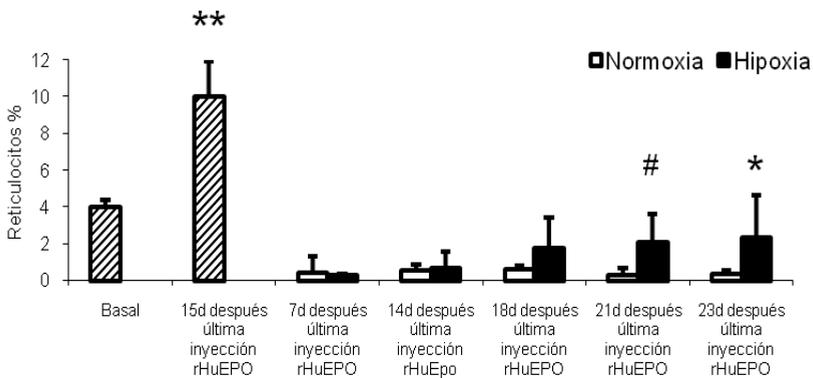


Los valores se expresan como mediana (rango intercuartílico) ($n=5$). Análisis de modelo lineal mixto. Post-Hoc *T* student con corrección de Bonferroni. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente al grupo Normoxia. (**) $p < 0.05$ frente a Basal. (#) $p = 0.07$ frente al grupo Normoxia.

El porcentaje de reticulocitos se ha convertido en un indicador del abuso de eritropoyetina recombinante por parte de los atletas (Parisotto, Gore y cols. 2000). La figura IV.24 muestra un incremento significativo en el

porcentaje de reticulocitos en los animales tratados con rHuEpo durante un periodo de dos semanas. El grupo sometido a hipoxia intermitente normobárica muestra un incremento mayor en el porcentaje de reticulocitos a medida que pasaba el tiempo frente al grupo normoxia, existiendo diferencia significativa al día veintitrés.

Figura IV.24. Porcentaje de reticulocitos en animales sometidos a hipoxia o normoxia previamente tratados con rHuEpo durante un periodo de dos semanas

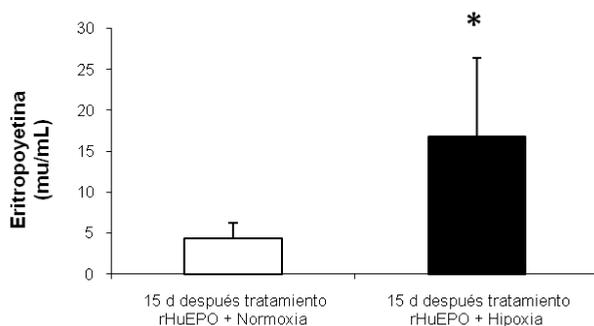


Los valores se expresan como mediana (rango intercuartílico) ($n=5$). Análisis de modelo lineal mixto. Post-Hoc *T* student con corrección de Bonferroni. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente al grupo Normoxia. (**) $p < 0.05$ frente a Basal. (#) $p = 0.06$ frente al grupo Normoxia.

4.2 Niveles de eritropoyetina en suero e índice de estimulación eritrocitario (OFF-Hr Score) tras la administración de rHuEpo

En la figura IV.25, se observa un incremento significativo, en día veintitrés, en los niveles de eritropoyetina en suero en el grupo de ratas sometidas a un protocolo de hipoxia intermitente normobárica que previamente habían sido tratadas con rHuEpo durante 15 días.

Figura IV.25. Niveles de eritropoyetina (mU/mL) en animales sometidos a hipoxia o normoxia y previamente tratados con rHuEpo durante un periodo de dos semanas



Los valores se expresan como mediana (rango intercuartílico) (n=5). T student para muestras no pareadas. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente al grupo Normoxia.

Como fue visto en la sección de Métodos de esta Tesis Doctoral, el índice de estimulación eritrocitario fue calculado teniendo en cuenta los niveles de hemoglobina (Hb en g/dL) y el porcentaje de reticulocitos (Ret%). Este parámetro es utilizado por las autoridades antidopaje como marcador indirecto de la administración de rHuEpo (Parisotto, Gore y cols. 2000). En la tabla IV.3 se observa que el OFF-Hr Score a los veintiún días de la última inyección de rHuEpo fue significativamente menor en el grupo hipoxia (77.2 ± 1.0) comparado con el grupo normoxia (91.4 ± 4.0). Similar observación se encuentra en el OFF-Hr Score veintitrés días después de la última inyección de rHuEpo, en donde este índice es significativamente menor en el grupo hipoxia (53.3 ± 10.0) comparado con el grupo normoxia (74.2 ± 4.0).

Tabla IV.3. Índice de estimulación eritrocitaria (OFF-Hr Score) en animales sometidos a hipoxia o normoxia previamente tratados con rHuEpo durante un periodo de dos semanas

	(OFF- HrScore) Índice de estimulación eritrocitaria	
Basal	37.2± 10.0	
15 días después administración rHuEpo	154.4± 26.0 (**)	
	Normoxia	Hipoxia
7 días después última inyección rHuEpo	134.4± 8.0	141.2± 1.0
14 días después última inyección de rHuEpo	117.2±20.0	131.4± 23.0
18 días después última inyección rHuEpo	95.2±1.0	96.1± 5.0
21 días después última inyección rHuEpo	91.4± 4.0	77.2± 1.0 (*)
23 días después última inyección rHuEpo	74.2± 4.0	53.3± 10.0 (*)

Los valores se expresan como mediana (rango intercuartílico) (n=5). Análisis de modelo lineal mixto. Post-Hoc T student con corrección de Bonferroni. La significación estadística se expresa como (**) $p < 0.05$ frente a Basal. (*) $p < 0.05$ frente al grupo Normoxia.

5. Estudio del efecto de un tratamiento con desmopresina (DDAVP) sobre los parámetros hematológicos utilizados para detectar el dopaje sanguíneo

La lucha contra el dopaje tiene el gran reto de erradicar cualquier manifestación que atente contra los valores del Olimpismo. El dopaje sanguíneo y las formas de enmascarar su uso, han puesto en evidencia la necesidad del Sistema Mundial Antidopaje de aunar esfuerzos para detectar las diferentes alternativas que utilizan ciertos deportistas para evitar las infracciones a las normas antidopaje. Con este objetivo, en esta Tesis Doctoral nos planteamos estudiar el efecto de un tratamiento con un fármaco, la desmopresina (DDAVP), que debido a su potencial hemodiluyente, podría alterar los parámetros hematológicos utilizados por las autoridades antidopaje para detectar el dopaje sanguíneo. Para ello, se obtuvieron dos muestras de sangre de sujetos físicamente activos en dos ocasiones. En la primera ocasión, recibieron una dosis de $4.3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de DDAVP + 1.5 L de agua y en la segunda sólo ingirieron 1.5 L de agua. Las muestras fueron analizadas para determinar la concentración de hemoglobina, hematocrito, reticulocitos y el OFF-Hr Score. Se analizaron también concentraciones

plasmáticas de creatinina, albúmina, proteínas totales y glucosa. A continuación exponemos los resultados.

5.1 Efecto de la administración de DDAVP, en las variables hematológicas monitorizadas por las autoridades antidopaje

La tabla IV.4 muestra una disminución significativa en los niveles de hemoglobina, hematocrito y en los valores del modelo OFF-Hr Score después del tratamiento con DDAVP. Todas estas diferencias fueron estadísticamente significativas tres horas después del tratamiento. La concentración de hemoglobina disminuyó de 15.2 ± 0.5 a 13.8 ± 0.5 g/dL. Los niveles de hematocrito disminuyeron de $45.8\% \pm 1.5$ a $42.0\% \pm 1.3$ después del tratamiento. Respecto al porcentaje de reticulocitos, se observa una tendencia a disminuir tras la administración de DDAVP, pero no fue estadísticamente significativa. Respecto al índice de estimulación eritrocitaria, los valores del modelo OFF-Hr Score fueron significativamente menores después de la administración de este medicamento. Las autoridades antidopaje analizan todos estos parámetros con el objetivo de detectar indirectamente la utilización de diferentes métodos de dopaje. Es importante recordar que los valores sanguíneos atípicos suponen a ciertos atletas

la consideración de “no apto” para participar en competición.

Tabla IV.4. Concentración de hemoglobina, valores de hematocrito, porcentaje de reticulocitos e índice OFF-Hr Score en grupos Agua y Agua + DDAVP

<i>Tiempo</i>	<i>Agua + DDAVP (n=5)</i>	<i>Agua (n=5)</i>	<i>Diferencia de medias</i>
Hemoglobina (g/dL)			
<i>Basal</i>	15.2 (0.5)	15.6 (0.5)	-0.4 (0.3, 1.6)
<i>Después del Tratamiento</i>	13.8 (0.5) **	15.5 (0.6)	-1.8 (-11.8, 13.8) *
Hematocrito (%)			
<i>Basal</i>	45.8 (1.5)	46.8 (1.8)	-1.0 (-3.0, 1.0)
<i>Después del Tratamiento</i>	42.0 (1.3) **	46.4 (1.9)	-4.4 (-38.2, 40.2) *
Reticulocitos (%)			
<i>Basal</i>	0.8 (0.2)	0.8 (0.2)	0.0 (0.7, 1.2)
<i>Después del Tratamiento</i>	0.6 (0.2)	0.7 (0.2)	-0.1 (0.3, 1.7)
OFF- Hr Score			
<i>Basal</i>	100.8 (0.7)	100.4 (5.2)	-3.2 (-6.8, 8.8)
<i>Después del Tratamiento</i>	90.9 (5.9)**	104.1 (4.2)	-13.2 (- 84.8, 86.8) *

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar ($n=5$) y diferencias entre las medias (95% CI). Prueba de Mann-Withney U. La significación estadística se expresa como (*) $p<0.05$ entre Agua y Agua + DDAVP. (**) $p<0.05$ entre Basal y Después del Tratamiento.

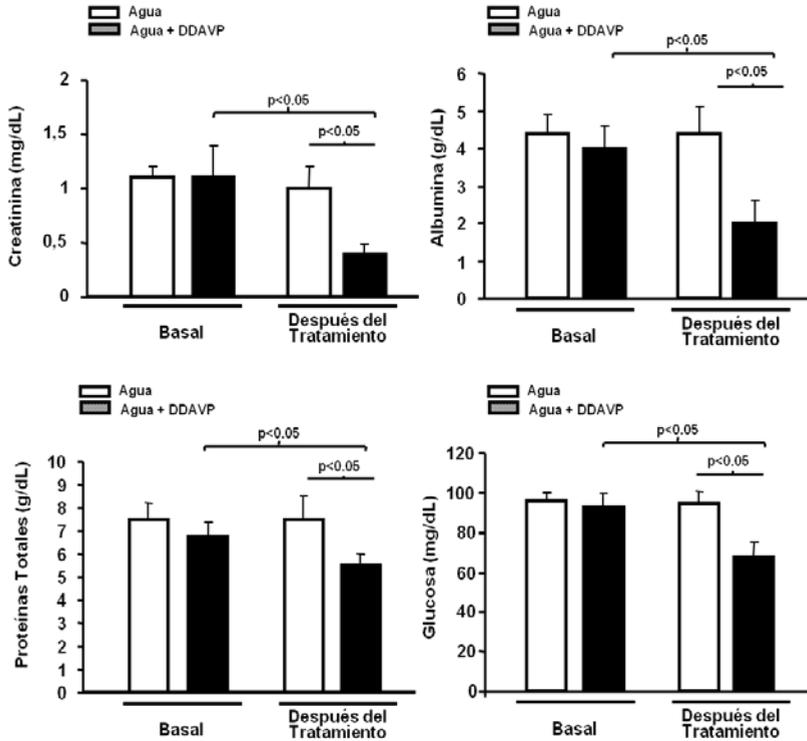
5.2 Efecto del tratamiento con DDAVP en la concentración plasmática de albumina, proteínas totales, creatinina y glucosa

Además de analizar los parámetros hematológicos comentados, nos propusimos estudiar el efecto de la administración de DDAVP en diferentes parámetros plasmáticos como glucosa, albúmina, creatinina y proteínas totales.

En la figura IV.26 se observa una disminución significativa en los niveles de creatinina plasmática después del tratamiento con DDAVP. El promedio de los niveles de creatinina de los sujetos en condiciones basales fue 1.1 ± 0.3 mg/dL. Tres horas después de la administración de DDAVP los valores fueron significativamente menores a los niveles fisiológicos 0.3 ± 0.1 mg/dL. Los valores normales en un hombre adulto están en el rango de 0.8 mg/dL a 1.2 mg/dL. Respecto a los valores de albúmina plasmática, se observa una disminución significativa en los niveles de albúmina plasmática después del tratamiento con DDAVP. El promedio de los valores de albúmina de los sujetos en condiciones basales fue de 4.4 ± 0.7 g/dL. Tres horas después de la administración de DDAVP los valores fueron significativamente menores a los niveles fisiológicos 2.1 ± 0.6 g/dL. Los valores normales

de un hombre adulto están en el rango de 3.2 g/dL a 5.2 g/dL. Respecto a la proteínas totales en el plasma los valores de los sujetos en condiciones basales fueron de 7.5 ± 1.1 g/dL. Tres horas después de la administración de DDAVP los valores fueron significativamente menores a los niveles fisiológicos 5.5 ± 0.9 g/dL. Los valores normales de un hombre adulto están en el rango de 6.6 g/dL a 8.3 g/dL. Para terminar, el promedio de los valores de glucosa plasmática de los sujetos en condiciones basales fue de 94.5 ± 6.1 mg/dL. Sin embargo, tres horas después de la administración de DDAVP los valores fueron significativamente menores a los niveles fisiológicos 67.6 ± 7.7 mg/dL. Los valores normales de un hombre adulto están en el rango de 74 mg/dL a 106 mg/dL.

Figura IV.26. Creatinina, proteínas totales, albúmina y glucosa plasmática en grupos Agua y Agua + DDAVP



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar ($n=5$). Prueba de Wilcoxon. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ entre Basal y Después del Tratamiento.

6. Estudio *in vitro*. Papel de las especies reactivas del oxígeno y PGC-1 α en la regulación por contracción de la inducción de MnSOD en músculo esquelético de ratón

Los resultados obtenidos en el segundo estudio planteado en la presente Tesis Doctoral en relación al efecto del entrenamiento anaeróbico, en combinación con la hipoxia, sobre la expresión muscular de PGC-1 α y MnSOD, nos condujo a diseñar toda una nueva serie de experimentos (*in vitro*) en los que nos planteamos determinar el papel de la electroestimulación en la activación de PGC-1 α y MnSOD en animales silvestres y deficientes (KO) en PGC-1 α . Del mismo modo quisimos estudiar el papel de las ERO en dicho proceso.

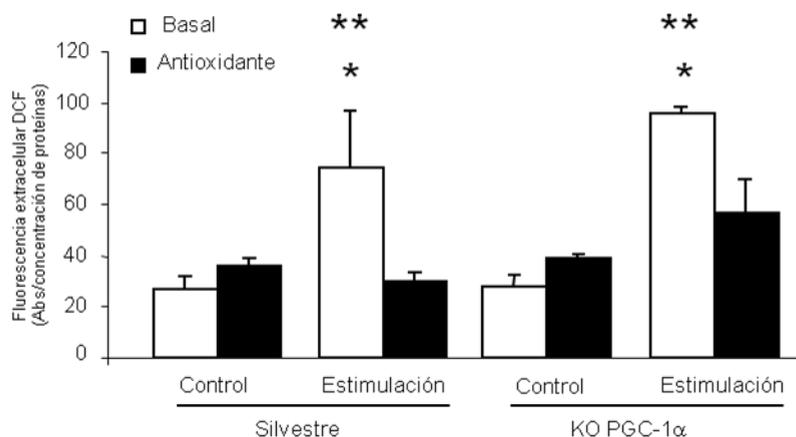
6.1 Efecto de la estimulación eléctrica en la oxidación extracelular de DCFH

Tal como se observa en la sección de Materiales y Métodos, la diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) ha sido utilizada como una herramienta para la medición de la producción de especies reactivas del oxígeno en diferentes tipos celulares (Bass, Parce y cols. 1983; Burow y Valet 1987). La intensidad de emisión de la fluorescencia está directamente relacionada con la

producción de ERO (LeBel, Ischiropoulos y cols. 1992) (Royall y Ischiropoulos 1993; Silveira, Pereira-Da-Silva y cols. 2003).

El protocolo de estimulación eléctrica indujo un incremento significativo de 166% y 230% en la fluorescencia extracelular de DCF tanto en el grupo de ratones silvestres como en los KO de PGC-1 α (Figura IV.27). El tratamiento antioxidante (combinación de GPX, GSH, CAT y SOD) disminuyó por completo la oxidación de DCFH en ambos grupos experimentales (silvestres y KO de PGC-1 α). No se observaron diferencias en la fluorescencia extracelular de DCF entre las células de ratones silvestres y KO de PGC-1 α , tanto antes como después de protocolo de estimulación eléctrica.

Figura IV.27. Niveles de fluorescencia de DCF en cultivo primario de células de músculo esquelético obtenidas de ratones silvestres y KO PGC-1 α

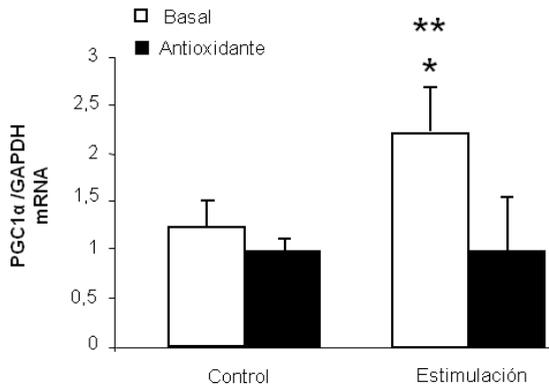


Valores expresados como media \pm desviación estándar ($n=6$). ANOVA de medidas repetidas. Post-Hoc Bonferroni. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente a Control + Basal en el mismo genotipo. (**) $p < 0.05$ frente a Estimulación + Antioxidante en el mismo genotipo.

6.2 Efecto de la estimulación eléctrica y el tratamiento antioxidante en la expresión de PGC-1 α y MnSOD

En la figura IV.28, observamos un incremento significativo de la electroestimulación en el mRNA de PGC-1 α de las células musculares de ratones silvestres. El tratamiento de las células musculares con una combinación de antioxidantes previene significativamente el incremento de la expresión de PGC-1 α .

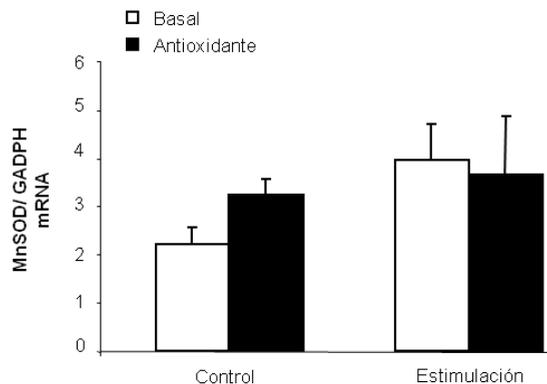
Figura IV.28. RT-PCR de PGC-1 α en cultivo primario de células de músculo esquelético obtenidas de ratones silvestres



Valores expresados como media \pm desviación estándar ($n=6$). ANOVA de medidas repetidas. Post-Hoc Bonferroni. El contenido de mRNA de PGC-1 α fue normalizado con el contenido de mRNA GAPDH. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente a Control + Basal. (**) $p < 0.05$ frente a Estimulación + Antioxidante.

Por su parte, en la figura IV.29, observamos que en células musculares de ratones silvestres la estimulación eléctrica no afectó la expresión a nivel de mRNA de MnSOD comparado con el grupo control. De igual forma, no se observó un efecto del tratamiento antioxidante.

Figura IV.29. RT-PCR de MnSOD en cultivo primario de células de músculo esquelético obtenidas de ratones silvestres



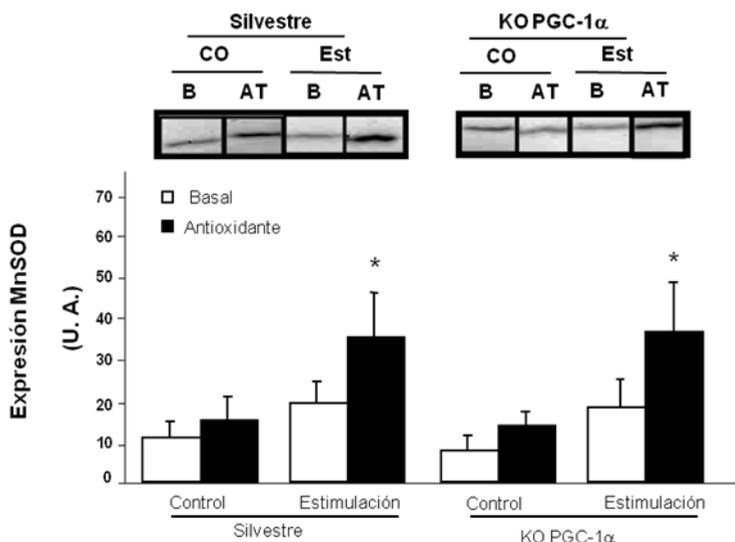
Las células fueron eléctricamente estimuladas durante dos horas (Estimulación) o reposo (Control) durante el tratamiento con (Antioxidantes) o sin antioxidantes (Basal). Valores expresados como media \pm desviación estándar ($n=6$).

6.3 Efecto de la estimulación eléctrica repetida y el tratamiento antioxidante en la expresión a nivel de proteína de MnSOD

En la figura IV.30, no se observa diferencia en la expresión de MnSOD entre las células de músculo esquelético de ratones silvestres y KO de PGC-1 α en condiciones basales. Después de cuatro días consecutivos de estimulación eléctrica, la expresión de MnSOD tiende a ser mayor (no significativo) que las

células no estimuladas independientemente de su genotipo. Cuando las células musculares fueron suplementadas con una combinación de antioxidantes la expresión de MnSOD aumentó de forma significativa alrededor de un 180% y 200% en las células de ratones silvestres y KO de PGC-1 α , respectivamente comparadas con los grupos control de células no estimuladas.

Figura IV.30. Efecto de la electroestimulación repetida durante cuatro días en la expresión a nivel de proteína de MnSOD en células de músculo esquelético obtenidas de ratones silvestres y KO PGC-1 α



La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente a Control + Basal en el mismo genotipo. (**) $p < 0.05$ frente a Estimulación + Antioxidante en el mismo genotipo. El control de carga fue verificado con el kit de tinción "MemCode™ Reversible Protein (Pierce, Rockford, IL, USA)". Basal (B), Antioxidante (AT).

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

Justificación del Estudio

En la presente Tesis Doctoral hemos querido estudiar, en primer lugar, el efecto que tendría el incremento artificial de la capacidad de transporte de oxígeno, a través del tratamiento con rHuEpo, sobre distintos parámetros musculares así como su implicación en la mejora del rendimiento físico. Son muchos los autores que, tanto en el ámbito clínico (Winearls, Oliver y cols. 1986; Bommer, Muller-Buhl y cols. 1987; Mayer, Thum y cols. 1988; Eschbach, Haley y cols. 1989) como en el ámbito deportivo (Berglund y Ekblom 1991; Lundby, Thomsen y cols. 2007; Lundby, Robach y cols. 2008), han destacado que los beneficios alcanzados con los tratamientos con Epo desbordan con creces su papel como estimuladora de la eritropoyesis. En este sentido los efectos pleitrópicos de la Epo están siendo estudiados por diversos grupos de investigación (Morishita, Masuda y cols. 1997; Acs y cols. 2001; Lappin, Maxwell y cols. 2002; Rotter, Menshykova y cols. 2008; Lundby, Hellsten y cols. 2008). Los posibles efectos de la hormona, a nivel del músculo esquelético, se fundamentan en el reciente descubrimiento de receptores

de Epo en este tejido (Scoppetta y Grassi 2004; Lundby, Hellsten y cols. 2008). En el primer estudio de la presente Tesis Doctoral nos planteamos determinar si el tratamiento con rHuEpo podría mediar los procesos de mitocondriogénesis, miogénesis y angiogénesis en el músculo esquelético, así como sus efectos sobre el rendimiento deportivo en animales de experimentación. Los resultados negativos obtenidos en este primer estudio en el que no observamos ninguna modificación en los procesos anteriormente descritos a nivel del músculo esquelético, ni sobre el rendimiento físico, en animales tratados con rHuEpo, a pesar de encontrar un aumento significativo en las diversas variables hematológicas determinadas, nos llevó a diseñar un segundo estudio. En éste nos planteamos determinar el efecto del aumento en la producción endógena de Epo (por la exposición a altitud simulada), en combinación con entrenamiento anaeróbico, sobre distintas adaptaciones musculares y hematológicas y sobre el rendimiento físico. De nuevo, en este caso, no observamos ningún efecto ni a nivel muscular, ni sobre el rendimiento, de la combinación de un protocolo de hipoxia intermitente con entrenamiento anaeróbico, a pesar de encontrar un significativo aumento en las variables hematológicas estudiadas. Los resultados obtenidos en los dos estudios anteriores nos planteron la necesidad de diseñar un tercer estudio conducente a

comparar el efecto del tratamiento con rHuEpo con un protocolo de hipoxia intermitente normobárica, sobre las variables hematológicas determinadas por las autoridades antidopaje. Nuestro principal objetivo al plantear este estudio era demostrar que los protocolos de hipoxia intermitente producen modificaciones hematológicas comparables a los tratamientos con rHuEpo. Los resultados obtenidos confirmaron nuestra hipótesis y fundamentaron el diseño experimental del cuarto estudio desarrollado en la presente Tesis Doctoral. En él nos planteamos determinar el efecto de un protocolo de hipoxia intermitente, tras la administración de rHuEpo, con el objetivo de comprobar un posible efecto enmascarador de la policitemia asociada a la hipoxia. Tras confirmar dicho efecto, diseñamos un nuevo protocolo experimental que constituye el quinto estudio de esta Tesis. En este trabajo nos planteamos, en seres humanos, estudiar el efecto hemodiluyente de la administración oral de desmopresina, un análogo de la hormona antidiurética, con un potencial efecto enmascarador del dopaje sanguíneo.

Los resultados obtenidos en el segundo estudio planteado en la presente Tesis Doctoral en relación al efecto del entrenamiento anaeróbico, en combinación con la hipoxia, sobre la expresión muscular de PGC-1 α y MnSOD, nos

condujo a diseñar toda una nueva serie de experimentos (*in vitro*) en los que determinamos el papel de la electroestimulación en la activación de PGC-1 α y MnSOD en animales silvestres y deficientes en PGC-1 α . Del mismo modo quisimos estudiar el papel de las ERO en dicho proceso. Estos experimentos, desarrollados en el laboratorio de la Profesora Ylva Hellsten (Departamento de Ciencias del Deporte y del Ejercicio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Copenhague, Dinamarca) conforman el sexto y último estudio que nos planteamos en esta Tesis.

A continuación discutimos los resultados obtenidos en cada uno de los estudios planteados.

1. Estudio del efecto de un tratamiento con rHuEpo en diversas adaptaciones musculares y hematológicas en animales de experimentación

En los últimos tres años se han publicado diversos trabajos acerca de la presencia de receptores de Epo (EpoR) en distintos tipos celulares no hematopoyéticos. El objetivo de estos estudios ha sido el de explicar las acciones “pleitrópicas” de esta hormona, descritas en diversos modelos fisiológicos y fisiopatológicos (cáncer, infarto de miocardio, accidente cerebro-vascular) (Lappin, Maxwell y cols. 2002), y que van más allá del mantenimiento del número de células rojas (Lappin, Maxwell y cols. 2002) (Xiong, Mahmood y cols. 2009)(Zhang, Xiong y cols. 2009).

Existen evidencias de la existencia de EpoR en el músculo esquelético de roedores y humanos (Lundby, Hellsten y cols. 2008; Rotter, Menshykova y cols. 2008). Algunos estudios han centrado la atención en estudiar, en roedores, los efectos del tratamiento con Epo en la angiogénesis (Kao, Xenocostas y cols. 2007), en la miogénesis (Rotter, Menshykova y cols. 2008), en la actividad de enzimas oxidativas del músculo esquelético (Cayla, Maire y cols. 2008), en la concentración de

glucosa en plasma (Cayla, Lavoie y cols. 1999), así como su implicación en la biogénesis mitocondrial en el músculo cardíaco (Carraway, Suliman y cols. 2010). Sin embargo, hasta donde nosotros conocemos, no existen estudios sobre el efecto del tratamiento con rHuEpo sobre la biogénesis mitocondrial en músculo esquelético.

En esta Tesis Doctoral, por tanto, hemos querido estudiar el efecto que tendría un tratamiento con rHuEpo, durante dos semanas, en el incremento en la capacidad de transporte de oxígeno y en la biogénesis mitocondrial en músculo esquelético. Con este propósito hemos medido la expresión, a nivel de proteína, de PGC-1 α . Este coactivador transcripcional, está considerado el regulador por excelencia del contenido mitocondrial en tejidos de mamíferos (Puigserver, Wu y cols. 1998). Se ha sugerido que la expresión de mTFA (uno de los principales factores de transcripción mitocondriales) se encuentra coordinada por factores nucleares respiratorios, entre ellos NRF-1 (Virbasius y Scarpulla 1994). Además, se ha demostrado que PGC-1 α estimula la expresión de NRF-1 y coactiva la función transcripcional de NRF-1 en el promotor de mTFA (Wu, Puigserver y cols. 1999).

Nuestros resultados muestran que en músculo sóleo el tratamiento con rHuEpo no modificó la expresión a nivel de proteína de PGC-1 α , NRF-1 y mTFA (Figura IV.4).

Decidimos estudiar también el efecto del tratamiento con rHuEpo en el contenido mitocondrial. NRF-1 se sabe que regula la expresión de citocromo C (Baar, Song y cols. 2003), considerado un marcador clásico de contenido mitocondrial en el músculo esquelético (Hood 2001; Gomez-Cabrera, Domenech y cols. 2008). En este sentido, no observamos que nuestro tratamiento modificase la expresión de citocromo C en el músculo sóleo (Figura IV.5). Similar resultado fue observado en humanos por Juel y cols., quienes demostraron que el contenido de citocromo C no se modificaba en músculo vasto lateral después de un tratamiento con rHuEpo (Juel, Thomsen y cols. 2007). Por el contrario Cayla y cols., demostraron, en músculo sóleo de rata, un incremento en la actividad de la enzima citocromo C oxidasa, tras un tratamiento con Epo (Cayla, Maire y cols. 2008). Este resultado contradictorio no puede ser explicado por la dosis de rHuEpo utilizada en el estudio ($600 \text{ UI}\cdot\text{Kg}^{-1}$) ni por la frecuencia de administración (cada dos días durante dos semanas), ya que en nuestro diseño experimental utilizamos dosis algo mayores durante más tiempo. En la misma línea, Carraway y cols., encontraron que en el músculo cardíaco de ratones tratados con rHuEpo durante tres días ($4000 \text{ UI}\cdot\text{Kg}^{-1}$) aumentaba el contenido de ADN mitocondrial y el volumen mitocondrial incluso antes del aumento de la capacidad de transporte de oxígeno

(incremento del hematocrito) (Carraway, Suliman y cols. 2010). De igual forma, el tratamiento con la hormona activó tanto la expresión del EpoR como el programa transcripcional de la biogénesis mitocondrial (mRNA de PGC-1 α , mTFA, NRF-1). Estos autores sugieren que la biogénesis mitocondrial en el músculo cardíaco se produce a través de la regulación del EpoR de la superficie celular y transducción de señales de la quinasa Akt1, que se sabe activa la óxido nítrico sintasa endotelial (Carraway, Suliman y cols. 2010).

Nuestros datos no confirman estos hallazgos obtenidos en el músculo cardíaco, en el músculo sóleo. Recientemente y, en un trabajo publicado en la prestigiosa revista "Blood" (Sinclair, Coxon y cols. 2010), se ha señalado que los EpoR detectados en diversos tipos celulares, incluyendo células endoteliales, neuronales y cardíacas, son debidos a diversos artefactos metodológicos. Aunque los niveles de mRNA de EpoR se detectan en todos los tipos celulares enlistados, estos se expresan entre 10-100 veces menos que en las células eritroides. Cuando se examinaron los niveles de EpoR por Western Blotting utilizando un anticuerpo monoclonal, en este trabajo se demostró que éstos son prácticamente indetectables en todos los tipos celulares estudiados. Estos datos cuestionan seriamente la presencia de EpoR

en células no hematopoyéticas y ponen en entredicho los estudios preclínicos que exploran las acciones “pleitrópicas” de los agentes estimuladores de la eritropoyesis (Sinclair, Coxon y cols. 2010).

Con base en que el tratamiento con rHuEpo puede inducir la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) tanto *in vitro* (Carlini, Reyes y cols. 1995) como *in vivo* (Wang, Chopp y cols. 2008), en la presente Tesis Doctoral hipotetizamos que continuas inyecciones de rHuEpo podrían incrementar la angiogénesis en el músculo esquelético de ratas no entrenadas a través del aumento de la expresión, a nivel de proteína, de VEGF. Nuestro modelo de tres semanas de tratamiento con rHuEpo no afectó el contenido de esta proteína en músculo sóleo ni en músculo gastrocnemio (Figuras IV.6 y IV.7). Lundby y cols., encontraron en humanos que los niveles de mRNA de VEGF en el músculo vasto lateral, tras una inyección de rHuEpo no se modificaba y que la administración prolongada de la hormona no generaba angiogénesis (Lundby, Hellsten y cols. 2008). Por tanto, los resultados de esta Tesis refuerzan la idea que la Epo podría no ser un estimulador de la angiogénesis en el músculo esquelético, requiriendo ésta un estímulo concomitante con la inducción de otros factores angiogénicos (Lundby, Hellsten y cols. 2008). Otro

argumento, comentado con anterioridad, que encontramos en la literatura para explicar este resultado, es la posible ausencia de EpoR en el músculo esquelético (Sinclair, Coxon y cols. 2010). Estudios *in vivo*, en córnea de rata, han demostrado una clara angiogénesis en respuesta al tratamiento con VEGF recombinante humana. Sin embargo, la utilización de Epo recombinante no induce la formación de nuevos vasos, lo que coincide con nuestros resultados (Sinclair, Coxon y cols. 2010).

La miogénesis es otro de los procesos cuya regulación se le ha atribuido a la Epo en el músculo esquelético. Este proceso está modulado por una variedad de factores de transcripción entre los cuales se encuentran los factores reguladores miogénicos: MyoD, Myf5, miogenina y MRF4 (Sabourin y Rudnicki 2000). Especialmente, MyoD y Myf5 juegan un importante papel en la formación del mioblasto mientras que miogenina y MRF4 son necesarios para su diferenciación y maduración (Thomas, Langley y cols. 2000). Estudios *in vitro* han demostrado que la administración con rHuEpo aumenta la proliferación de mioblastos y células satélite mediado por un aumento de la expresión a nivel de mRNA de MyoD y Myf5 (Ogilvie, Yu y cols. 2000). Además, Rottery cols., han observado que después de una lesión por aplastamiento en el músculo sóleo, aumenta el número de células satélite

proliferativas, observando a su vez que el tratamiento con rHuEpo genera una rápida y mejor regeneración del músculo esquelético (Rotter, Menshykova y cols. 2008). Similar función en el desarrollo y la reparación del tejido muscular, en ciertos desórdenes musculares como la distrofia muscular y la atrofia muscular espinal, ha sido atribuida al nuevo papel que podría desempeñar la Epo (Scoppetta y Grassi 2004). Por tanto, en esta Tesis Doctoral hipotetizamos que la administración continua de rHuEpo durante dos semanas afectaría la expresión de los factores reguladores miogénicos Myf5 y MyoD. No obstante, como se observa en las figura IV.8, el tratamiento no afecta el contenido de estas dos proteínas ni en músculo gastrocnemio, ni en músculo sóleo. Por el contrario, Lundby y cols., encontraron que una única inyección de rHuEpo aumentó la expresión de MRF4 a nivel de mRNA en músculo vasto lateral, sugiriendo de esta forma su participación en el proceso de diferenciación muscular. La razón de no observar cambios en este factor miogénico se podría deber a la baja dosis empleada en nuestra Tesis (300 UI) comparada con la usada por Lundby cols., (15000 UI) (Lundby, Hellsten y cols. 2008). Debemos destacar también que los experimentos llevados a cabo en este estudio fueron desarrollados en humanos, mientras que los nuestros se desarrollaron en rata.

El tratamiento con Epo recombinante produjo una clara policitemia en nuestros animales (Tabla IV.1), confirmando datos previamente publicados por otros grupos de investigación (Kawamura, Higuchi y cols. 1990) (Berglund y Ekblom 1991; Verbrugge y Goodnough 1994). Los efectos de la administración de Epo en las adaptaciones hematológicas y su relación con el aumento del rendimiento físico son muy conocidos, aunque en diversos trabajos de investigación se han demostrado resultados contradictorios (Verbrugge y Goodnough 1994; Juel, Thomsen y cols. 2007; Thomsen, Rentsch y cols. 2007). Nuestros datos demuestran un incremento significativo en la concentración de hemoglobina de ratas tratadas con inyecciones continuas de rHuEpo, reforzando la idea de la efectividad de la hormona en nuestro diseño experimental. Con el objetivo de dilucidar el papel de la rHuEpo en el teórico aumento de la capacidad de transporte de oxígeno, nuestros animales no entrenados fueron sometidos a una prueba en tapiz rodante para determinar la velocidad máxima aeróbica. Como se demuestra en la figura IV.9, la velocidad máxima aeróbica no se modificó, a pesar del incremento en los niveles de hemoglobina. Estos datos, confirman los trabajos publicados por diversos investigadores en los que introducen el concepto del “hematocrito óptimo” para el rendimiento. Los primeros estudios en los que se plantea

la posibilidad de su existencia, se publican entre las décadas de los 50 y los 60. Se sabe que en condiciones de anemia, la habilidad del sistema circulatorio para distribuir el oxígeno a los tejidos está disminuida debido a la incapacidad para transportar oxígeno por la sangre. En condiciones de policitemia, esta dificultad se da, debido a una viscosidad excesiva. Por tanto la habilidad del sistema cardiovascular para distribuir el oxígeno aumenta a medida que lo hace el hematocrito hasta cierto valor superado el cual ésta empieza a disminuir. Este valor se considera el valor de hematocrito óptimo (Crowell, Ford y cols. 1959; Dreizen 1962; Smith y Crowell 1963; Crowell y Smith 1967). Este concepto es fundamental en el ámbito del alto rendimiento deportivo, especialmente en aquellas especialidades deportivas más susceptibles de verse afectadas por el dopaje sanguíneo. En 1994 Verbrugge y Goodnough plantearon un estudio, en animales, cuyo objetivo fue determinar el valor de hematocrito óptimo que se relacionaba con un mayor rendimiento en una prueba de resistencia aeróbica. Los autores utilizaron dosis de rHuEpo ($600 \text{ UI}\cdot\text{kg}^{-1}$, tres veces por semana durante tres semanas) para incrementar el hematocrito de las ratas hasta valores del 62.2%. Estas dosis las combinaron con entrenamientos aeróbicos (seis días a la semana) durante todo el tratamiento. El principal resultado del trabajo fue que la policitemia severa inducida por el tratamiento con

Epo, no se acompañó de un incremento en la resistencia aeróbica de los animales. De hecho el grupo de animales entrenados y no tratados con rHuEpo (hematocrito 47.3%) corrió el mismo tiempo en el test de resistencia que el grupo tratado. En el año 2009 otro grupo de investigación, en este caso utilizando como modelo experimental el ratón, volvió a plantearse la determinación del hematocrito óptimo para el máximo rendimiento en pruebas aeróbicas (Schuler, Arras y cols. 2009). Estos autores utilizaron la administración de NESP (nueva proteína estimuladora de la eritropoyesis) con el objetivo de aumentar su hematocrito. Los niveles más elevados de $VO_{2m\acute{a}x}$, así como el tiempo máximo hasta el agotamiento (a intensidades submáximas) se alcanzaron con valores de hematocrito del 58% en los animales tratados con NESP. Sin embargo, dado que la viscosidad elevada asociada con valores superiores de hematocrito limita el rendimiento del sistema cardiovascular (máximo gasto cardiaco) (Boning, Maassen y cols. 2010), con porcentajes superiores de hematocrito los animales no mejoraron su capacidad aeróbica. Robertson y cols. han estimado que el hematocrito óptimo en humanos oscila entre el 43.3% y el 54.8% en hombres, y entre el 38.0% y el 45.0% en mujeres (Robertson, Gilcher y cols. 1982). Curiosamente, los límites del 50% establecidos por la AMA tienen como efecto que aquellos deportistas que utilizan el dopaje

sanguíneo lo hagan en óptimas condiciones (Boning, Maassen y cols. 2010). En nuestro estudio encontramos un aumento en el hematocrito de 45.1 ± 1.4 a $49.0 \pm 2.8\%$ en el grupo tratado con Epo. Sin embargo no encontramos ningún efecto del tratamiento sobre la velocidad máxima aeróbica en nuestros animales. Una posible explicación sería la no consecución del hematocrito óptimo en nuestro modelo experimental.

2. Estudio del efecto de un protocolo de hipoxia intermitente normobárica, en combinación con entrenamiento anaeróbico, en diversos parámetros hematológicos, musculares y de rendimiento físico en animales de experimentación

La mayoría de los estudios diseñados para evaluar el efecto del ejercicio físico combinado con la hipoxia en el rendimiento se han desarrollado siguiendo protocolos de entrenamiento de resistencia (Abdelmalki, Fimbel y cols. 1996; Levine y Stray-Gundersen 1997). Uno de nuestros objetivos al plantear este estudio fue el de determinar si el rendimiento podría incrementarse con una combinación de entrenamiento anaeróbico, a nivel del mar, con un protocolo de hipoxia intermitente normobárica. En el año 2000 y, en un estudio realizado en humanos, se

demostró que el rendimiento anaeróbico puede mejorar tras 10 días de exposición a hipoxia intermitente normobárica y entrenamiento sobre el nivel del mar (Nummela y Rusko 2000). Sin embargo las adaptaciones hematológicas y/o musculares involucradas en este proceso no se han estudiado con detalle.

Nuestros resultados indican que 12 horas de hipoxia por día, siete días a la semana, a ~4000m de altura y durante tres semanas, fueron suficientes para producir un incremento significativo en los niveles de hemoglobina, hematocrito y Epo en nuestros animales (Figuras IV.10, IV.11 y IV.12).

Como hemos comentado en el apartado anterior, la máxima velocidad alcanzada en una prueba de carrera en tapiz rodante, se considera un importante parámetro para la evaluación de la capacidad máxima aeróbica en animales (Davies, Packer y cols. 1982). En nuestro estudio determinamos este parámetro antes y después del periodo de entrenamiento (Tabla IV.2) y encontramos una mejora significativa en el rendimiento en los animales entrenados que no se correlacionó con cambios en marcadores de biogénesis mitocondrial en músculo gastrocnemio rojo: PGC-1 α , citocromo C y actividad citrato sintasa (Figuras IV. 16, IV.17 y IV. 18). En relación a PGC-1 α , nuestro grupo de investigación previamente ha

demostrado que este coactivador transcripcional puede ser inducido en el músculo gastrocnemio de rata después de tres semanas de entrenamiento (Gomez-Cabrera, Domenech y cols. 2008) o tras dos episodios consecutivos de ejercicio (Baar, Wende y cols. 2002). Además, se sabe que en células musculares C₂C₁₂ mantenidas en un ambiente al 0.2% de O₂ aumenta la expresión de PGC-1 α a nivel de proteína. Esto demuestra la relación que existe entre la disminución de la disponibilidad de oxígeno y la expresión de PGC-1 α . (Arany, Foo y cols. 2008). Sin embargo, en nuestros resultados no encontramos un efecto aditivo de la hipoxia, combinado o no con entrenamiento anaeróbico, en la expresión a nivel de proteína de PGC-1 α en músculo gastrocnemio rojo (Figura IV.16). Determinamos también la expresión, a nivel de proteína, de citocromo C y la actividad de la enzima citrato sintasa en nuestros grupos experimentales. En este caso, una vez más, no encontramos modificación alguna en la porción roja del músculo gastrocnemio en estos relevantes marcadores de contenido mitocondrial (Reichmann, Hoppeler y cols. 1985; Hood 2001). Nuestros resultados concuerdan con los publicados por el grupo de Lester Packer en 1982, en los cuales mostraron que animales entrenados de forma anaeróbica presentaron un mayor VO_{2máx} (comparado con los controles) en ausencia de un incremento en el

contenido mitocondrial en el músculo esquelético (Davies, Packer y cols. 1982).

El entrenamiento anaeróbico es una adecuada intervención para inducir adaptaciones de enzimas glucolíticas en el músculo esquelético (Takekura y Yoshioka 1990; MacDougall, Hicks y cols. 1998). En este tejido, el complejo piruvato deshidrogenada (PDC) está involucrado en la regulación de la vía de oxidación de la glucosa. Las quinasa del PDC, la PDK-1, inhibe la actividad de la piruvato deshidrogenasa a través de la fosforilación de la subunidad 1, y se ha demostrado que la expresión de esta enzima es sensible a hipoxia (Sugden y Holness 2003). En esta Tesis Doctoral, hipotetizamos que la permanencia a gran altura podría fomentar los efectos del ejercicio sobre la función de PDK-1 en el músculo esquelético. Sin embargo, el protocolo de hipoxia intermitente normobárica combinada o no con entrenamiento anaeróbico, no indujo una respuesta transcripcional de PDK-1 en el músculo esquelético (Figura IV.13). Por tanto, ni la biogénesis mitocondrial, ni las vías de oxidación de la glucosa estudiadas fueron modificadas en el músculo esquelético.

Nuestro grupo de investigación ha estado involucrado durante años en el estudio del estrés oxidativo inducido por ejercicio (Sastre, Asensi y cols. 1992; Viña, Gomez-

Cabrera y cols. 2000; Gomez-Cabrera, Pallardo y cols. 2003) y de forma específica en el estudio de la inducción de los sistemas protectores como son las enzimas antioxidantes y las proteínas citoprotectoras inducibles por estrés (HSPs) (Gomez-Cabrera, Borrás y cols. 2005; Gomez-Cabrera, Domenech y cols. 2008). Tanto el ejercicio físico como la hipoxia han sido relacionados con el estrés oxidativo (Radak, Asano y cols. 1997; Noble, Ho y cols. 2006). Esta fue la razón por la cual determinamos los niveles de la Hsp70 y de la enzima antioxidante MnSOD en nuestro modelo. Nuestros resultados muestran que ni la hipoxia ni el entrenamiento anaeróbico afectan el contenido de Hsp70 y MnSOD en el músculo gastrocnemio rojo (Figuras IV. 14 y IV. 15). Se ha sugerido que la inducción por ejercicio de estas proteínas exhibe un umbral dependiente de la intensidad del mismo (Milne y Noble 2002). La velocidad máxima aeróbica alcanzada por nuestras ratas durante el entrenamiento anaeróbico fue de $58 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$. Consideramos que la intensidad de nuestro protocolo de entrenamiento podría explicar estos resultados contradictorios (Ogura, Naito y cols. 2006).

Teniendo en cuenta que el entrenamiento de velocidad produce un mayor aumento relativo en la actividad contráctil en fibras rápidas del músculo esquelético

(Laughlin, Simpson y cols. 1990), determinamos los niveles de citocromo C y de MnSOD en la porción blanca del músculo gastrocnemio en todos los grupos experimentales. No encontramos cambios significativos como resultado del entrenamiento, de la hipoxia o de la combinación de ambos factores. Nuestros resultados confirman los datos previamente reportados por otros grupos de investigación. Hilty y cols., encontraron un incremento significativo en el $VO_{2m\acute{a}x}$ en ratas después de un protocolo de entrenamiento anaeróbico que no estuvo acompañado por el incremento de marcadores de contenido mitocondrial en músculo gastrocnemio blanco (Hilty, Groth y cols. 1989). Resultados similares fueron reportados con modelos de hipoxia, donde no se observaron incrementos en el contenido mitocondrial en fibras musculares de contracción rápida como resultado de protocolos de hipoxia aguda o crónica (Pastoris, Foppa y cols. 1995; Kennedy, Stanley y cols. 2001).

La serie de resultados negativos nos llevó a estudiar diferentes adaptaciones hematológicas en nuestros animales (Saltin y Calbet 2006). Evaluamos si después de aumentar los valores hematológicos generados por la hipoxia, nuestros animales lograrían efectos adicionales sobre la velocidad máxima aeróbica (VMA). En los grupos hipóxicos encontramos un aumento muy significativo de la

hemoglobina, el hematocrito y los niveles de Epo en plasma (Figuras IV.10, IV.11 y IV.12). Sin embargo, la VMA mejoró en la misma medida en los grupos entrenados en normoxia o en combinación con el protocolo de hipoxia intermitente (Tabla IV.2). A pesar de que algunos estudios sobre el nivel del mar han demostrado que el incremento artificial del hematocrito aumenta el rendimiento aeróbico y el $VO_{2\text{máx}}$ (Buick, Gledhill y cols. 1980; Thomson, Stone y cols. 1982) nuestros resultados coinciden con hallazgos previos de otros grupos de investigación. Utilizando altitud simulada y, a pesar del incremento en la concentración de hemoglobina/hematocrito, después de un protocolo “living high-training low”, no se han reportado efectos en la capacidad aeróbica máxima por diferentes grupos (Basset, Joanisse y cols. 2006; Robach, Schmitt y cols. 2006). Reboul y cols, utilizando un diseño experimental diferente y a pesar del marcado incremento en la hemoglobina total con el entrenamiento en altitud, mostraron que el aumento en la VMA fue similar al encontrado en los animales mantenidos en condiciones de normoxia y entrenados durante cinco semanas (Reboul, Tanguy y cols. 2005). Este resultado ha sido clásicamente reportado en distintos estudios realizados en humanos y animales con el mismo diseño experimental (Henderson, Clancy y cols. 2001; Galbes, Goret y cols.

2008). Parte de estos resultados podrían explicarse por el hecho de que los animales que viven y se entrenan en hipoxia realizan su entrenamiento a una intensidad menor que los animales entrenados en normoxia. Sin embargo, esta explicación no es adecuada en nuestro modelo experimental en el que todos los animales (hipoxia y normoxia) fueron entrenados a nivel del mar con la misma intensidad del ejercicio. Consideramos, por tanto, que al igual que en el apartado anterior, la no consecución de un hematocrito óptimo tras la exposición a la hipoxia, podría ser el motivo de este resultado. En nuestro estudio encontramos un aumento en el hematocrito de 40.1 ± 4.1 a $52.5 \pm 1.8\%$ en el grupo hipoxia reposo y de 43.0 ± 1.3 a $51.2 \pm 2.1\%$ en el grupo hipoxia entrenado. Los valores presentados por estos dos grupos difirieron significativamente de los presentados por los grupos normoxia.

Como conclusión podemos afirmar que nuestra estrategia de entrenamiento anaeróbico sobre el nivel del mar, en combinación con hipoxia intermitente normobárica, fue efectiva en la inducción de las adaptaciones hematológicas pero no mejoró el rendimiento físico en ratas. Además, no se encontraron cambios en el músculo esquelético a nivel de proteína de PGC-1 α , citocromo C, PDK-1, Hsp70, MnSOD y citrato sintasa en ningún grupo experimental. En conjunto, estos resultados nos llevan a

concluir que la mejora de la capacidad máxima aeróbica es un fenómeno multifactorial que no depende exclusivamente de las adaptaciones en músculo esquelético (Davies, Packer y cols. 1982), ni de los cambios hematológicos (Gore, Hahn y cols. 1998).

3. Estudio del efecto de dos tratamientos con rHuEpo y un protocolo de hipoxia intermitente normobárica sobre las adaptaciones hematológicas en animales de experimentación

Entre las estrategias que pueden ser utilizadas para aumentar el volumen eritrocitario, en esta Tesis nos hemos centrado en el estudio de los tratamientos con rHuEpo y en los protocolos de hipoxia intermitente normobárica. En la literatura cada alternativa ha sido estudiada por separado, pero pocos estudios han realizado un análisis comparativo sobre el efecto de estas dos alternativas en diversos parámetros hematológicos.

El uso de cámaras hipóxicas para mejorar el rendimiento ha generado un importante debate acerca de la conveniencia de considerar estos sistemas como métodos de dopaje o simplemente como ayudas ergogénicas (Levine 2006; Malloy, Kell y cols. 2007; Sanchis-Gomar, Martínez-Bello y cols. 2009; Boning 2010; Ferretti 2010;

Hinghofer-Szalkay 2010; Lippi y Franchini 2010; Lippi, Franchini y cols. 2010; Sanchis-Gomar, Martinez-Bello y cols. 2010).

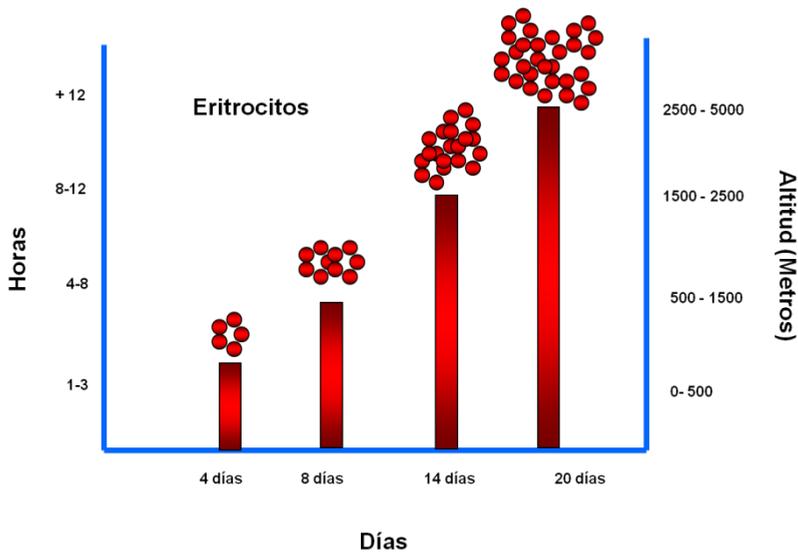
La exposición a hipoxia se relaciona con un incremento en la concentración de Epo en plasma con el concomitante incremento en los parámetros hematológicos (Abbrecht y Littell 1972; Ou, Chen y cols., 1992). Este efecto está mediado principalmente por la cantidad y frecuencia del estímulo hipóxico, tal y como ha sido observado en roedores y sujetos entrenados (Mylrea y Abbrecht 1970; Abellan, Remacha y cols. 2005). Un aumento de la Epo en suero del 62-770% produce un incremento en parámetros hematológicos similar al que se obtiene al exponerse a una altitud de entre 2500m y 8500m (Savourey, Garcia y cols. 1994; Savourey, Garcia y cols. 1996; Stray-Gundersen, Chapman y cols. 2001; Heinicke, Prommer y cols. 2003; Savourey, Launay y cols. 2004). Existen estudios muy sólidos en la literatura que muestran que el método más eficaz para estimular la eritropoyesis y mejorar el rendimiento físico en atletas sobre el nivel del mar (la llamada estrategia “Living High-Training Low”) requiere lo siguiente: 2500m de altitud y 22 horas al día de exposición durante al menos 28 días. Esto debe ir acompañado de entrenamientos diarios a una altitud de 1250m (Wilber, Stray-Gundersen y cols. 2007). Por otra parte, respecto al efecto del tratamiento con rHuEpo, y

como hemos comentado en apartados anteriores, Verbrugge y cols. demostraron en roedores que inyecciones de rHuEpo ($600 \text{ UI}\cdot\text{kg}^{-1}$) cada tres días durante tres semanas provocaban un importante aumento del hematocrito (Verbrugge y Goodnough 1994). El marcado incremento en las variables hematológicas después de un tratamiento con Epo también ha sido reportado en humanos (Lundby, Thomsen cols. 2007). A pesar de los similares efectos hematológicos generados por estos dos métodos, la literatura es escasa en presentar una comparación de los efectos sobre la capacidad de transporte de oxígeno de estas dos alternativas. Nuestros resultados demuestran que la concentración de hemoglobina y el hematocrito de los dos grupos tratados con rHuEpo (300 UI por animal y 500 UI por animal), así como del grupo hipoxia, se encuentran significativamente aumentados al final del periodo experimental (Figuras IV. 19 y IV.20). Además el incremento en la concentración de hemoglobina es significativamente mayor en el grupo rHuEpo 500 cuando se compara con rHuEpo 300 e Hipoxia. Respecto al hematocrito, al finalizar los tratamientos, los tres grupos mostraron valores significativamente mayores cuando se comparan con sus valores basales. De nuevo y, tal y como cabría esperar, en el caso del grupo rHuEpo 500 estos incrementos estuvieron por encima del resto de

grupos experimentales. Respecto al porcentaje de reticulocitos los tres grupos mostraron un aumento significativo en sus valores tras los tratamientos y el protocolo de hipoxia intermitente normobárica. Sin embargo, de nuevo en el grupo rHuEpo 500 es en el que observamos un incremento mayor (Figura IV.21). Woo y cols., demostraron que distintas dosis de rHuEpo (10, 100, 450, 1350 y 4050 UI·kg⁻¹ de peso) aumentaban el porcentaje de reticulocitos y la concentración de hemoglobina de forma escalonada (Woo, Krzyzanski y cols. 2006; Woo, Krzyzanski y cols. 2007). De igual forma, Abbrecht y cols., demostraron que ratones sometidos a distintas concentraciones decrecientes de O₂ generaban una mayor respuesta hematológica en la medida en la que el estímulo hipóxico se hacía más agresivo (Mylrea y Abbrecht 1970). De los pocos estudios acerca de los efectos de un tratamiento con rHuEpo e hipoxia, Carraway y cols., encontraron que roedores sometidos a hipoxia continua durante catorce días aumentaron la concentración de hemoglobina de 14.3±0.2 a 19.7±0.3 (g/dL) mientras que roedores tratados con una dosis de 4000 UI·kg⁻¹ de peso durante tres días consecutivos sólo aumentaron los niveles de hemoglobina de 14.3±0.2 a 17.0±1.4 (g/dL) (Carraway, Suliman y cols. 2010). En este caso, el efecto policitémico fue mayor como consecuencia de la hipoxia, seguramente por la intensidad y frecuencia

del estímulo (catorce días a 5500m) (Figura V.1). En nuestro modelo demostramos, en primer lugar, que la policitemia es dependiente de la dosis empleada y, en segundo lugar, que una menor dosis de Epo (300 UI por animal) provoca un aumento similar en la hemoglobina y el hematocrito al obtenido con el protocolo de hipoxia intermitente normobárica.

Figura V. 1. Factores que influyen en el aumento del volumen eritrocitario: Altitud, número de horas y frecuencia



Recientemente se ha demostrado que la masa de hemoglobina total determina, en parte, el $VO_{2\text{máx}}$ al aumentar la diferencia arterio-venosa de oxígeno. En este estudio se observó que este efecto se puede conseguir bien a través de la adaptación a la altura o bien a través

de la manipulación sanguínea. Esta última mimetiza los efectos de la altitud, aunque excediendo su magnitud (Schmidt y Prommer 2010). Las manipulaciones sanguíneas están prohibidas por la AMA, mientras que los protocolos de hipoxia se encuentra bajo revisión (Sanchis-Gomar, Martínez-Bello y cols. 2009). La vulneración del espíritu del deporte y el juego limpio, como valores fundamentales del Olimpismo, al igual que los riesgos y los posibles efectos secundarios asociados a la hipoxia, son los dos argumentos a los que se recurre a la hora de cuestionar la permisividad de este método en el ámbito deportivo. De hecho, la base de esta técnica es clara: tiene unos efectos similares a los tratamientos con Epo (en mayor o menor dosis) o a los que podría tener cualquier otra sustancia análoga prohibida por la AMA como la darbepoetina o la CERA (Continuous Erythropoietic Receptor Activator), entre otros.

La principal conclusión que podemos obtener de nuestro estudio es que un protocolo de hipoxia intermitente normobárica y la administración de una dosis concreta de Epo (300 UI por animal) pueden modificar de forma similar los parámetros hematológicos analizados por las autoridades antidopaje.

4. Estudio del efecto de un protocolo de hipoxia intermitente normobárica en parámetros hematológicos tras la administración de rHuEpo en animales de experimentación

Tal y como hemos comentado en el apartado anterior, el uso de cámaras hipóxicas normobáricas para aumentar el rendimiento de los atletas ha generado polémica en la literatura (Levine y Stray-Gundersen 1997; Wilber 2007). El debate gira en torno a si estos sistemas pueden considerarse como un método de dopaje o simplemente como una ayuda ergogénica (Levine 2006). Estas cámaras son especialmente utilizadas como método para aumentar la producción endógena de Epo con la intención de aumentar el rendimiento físico (Bonetti, Hopkins y cols. 2006; Levine y Stray-Gundersen 2006; Neya, Enoki y cols. 2007). Sin embargo desconocemos la existencia de estudios previos que hayan investigado los efectos de un protocolo de hipoxia intermitente normobárica en diversos parámetros hematológicos (hemoglobina, hematocrito, reticulocitos, índice de estimulación eritrocitaria) tras la administración de rHuEpo en animales de experimentación. Consideramos importante señalar que estos parámetros hematológicos son utilizados actualmente por distintas federaciones internacionales

para determinar la posible violación de infracciones antidopaje, especialmente las relacionadas con el dopaje sanguíneo. En el caso de las normas antidopaje de la UCI, los corredores son sometidos a distintos análisis con el objetivo de determinar los niveles en sangre de: hematocrito, hemoglobina y reticulocitos, entre otros. Si el análisis de sangre muestra valores atípicos, el corredor es declarado “no apto” para la competición y es sometido a vigilancia por las autoridades antidopaje. Bajo esta normativa, los valores atípicos para hombres son: hematocrito superior a 50% (con niveles de hemoglobina superiores a 17g/dL), reticulocitos por debajo de 0.2% (valores por encima de 2.4% justifican el seguimiento del deportista) y un índice de estimulación eritrocitaria (OFF-Hr Score) mayor de 133 (valores entre 125 y 133 justifican el seguimiento al corredor). Similar estrategia de control de dopaje es utilizada por otras federaciones como puede ser la Federación Internacional de Esquí. Por otra parte, con la inclusión del pasaporte biológico como herramienta antidopaje se refuerza la importancia del uso de métodos indirectos para controlar e identificar valores hematológicos atípicos en los deportistas (Malcovati, Pascutto y cols. 2003).

El desarrollo de pruebas en sangre para identificar el uso indebido de Epo por parte de los atletas ha sido uno de

los mayores objetivos, no sólo de las políticas antidopaje sino de la investigación antidopaje. Desde el año 2000, gran cantidad de artículos han sido publicados acerca de las posibilidades de detección del uso de Epo por los deportistas de forma indirecta (Parisotto, Gore y cols. 2000; Parisotto, Wu y cols. 2001; Gore, Parisotto y cols. 2003; Sharpe, Ashenden y cols. 2006). Con base en este método, tanto la eritropoyesis acelerada debido al uso reciente de Epo (ON-models), así como la eritropoyesis disminuida debido al anterior uso de Epo (OFF-Models, por ejemplo OFF-Hr Score) puede ser detectada usando modelos estadísticos multivariados (Parisotto, Gore y cols. 2000). Por ejemplo, si un atleta suspende el tratamiento con Epo entre dos y tres semanas antes de la competición, el modelo estadístico OFF-Hr Score puede detectar hasta un total de dos tercios de estos casos (Parisotto, Gore y cols. 2000). Diversos estudios han demostrado que atletas que interrumpen la administración de Epo más de cuatro semanas antes de la competición pierden los beneficios del aumento de la capacidad de transporte de oxígeno, lo cual implica que el atleta debe continuar usando Epo en las semanas inmediatamente anteriores a la competición (Parisotto, Wu y cols. 2001; Sharpe, Hopkins y cols. 2002). El modelo OFF-Hr Score se basa en la combinación de elevados niveles de hemoglobina al mismo tiempo que una disminución en los

reticulocitos, fenómeno que se produce cuando el deportista detiene el tratamiento con Epo (Souillard, Audran y cols. 1996; Parisotto, Gore y cols. 2000; Gore, Parisotto y cols. 2003). Desde el año 2000 ha sido demostrada la precisión de este método en la detección indirecta del abuso de Epo (Gore y cols., 2003; Parisotto y cols., 2000; Parisotto y cols., 2001; Sharpe y cols., 2006). Es por esta razón que el modelo OFF-Hr Score ha sido adoptado por las autoridades antidopaje (Gore y cols., 2003). Desde hace varios años, la UCI reconoció la importancia del modelo OFF-Hr Score y continuamente excluye de las competiciones a quienes muestran valores atípicos en este modelo (Sharpe y cols., 2006).

Llegados a este punto de la discusión, consideramos necesario comentar que dado que nuestro estudio fue desarrollado en ratas Wistar macho jóvenes, las conclusiones de nuestro trabajo, a la hora de hacerlas extensivas al modelo humano, deben interpretarse con cautela. Por ejemplo, los valores de reticulocitos en nuestras ratas en condiciones basales, si los aplicásemos al modelo OFF-Hr Score en humanos, se encuentran fuera del rango establecido por las autoridades antidopaje ($3.9 \pm 0.3\%$) (Tabla IV.3). Aunque los valores de hemoglobina de las ratas están en el mismo rango que los humanos, el hecho de que los reticulocitos sean tan

elevados, supone valores del índice de estimulación eritrocitario desproporcionados cuando se comparan entre ellos. Sin embargo, y a pesar de esta limitación experimental, se observan diferencias significativas en el índice de estimulación eritrocitario entre los animales en hipoxia y normoxia en las dos últimas extracciones (ver tabla IV.3). El modelo OFF-Hr Score a los veintiún y veintitrés días después de la última dosis de rHuEpo, fue significativamente menor en el grupo hipoxia comparado con el grupo normoxia. Además de estudiar el índice de estimulación eritrocitaria quisimos dilucidar si después de la administración de Epo, un protocolo de hipoxia intermitente normobárica podría inducir un cambio significativo en tres parámetros hematológicos también utilizados por las autoridades antidopaje: hemoglobina, hematocrito y reticulocitos. Encontramos que el tratamiento con rHuEpo induce un incremento significativo en la concentración de hemoglobina y en el hematocrito después de dos semanas de tratamiento (Figura IV.22 y IV.23). En este sentido, tras el tratamiento, los animales en el grupo normoxia mostraron una disminución gradual tiempo-dependiente en la concentración de hemoglobina y hematocrito, mientras que los animales que fueron sometidos a hipoxia sólo mostraron una leve disminución en estos parámetros (Figuras IV.22 y IV.23). Por tanto, un protocolo de hipoxia intermitente normobárica, tras un

tratamiento con Epo, puede modificar parámetros hematológicos relevantes determinados por las autoridades antidopaje. De igual forma, y con la aplicación de una novedosa forma de controlar las variables fisiológicas, como es el pasaporte biológico, también esta estrategia podría ser utilizada para mantener los valores dentro de los límites permitidos, a pesar de realizar prácticas prohibidas. Nuestros resultados confirman datos previamente publicados por otros grupos de investigación y en los que se detecta una marcada disminución en el porcentaje de reticulocitos, acompañada de elevadas concentraciones de hemoglobina/hematocrito, cuando cesa el tratamiento con rHuEpo. La novedad de estos datos radica en la demostración experimental de la posibilidad de modificar diversos parámetros hematológicos con la hipoxia y tras un tratamiento con Epo. El aumento significativo en la síntesis de Epo endógena, en los animales sometidos a hipoxia intermitente normobárica, podría explicar estas modificaciones (Figura IV.25). En 1957, García, demostró que roedores sometidos a hipoxia hipóbarica durante cuatro semanas aumentaron el número de eritrocitos disminuyendo el volumen plasmático (García 1957). Recientemente se ha demostrado que la activación de la eritropoyesis mediada por la administración de rHuEpo genera similar comportamiento, aumentando la

concentración de hemoglobina no sólo por su efecto eritropoyético, sino también por su efecto en la reducción del volumen plasmático (Lundby, Thomsen y cols. 2007). En este sentido, la disminución en los valores de hemoglobina y hematocrito de nuestros animales, después de la cesación del tratamiento con rHuEpo, consideramos que podría representar la recuperación del volumen normal de plasma en el grupo normoxia.

5. Estudio del efecto de un tratamiento con desmopresina sobre los parámetros hematológicos utilizados para detectar el dopaje sanguíneo

A lo largo de esta discusión hemos mostrado evidencias de los beneficios del dopaje sanguíneo así como de nuevos métodos que podrían ser utilizados para enmascararlo. Las autoridades antidopaje recientemente han expresado su preocupación acerca de los métodos de hemodilución para enmascarar el dopaje sanguíneo (WADA, 2011). En la presente Tesis nos planteamos confirmar la hipótesis de que la hemodilución, inducida por el tratamiento con un análogo de la hormona antidiurética (la desmopresina), podría alterar los parámetros hematológicos utilizados para detectar el dopaje sanguíneo en el deporte.

Como hemos comentado en varios apartados de la presente Tesis, entre los métodos legales, permitidos, para aumentar el hematocrito se incluyen el entrenamiento en altura y las cámaras hipóxicas. Entre los métodos ilegales se encuentran el dopaje sanguíneo (infusión de glóbulos rojos empaquetadas propias, homólogas o heterólogas) y la administración de Epo (Cooper y cols., 2008). Además existen otros componentes que se encuentran en la lista prohibida de la AMA: sustitutos de sangre (perfluorocarbonos y transportadores de oxígeno ligados a la hemoglobina) y componentes que afectan la curva de disociación de la hemoglobina como el RSR13 (right-shifting reagent 13 o efaproxiral) (WADA, 2011). Teniendo en cuenta la amplia lista de agentes y técnicas de dopaje sanguíneo es necesario tener un amplio rango de pruebas para detectarlo. Como hemos visto en apartados anteriores de la discusión, el efecto más importante del dopaje sanguíneo y del tratamiento con Epo es la alteración de una serie de parámetros hematológicos determinados para detectar de forma indirecta este tipo de prácticas. Un problema con esta clase de pruebas es que los resultados pueden ser fácilmente modificados con la aplicación de distintos métodos enmascaradores. Esto permite a los deportistas ajustar los valores dentro de los

umbrales “legales” y continuar disfrutando de los beneficios del dopaje sanguíneo (Cooper y cols., 2008). Los expansores de volumen plasmático (EVP) como la albúmina, el dextrano o el hidroxietil-almidón son considerados agentes enmascaradores (Guddat y cols., 2005; Gutiérrez Gallego y cols., 2004). Los deportistas, a menudo asistidos por el personal médico, aprenden rápidamente acerca de las sustancias que pueden ser usadas para prevenir la deshidratación y además aumentar el rendimiento. Del mismo modo se sabe que la combinación de EVP y Epo recombinante puede ser ventajosa, ya que provoca un aumento del volumen sanguíneo mientras que los niveles de hematocrito y hemoglobina permanecen dentro del rango legal permitido. En este sentido se ha demostrado que los miembros del equipo Finlandés de Esquí usaron el expansor de volumen plasmático, hidroxietil-almidón, antes del Campeonato Nórdico Mundial de Esquí en 2001 (Cooper y cols., 2008). Los EVP están prohibidos porque el incremento del volumen plasmático puede potencialmente aumentar el rendimiento (por prevención de la deshidratación) (Gomez, Guddat y cols., 2008) y, por otra parte, puede ser utilizado para enmascarar un aumento de los valores hematológicos mediante la aplicación de métodos ilegales (WADA, 2011).

En nuestro estudio en humanos, combinamos una dosis de desmopresina (DDAVP) con 1.5 litros de agua y estudiamos sus efectos hemodiluyentes, en sujetos sanos activos. Tras la administración de Agua + DDAVP encontramos una rápida y significativa disminución de los niveles de hematocrito y hemoglobina (Tabla IV.4). Los valores de hematocrito, tras la administración de desmopresina, disminuyeron desde valores basales de 45.8% a 42.0% ($p < 0.01$), mientras que los valores de hemoglobina disminuyeron desde valores basales de 15.2 g/dL a 13.8 g/dL ($p < 0.01$). En un trabajo reciente se demostró que la infusión intravenosa de expansores de volumen plasmático (Gelofusine) en hombres físicamente activos, resultaba en un reducción significativa de los niveles de hemoglobina (16.0 g/dL pre-infusión vs 14.7 g/dL post-infusión; $p < 0.001$) y del hematocrito (44.0% pre-infusión vs 41.0% post-infusión; $p < 0.01$) (Berger y cols., 2006). Consideramos que nuestros resultados apoyan la idea de que el tratamiento con DDAVP es similar a la administración de un EVP. Aunque no encontramos una disminución significativa en el porcentaje de reticulocitos, el tratamiento con DDAVP produjo una disminución significativa en el modelo OFF-Hr Score. Nuestros datos demuestran que la administración de DDAVP puede enmascarar el uso ilegal de métodos que incrementan el

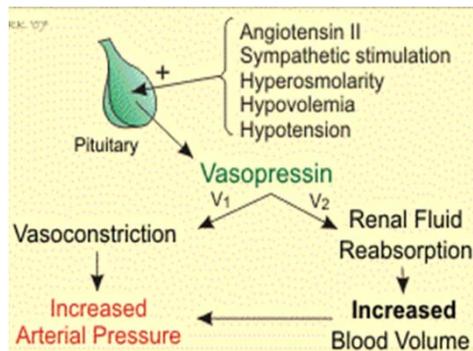
rendimiento en deportes aeróbicos, incluyendo el dopaje sanguíneo y la administración de Epo.

Además de analizar los parámetros hematológicos quisimos evaluar los cambios en los niveles de diferentes parámetros plasmáticos después de la administración de DDAVP. El tratamiento con DDAVP provoca una disminución en los niveles de creatinina, albúmina, proteínas totales y glucosa, que alcanzan, en todos los casos, valores por debajo de sus niveles fisiológicos (Figura IV.26).

Concluimos que el tratamiento con $4.3 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de DDAVP disminuye significativamente los principales parámetros hematológicos determinados por las autoridades antidopaje para detectar el dopaje sanguíneo y la administración de Epo. Ninguno de estos parámetros fue modificado tras la administración de 1.5 L de agua mineral a los sujetos (sin combinación con desmopresina). Este trabajo fue publicado en el año 2009 en la revista científica: "Internacional Journal of Sports Medicine". En el último párrafo de la discusión, advertimos de la importancia de considerar la DDAVP como un agente enmascarador, y señalamos la necesidad de incluirla en el listado de sustancia prohibidas. Es importante mencionar que la DDAVP no se encontraba en la lista de sustancias y métodos prohibidos en el deporte ni en el 2009 ni en el 2010. No

obstante, gracias a la publicación de este estudio, la lista actual de sustancias y métodos prohibidos ha sido modificada y ampliada con la incorporación de la DDAVP, en la sección de “Diuréticos y otros agentes enmascaradores”, con efectos a partir del 1 de enero de 2011.

Figura V.2. Acción de la vasopresina, retención de líquidos y aumento del volumen sanguíneo



Finalmente, consideramos que las autoridades antidopaje también deberían estudiar la posibilidad de realizar un estricto análisis sanguíneo que incluya creatinina plasmática, albúmina, proteínas totales y niveles de glucosa (aparte de hematocrito, hemoglobina y reticulocitos) para prevenir la hemodilución artificial.

6. Estudio *in vitro*. Papel de las especies reactivas del oxígeno y PGC-1 α en la regulación por contracción de la inducción de MnSOD en músculo esquelético de ratón

Los resultados obtenidos en el segundo estudio planteado en la presente Tesis Doctoral en relación al efecto del entrenamiento anaeróbico, en combinación con la hipoxia, sobre la expresión muscular de PGC-1 α y MnSOD, nos condujo a diseñar toda una nueva serie de experimentos (*in vitro*) en los que nos planteamos determinar el papel de la electroestimulación en la activación de PGC-1 α y MnSOD en animales silvestres y deficientes (KO) en PGC-1 α . Del mismo modo quisimos estudiar el papel de las ERO en dicho proceso. El principal resultado encontrado en este estudio es que el tratamiento antioxidante en células electroestimuladas, inhibe la inducción de PGC-1 α a nivel de mRNA, demostrando que la inducción por contracción de PGC-1 α , está regulada por ERO.

Desde finales de la década de los 70 se sabe que la contracción muscular aumenta la formación de ERO tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (Dillard, Litov y cols. 1978; Davies, Quintanilha y cols. 1982; Silveira, Pereira-

Da-Silva y cols. 2003; Silveira, Pilegaard y cols. 2006; Hellsten, Nielsen y cols. 2007) y que mientras grandes cantidades de ERO pueden resultar dañinas para el tejido, menores niveles pueden ser importantes en el proceso de señalización celular, tal y como ha sido evidenciado a través de la inducción de diferentes genes (Gomez-Cabrera, Borrás y cols. 2005; Irrcher, Ljubcic y cols. 2009).

Como prerrequisito para el estudio del papel de las ERO en la inducción por contracción de PGC-1 α y de MnSOD, examinamos la formación de ERO en células de ratones silvestres y KO de PGC-1 α , en condiciones basales y en respuesta a la electroestimulación. Nuestros resultados muestran que las células de los ratones silvestres y KO de PGC-1 α tienen similar producción de ERO en condiciones basales y que se produce similar aumento en la formación de ERO, como resultado de la electroestimulación, en ambos tipos de células. Similar resultado fue encontrado por Adhietty y cols., quienes observaron que la producción de ERO en mitocondria aislada de células de músculo esquelético no se encontraba afectada por la ausencia de PGC-1 α (Adhietty, Ugucioni y cols. 2009). Sin embargo, estos resultados contrastan con las observaciones hechas en fibroblastos de ratón, en

donde se encontró que la producción de ERO fue mucho mayor en células de ratones KO de PGC-1 α que en ratones silvestres (St-Pierre, Drori y cols. 2006). En nuestro estudio, dos horas de electroestimulación aumentaron un 166% y 230% la fluorescencia extracelular de DCF, cuando las comparamos con las células control (Figura IV. 27). El tratamiento antioxidante inhibió completamente la oxidación de DCFH en ambos grupos, silvestres y KO de PGC-1 α , demostrando que la oxidación de DCFH fue generada específicamente por ERO.

El segundo paso de nuestro estudio fue establecer si la expresión de PGC-1 α estaba aumentada como consecuencia del protocolo de electroestimulación, y si este efecto estaba mediado por las ERO. Dos horas de electroestimulación aumentan la expresión a nivel de mRNA de PGC-1 α (Figura IV. 28), mientras que la combinación de contracción con tratamiento antioxidante inhibe esta respuesta (Figura IV. 28), sugiriendo que la inducción por contracción de PGC-1 α fue dependiente de la formación de ERO. También encontramos que la expresión a nivel de mRNA de MnSOD no fue afectada ni por la electroestimulación aguda ni por el tratamiento antioxidante (Figura IV. 29). Estos resultados sugieren que la electroestimulación o los antioxidantes no regulan la expresión a nivel de

mRNA de MnSOD. Cuando estudiamos los niveles de proteína de la MnSOD y su relación con la electroestimulación observamos que los niveles de la expresión de MnSOD no fueron incrementados ni por la sola electroestimulación, ni por el tratamiento antioxidante, sino que la inducción fue evidente cuando la electroestimulación se combinó con el tratamiento antioxidante (Figura IV. 30). La inducción de MnSOD se observó en las células de los animales silvestres y deficiente en PGC-1 α (KO). Este dato sugiere que las ERO generadas durante la contracción regulan la expresión de PGC-1 α a nivel de mRNA, pero inhiben la expresión a nivel de proteína de MnSOD, en cultivo primario de células de músculo esquelético de ratón. Juntos, estos datos claramente sugieren que la inducción por contracción de MnSOD puede ocurrir independientemente de PGC-1 α , y muestra también una disociación entre la regulación por ERO de la expresión de ambas proteínas.

Muchos grupos de investigación, incluido el nuestro, han demostrado que la administración con antioxidantes reduce significativamente la inducción por ejercicio de la expresión de MnSOD (y de otras enzimas antioxidantes) en el músculo esquelético usando diferentes modelos *in vivo* (Khassaf, McArdle y cols. 2003; Gomez-Cabrera, Borrás y cols. 2005;

Ristow, Zarse y cols. 2009). La conclusión de estos estudios es que el incremento del contenido antioxidante del tejido reduciría la inducción de enzimas protectoras, como MnSOD. Sin embargo, nuestros resultados en células de músculo esquelético en cultivo, contradicen estos resultados previos.

Para determinar la relación de las ERO y PGC-1 α en la regulación de MnSOD, se desarrolló un nuevo experimento con células de ratones silvestres y KO de PGC-1 α . Las células fueron sometidas a dos horas de electroestimulación por día durante cuatro días, siendo recogidas al quinto día para la determinación de la expresión de MnSOD a nivel de proteína. Se observó una tendencia a aumentar la expresión de MnSOD tanto en el grupo silvestre como en el KO de PGC-1 α , sin ser estadísticamente significativa (Figura IV. 30). La razón de la ausencia de efecto en la inducción de MnSOD es incierta, pero puede reflejar el limitado periodo de tiempo de cuatro días. Sin embargo, cuando las células fueron simultáneamente tratadas con antioxidantes durante la electroestimulación se observó un marcado incremento en la expresión a nivel de proteína de MnSOD, tanto en las células de ratones silvestres como en las KO de PGC-1 α (Figura IV. 30). Esta observación sugiere que las ERO formadas durante la contracción de las células musculares,

inhiben la regulación de MnSOD y que si las ERO son inhibidas con el tratamiento antioxidante, la contracción induce un claro incremento de MnSOD. Esto también indica que las ERO tienen efectos contrarios en los niveles de mRNA de PGC-1 α y en los niveles de proteína de MnSOD y, por tanto indican, que PGC-1 α no es el principal mediador para la inducción por contracción de MnSOD. El efecto positivo del tratamiento antioxidante en la contracción, por un aumento en los niveles de mRNA de enzimas de defensas antioxidante (Uncoupling protein 3), ha sido observado en el músculo esquelético de humanos (Hellsten, Nielsen y cols. 2007). Sin embargo, el efecto negativo de las ERO en las células musculares sobre la MnSOD resulta ciertamente paradójico. Cabría esperar que un incremento en la formación de radicales libres se acompañe de un aumento de la defensa antioxidante en las células.

La principal conclusión de este estudio es que los radicales libres generados durante la contracción de células de músculo esquelético en cultivo, inducen un incremento en la expresión a nivel de mRNA de PGC-1 α , mientras que los radicales libres generados durante contracciones repetidas tienen un efecto negativo en el aumento de la expresión a nivel de proteína de MnSOD. La contracción repetida en combinación con antioxidantes

induce la expresión de MnSOD de forma similar tanto en células de ratones silvestres como KO de PGC-1 α . En definitiva, PGC-1 α no es esencial para inducir por contracción la expresión de MnSOD en cultivo primario de células de músculo esquelético de ratón.

El mecanismo de acción por el que los antioxidantes ejercen sus efectos, en el músculo esquelético, es diferente cuando se comparan modelos *in vivo* con modelos *in vitro*.

VI. SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

VI. SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

Justification of the Study

In this Doctoral Thesis our first aim was to determine the effect of the artificial increment of the oxygen delivery capacity on different muscular parameters and on performance, by using rHuEpo. There are several studies both in clinical (Winearls, Oliver et al. 1986; Bommer, Muller-Buhl et al. 1987; Mayer, Thum et al. 1988; Eschbach, Haley et al. 1989) and sports fields (Berglund y Ekblom 1991; Lundby, Thomsen et al. 2007; Lundby, Robach et al. 2008) showing that the improvements achieved with Epo treatment outweigh the erythropoietic action of the hormone. In this regard the pleiotropic effects of Epo are being studied by several research groups (Morishita, Masuda et al. 1997; Acs et al. 2001; Lappin, Maxwell et al. 2002; Rotter, Menshykova et al. 2008; Lundby, Hellsten et al. 2008). The beneficial effects of Epo in skeletal muscle are based on the recent discovery of Epo receptors (EpoR) in this tissue (Scoppetta y Grassi 2004; Lundby, Hellsten et al. 2008).

In our first study we proposed to determine whether rHuEpo treatment could be involved in mitochondrial biogenesis, myogenesis, or angiogenesis in skeletal muscle. We also wanted to test the effects of the hormone on exercise performance in experimental animals. None of the results obtained in this first study presented any changes in the processes described above at the level of skeletal muscle, or in physical performance in animals treated with rHuEpo, although a significant increase in hematological levels was found which led us to design a second study. In this we decided to test the effect of an increase in the endogenous production of Epo (using a hypoxic protocol), in combination with anaerobic training, on different muscular and hematological adaptations. We also studied the effect of this combination on performance. Again, in this case, we found no effect on either the skeletal muscle or performance, as a result of the combination of intermittent hypoxia and anaerobic training, despite finding a significant increase in the hematological variables analyzed.

The results from these studies led us to devise our third experimental design in which we aimed to study the hematological modifications induced by two treatments with rHuEpo and compare both outcomes with an intermittent hypoxic protocol. We wanted to demonstrate

that an intermittent hypoxic protocol can induce the same hematological modifications as Epo treatments.

Results confirmed our hypothesis and underpinned the experimental design of the fourth study developed in this Doctoral Thesis. In this we proposed to determine the effect of intermittent hypoxia on hematological parameters after rHuEpo administration in an animal model. Our guiding hypothesis was that the hypoxia-induced erythropoiesis could be involved in the masking effects of this strategy when combined with Epo treatments. After confirming the role of hypoxia as a masking strategy, we designed the fifth experimental study of this Doctoral Thesis. This is the only human study in the Thesis and we aimed to determine whether administration of desmopressin, a synthetic analogue of vasopressin, could be associated with a significant hemodilution and thus be considered as a masking agent in sports.

In the second study of this Doctoral Thesis, we aimed to determine the effect of intermittent normobaric hypoxia in combination with sprint interval training in the expression of PGC-1 α and MnSOD. Our results led us to develop a new series of experiments (*in vitro*) in which we proposed to determine the role of reactive oxygen species and PGC-1 α in the contraction-induced expression of MnSOD in primary skeletal muscle cells from wild type and knock-out for PGC-1 α mice. These experiments, developed in the

laboratory of Professor Ylva Hellsten (Department of Exercise and Sport Sciences, Faculty of Sciences, University of Copenhagen, Denmark) constitute the sixth and last study of the present Doctoral Thesis.

We shall now address the results obtained in each of the above-mentioned studies.

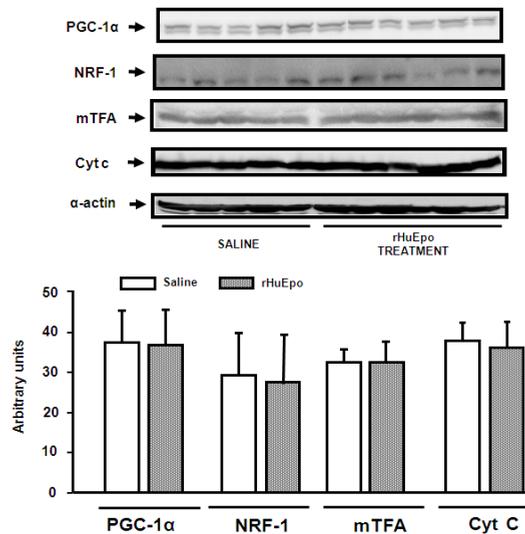
1. Study of the effect of rHuEpo treatment on skeletal muscle adaptations in experimental animals

There is evidence showing that the Epo receptor is present in skeletal muscle in rodents (Rotter, Menshykova et al. 2008) and humans (Lundby, Hellsten et al. 2008). Many studies have focused on the effect of rHuEpo treatment in angiogenesis, (Kao, Xenocostas et al. 2007) myogenesis (Rotter, Menshykova et al. 2008), oxidative enzymes activities in skeletal muscle (Cayla, Maire et al. 2008), mitochondrial biogenesis in the cardiac muscle (Carraway, Suliman et al. 2010), and plasma glucose concentrations (Cayla, Lavoie et al. 1999). However, as far as we know, there are no studies on the effect of rHuEpo on mitochondriogenesis in skeletal muscle.

In this Doctoral Thesis, we aimed to determine whether rHuEpo treatment for two weeks was involved in the increase of oxygen delivery capacity and in skeletal muscle mitochondrial biogenesis. For this purpose, we determined the peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α protein levels in skeletal muscle. PGC-1 α is considered the master regulator of the mitochondrial content in mammalian tissues (Puigserver, Wu et al. 1998). It has been suggested that the expression of the mitochondrial transcription factor A (one of the main

mitochondrial transcription factors involved in mitochondrial DNA replication) is coordinated by nuclear respiratory factors, such as NRF-1 (Virbasius and Scarpulla 1994). Moreover, it has also been shown that PGC-1 α stimulates NRF-1 expression and coactivates the transcriptional functions of NRF-1 in the mTFA promoter (Wu, Puigserver et al. 1999). Our results show that, in soleus muscle, treatment with rHuEpo did not modify the protein expression of PGC-1 α , NRF-1 or mTFA (Figure VI.1).

Figure VI.1. Western blot analysis of PGC-1 α , NRF-1, mTFA and cytochrome C in soleus muscle in rHuEpo treated rats



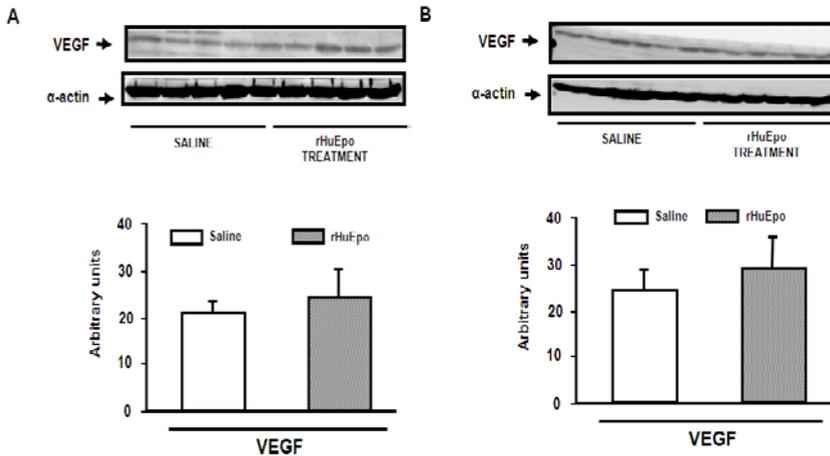
Values are shown as mean \pm SD. Saline group, n=6; rHuEpo treated group, n=6.

Thus we decided to study the effect of rHuEpo treatment on the mitochondrial content in our animals. It is well known that among the genes regulated by NRF-1, the classical marker of mitochondrial content, cytochrome C, is one of the most important (Hood 2001; Gomez-Cabrera, Domenech et al. 2008). We did not find any effect of the treatment on the protein levels of cytochrome C in soleus muscle (Figura VI.1). Similar results have been previously reported in humans by Juel *et al.* These authors showed that the content of cytochrome C was not modified in the vastus lateralis after treatment with rHuEpo (Juel, Thomsen et al. 2007). On the contrary, Cayla *et al.*, found a significant increase in the activity of cytochrome c oxidase in rat soleus muscle after Epo treatment (Cayla, Maire et al. 2008). Similar results were reported by Carraway et al. who found, an increase in the mitochondrial DNA content and volume, in the cardiac muscle of mice treated with rHuEpo for three days (4000 IU Kg⁻¹) (Carraway, Suliman et al. 2010). Similarly, the Epo treatment activated both the expression of EpoR and the mitochondrial biogenesis transcriptional programme (PGC-1 α , mTFA, and NRF-1 mRNA levels). They also found that Epo acted through its cell surface receptor and eNOS-Akt1 signal transduction pathway (Carraway,

Suliman et al. 2010). Our data in soleus muscle are not in accordance with the findings reported in cardiac muscle. Recently, in an study published in "Blood", data challenging the notion of the presence or function of EpoR on nonhematopoietic cells (endothelial, neuronal, and cardiac cells) has been reported (Sinclair, Coxon et al. 2010). EpoR protein levels were undetectable in all the cell types studied. These results call into question the preclinical basis for clinical studies exploring direct, "pleiotropic" actions of erythropoiesis stimulating agents (Sinclair, Coxon et al. 2010).

On the basis that rHuEpo treatment can induce vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in different tissues *in vivo* (Wang, Chopp et al. 2008) and *in vitro* (Carlini, Reyes et al. 1995) we hypothesized that continuous rHuEpo injections would increase angiogenesis in rat skeletal muscle by increasing the protein content of VEGF in resting conditions. However our treatment did not affect the VEGF protein content in either soleus or gastrocnemius muscle (See Figure VI.2).

Figure VI.2. Western blot analysis of VEGF in soleus (A) and gastrocnemius (B) muscle in rHuEpo treated rats



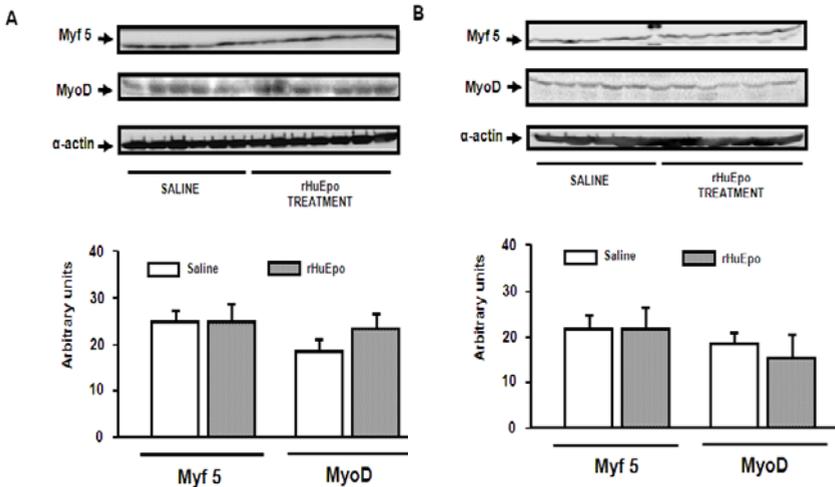
Values are shown as mean \pm SD. Saline group, $n=6$; rHuEpo treated group, $n=6$.

Similar results have been previously reported. Lundby *et al.* found, after a single or prolonged rHuEpo administration, that VEGF mRNA levels were unaffected in vastus lateralis (Lundby, Hellsten *et al.* 2008). It has been demonstrated that Epo can stimulate angiogenesis in pathological conditions, i.e. traumatized skeletal muscle tissue (Rotter, Menshykova *et al.* 2008) and in brain after stroke (Wang, Zhang *et al.* 2004). However, the present observation that two weeks of rHuEpo treatment did not induce an increase of VEGF protein content in soleus and gastrocnemius muscle reinforces the idea that this

hormone does not promote angiogenesis in skeletal muscle in physiological conditions.

Epo may play a role in muscle development and repair in normal tissue or in some human muscle disorders, such as muscular dystrophies and spinal muscle atrophies (Scoppetta and Grassi 2004). In an *in vitro* study, stimulation with rHuEpo was found to enhance proliferation and reduce the differentiation of both myoblasts and satellite cells (Ogilvie, Yu et al. 2000). This is the reason why we hypothesized that a continuous rHuEpo treatment would affect the protein content of two myogenic regulatory factors such as Myf5 and MyoD. We failed to find changes in the protein levels of those transcription factors in either soleus or gastrocnemius muscle (See Figure VI.3.). In contrast, Lundy *et al.*, found that a single injection of a high dose of Epo did increase MRF4 mRNA, suggesting a role in muscle fibre differentiation or growth (Lundby, Hellsten et al. 2008). In addition, it has been shown that Epo-treated injured muscles increase the number of proliferating satellite cells and of muscle strength, indicating that Epo may act as a mitogen on muscle stem cells (Rotter, Menshykova et al. 2008). Our results could be explained because of the low dose of recombinant human erythropoietin used (300 IU).

Figure VI.3. Western blot analysis of Myf 5 and MyoD in soleus (A) and gastrocnemius muscle (B) in rHuEpo treated rats



Values are shown as mean \pm SD. Saline group, $n=6$; rHuEpo treated group, $n=6$.

Regarding the effects of Epo in hematological parameters, two weeks of treatment induced a very significant increase both in hemoglobin and in the percentage of reticulocytes in our animals (Table VI.1). Different research groups have published similar results previously (Kawamura, Higuchi et al. 1990; Berglund and Ekblom 1991; Verbrugge and Goodnough 1994).

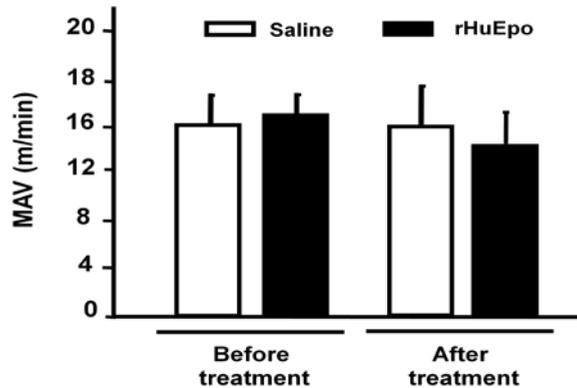
Table VI.1. Hemoglobin concentration and percentage of reticulocytes before and after two weeks of rHuEpo treatment

	HEMOGLOBIN (g/dL)		RETICULOCYTES (%)	
	Pre	Post	Pre	Post
Saline	15.2± 0.9	14.7± 0.8	2.8± 0.4	2.9 ± 0.3
rHuEpo Treatment	16.4± 0.7	18.4± 0.7 (**)	3.8± 1.0	6.2± 0.4 (**)

*Values are mean ± SD (n=6). Student's T test. (**)* indicates $p < 0.01$ vs Pre.

The effects of Epo on different hematological adaptations and in the enhancement of the aerobic performance have been well studied. However, contrary results have been found in rats (Verbrugge and Goodnough 1994) and in humans (Juel, Thomsen et al. 2007; Thomsen, Rentsch et al. 2007; Lundby, Robach et al. 2008). This is why we wanted to determine whether the increase in the hemoglobin concentration after the Epo treatment was associated with an increase in the maximal oxygen consumption in our animals. Untrained rats were subjected to a maximal aerobic velocity test, before and after the treatment, and we did not find any positive effect of the Epo administration in their performance (See Figure VI.4).

Figure VI.4. Maximal aerobic velocity before and after rHuEpo treatment



Values are shown as mean \pm SD. Saline group, $n=6$; rHuEpo treated group, $n=6$.

Our results, although paradoxical, are in accordance with previous research work in which the concept of “optimal hematocrit” for performance was coined. In anemic conditions the ability of the circulatory system to deliver oxygen to the tissues is impaired because of inadequate oxygen capacity of the blood. In polycythemic conditions impairment exists because of excessive viscosity. Thus, the ability of the circulatory system to deliver oxygen increases as the hematocrit ratio increases toward a certain value and declines when the hematocrit ratio goes beyond this value. This value is defined as the optimal hematocrit (Crowell, Ford et al. 1959; Dreizen 1962; Smith and Crowell 1963; Crowell and Smith 1967). We consider

that the optimal hematocrit is critical to achieve the highest level in sport performance, especially in those sport specialities in which blood doping is very effective.

In 1994, Verbrugge and Goodnough aimed to study the effect of rHuEpo- induced severe polycythemia on aerobic endurance performance. The animals were trained and treated with $600 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$ of Epo (3 days a week for 3 weeks). Results indicated that the Epo group had a significantly higher hematocrit (62.2% vs. placebo value of 47.3%), but did not have a different running time to exhaustion (75 min vs. placebo value of 73 min).

In 2009 another research group, using mice as an experimental model, aimed to determine the optimal hematocrit that facilitates the greatest O_2 flux during maximal exercise (Schuler, Arras et al. 2009). These authors elevated the mice hematocrit levels by administering novel erythropoiesis-stimulating protein (NESP). Highest maximal O_2 uptake and maximal time to exhaustion at submaximal exercise intensities were reached at hematocrit values of 58 % and 57% for NESP treated mice. However, because elevated blood viscosity associated with increasing hematocrit levels may limit cardiac performance, higher hematocrit levels were not associated with the highest attainable exercise capacity.

In a human study, Robertson *et al.* estimated that the optimal hematocrit, ranges somewhere between 43.3%

and 54.8% in males, (Robertson, Gilcher et al. 1982). Strangely, the limits of 50% prescribed by some sport organisations might have the effect that dopers even better hit the optimal hematocrit (Boning, Maassen et al. 2010).

In our study we found an increase in the hematocrit from 45.1 ± 1.4 to $49.0 \pm 2.8\%$ in the Epo treated group. However we did not find any effect of the treatment on the maximal aerobic velocity in our animals. We consider that one explanation to our results is the lack of achievement of the optimal hematocrit in our animals.

2. Study of the effect of intermittent normobaric hypoxia in combination with sprint interval training, on different hematological and skeletal muscle adaptations, in experimental animals

Most of the studies designed to test the effect of exercise training combined with hypoxia on performance have been developed following endurance training protocols (Abdelmalki, Fimbel et al. 1996; Levine and Stray-Gundersen 1997). We aimed to determine whether aerobic performance could be increased with a

combination of anaerobic training, at sea level, with normobaric hypoxia in an altitude house. Although it has been previously demonstrated in humans that the sprint performance can be improved after 10 days of living in normobaric hypoxia and training at sea level (Nummela and Rusko 2000), the hematological and/or skeletal muscle adaptations involved in the process have not been studied in detail.

The maximum treadmill velocity attained in a running test is considered a significant parameter for the evaluation of the maximal aerobic capacity (MAV) in animals (Davies, Packer et al. 1982). We determined the MAV of our animals before and after the training period (see Table VI.2.), and we found a significant improvement in performance in the trained animals that was not correlated with changes in the red gastrocnemius mitochondrial biogenesis markers i.e. PGC-1 α , cytochrome C and citrate synthase activity (See Figure VI.5).

Table VI.2. Maximal aerobic velocity before and after an intermittent normobaric hypoxic protocol combined with sprint interval training

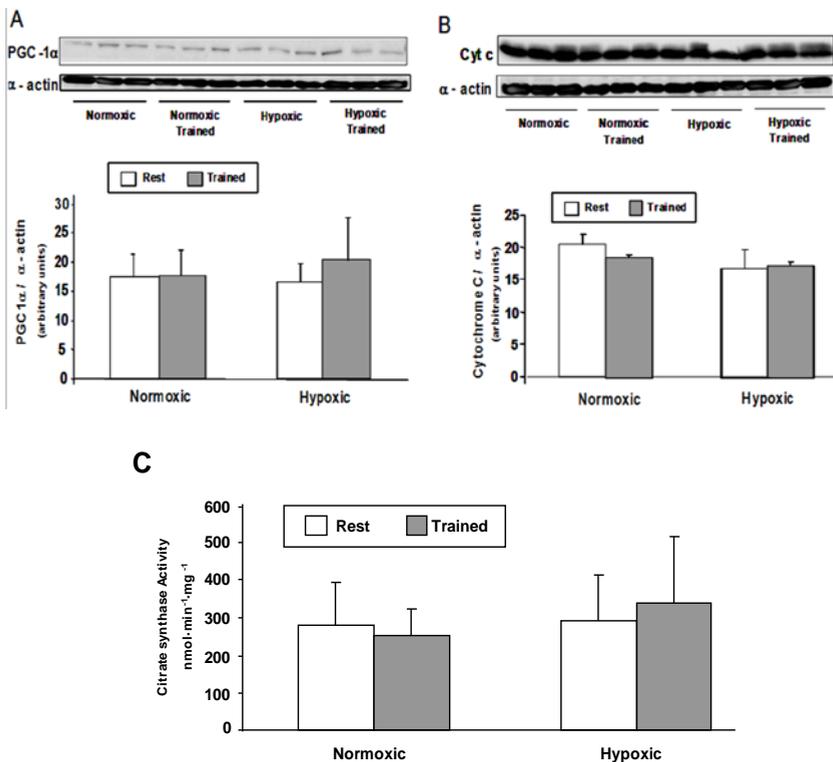
	Normoxic				Hypoxic			
	Rest		Trained		Rest		Trained	
	Basal	After 21 days	Basal	After 21 days	Basal	After 21 days	Basal	After 21 days
MAV (m·m in ⁻¹)	44.7 ± 4.0	49.1 ± 7.0	45.0 ± 3.1	64.8 ± 4.1 (*)	49.5 ± 6.4	56.3 ± 9.3	52.4 ± 5.2	66.8 ± 5.4 (*)

Values are means ± SD (n=6) (*) indicates $p < 0.05$ vs Basal.

As mentioned in the previous section of the Discussion, PGC-1 α is a powerful transcriptional coactivator that regulates metabolism in mammalian tissues (Lin, Handschin et al. 2005). We have previously shown that PGC-1 α can be induced in rat gastrocnemius muscle after three weeks of aerobic training (Gomez-Cabrera, Domenech et al. 2008) or after two consecutive bouts of exercise (Baar, Wende et al. 2002). Moreover PGC-1 α levels in C₂C₁₂ myotubes maintained in 0.2% oxygen are elevated, thus showing a positive effect of reduced oxygen availability in the expression of this protein (Arany, Foo et al. 2008). However, we did not find an additive effect of hypoxia combined or not with sprint interval training on red gastrocnemius muscle PGC-1 α protein levels. We also determined the protein levels of cytochrome C and the

enzyme activity of citrate synthase in our experimental groups. Again in this case we did not find any significant modification in the red portion of gastrocnemius muscles in these relevant markers of mitochondrial content (Reichmann, Hoppeler et al. 1985; Hood 2001) (See Figure VI.5).

Figure VI.5. Citrate synthase activity (C) and western blotting analysis of PGC-1 α (A) and cytochrome C (B) in the red gastrocnemius muscle in hypoxic and normoxic groups of rats trained for twenty-one days

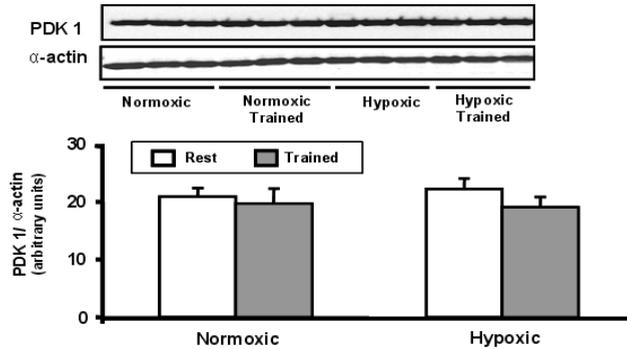


Values are expressed as the mean \pm SD ($n=6$).

Our results are in accordance with those reported by Lester Packer's group in 1982. They found higher VO_{2max} (relative to controls) in sprint-trained animals in the absence of an increase in their mitochondrial content in skeletal muscle (Davies, Packer et al. 1982).

Sprint training is a proper intervention to induce skeletal muscle adaptations in glycolytic enzymes (Takekura and Yoshioka 1990; MacDougall, Hicks et al. 1998). In muscle, the pyruvate dehydrogenase complex (PDC) is involved in the regulation of the glucose oxidation pathway. PDKs inhibit pyruvate dehydrogenase activity by phosphorylating its E1 subunit and it has been shown that this enzyme expression is sensitive to hypoxia (Sugden and Holness 2003). We hypothesized that living at high altitude could foster the effects of exercise on the function of PDK-1 in skeletal muscle. However our normobaric hypoxic protocol combined or not with sprint training, did not induce any transcriptional response in PDK-1 gene in skeletal muscle (See Figure VI.6). Contrary to our previous belief neither the mitochondrial biogenesis nor the glucose oxidation pathways studied were modified in our experimental model in skeletal muscle.

Figure VI.6. Western blotting analysis of PDK-1 in red gastrocnemius muscle in hypoxic and normoxic groups of rats trained for twenty-one days

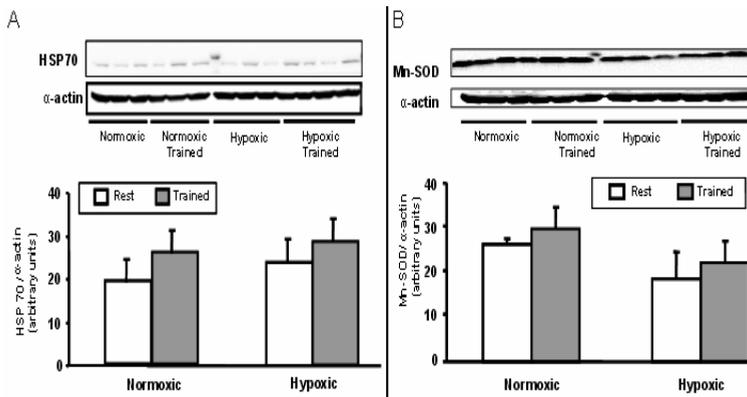


Values are expressed as the mean \pm SD ($n=6$).

Our research group has been involved for years in the study of the exercise-induced oxidative stress (Sastre, Asensi et al. 1992; Viña, Gomez-Cabrera et al. 2000; Gomez-Cabrera, Pallardo et al. 2003) and more specifically in the study of the induction of protective systems such as the antioxidant enzymes and the cytoprotective inducible stress proteins in skeletal muscle with exercise (Gomez-Cabrera, Borrás et al. 2005; Gomez-Cabrera, Domenech et al. 2008). Both exhaustive physical exercise and hypoxia have been related to oxidative stress (Radak, Asano et al. 1997; Noble, Ho et al. 2006). Regarding to antioxidant enzyme at high altitude Dutta et al., have shown that intermittent hypoxia (6100 m)

during 7 days increases the levels of thiobarbituric acid reactive substance and protein carbonyl content in gastrocnemius muscle of rats (Dutta, Ray et al. 2008) and Radak *et al.*, have shown that 6 months of intermittent exposure to high altitude (4000m) resulted in decreased activity and protein content of mitochondrial SOD in skeletal muscle of rats (Radak et al., 1994). This is why we determined the protein levels of Hsp70 and the antioxidant enzyme MnSOD in our model. Neither hypoxia nor sprint training affect the content of HSP70 and MnSOD in red gastrocnemius muscle (See Figure VI.7). Regarding to hypoxia exposure, we believe that the altitude achieved in our protocol was not enough to promote a disbalance to compromise the antioxidant defense system in gastrocnemius muscle. In accordance with us, Radak *et al.*, were not able to detect significant effect of 4 wk exposure to 4000m on the activities of antioxidant enzymes (Radak et al. 1997). Regarding the effect of training the exercise-induced increase in the proteins exhibits an intensity-dependent threshold that in skeletal muscle is related to their known recruitment patterns (Milne and Noble 2002). The maximal velocity during the anaerobic protocol attained by our rats was $58 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$. We consider that the intensity of the training protocol could explain these contradictory results (Ogura, Naito et al. 2006).

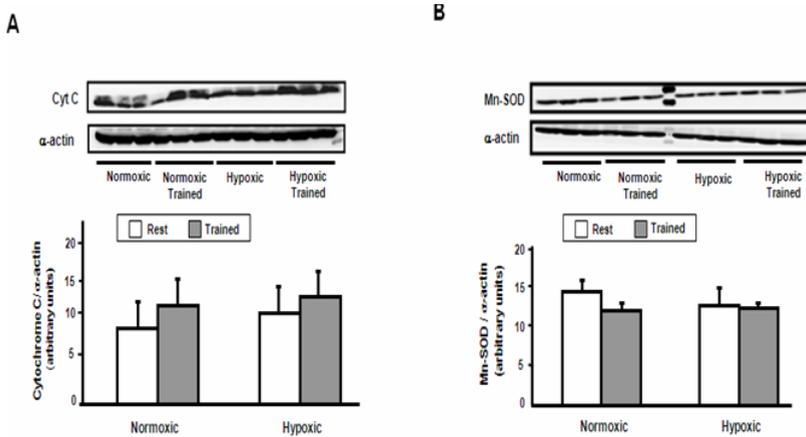
Figure VI.7. Western blotting analysis of Hsp70 (A) and MnSOD (B) in red gastrocnemius muscle in hypoxic and normoxic groups of rats trained for twenty-one days



Values are expressed as the mean \pm SD ($n=6$).

Taking into account that sprint training produces the greatest relative increase in contractile activity in fast-twitch, white, skeletal muscle (Laughlin, Simpson et al. 1990) we determined the protein levels of cytochrome C and MnSOD, in the white portion of gastrocnemius muscle in all the experimental groups. We did not find any significant changes as a result of training, hypoxia or its combination (See Figure VI.8).

Figure VI.8. Western blotting analysis of cytochrome C (A) and MnSOD (B) in white gastrocnemius muscle in hypoxic and normoxic groups of rats trained for 21 days



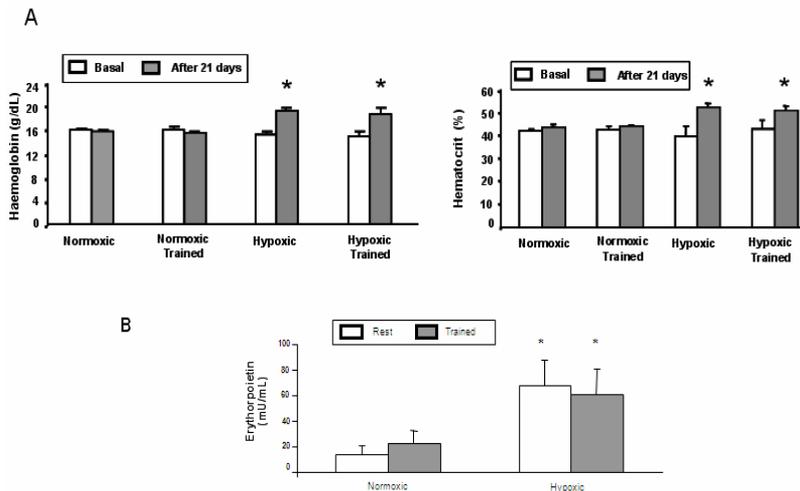
Values are expressed as the mean \pm SD (n=6)

Our results confirm the data previously published by other research groups. Hilty et al. found a significant increase in the VO_{2max} in rats after an sprint training protocol that was not accompanied by any increase in markers of mitochondrial content measured in the white gastrocnemius (Hilty, Groth et al. 1989). Similar results have been reported with models of hypoxia i.e. no increase in the mitochondrial content of the fast-twitch muscles as a result of acute or chronic hypoxic protocols (Pastoris, Foppa et al. 1995; Kennedy, Stanley et al. 2001).

The series of negative results led us to study different hematological adaptations in our animals (Saltin and Calbet 2006). We tested whether after increasing hematological values promoted by hypoxia; our animals would achieve additional effects on MAV. In the hypoxic groups we found a very significant increase in the hemoglobin, hematocrit and Epo plasma levels (See Figure VI.9). However MVA improved to the same extent in the normoxic and hypoxic trained groups (See Table VI.2). Although some sea level studies have shown that an artificial increase in hematocrit improves aerobic performance and VO_{2max} (Buick, Gledhill et al. 1980; Thomson, Stone et al. 1982) our results agree with previous findings from other laboratories. Using simulated altitude, and in spite of increasing hemoglobin/hematocrit concentration after a “living high-training low” paradigm, no effect has been reported in maximal aerobic capacity by different research groups (Basset, Joanisse et al. 2006; Robach, Schmitt et al. 2006). Reboul and collaborators (Reboul, Tanguy et al. 2005), using a different experimental design, and in spite of a marked increase in total hemoglobin with altitude training, showed that the improvements on MAV were similar to those found in normoxic animals trained for five weeks. Such a result has been classically reported in different studies performed in humans and animals using the same

experimental design (Henderson, Clancy et al. 2001; Galbes, Goret et al. 2008). Part of these results could be explained by the fact that the animals that live and train in hypoxia perform their exercise training at a lower absolute intensity than normoxic trained animals. However, this explanation is not suitable in our experimental model in which all the animals (hypoxic and normoxic) were trained at sea level at the same exercise intensity. We consider that, as in the previous study, one explanation to our results is the lack of achievement of the optimal hematocrit in our experimental design.

Figure VI.9. Effect of living at high altitude in combination with sea level sprint training on hematological adaptations



Values are expressed as the mean \pm SD ($n=6$). (*) indicates $p < 0.05$ vs Normoxic.

Our “living high-sprint training low” strategy was very effective in the induction of hematological adaptations but did not improved performance in rats. Moreover no changes were found in the skeletal muscle in PGC-1 α , cytochrome C, PDK-1, Hsp70, MnSOD protein content and in the citrate synthase activity in any experimental group.

Taken together, these results lead us to conclude that the improvement of the maximal aerobic capacity is a multifactorial phenomenon that neither depends exclusively on skeletal muscle adaptations (Davies, Packer et al. 1982), nor on hematological changes (Gore, Hahn et al. 1998).

3. Study of hematological modifications induced by two treatments with rHuEpo and comparison of both outcomes with a intermittent hypoxic protocol

The use of normobaric hypoxic chambers to improve athletes' performance has become controversial (Levine and Stray-Gundersen 1997; Wilber 2007; Wilber, Stray-Gundersen et al. 2007). Nowadays, there is an active debate around the moral implications of the use of hypoxic devices in sports, and a great controversy exists about

whether these systems should be considered as a doping methods or ergogenic aids (Levine 2006; Malloy, Kell et al. 2007; Sanchis-Gomar, Martinez-Bello et al. 2009; Boning 2010; Ferretti 2010; Hinghofer-Szalkay 2010; Lippi and Franchini 2010; Lippi, Franchini et al. 2010; Sanchis-Gomar, Martinez-Bello et al. 2010).

The hypoxic exposure has been related with an increment in erythropoietin concentration with the concomitant formation of new red blood cells (Abbrecht and Littell 1972). This effect is mainly mediated by the frequency and the quantity of the hypoxic dose as it has been reported in animals and humans (Mylrea and Abbrecht 1970; Abellan, Ventura et al. 2007).

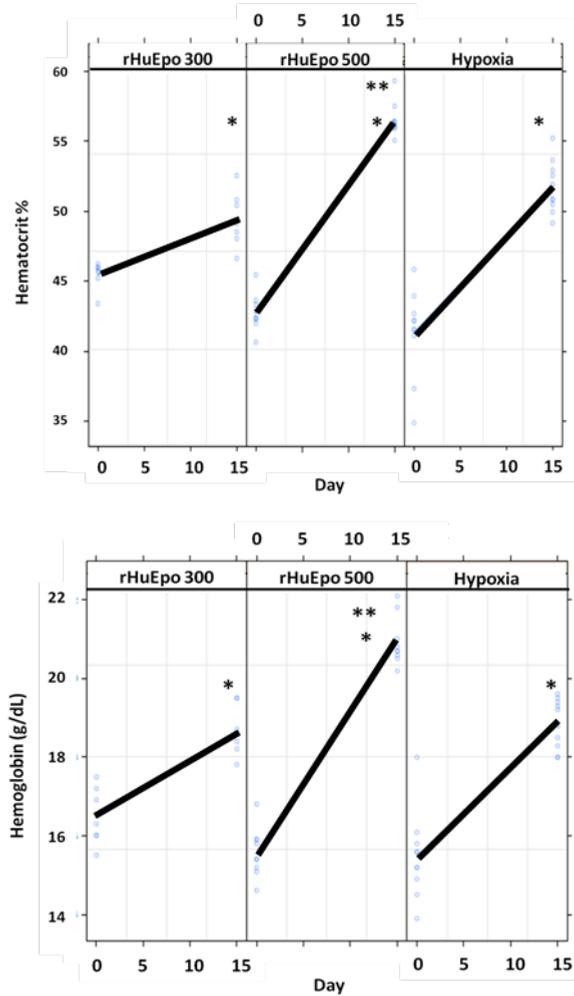
It has been shown that an increase in serum Epo around 62 to 770% can induce a similar increment in hematological parameters as those reported with simulated altitudes around 2500-8500 m (Savourey, Garcia et al. 1994; Savourey, Garcia et al. 1996; Stray-Gundersen, Chapman et al. 2001; Heinicke, Prommer et al. 2003; Savourey, Launay et al. 2004).

Several researchers have shown that the most effective strategy to increase erythropoiesis and performance in athletes by using the “Living High-Training Low” technique, requires altitudes around 2500m (22 hours a day at least for 28 days) (Wilber, Stray-Gundersen et al. 2007).

On the other hand, several studies (including those reported in this Doctoral Thesis) have shown, in both human and murine models, that treatment with rHuEpo is also a very effective strategy to increase the hematocrit (Verbrugge and Goodnough 1994; Lundby, Thomsen et al. 2007). Despite the similar hematological modifications achieved with these two strategies (Epo treatment and hypoxia), comparative studies among them are very limited. Thus the major aim of our study was to compare the hematologic modifications of two different rHuEpo treatments (300 IU/animal or 500 IU/animal) with a normobaric intermittent hypoxic protocol.

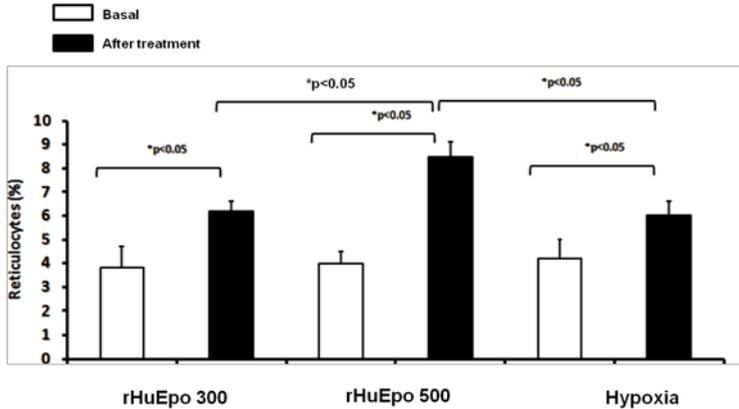
Our results show that the hemoglobin and hematocrit concentration were significantly increased in the rHuEpo (300 IU and 500 IU) and in the hypoxic groups (See Figure VI.10) after the treatments. However, as expected, these parameters were significantly higher in the group treated with the higher dose of Epo (500 IU) when compared with the other groups. Regarding the percentage of reticulocytes, the three experimental groups shown a significant increase in this parameter at the end of the experimental period (Figure VI.11). However, again the rHuEpo 500 group showed significant higher values when compared with the rHuEpo 300 and the hypoxic group.

Figure VI.10. Hemoglobin and hematocrit concentration in hypoxic and rHuEpo treated groups



Linear mixed model analysis of 8 samples per group. T student correction. (*) $p < 0.05$ Day 15 vs Day 0. (**) $p < 0.05$ rHuEpo 500 vs rHuEpo 300 and Hypoxia.

Figure VI.11. Percentage of reticulocytes in hypoxic and rHuEpo treated groups



Values are expressed as mean \pm SD ($n=8$). Linear mixed model analysis. *T* student correction. (*) $p<0.05$ Day 15 vs Day 0. (**) $p<0.05$ rHuEpo 500 vs rHuEpo 300.

Woo *et al.* reported, in two different studies, that rats treated with incremental doses of rHuEpo (10, 100, 450, 1350 y 4050 IU \cdot kg $^{-1}$) shown an increase in the hemoglobin concentration and percentage of reticulocytes in a dose dependent manner (Woo, Krzyzanski *et al.* 2006; Woo, Krzyzanski *et al.* 2007). In the same line, Abbrechth *et al.*, demonstrated that mice submitted to different pO_2 increased their hematological levels in an oxygen concentration dependent manner (Mylrea and Abbrechth 1970). Carraway *et al.*, found that mice submitted to hypoxia (5486m) during 14 days increased their hemoglobin concentration from 14.3 ± 0.2 to 19.7 ± 0.3

(g/dL) while mice treated with a dose of rHuEpo (4000 IU·kg⁻¹) during three consecutive days just increased their hemoglobin concentration from 14.3±0.2 to 17.0±1.4 (g/dL) (Carraway, Suliman et al., 2010).

In our model we also found that the hematological modifications were dependent on the dose of Epo and that the hypoxic protocol was as effective as the lower dose of Epo (300 IU/animal) to induce a significant increase in the hematological variables.

Blood manipulations are prohibited by WADA, whereas hypoxic protocols are allowed (Sanchis-Gomar, Martinez-Bello et al. 2009). Some researchers consider that hypoxia should be included in the WADA prohibited list of substances. They consider that the hypoxic methods wound the spirit of the sport and fair play. Moreover the risks that these methods entail are a subject of controversy in sport.

The major conclusion that can be drawn from our study is that an intermittent normobaric hypoxic protocol as the treatment with rHuEpo can similarly modify the hematological parameters tested by antidoping authorities.

4. Effect of intermittent hypoxia on hematological parameters after rHuEpo administration in an animal model

As stated in the previous sections, the use of normobaric hypoxic chambers to improve athletes' performance has become controversial in the sport field (Levine and Stray-Gundersen 1997; Wilber 2007; Wilber, Stray-Gundersen et al. 2007). A great debate exists about whether these systems can be considered as a doping method or simply an ergogenic aid (Levine 2006). These chambers have been used in part as a method to increase endogenous production of Epo with the intent to improve exercise performance (Nummela and Rusko 2000; Bonetti, Hopkins et al. 2006; Levine 2006; Neya, Enoki et al. 2007). However, to our knowledge, no previous studies have investigated the effect of a potent intermittent hypoxic protocol on relevant hematological parameters (hemoglobin, hematocrit, reticulocytes and the erythropoietic stimulation index) after the administration of rHuEpo for two weeks in a group of animals. Although these hematological parameters are of secondary nature some international sport federations currently exclude athletes who show aberrant values of these parameters from competition. For instance, the anti-doping UCI rules

in the section that refers to blood tests (13.1.062/13.1.063) clearly state that riders shall submit to blood tests organised by the UCI to determine their following blood levels: hematocrit, hemoglobin, reticulocytes and free plasma hemoglobin. If the blood analysis shows an atypical blood value, the rider shall be deemed unfit for competition cycling and may not participate in cycling races. Atypical blood values under these regulations are (for men): hematocrit above 50% (with hemoglobin above 17 g/dl) and stimulation index (OFF-Hr Score) above 133 (those indexes between 125 and 133 justify a follow-up of the rider). Regarding the percentage of reticulocytes those values lower than 0.2% (those above 2.4% justify a follow-up of the rider) are also considered atypical.

The development of blood tests to identify athletes using the previously undetectable drug rHuEpo has been one of the major aims in anti-doping research. Since 2000 a series of papers have been published showing the accuracy of a novel method for the indirect detection of rHuEpo abuse (Parisotto, Gore et al. 2000; Parisotto, Wu et al. 2001; Gore, Parisotto et al. 2003; Sharpe, Ashenden et al. 2006). Based on this method the current use (ON-models) and the recent use of rHuEpo (OFF-models) can be detected using multivariate statistical models (Parisotto, Gore et al. 2000). This model seems to be highly discriminatory and has shown very promising

results. If athletes suspend the rHuEpo treatment 2-3 weeks before competition, the OFF-model can detect approximately two-thirds of them (Parisotto, Gore et al. 2000). Several studies have shown that athletes who stop taking rHuEpo more than four weeks prior to competition lose all competitive advantage which implies that athletes must continue to use Epo in the weeks immediately before competition (Parisotto, Wu et al. 2001; Sharpe, Hopkins et al. 2002). The OFF-model relies on elevated hemoglobin at the same time as depressed reticulocytes which occurs when athletes cease injecting rHuEpo (Souillard, Audran et al. 1996; Parisotto, Gore et al. 2000; Gore, Parisotto et al. 2003). In the rat model, and in basal conditions, all the reticulocyte values are out of range ($3.9\% \pm 0.35$) when we compare them with humans. Although hemoglobin values are in the same range in humans and rats, the fact that reticulocytes are out of range gives values of OFF-Hr Score in rats that are not comparable with humans. Despite this experimental limitation we have found a significant difference between the hypoxic and normoxic animals in the last extractions. The OFF-Hr Score, twenty-one and twenty-three days after the last rHuEpo injection, was significantly lower in the hypoxic group when compared to the normoxic group (See Table VI.3).

Table VI.3. Effect of intermittent hypoxia and normoxia on the OFF-Hr Score

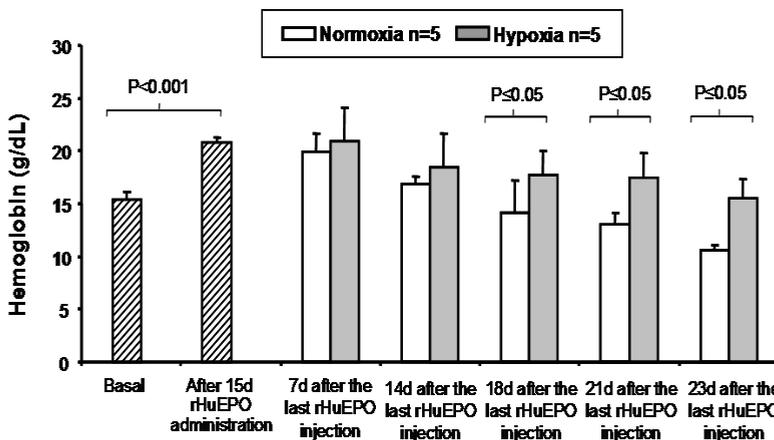
	(OFF- Hr Score)	
	Basal	37.2± 10
15 days after rHuEpo injection	154.4± 26 (**)	
	Normoxia	Hypoxia
7 days after the last rHuEpo injection	134.4± 8	141.2± 1
14 days after the last rHuEpo injection	117.2±20	131.4± 23
18 days after the last rHuEpo injection	95.2±1	96.1± 5
21 days after the last rHuEpo injection	91.4± 4	77.2± 1 (*)
23 days after the last rHuEpo injection	74.2± 4	53.3±10 (*)

*Values are shown as the median and the difference between third quartile and first quartile (interquartile range Q3-Q1). Hypoxia, N=5; Normoxia, N=5. (**)* $P < 0.01$ vs Basal. (*) $p < 0.05$ vs Normoxia

Apart from the determination of the OFF-Hr Score we also wanted to determine whether, after administration of rHuEpo, an intermittent hypoxic protocol could induce a significant change in three relevant blood parameters also tested by the antidoping authorities: hemoglobin, hematocrit and reticulocytes when compare with normoxic group. We found that treatment with Epo induced a very significant increase in hemoglobin, hematocrit and

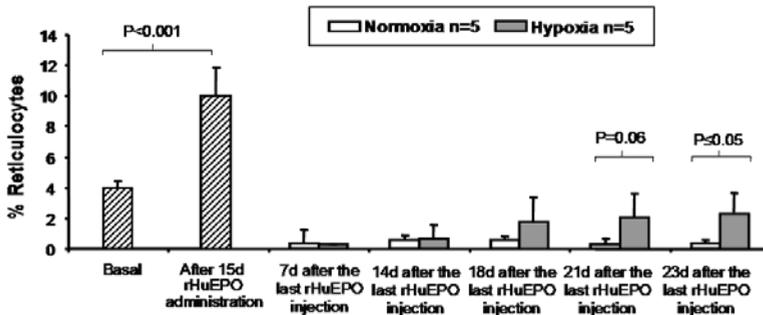
reticulocytes in our animals. Following the treatment the normoxic animals showed a time-dependent gradual decrease in hemoglobin, hematocrit and reticulocytes, while the animals that followed the hypoxic protocol only showed a mild decrease in these parameters (See Figures VI.12, VI.13 and VI.14).

Figure VI.12. Hemoglobin concentration in hypoxic and normoxic groups of rats previously treated with rHuEpo during a period of two weeks



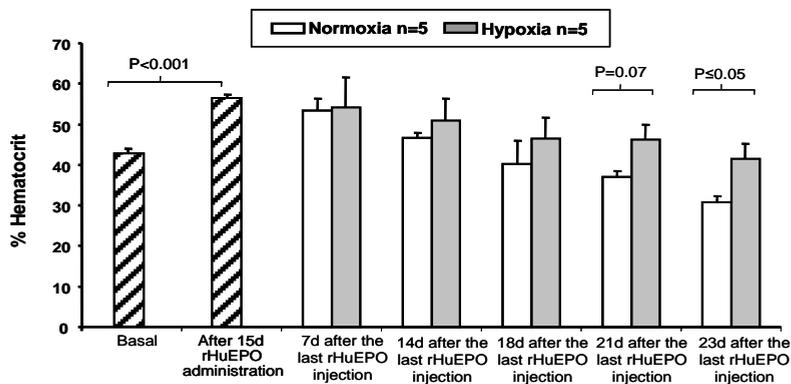
Values are shown as the median and the difference between third quartile and first quartile (interquartile range Q3-Q1). Hypoxia, N=5; Normoxia, N=5.

Figure VI.13. Percentage of reticulocytes in a hypoxic and a normoxic groups of rats previously treated with rHuEpo during a two weeks period



Values are shown as the median and the difference between third quartile and first quartile (interquartile range Q3-Q1). Hypoxia, N=5; Normoxia, N= 5.

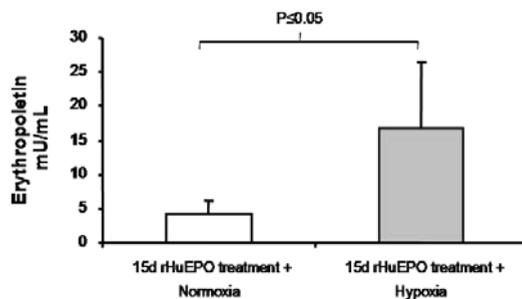
Figure VI.14. Hematocrit concentration in hypoxic and normoxic groups of rats previously treated with rHuEpo during a period of two weeks



Values are shown as the median and the difference between third quartile and first quartile (interquartile range Q3-Q1).Hypoxia, N=5; Normoxia, N=5.

Therefore an intermittent hypoxic protocol after rHuEpo administration can modify relevant hematological parameters including the OFF-Hr Score. Our results confirm the physiological response previously reported by other experimental groups i.e. a sharp decrease in the reticulocyte count accompanied with elevated hemoglobin/hematocrit concentrations when we ceased administering rHuEpo to our animals. The novelty of our contribution is that these hematological changes can be significantly modified after the application of a potent intermittent hypoxic protocol. The significant increase in the synthesis of endogenous Epo in the animals undergoing hypoxia could explain these modifications (See Figure VI.15).

Figure VI.15. Erythropoietin levels (mU/mL) in hypoxic and normoxic groups of rats previously treated with rHuEpo during a two weeks period



Values are shown as the median and the difference between third quartile and first quartile (interquartile range Q3-Q1). N=5; Normoxia, N=5.

It has been recently shown that rHuEpo increases hemoglobin concentration not only by promoting erythropoiesis, but also by reducing plasma volume (Lundby, Thomsen et al. 2007). The latter may account for ~40% of the elevation observed in the hematocrit. Thus, part of the reduction in hemoglobin after cessation of Epo treatment may just represent the recovery of the normal plasma volume in the normoxic group. An open question to be elucidated in future studies is how intermittent hypoxia influences plasma volume after rHuEpo cessation. A major conclusion that can be drawn from our experiment is that intermittent hypoxic treatments after rHuEpo administration can significantly modify the main hematological parameters tested by the anti-doping authorities making the misuse of Epo more difficult to detect using the indirect methods.

Our results in an animal model suggest checking the described phenomena in humans in order to reach major conclusions.

5. Desmopressin, hemodilution and blood doping in sports. Study in humans

Optimum performance in aerobic sports requires an efficient absorption, transport, delivery and consumption of oxygen by the exercising muscle (Wagner 1996). Maximal oxygen uptake in the athlete is multifactorial (Astrand and Rodahl 1970). Raising the blood content by rising the hemoglobin/hematocrit is an easy method to increase oxygen delivery and improve sport performance (Ekblom, Wilson et al. 1976; Brien and Simon 1987). The sporting authorities allow all methods that affect the intake of gas into the body, but restrict those that directly add liquids. Consequently legal methods of raising hematocrit include altitude training and hypoxic chambers and illegal methods include blood doping (infusion of packed red blood cells autologous, homologous or heterologous) and administration of Epo (Cooper and Beneke 2008). Moreover several other compounds are on the WADA banned list: blood substitutes (perfluorocarbons and hemoglobin-based oxygen carriers) and compounds that affect the hemoglobin dissociation curve such as RSR13 (right-shifting reagent 13 or efaproxiral) (WADA 2011). Blood doping came to prominence in the 1970s and 1980s with Finnish and Italian distance runners and the 1984

U.S. Olympic cycling team admitting to its use (Cooper and Beneke 2008). The use of Epo came to prominence in the 1998 Tour of France although it is likely to have been taken much earlier. Taken into account the wide list of agents and techniques in the blood doping practices it is necessary to have a wide range of tests to detect it. The major physiological effect of blood doping and Epo treatment is an increase in hematocrit/hemoglobin values. Therefore the simplest test is to analyze in the athletes these values prior to an event and refuse to allow entry when these values, and others, go beyond a limit. The atypical blood values under these regulations have been enlisted in the previous section. One problem with this kind of tests is that is very easy “to do it yourself”. Therefore it allows the athletes to adjust the values just below the threshold and still gain much of the benefits of blood doping or Epo (Cooper and Beneke 2008). Plasma volume Expanders (PVEs) such as albumin, dextran or hydroxyethyl starch are considered masking agents (Gutierrez Gallego and Segura 2004; Guddat, Thevis et al. 2005). Athletes, often through their medical consultants, have rapidly learned that these substances can be used to prevent dehydration and thus enhance performance. In addition, the combined use of PVEs and recombinant erythropoietin can be advantageous, as an elevated blood volume is achieved while hematocrit and hemoglobin

concentration may remain within the legal range. It has been demonstrated that members of the Finnish ski team used the plasma volume expander hydroxyethyl starch prior to the world Nordic ski championship in 2001 (Cooper and Beneke 2008). PVEs are banned because raising plasma volume can potentially be a performance enhancing (preventing dehydration) (Guddat, Thevis et al. 2008) and its use can mask a rise in haematological values caused by illegal methods.

Desmopressin, 1 – desamino – 8 - D -arginine-vasopressin (DDAVP) is a synthetic analogue of vasopressin with increased antidiuretic activity and decreased pressor activity (Robinson 1976) . It works by limiting the amount of water that is eliminated in urine and binds to V2 receptors in renal collecting ducts, increasing water resorption. Moreover, it is degraded more slowly than recombinant vasopressin and requires less frequent administration (Owen, Iggo et al. 1954). After administration of DDAVP and water we found a significant and fast decrease in the hematocrit and hemoglobin concentration (See Table VI.4). The hematocrit values decreased after desmopressin administration from a basal value of 45.8 % to 42.0 % ($p < 0.05$), while the hemoglobin values decreased from a basal value of 15.2 g/dL to 13.8 g/dL ($p < 0.05$). In a recent paper it was demonstrated that

intravenous infusion of a plasma volume expander (Gelofusine), in recreationally active men, resulted in a significant reduction in hemoglobin values (16.0 g/dL preinfusion vs 14.7 g/dL postinfusion; $p < 0.001$) and hematocrit concentration (44.0 % preinfusion vs 41.0 % postinfusion; $p < 0.01$) (Berger, Campbell et al. 2006). We consider that our results support the idea that treatment with DDAVP is similar to the administration of PVEs. Although we did not find a significant decrease in the reticulocyte levels, treatment with DDAVP and water resulted in a significant decrease of the OFF-Hr Score. As previously mentioned, the OFF-model relies on elevated hemoglobin (hematocrit) rates at the same time as decreased reticulocyte counts which occurs when athletes cease injecting Epo (Souillard, Audran et al. 1996; Parisotto, Gore et al. 2000; Gore, Parisotto et al. 2003). Since 2000 it has been demonstrated the accuracy of this method for the indirect detection of Epo abuse (Parisotto, Gore et al. 2000; Parisotto, Wu et al. 2001; Gore, Parisotto et al. 2003; Sharpe, Ashenden et al. 2006). This is the reason why the OFF-Hr Score has been adopted by the anti-doping agencies (Gore, Parisotto et al. 2003). For instance, the International Cycling Union has already recognized the merit of the OFF-Hr model and currently excludes athletes from competition who show aberrant OFF-Hr score values (Sharpe, Ashenden et al.

2006). Our data demonstrate that DDAVP administration may mask the use of illegal methods to improve performance in aerobic sports, including blood doping and administration of Epo (See Table VI.4).

Table VI.4. Hemoglobin, hematocrit, reticulocyte and values of the OFF-Hr Score in Water and Water + DDAVP groups

<i>Time</i>	<i>Water + DDAVP (n=5)</i>	<i>Water (n=5)</i>	<i>Mean difference</i>
Hemoglobin (g/dL)			
<i>Basal</i>	15.2 (0.5)	15.6 (0.5)	-0.4 (0.3 , 1.6)
<i>After Treatment</i>	13.8 (0.5) **	15.5 (0.6)	-1.8 (-11.8 , 13.8) *
Hematocrit (%)			
<i>Basal</i>	45.8 (1.5)	46.8 (1.8)	-1.0 (-3.0 , 1.0)
<i>After Treatment</i>	42.0 (1.3) **	46.4 (1.9)	-4.4 (-38.2 , 40.2) *
Reticulocytes (%)			
<i>Basal</i>	0.8 (0.2)	0.8 (0.2)	0.0 (0.7 , 1.2)
<i>After Treatment</i>	0.6 (0.2)	0.7 (0.2)	-0.1 (0.3 , 1.7)
OFF-Hr Score			
<i>Basal</i>	100.8 (0.7)	100.4 (5.2)	-3.2 (-6.8 , 8.8)
<i>After Treatment</i>	90.9 (5.9)**	104.1 (4.2)	-13.2 (- 84.8 , 86.8) *

Values are expressed as the mean ± SD and mean differences (95 % CI). Mann-Whitney U test. () p < 0.05 between Water + DDAVP vs. Water groups. (**) p < 0.05) between Basal and After the Treatment.*

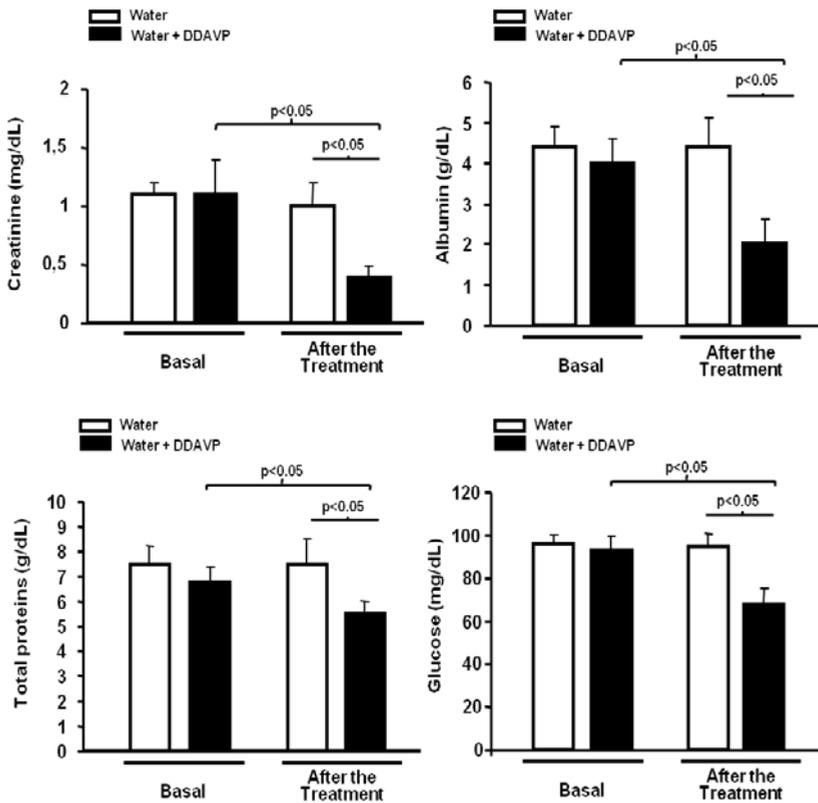
Apart from the haematological parameters we also wanted to assess the changes on the concentration of different plasma parameters after administration of DDAVP in our subjects in order to determine its misuse with an easy method. Treatment with DDAVP and water caused a sharp decrease in creatinine, albumin, total proteins and glucose plasma concentration, all of them being below the physiological levels (See Figure VI.16). We conclude that treatment with 0.3 mg of DDAVP with 1.5 liters of water significantly decreases the main haematological values measured by the anti-doping authorities to detect blood doping. None of the parameters analyzed in this study were significantly modified after administration to the subjects of 1.5 liters of mineral water.

This drug, when we published our study in 2009, was not included in the prohibited list and it was recommended by WADA as an antidiarrheal (WADA 2008). However, and taking into account our results, in the new prohibited list of substances (2011), the WADA has decided to include desmopressin as a masking agent in the section 5 called "Diuretics and other masking agents".

Finally we consider that the anti-doping authorities should also assess the possibility of performing to the athletes a more strict blood analysis that include plasma creatinine, albumin, total protein and glucose concentration (apart

from hematocrit, hemoglobin and reticulocytes) to prevent artificial blood hemodilution.

Figure VI.16. Plasma creatinine, albumin, proteins and glucose concentration over time in Water and Water + DDAVP groups



Values are expressed as the mean \pm SD. Wilcoxon Test.

6. Role of reactive oxygen species and PGC-1 α in the contraction induced expression of MnSOD in primary mouse skeletal muscle cell

In the second study of this Doctoral Thesis we aimed to determine the effect of intermittent normobaric hypoxia in combination with sprint interval training in the expression of PGC-1 α and MnSOD. Our results led us to develop a new series of experiments (*in vitro*) in which we aimed to determine the role of reactive oxygen species (ROS) and PGC-1 α in the contraction induced expression of MnSOD in primary mouse skeletal muscle cells from Wild Type and Knock out for PGC-1 α mice.

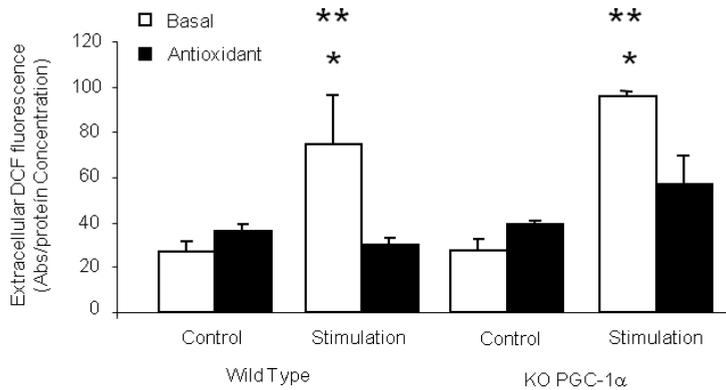
The main findings of the present study were that antioxidant treatment of electrostimulated mouse muscle cells, abolished the contraction induced increase in PGC-1 α mRNA demonstrating that the contraction induced up-regulation of PGC-1 α mRNA is regulated by ROS. MnSOD protein levels were not significantly up-regulated by either electrostimulation or antioxidants alone, but up-regulation was evident when electrostimulation was combined with antioxidant treatment. The up-regulation of MnSOD occurred in both WT and PGC-1 α KO cells. These data suggest that ROS formed during contraction up-regulates PGC-1 α mRNA levels but inhibits the MnSOD protein

expression in primary mouse skeletal muscle cells. Combined, the data of the present study clearly suggests that contraction induced up-regulation of MnSOD can occur independently of PGC-1 α and also shows a dissociation between the contraction induced regulation of PGC-1 α and MnSOD where ROS affect their expression in an opposing manner.

Muscle contraction leads to an enhanced formation of ROS (Silveira, Pereira-Da-Silva et al. 2003; Silveira, Pilegaard et al. 2006; Hellsten, Nielsen et al. 2007) and although large quantities of ROS may be damaging to the tissue. We have previously demonstrated that lower levels may be important for cellular signalling as evidenced by ROS mediated up-regulation of the expression of a number of genes (Gomez-Cabrera, Borrás et al. 2005; Irrcher, Ljubcic et al. 2009). As a prerequisite for the study of the role of ROS in contraction induced PGC-1 α and MnSOD up-regulation, we examined the formation of ROS in cells from WT and PGC-1 α KO mice during basal condition and in response to electrostimulation. Our findings that WT and PGC-1 α KO muscle cells had similar basal levels of ROS and the effect of electro-stimulation are in accordance with the study of Adhietty and co-workers (Adhietty, Ugucioni et al. 2009) in which ROS production was not affected by the lack of PGC-1 α in mouse skeletal muscle cells. However, these

findings contrast other observations. St-Pierre et al. found that the formation of ROS in fibroblasts from PGC-1 α KO mice was greater than in fibroblasts from WT mice mouse (St-Pierre, Drori et al. 2006). In our study, two hours of electrical stimulation resulted in a 166% and 230% increase ($p < 0.05$) in extracellular DCF fluorescence compared with control in both WT and PGC-1 α KO. The addition of antioxidants (GSH, CAT, GPX and SOD) completely abolished the extracellular DCFH oxidation both in WT and in PGC-1 α KO mice. These results demonstrate that the DCFH oxidation was specifically induced by ROS (See Figure VI. 17).

Figure VI.17. DCF fluorescence in primary mouse skeletal muscle cells obtained from skeletal muscle of wild type (WT) and PGC-1 α knockout (KO) mice

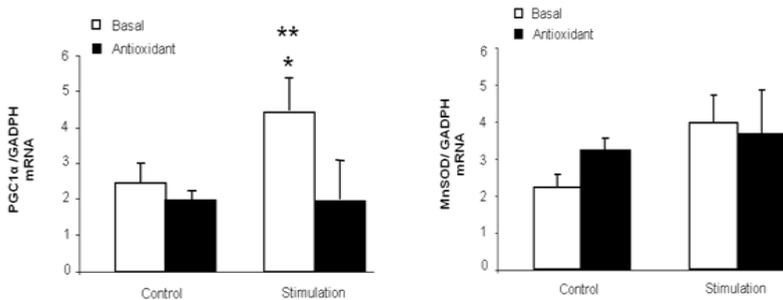


Values are expressed as the mean \pm SD. (*) indicates $p < 0.05$ vs control with the same genotype. (**) indicates $p < 0.05$ vs Antioxidant + Stimulation with the same genotype.

The second step in our study was to establish whether the expression of PGC-1 α was enhanced by an acute electrostimulation protocol and whether this effect was mediated by ROS. Two hours of electrical stimulation enhanced the PGC-1 α mRNA level by about 70% and the response was abolished by treatment with antioxidants. These results suggest that the contraction induced increase in PGC-1 α was dependent on ROS formation (Figure VI. 18). We also found that the level of MnSOD mRNA remained unaffected by acute electrostimulation and by addition of antioxidants (See Figure VI. 18). These results

suggest that electrical stimulation or antioxidants do not regulate MnSOD mRNA. Several research groups, including our own, have demonstrated that administration of antioxidants significantly reduce the exercise-induced expression of MnSOD (and other antioxidant enzymes) in skeletal muscle using *in vivo* models (Khassaf, McArdle et al. 2003; Gomez-Cabrera, Borrás et al. 2005; Ristow, Zarse et al. 2009). However our results using primary mouse skeletal muscle cells, contradicts these previous findings. From these data it cannot, however, be excluded that PGC-1 α regulates MnSOD as it is unlikely that the increase in PGC-1 α mRNA with one single bout of electrical stimulation was associated with an increase in PGC-1 α protein.

Figure VI.18. PGC-1 α and MnSOD mRNA content in primary mouse skeletal muscle cells obtained from wild type (WT)

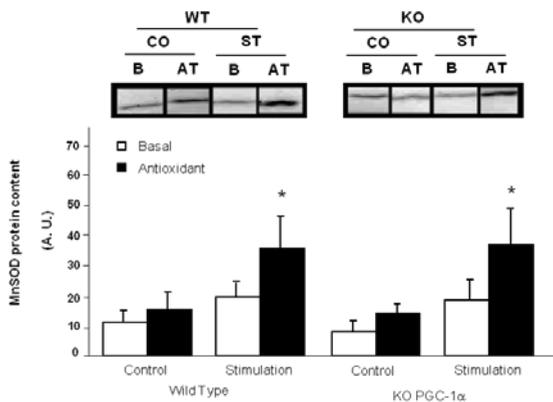


Values are expressed as the mean \pm SD. (*) indicates $p < 0.05$ vs Control. (**) indicates $p < 0.05$ vs Antioxidant + Stimulation.

To determine the involvement of ROS and PGC-1 α in the regulation of MnSOD expression, an experiment involving skeletal muscle cells from WT and PGC-1 α KO animals were conducted. Cells were subjected to two hours bouts of electrical stimulation per day for four consecutive days. The cells were harvested on the fifth day. The observation of a trend ($P < 0.1$) for an increase in MnSOD protein with electrical stimulation in both genotypes (See Figure VI. 19) is somewhat in contrast to previous findings in mouse skeletal muscles, where training prevented age-associated decline in MnSOD protein content in WT mice but not in PGC-1 α KO mice (Leick, Lyngby et al. 2010). The reason for lack of significant effect of repeated electrical stimulation is unclear but may reflect the limited time period of four days. Nevertheless, when cells were simultaneously treated with antioxidants during the electrostimulation period there was a marked increase in the MnSOD protein levels in both WT and PGC-1 α KO cells. This observation suggests that ROS formed during contraction of muscle cells inhibit the up-regulation of MnSOD and that when ROS are removed by antioxidants, contraction induces a clear increase in MnSOD. This also indicates that ROS have opposing effects on PGC-1 α mRNA and MnSOD protein and therefore strongly indicates that PGC-1 α is not a main mediator of contraction-induced MnSOD expression. A

positive effect of antioxidant treatment on contraction induced enhancements in mRNA levels have been observed in human skeletal muscle where a week of prior antioxidant treatment enhanced the exercise induced mRNA expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) (Hellsten, Nielsen et al. 2007). However, the reason for a negative effect of ROS on proteins involved in antioxidant defence such as MnSOD and UCP-3 is unclear and somehow seems contradictory as it would be expected that an increased formation of oxygen radicals would lead to an enhanced antioxidant defence in the cells.

Figure VI.19. The effect of repeated electrostimulation during four days on MnSOD protein content in skeletal muscle cells isolated from WT and PGC-1 α KO mice



Values are expressed as the mean \pm SD. (*) indicates $p < 0.05$ vs all groups in the same genotype.

In conclusion, whereas ROS were found to be responsible for the contraction induced increase in PGC-1 α mRNA in primary mouse skeletal muscle cells, ROS had a negative effect on the increase in MnSOD protein with repeated bouts of contractions. The contraction induced increase in MnSOD protein was similar in WT and PGC-1 α KO cells. Combined, these data provide evidence for that PGC-1 α is not essential for the contraction induced expression of MnSOD in primary mouse skeletal muscle cell culture. Our data suggest that the mode of action by which antioxidants exert their effect is different when they are added to cells in culture than when received systematically *in vivo*.

VII. CONCLUSIONES

VII.CONCLUSIONES

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

1. La administración de rHuEpo durante dos semanas, aunque aumenta diversas variables hematológicas, no ejerce efecto alguno en la biogénesis mitocondrial, la miogénesis o la angiogénesis en el músculo esquelético de rata. El aumento de la capacidad de transporte de oxígeno no modifica la capacidad máxima aeróbica en una prueba incremental en tapiz rodante.
2. La hipoxia intermitente normobárica, en combinación con entrenamiento anaeróbico (estrategia “living high-sprint training low”), es efectiva en la inducción de adaptaciones hematológicas pero no en la mejora del rendimiento físico, cuando se compara con el entrenamiento sobre el nivel del mar (estrategia “living low-sprint training low”). La hipoxia, el entrenamiento o la combinación de ambos factores no generaron modificaciones en el proceso de biogénesis mitocondrial y/o en la defensa antioxidante en el músculo esquelético de rata.

3. La administración en ratas de rHuEpo produce incrementos similares, en los parámetros hematológicos analizados por las autoridades antidopaje, a los producidos por la exposición a hipoxia intermitente normobárica.
4. La aplicación de un protocolo de hipoxia normobárica intermitente en ratas, tras la administración de rHuEpo, modifica sustancialmente los principales parámetros hematológicos determinados por las autoridades antidopaje. La hipoxia, por tanto, puede dificultar la detección del uso indebido de Epo por métodos indirectos.
5. El tratamiento con desmopresina disminuye significativamente los parámetros hematológicos evaluados por las autoridades antidopaje para detectar el dopaje sanguíneo. La evidencia presentada en la presente Tesis Doctoral, sobre el potencial enmascarador de la desmopresina, ha supuesto su incorporación en la Lista de Sustancias y Métodos Prohibidos por la Agencia Mundial Antidopaje para el año 2011.
6. Los radicales libres generados durante un protocolo de electroestimulación en cultivo primario de células de músculo esquelético, inducen un incremento en la expresión a nivel de mRNA de

PGC-1 α , pero no afectan a la expresión de MnSOD. La electroestimulación crónica, en combinación con antioxidantes, induce la expresión de MnSOD tanto en células de ratones silvestres como KO de PGC-1 α . PGC-1 α no es esencial para inducir, por electroestimulación, la expresión de MnSOD en cultivo primario de células de músculo esquelético de ratón. El mecanismo de acción por el que los antioxidantes ejercen sus efectos es diferente cuando se comparan modelos *in vivo* con modelos *in vitro*.

VII.CONCLUSIONS

In the light of our results, we can draw the conclusions listed below:

1. Although rHuEpo administration for two weeks increased hematological values, it did not produce any effect on mitochondrial biogenesis, myogenesis or angiogenesis in rat skeletal muscle. The increased oxygen-carrying capacity did not change the maximal aerobic capacity in a treadmill incremental test.
2. Intermittent normobaric hypoxia in combination with anaerobic training (“living high-sprint training low” strategy) was effective in inducing hematological adaptations but no improvement was found in physical performance when compared with sea level training (“living low-sprint training low” strategy). Hypoxia, training or a combination of both factors did not cause changes in the mitochondrial biogenesis process and/or antioxidant defense in rat skeletal muscle.
3. rHuEpo administration in rats produced similar increments in blood parameters analyzed by anti-doping authorities to those produced by exposure

to intermittent normobaric hypoxia.

4. The application of an intermittent normobaric hypoxic protocol in rats after rHuEpo administration substantially modified the main hematological parameters tested by anti-doping authorities. Hypoxia can therefore mask the abuse of Epo detected by using indirect methods.
5. Treatment with desmopressin decreases significantly the hematological parameters used by anti-doping authorities to detect blood doping. The evidence presented in this Doctoral Thesis on the potential masking effect of desmopressin has led it to be included in The 2011 Prohibited List of Substances by the World Anti-doping Agency.
6. The free radicals generated during an electrical stimulation protocol in primary mouse skeletal muscle cells, induced an increase in PGC-1 α but did not affect the level of MnSOD. The repeated electrical stimulation protocol induced the expression of MnSOD in both wild type and KO PGC-1 α cells. PGC-1 α is not essential for the contraction-induced expression of MnSOD in primary mouse skeletal muscle cells. The mode of action by which antioxidants exert their effect is different when they are added to cells in culture than when they are received systematically *in vivo*.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abbrecht, P. H. and J. K. Littell (1972). "Plasma erythropoietin in men and mice during acclimatization to different altitudes." *J Appl Physiol* 32(1): 54-8.

Abdelmalki, A., S. Fimbel, et al. (1996). "Aerobic capacity and skeletal muscle properties of normoxic and hypoxic rats in response to training." *Pflugers Arch* 431(5): 671-9.

Abellan, R., R. Ventura, et al. (2007). "Intermittent hypoxia exposure in a hypobaric chamber and erythropoietin abuse interpretation." *J Sports Sci* 25(11): 1241-50.

Acs, G., P. Acs, et al. (2001). "Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer." *Cancer Res* 61(9): 3561-5.

Adihetty, P. J., G. Ugucioni, et al. (2009). "The role of PGC-1 α on mitochondrial function and apoptotic susceptibility in muscle." *Am J Physiol Cell Physiol* 297(1): C217-25.

Akhter, S. A., A. D. Eckhart, et al. (1999). "In vivo inhibition of elevated myocardial beta-adrenergic receptor kinase activity in hybrid transgenic mice restores normal beta-adrenergic signaling and function." *Circulation* 100(6): 648-53.

Altan, M., P. Atukeren, et al. (2009). "Influence of intermittent hypobaric exposure on SOD and TBARS levels in trained rats." *Chin J Physiol* 52(2): 106-12.

Ameln, H., T. Gustafsson, et al. (2005). "Physiological activation of hypoxia inducible factor-1 in human skeletal muscle." *Faseb J* 19(8): 1009-11.

Ames, B. N. (1983). "Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases." *Science* 221(4617): 1256-64.

Ames, B. N. (1983). "Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases." *Science* 221: 1256-1264.

Ames, B. N., M. K. Shigenaga, et al. (1993). "Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 7915-7922.

Anagnostou, A., E. S. Lee, et al. (1990). "Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(15): 5978-82.

Anagnostou, A., Z. Liu, et al. (1994). "Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(9): 3974-8.

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.

Arany, Z., S. Y. Foo, et al. (2008). "HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha." *Nature* 451(7181): 1008-12.

Aruoma, O. I., B. Halliwell, et al. (1989). "The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a

requirement for an iron(II)-iron(III) complex." *Biochem J* 258(2): 617-20.

Asha Devi, S., M. V. Subramanyam, et al. (2005). "Adaptations of the antioxidant system in erythrocytes of trained adult rats: impact of intermittent hypobaric-hypoxia at two altitudes." *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 140(1): 59-67.

Ashenden, M. J., C. J. Gore, et al. (2000). "Simulated moderate altitude elevates serum erythropoietin but does not increase reticulocyte production in well-trained runners." *Eur J Appl Physiol* 81(5): 428-35.

Ashenden, M. J., C. J. Gore, et al. (1999). "'Live high, train low' does not change the total haemoglobin mass of male endurance athletes sleeping at a simulated altitude of 3000 m for 23 nights." *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 80(5): 479-84.

Ashenden, M. J., C. J. Gore, et al. (1999). "Effects of a 12-day 'live high, train low' camp on reticulocyte production and haemoglobin mass in elite female road cyclists." *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 80(5): 472-8.

Askew, E. W. (2002). "Work at high altitude and oxidative stress: antioxidant nutrients." *Toxicology* 180(2): 107-19.

Astrand, P. O. and K. Rodahl (1970). *Textbook of work physiology*. New York, McGraw-Hill.

Baar, K., A. R. Wende, et al. (2002). "Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1." *Faseb J* 16(14): 1879-86.

Bailey, D. M. and B. Davies (2001). "Acute mountain sickness; prophylactic benefits of antioxidant vitamin supplementation at high altitude." *High Alt Med Biol* 2(1): 21-9.

Basset, F. A., D. R. Joanisse, et al. (2006). "Effects of short-term normobaric hypoxia on haematology, muscle phenotypes and physical performance in highly trained athletes." *Exp Physiol* 91(2): 391-402.

Beidleman, B. A., S. R. Muza, et al. (2003). "Intermittent altitude exposures improve muscular performance at 4,300 m." *J Appl Physiol* 95(5): 1824-32.

Beidleman, B. A., S. R. Muza, et al. (2008). "Seven intermittent exposures to altitude improves exercise performance at 4300 m." *Med Sci Sports Exerc* 40(1): 141-8.

Beidleman, B. A., S. R. Muza, et al. (2009). "Intermittent hypoxic exposure does not improve endurance performance at altitude." *Med Sci Sports Exerc* 41(6): 1317-25.

Belcher, E. H. and E. B. Harriss (1959). "Studies of red cell life span in the rat." *J Physiol* 146(2): 217-34.

Benjamin, I. J., B. Kroger, et al. (1990). "Activation of the heat shock transcription factor by hypoxia in mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(16): 6263-7.

Benzi, G. and A. Moretti (1995). "Age and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system." *Free Rad. Biol. Med.* 19(1): 77-101.

Berger, N. J., I. T. Campbell, et al. (2006). "Influence of acute plasma volume expansion on VO₂ kinetics, VO₂ peak, and performance during high-intensity cycle exercise." *J Appl Physiol* 101(3): 707-14.

Berglund, B. and B. Ekblom (1991). "Effect of recombinant human erythropoietin treatment on blood pressure and some haematological parameters in healthy men." *J Intern Med* 229(2): 125-30.

Bigard, A. X., A. Brunet, et al. (1991). "Skeletal muscle changes after endurance training at high altitude." *J Appl Physiol* 71(6): 2114-21.

Bingham, E. C. and R. R. Roepke (1944). "THE RHEOLOGY OF THE BLOOD : IV. THE FLUIDITY OF WHOLE BLOOD AT 37 degrees C." *J Gen Physiol* 28(2): 131-49.

Bommer, J., E. Muller-Buhl, et al. (1987). "Recombinant human erythropoietin in anaemic patients on haemodialysis." *Lancet* 1(8529): 392.

Bonetti, D. L., W. G. Hopkins, et al. (2006). "High-intensity kayak performance after adaptation to intermittent hypoxia." *Int J Sports Physiol Perform* 1(3): 246-60.

Boning, D. (2010). "Hypoxia application in athletes is not doping." *Eur J Appl Physiol* 108(2): 415.

Boning, D., N. Maassen, et al. "The Hematocrit Paradox - How Does Blood Doping Really Work?" *Int J Sports Med*.

Bondy, S. C. (1992). "Reactive oxygen species: relation to aging and neurotoxic damage." *Neurotoxicology* 13(1): 87-100.

Booth, F. (1977). "Effects of endurance exercise on cytochrome C turnover in skeletal muscle." *Ann N Y Acad Sci* 301: 431-9.

Boveris, A., N. Oshino, et al. (1972). "The cellular production of hydrogen peroxyde." *Biochem. J.* 128: 617-630.

Brand, M. D. and M. P. Murphy (1987). "Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells." *Biol. Rev.* 62: 141-193.

Breen, A. P. and J. A. Murphy (1995). "Reactions of oxyl radicals with DNA." *Free Rad. Biol. Med.* 18(6): 1033-1077.

Brien, A. J. and T. L. Simon (1987). "The effects of red blood cell infusion on 10-km race time." *Jama* 257(20): 2761-5.

Brugniaux, J. V., L. Schmitt, et al. (2006). "Living high-training low: tolerance and acclimatization in elite endurance athletes." *Eur J Appl Physiol* 96(1): 66-77.

Brugniaux, J. V., L. Schmitt, et al. (2006). "Eighteen days of "living high, training low" stimulate erythropoiesis and enhance aerobic performance in elite middle-distance runners." *J Appl Physiol* 100(1): 203-11.

Bruick, R. K. and S. L. McKnight (2001). "A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF." *Science* 294(5545): 1337-40.

Buick, F. J., N. Gledhill, et al. (1980). "Effect of induced erythrocythemia on aerobic work capacity." *J Appl Physiol* 48(4): 636-42.

Byers, T. (1993). "Vitamin E supplements and coronary heart disease." *Nutr. Rev.* 51: 333-345.

Cadenas, E., A. Boveris, et al. (1977). "Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADPH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria." *Arch. Biochem. Biophys.* 180: 248-257.

Carlini, R. G., A. A. Reyes, et al. (1995). "Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro." *Kidney Int* 47(3): 740-5.

Carmeliet, P., Y. Dor, et al. (1998). "Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis." *Nature* 394(6692): 485-90.

Carraway, M. S., H. B. Suliman, et al. (2010) "Erythropoietin activates mitochondrial biogenesis and couples red cell mass to mitochondrial mass in the heart." *Circ Res* 106(11): 1722-30.

Cayla, J., C. Lavoie, et al. (1999). "Effects of recombinant erythropoietin (r-HuEPO) on plasma glucose concentration in endurance-trained rats." *Acta Physiol Scand* 166(3): 247-9.

Cayla, J. L., P. Maire, et al. (2008). "Erythropoietin induces a shift of muscle phenotype from fast glycolytic to slow oxidative." *Int J Sports Med* 29(6): 460-5.

Cazorla, O., Y. Ait Mou, et al. (2006). "Effects of high-altitude exercise training on contractile function of rat skinned cardiomyocyte." *Cardiovasc Res* 71(4): 652-60.

Cockman, M. E., N. Masson, et al. (2000). "Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von

Hippel-Lindau tumor suppressor protein." *J Biol Chem* 275(33): 25733-41.

Conboy, I. M., M. J. Conboy, et al. (2005). "Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment." *Nature* 433(7027): 760-4.

Connes, P., O. Yalcin, et al. (2006). "In health and in a normoxic environment, VO₂ max is/is not limited primarily by cardiac output and locomotor muscle blood flow." *J Appl Physiol* 100(6): 2099.

Connett, R. J., C. R. Honig, et al. (1990). "Defining hypoxia: a systems view of VO₂, glycolysis, energetics, and intracellular PO₂." *J Appl Physiol* 68(3): 833-42.

Connor, M. K., M. Takahashi, et al. (1996). "Tissue-specific stability of nuclear- and mitochondrially encoded mRNAs." *Arch Biochem Biophys* 333(1): 103-8.

Cooper, C. E. and R. Beneke (2008). *Drugs and Ergogenic Aids to Improve Sport Performance*. London, Portland Press.

Costa, L. E. (1990). "Hepatic cytochrome P-450 in rats submitted to chronic hypobaric hypoxia." *Am J Physiol* 259(4 Pt 1): C654-9.

Costa, L. E., A. Boveris, et al. (1988). "Liver and heart mitochondria in rats submitted to chronic hypobaric hypoxia." *Am J Physiol* 255(1 Pt 1): C123-9.

Costa, L. E., G. Mendez, et al. (1997). "Oxygen dependence of mitochondrial function measured by high-resolution respirometry in long-term hypoxic rats." *Am J Physiol* 273(3 Pt 1): C852-8.

Cross, A. J., P. Slater, et al. (1987). "Sodium dependent D-[3H]aspartate binding in cerebral cortex in patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases." *Neurosci Lett* 79(1-2): 213-7.

Crowell, J. W. and E. E. Smith (1967). "Determinant of the optimal hematocrit." *J Appl Physiol* 22(3): 501-4.

Crowell, J. W., R. G. Ford, et al. (1959). "Oxygen transport in hemorrhagic shock as a function of the hematocrit ratio." *Am J Physiol* 196(5): 1033-8.

Crowell, J. W. and W. W. Johnson (1959). "The role of the hematocrit ratio in circulatory arrest." *Surgery* 45(3): 432-5.

Chance, B., H. Sies, et al. (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." *Physiol Rev* 59(3): 527-605.

Chandel, N. S., E. Maltepe, et al. (1998). "Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(20): 11715-20.

Chandel, N. S., D. S. McClintock, et al. (2000). "Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing." *J Biol Chem* 275(33): 25130-8.

Charge, S. B., A. S. Brack, et al. (2002). "Aging-related satellite cell differentiation defect occurs prematurely after Ski-induced muscle hypertrophy." *Am J Physiol Cell Physiol* 283(4): C1228-41.

Charge, S. B. and M. A. Rudnicki (2004). "Cellular and molecular regulation of muscle regeneration." *Physiol Rev* 84(1): 209-38.

Cheeseman, K. H. and T. F. Slater (1993). "An introduction to free radical biochemistry." *Br. Med. Bull.* 49(3): 588-603.

Davies, K. J., L. Packer, et al. (1982). "Exercise bioenergetics following sprint training." *Arch Biochem Biophys* 215(1): 260-5.

Davies, K. J. A. (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects." *J. Biol. Chem.* 262: 9895-9901.

Dehnert, C., M. Hutler, et al. (2002). "Erythropoiesis and performance after two weeks of living high and training low in well trained triathletes." *Int J Sports Med* 23(8): 561-6.

Derelanko, M. J. (1987). "Determination of erythrocyte life span in F-344, Wistar, and Sprague-Dawley rats using a modification of the [³H]diisopropylfluorophosphate ([³H]DFP) method." *Fundam Appl Toxicol* 9(2): 271-6.

Devi, S. A., R. Vani, et al. (2007). "Intermittent hypobaric hypoxia-induced oxidative stress in rat erythrocytes: protective effects of vitamin E, vitamin C, and carnitine." *Cell Biochem Funct* 25(2): 221-31.

Dimson, S. B. (1977). "Desmopressin as a treatment for enuresis." *Lancet* 1(8024): 1260.

Donahue, J. L. and D. T. Lowenthal (1997). "Nocturnal polyuria in the elderly person." *Am J Med Sci* 314(4): 232-8.

Dreizen, P. (1962). "Rheology of Human Blood. Studies on the Flow of Fresh Venous Blood and of Citrated Blood through Tubing of Diameters between 0.09 and 0.20 Cm." *J Clin Invest* 41(11): 2036-53.

Dufour, S. P., E. Ponsot, et al. (2006). "Exercise training in normobaric hypoxia in endurance runners. I. Improvement in aerobic performance capacity." *J Appl Physiol* 100(4): 1238-48.

Dutta, A., K. Ray, et al. (2008). "L-carnitine supplementation attenuates intermittent hypoxia-induced oxidative stress and delays muscle fatigue in rats." *Exp Physiol* 93(10): 1139-46.

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.

Eklblom, B., G. Wilson, et al. (1976). "Central circulation during exercise after venesection and reinfusion of red blood cells." *J Appl Physiol* 40(3): 379-83.

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.

Eschbach, J. W., N. R. Haley, et al. (1989). "The use of recombinant erythropoietin in the treatment of the anemia of chronic renal failure." *Ann N Y Acad Sci* 554: 225-30.

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.

Favret, F., K. K. Henderson, et al. (2003). "Effects of exercise training on acclimatization to hypoxia: systemic O₂ transport during maximal exercise." *J Appl Physiol* 95(4): 1531-41.

Feldser, D., F. Agani, et al. (1999). "Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2." *Cancer Res* 59(16): 3915-8.

Fenton, H. J. H. (1894). "Oxidation of tartaric acid in the presence of iron." *J. Chem. Soc. Trans.* 65: 899-910.

Ferretti, G. (2010). "Of intermittent hypoxia and doping." *Eur J Appl Physiol* 108(2): 413-4.

Forstrom, J. W., J. J. Zakowski, et al. (1978). "Identification of the catalytic site of the rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine." *Biochemistry.* 17: 2639-2644.

Freeman, B. A. and J. Crapo (1982). "Biology of disease: Free radicals and tissue injure." *Lab. Invest.* 47: 412-426.

Frei, B. (1994). "Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action." *Am. J. Med.* 97(3A): 5S-13S.

Fridovich, I. (1974). "Superoxide dismutases." *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 41(0): 35-97.

Fridovich, I. (1978). "Superoxide dismutases: defence against endogenous superoxide radical." *Ciba Found Symp*(65): 77-93.

Fryers, G. R. (1952). "Effect of decreased atmospheric pressure on blood volume of rats." *Am J Physiol* 171(2): 459-64.

Galbes, O., L. Goret, et al. (2008). "Combined effects of hypoxia and endurance training on lipid metabolism in rat skeletal muscle." *Acta Physiol (Oxf)* 193(2): 163-73.

Gamboa, J. L. and F. H. Andrade "Mitochondrial content and distribution changes specific to mouse diaphragm after chronic normobaric hypoxia." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298(3): R575-83.

Garcia, J. F. (1957). "Erythropoietic response to hypoxia as a function of age in the normal male rat." *Am J Physiol* 190(1): 25-30.

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.

Gomez-Cabrera, M. C., G. L. Close, et al. (2009). "Effect of xanthine oxidase-generated extracellular superoxide on skeletal muscle force generation." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.

Gomez-Cabrera, M. C., E. Domenech, et al. (2008). "Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance." *Am J Clin Nutr* 87(1): 142-9.

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.

Gore, C. J., A. Hahn, et al. (1998). "Altitude training at 2690m does not increase total haemoglobin mass or sea level VO₂max in world champion track cyclists." *J Sci Med Sport* 1(3): 156-70.

Gore, C. J., A. G. Hahn, et al. (2001). "Live high:train low increases muscle buffer capacity and submaximal cycling efficiency." *Acta Physiol Scand* 173(3): 275-86.

Gore, C. J., R. Parisotto, et al. (2003). "Second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes." *Haematologica* 88(3): 333-44.

Gore, C. J. and W. G. Hopkins (2005). "Counterpoint: positive effects of intermittent hypoxia (live high:train low) on exercise performance are not mediated primarily by augmented red cell volume." *J Appl Physiol* 99(5): 2055-7; discussion 2057-8.

Gore, C. J., F. A. Rodriguez, et al. (2006). "Increased serum erythropoietin but not red cell production after 4 wk of intermittent hypobaric hypoxia (4,000-5,500 m)." *J Appl Physiol* 101(5): 1386-93.

Green, H., B. Roy, et al. (2000). "Downregulation in muscle Na(+)-K(+)-ATPase following a 21-day expedition to 6,194 m." *J Appl Physiol* 88(2): 634-40.

Green, H. J., J. R. Sutton, et al. (1989). "Operation Everest II: adaptations in human skeletal muscle." *J Appl Physiol* 66(5): 2454-61.

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.

Guddat, S., M. Thevis, et al. (2008). "Rapid screening of polysaccharide-based plasma volume expanders dextran and hydroxyethyl starch in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Biomed Chromatogr* 22(7): 695-701.

Guddat, S., M. Thevis, et al. (2005). "Identification and quantification of the plasma volume expander dextran in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of enzymatically derived isomaltose." *Biomed Chromatogr* 19(10): 743-50.

Gutierrez Gallego, R. and J. Segura (2004). "Rapid screening of plasma volume expanders in urine using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry." *Rapid Commun Mass Spectrom* 18(12): 1324-30.

Gutteridge, J. M. (1994). "Antioxidants, nutritional supplements and life-threatening diseases." *Br J Biomed Sci* 51(3): 288-95.

Gutteridge, J. M. C. (1993). *Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. The place of oxygen free radicals in HIV infections*, Elsevier Science Ireland.

Guzy, R. D., B. Hoyos, et al. (2005). "Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing." *Cell Metab* 1(6): 401-8.

Haber, F. and J. Weiss (1932). "Über die Katalyse des Hydroperoxydes." *Naturweiss.* 20: 948.

Hahn, A. G., C. J. Gore, et al. (2001). "An evaluation of the concept of living at moderate altitude and training at sea level." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 128(4): 777-89.

Halliwell, B. (1991). "Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease." *Am. J. Med.* 91(3C): 14S-22S.

Halliwell, B. (1996). "Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation." *Biochemical Society Transactions* 24(4): 1023-1027.

Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1995). "The definition and measurement of antioxidants in biological systems." *Free Radic Biol Med* 18(1): 125-6.

Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1986). "Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts." *Arch. Biochem. Biophys.* 246: 501-514.

Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1989). *Free radicals in biology and medicine.* Oxford, Clarendon Press, Reino Unido.

Hamlin, M. J. and J. Hellemans (2007). "Effect of intermittent normobaric hypoxic exposure at rest on haematological, physiological, and performance parameters in multi-sport athletes." *J Sports Sci* 25(4): 431-41.

Hamlin, M. J., E. A. Hinckson, et al. (2008). "Simulated rugby performance at 1550-m altitude following adaptation

to intermittent normobaric hypoxia." *J Sci Med Sport* 11(6): 593-9.

Hamlin, M. J., H. C. Marshall, et al. (2009). "Effect of intermittent hypoxic training on 20 km time trial and 30 s anaerobic performance." *Scand J Med Sci Sports*.

Hassan, H. M. (1989). "Microbial superoxide dismutases." *Adv Genet* 26: 65-97.

Heinicke, K., N. Prommer, et al. (2003). "Long-term exposure to intermittent hypoxia results in increased hemoglobin mass, reduced plasma volume, and elevated erythropoietin plasma levels in man." *Eur J Appl Physiol* 88(6): 535-43.

Hellsten, Y. (1994). "Xanthine dehydrogenase and purine metabolism in man. With special reference to exercise." *Acta Physiol Scand Suppl* 621: 1-73.

Hellsten, Y., J. J. Nielsen, et al. (2007). "Antioxidant supplementation enhances the exercise-induced increase in mitochondrial uncoupling protein 3 and endothelial nitric oxide synthase mRNA content in human skeletal muscle." *Free Radic Biol Med* 43(3): 353-61.

Henderson, K. K., R. L. Clancy, et al. (2001). "Living and training in moderate hypoxia does not improve VO₂ max more than living and training in normoxia." *J Appl Physiol* 90(6): 2057-62.

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.

Hilty, M. R., H. Groth, et al. (1989). "Determinants of VO₂max in rats after high-intensity sprint training." *J Appl Physiol* 66(1): 195-201.

Hill, N. S., G. L. Sardella, et al. (1987). "Reticulocytosis, increased mean red cell volume, and greater blood viscosity in altitude susceptible compared to altitude resistant rats." *Respir Physiol* 70(2): 229-40.

Hinckson, E. A., W. G. Hopkins, et al. (2006). "The effect of intermittent hypoxic training via a hypoxic inhaler on physiological and performance measures in rowers: a pilot study." *J Sci Med Sport* 9(1-2): 177-80.

Hinghofer-Szalkay, H. (2010). "Intermittent hypoxic training: risks versus benefits." *Eur J Appl Physiol* 108(2): 417.

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., L. B. Oscai, et al. (1970). "Mitochondrial citric acid cycle and related enzymes: adaptive response to exercise." *Biochem Biophys Res Commun* 40(6): 1368-73.

Hood, D. A. (2001). "Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle." *J Appl Physiol* 90(3): 1137-57.

Hood, D. A., I. Irrcher, et al. (2006). "Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle." *J Exp Biol* 209(Pt 12): 2265-75.

Hoppeler, H. (1986). "Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle." *Int J Sports Med* 7(4): 187-204.

Hu, J., D. J. Discher, et al. (1998). "Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand." *Biochem Biophys Res Commun* 245(3): 894-9.

Huang, L. E., Z. Arany, et al. (1996). "Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit." *J Biol Chem* 271(50): 32253-9.

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.

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.

Irrcher, I., V. Ljubcic, et al. (2009). "Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1alpha transcription in skeletal muscle cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 296(1): C116-23.

Iyer, N. V., L. E. Kotch, et al. (1998). "Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha." *Genes Dev* 12(2): 149-62.

Jacobs-El, 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.

Jelkmann, W. (1992). "Erythropoietin: structure, control of production, and function." *Physiol Rev* 72(2): 449-89.

Jiang, B. H., G. L. Semenza, et al. (1996). "Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension." *Am J Physiol* 271(4 Pt 1): C1172-80.

Joanny, P., J. Steinberg, et al. (2001). "Operation Everest III (Comex'97): the effect of simulated severe hypobaric hypoxia on lipid peroxidation and antioxidant defence systems in human blood at rest and after maximal exercise." *Resuscitation* 49(3): 307-14.

Juel, C., J. J. Thomsen, et al. (2007). "Effects of prolonged recombinant human erythropoietin administration on muscle membrane transport systems and metabolic marker enzymes." *Eur J Appl Physiol* 102(1): 41-4.

Julian, C. G., C. J. Gore, et al. (2004). "Intermittent normobaric hypoxia does not alter performance or erythropoietic markers in highly trained distance runners." *J Appl Physiol* 96(5): 1800-7.

Katayama, K., H. Matsuo, et al. (2003). "Intermittent hypoxia improves endurance performance and submaximal exercise efficiency." *High Alt Med Biol* 4(3): 291-304.

Katayama, K., K. Sato, et al. (2007). "Intermittent hypoxia does not increase exercise ventilation at simulated moderate altitude." *Int J Sports Med* 28(6): 480-7.

Katayama, K., K. Sato, et al. (2004). "Effect of intermittent hypoxia on oxygen uptake during submaximal exercise in endurance athletes." *Eur J Appl Physiol* 92(1-2): 75-83.

Kao, R., A. Xenocostas, et al. (2007). "Erythropoietin improves skeletal muscle microcirculation and tissue bioenergetics in a mouse sepsis model." *Crit Care* 11(3): R58.

Kennedy, S. L., W. C. Stanley, et al. (2001). "Alterations in enzymes involved in fat metabolism after acute and chronic altitude exposure." *J Appl Physiol* 90(1): 17-22.

Ketterer, B. (1986). "Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases." *Xenobiotica*. 16: 957-973.

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.

Kim, J. W., I. Tchernyshyov, et al. (2006). "HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia." *Cell Metab* 3(3): 177-85.

Kim, R. J., C. Malattia, et al. (2004). "Vasopressin and desmopressin in central diabetes insipidus: adverse effects and clinical considerations." *Pediatr Endocrinol Rev* 2 Suppl 1: 115-23.

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.

Koistinen, P. O., H. Rusko, et al. (2000). "EPO, red cells, and serum transferrin receptor in continuous and intermittent hypoxia." *Med Sci Sports Exerc* 32(4): 800-4.

Kumar, D., A. Bansal, et al. (1999). "Biochemical and immunological changes on oral glutamate feeding in male albino rats." *Int J Biometeorol* 42(4): 201-4.

Lappin, T. R., A. P. Maxwell, et al. (2002). "EPO's alter ego: erythropoietin has multiple actions." *Stem Cells* 20(6): 485-92.

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., T. Simpson, et al. (1990). "Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training." *J Appl Physiol* 68(6): 2337-43.

Lee, P. J., B. H. Jiang, et al. (1997). "Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia." *J Biol Chem* 272(9): 5375-81.

Leick, L., J. F. Wojtaszewski, et al. (2008). "PGC-1alpha is not mandatory for exercise- and training-induced adaptive gene responses in mouse skeletal muscle." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294(2): E463-74.

Levine, B. D. and J. Stray-Gundersen (1992). "A practical approach to altitude training: where to live and train for optimal performance enhancement." *Int J Sports Med* 13 Suppl 1: S209-12.

Levine, B. D. and J. Stray-Gundersen (1997). "'Living high-training low": effect of moderate-altitude

acclimatization with low-altitude training on performance." *J Appl Physiol* 83(1): 102-12.

Levine, B. D. and J. Stray-Gundersen (2005). "Point: positive effects of intermittent hypoxia (live high:train low) on exercise performance are mediated primarily by augmented red cell volume." *J Appl Physiol* 99(5): 2053-5.

Levine, B. D. (2006). "Should "artificial" high altitude environments be considered doping?" *Scand J Med Sci Sports* 16(5): 297-301.

Levy, J. H. (2008). "Pharmacologic methods to reduce perioperative bleeding." *Transfusion* 48(1 Suppl): 31S-38S.

Lin, J., C. Handschin, et al. (2005). "Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators." *Cell Metab* 1(6): 361-70.

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.

Lin, J., P. H. Wu, et al. (2004). "Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice." *Cell* 119(1): 121-35.

Lippi, G. and M. Franchini (2010). "Intermittent hypoxic training: doping or what?" *Eur J Appl Physiol* 108(2): 411-2.

Lippi, G., M. Franchini, et al. (2010). "Normobaric hypoxia and sports: the debate continues." *Eur J Appl Physiol*.

Lippman, R. D. (1985). "Rapid in vivo quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man." *Exp. Gerontol.* 20: 1-5.

Lok, C. N. and P. Ponka (1999). "Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene." *J Biol Chem* 274(34): 24147-52.

Lundby, C., Y. Hellsten, et al. (2008). "Erythropoietin receptor in human skeletal muscle and the effects of acute and long-term injections with recombinant human erythropoietin on the skeletal muscle." *J Appl Physiol* 104(4): 1154-60.

Lundby, C., T. K. Nielsen, et al. (2005). "The influence of intermittent altitude exposure to 4100 m on exercise capacity and blood variables." *Scand J Med Sci Sports* 15(3): 182-7.

Lundby, C., P. Robach, et al. (2008). "Does recombinant human Epo increase exercise capacity by means other than augmenting oxygen transport?" *J Appl Physiol* 105(2): 581-7.

Lundby, C., J. J. Thomsen, et al. (2007). "Erythropoietin treatment elevates haemoglobin concentration by increasing red cell volume and depressing plasma volume." *J Physiol* 578(Pt 1): 309-14.

MacDougall, J. D., A. L. Hicks, et al. (1998). "Muscle performance and enzymatic adaptations to sprint interval training." *J Appl Physiol* 84(6): 2138-42.

Magalhaes, J., A. Ascensao, et al. (2005). "Acute and severe hypobaric hypoxia increases oxidative stress and

impairs mitochondrial function in mouse skeletal muscle." *J Appl Physiol* 99(4): 1247-53.

Magalhaes, J., A. Ascensao, et al. (2004). "Oxidative stress in humans during and after 4 hours of hypoxia at a simulated altitude of 5500 m." *Aviat Space Environ Med* 75(1): 16-22.

Maiti, P., S. B. Singh, et al. (2006). "Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain." *Neurochem Int* 49(8): 709-16.

Malloy, D. C., R. Kell, et al. (2007). "The spirit of sport, morality, and hypoxic tents: logic and authenticity." *Appl Physiol Nutr Metab* 32(2): 289-96.

Maloyan, A., L. Eli-Berchoer, et al. (2005). "HIF-1alpha-targeted pathways are activated by heat acclimation and contribute to acclimation-ischemic cross-tolerance in the heart." *Physiol Genomics* 23(1): 79-88.

Mayer, G., J. Thum, et al. (1988). "Working capacity is increased following recombinant human erythropoietin treatment." *Kidney Int* 34(4): 525-8.

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). "The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen." *J Biol Chem* 244(22): 6056-63.

Melillo, G., T. Musso, et al. (1995). "A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the

inducible nitric oxide synthase promoter." *J Exp Med* 182(6): 1683-93.

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.

Milne, K. J. and E. G. Noble (2002). "Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent." *J Appl Physiol* 93(2): 561-8.

Miyazaki, S. and A. Sakai (2000). "The effect of "living high-training low" on physical performance in rats." *Int J Biometeorol* 44(1): 24-30.

Mizuno, M., G. K. Savard, et al. (2008). "Skeletal muscle adaptations to prolonged exposure to extreme altitude: a role of physical activity?" *High Alt Med Biol* 9(4): 311-7.

Mohanraj, P., A. J. Merola, et al. (1998). "Antioxidants protect rat diaphragmatic muscle function under hypoxic conditions." *J Appl Physiol* 84(6): 1960-6.

Moller, P., S. Loft, et al. (2001). "Acute hypoxia and hypoxic exercise induce DNA strand breaks and oxidative DNA damage in humans." *Faseb J* 15(7): 1181-6.

Morishita, E., S. Masuda, et al. (1997). "Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death." *Neuroscience* 76(1): 105-16.

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.

Morton, J. P. and N. T. Cable (2005). "Effects of intermittent hypoxic training on aerobic and anaerobic performance." *Ergonomics* 48(11-14): 1535-46.

Mounier, R., V. Pialoux, et al. (2006). "Leukocyte's Hif-1 expression and training-induced erythropoietic response in swimmers." *Med Sci Sports Exerc* 38(8): 1410-7.

Mylrea, K. C. and P. H. Abbrecht (1970). "Hematologic responses of mice subjected to continuous hypoxia." *Am J Physiol* 218(4): 1145-9.

Nakanishi, K., F. Tajima, et al. (1995). "Effects of hypobaric hypoxia on antioxidant enzymes in rats." *J Physiol* 489 (Pt 3): 669-76.

Nemeth, N., T. Alexy, et al. (2009). "Inter-species differences in hematocrit to blood viscosity ratio." *Biorheology* 46(2): 155-65.

Neubauer, J. A. (2001). "Invited review: Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia." *J Appl Physiol* 90(4): 1593-9.

Neya, M., T. Enoki, et al. (2007). "The effects of nightly normobaric hypoxia and high intensity training under intermittent normobaric hypoxia on running economy and hemoglobin mass." *J Appl Physiol* 103(3): 828-34.

Noble, E. G., R. Ho, et al. (2006). "Exercise is the primary factor associated with Hsp70 induction in muscle of treadmill running rats." *Acta Physiol (Oxf)* 187(4): 495-501.

Nummela, A. and H. Rusko (2000). "Acclimatization to altitude and normoxic training improve 400-m running performance at sea level." *J Sports Sci* 18(6): 411-9.

O'Hagan, K. A., S. Cocchiglia, et al. (2009). "PGC-1alpha is coupled to HIF-1alpha-dependent gene expression by increasing mitochondrial oxygen consumption in skeletal muscle cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(7): 2188-93.

Ogilvie, M., X. Yu, et al. (2000). "Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts." *J Biol Chem* 275(50): 39754-61.

Ogura, Y., H. Naito, et al. (2005). "Sprint-interval training-induced alterations of Myosin heavy chain isoforms and enzyme activities in rat diaphragm: effect of normobaric hypoxia." *Jpn J Physiol* 55(6): 309-16.

Ogura, Y., H. Naito, et al. (2006). "Sprint-interval training induces heat shock protein 72 in rat skeletal muscles." *Journal of Sports Science and Medicine* 5: 194-201.

Okamoto, H. (1985). "Molecular basis of experimental diabetes degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic b-cells os islets of Langerhans." *Bioassays* 2: 15-21.

Owen, J. A., B. Iggo, et al. (1954). "The determination of creatinine in plasma or serum, and in urine; a critical examination." *Biochem J* 58(3): 426-37.

Pacifi, R. E. and K. J. Davies (1991). "Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free radical theory of aging revised." *Gerontology* 37: 166-180.

Palmer, L. A. and R. A. Johns (1998). "Hypoxia upregulates inducible (Type II) nitric oxide synthase in an

HIF-1 dependent manner in rat pulmonary microvascular but not aortic smooth muscle cells." *Chest* 114(1 Suppl): 33S-34S.

Parisotto, R., C. J. Gore, et al. (2000). "A novel method utilising markers of altered erythropoiesis for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes." *Haematologica* 85(6): 564-72.

Parisotto, R., M. Wu, et al. (2001). "Detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes utilizing markers of altered erythropoiesis." *Haematologica* 86(2): 128-37.

Pastoris, O., P. Foppa, et al. (1995). "Effects of hypoxia on enzyme activities in skeletal muscle of rats of different ages. An attempt at pharmacological treatment." *Pharmacological Research* 32(6): 375-81.

Pastoris, O., P. Foppa, et al. (1995). "Effects of hypoxia on enzyme activities in skeletal muscle of rats of different ages. An attempt at pharmacological treatment." *Pharmacol Res* 32(6): 375-81.

Perhonen, M., T. E. Takala, et al. (1996). "Effects of prolonged exposure to and physical training in hypobaric conditions on skeletal muscle morphology and metabolic enzymes in rats." *Pflugers Arch* 432(1): 50-8.

Pialoux, V., R. Mounier, et al. (2009). "Thirteen days of "live high-train low" does not affect prooxidant/antioxidant balance in elite swimmers." *Eur J Appl Physiol* 106(4): 517-24.

Pialoux, V., R. Mounier, et al. (2009). "Effects of the 'live high-train low' method on prooxidant/antioxidant balance on elite athletes." *Eur J Clin Nutr* 63(6): 756-62.

Piehl Aulin, K., J. Svedenhag, et al. (1998). "Short-term intermittent normobaric hypoxia--haematological, physiological and mental effects." *Scand J Med Sci Sports* 8(3): 132-7.

Pilegaard, H., G. A. Ordway, et al. (2000). "Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279(4): E806-14.

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.

Powell, F. L. and N. Garcia (2000). "Physiological effects of intermittent hypoxia." *High Alt Med Biol* 1(2): 125-36.

Pryor, W. A., G. L. Squadrito, et al. (1995). "A new mechanism for the toxicity of ozone." *Toxicol Lett* 82-83: 287-93.

Psilander, N., R. Damsgaard, et al. (2003). "Resistance exercise alters MRF and IGF-I mRNA content in human skeletal muscle." *J Appl Physiol* 95(3): 1038-44.

Puigserver, P., Z. Wu, et al. (1998). "A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis." *Cell* 92(6): 829-39.

Pugh, L. G. (1964). "Blood Volume and Haemoglobin Concentration at Altitudes above 18,000 Ft. (5500 M)." *J Physiol* 170: 344-54.

Radak, Z., K. Asano, et al. (1998). "The effect of high altitude and caloric restriction on reactive carbonyl derivatives and activity of glutamine synthetase in rat brain." *Life Sci* 62(15): 1317-22.

Radak, Z., K. Asano, et al. (1997). "High altitude training increases reactive carbonyl derivatives but not lipid peroxidation in skeletal muscle of rats." *Free Radic Biol Med* 22(6): 1109-14.

Radak, Z., K. Lee, et al. (1994). "Oxidative stress induced by intermittent exposure at a simulated altitude of 4000 m decreases mitochondrial superoxide dismutase content in soleus muscle of rats." *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 69(5): 392-5.

Raine, A. E. (1988). "Hypertension, blood viscosity, and cardiovascular morbidity in renal failure: implications of Robinson, N., P. E. Sottas, et al. "ORIGINAL ARTICLE: Stability and robustness of blood variables in an antidoping context." *Int J Lab Hematol.erythropoietin therapy.*" *Lancet* 1(8577): 97-100.

Rawley, D. A. and B. Halliwell (1983). "Formation of hidroxil radicals from hydrogen peroxide and iron salts by superoxide- and ascorbate-dependent machanism: Relevance to the pathology of rheumatoid disease." *Clin. Sci.* 64: 649-653.

Reardon, W., R. J. Ross, et al. (1992). "Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA." *Lancet* 340(8832): 1376-9.

Reboul, C., S. Tanguy, et al. (2005). "Altitude negates the benefits of aerobic training on the vascular adaptations in rats." *Med Sci Sports Exerc* 37(6): 979-85.

Reboul, C., S. Tanguy, et al. (2005). "Chronic hypoxia exposure depresses aortic endothelium-dependent vasorelaxation in both sedentary and trained rats: involvement of L-arginine." *J Appl Physiol* 99(3): 1029-35.

Reboul, C., S. Tanguy, et al. (2005). "Cardiac remodeling and functional adaptations consecutive to altitude training in rats: implications for sea level aerobic performance." *J Appl Physiol* 98(1): 83-92.

Reichmann, H., H. Hoppeler, et al. (1985). "Biochemical and ultrastructural changes of skeletal muscle mitochondria after chronic electrical stimulation in rabbits." *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology* 404(1): 1-9.

Rifkind, J. M., L. Zhang, et al. (1991). "The hypoxic stress on erythrocytes associated with superoxide formation." *Free Radic Res Commun* 12-13 Pt 2: 645-52.

Ristow, M., K. Zarse, et al. (2009). "Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(21): 8665-70.

Robach, P., L. Schmitt, et al. (2006). "Living high-training low: effect on erythropoiesis and maximal aerobic performance in elite Nordic skiers." *Eur J Appl Physiol* 97(6): 695-705.

Robinson, A. G. (1976). "DDAVP in the treatment of central diabetes insipidus." *N Engl J Med* 294(10): 507-11.

Robinson, B. H. (1993). "Lacticacidemia." *Biochim Biophys Acta* 1182(3): 231-44.

Rock, C. L., R. A. Jacob, et al. (1996). "Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients:

vitamin C, vitamin E, and the carotenoids." *J Am Diet Assoc* 96(7): 693-702; quiz 703-4.

Rodriguez, A. M., P. M. Carrico, et al. (2000). "Mitochondrial or cytosolic catalase reverses the MnSOD-dependent inhibition of proliferation by enhancing respiratory chain activity, net ATP production, and decreasing the steady state levels of H₂O₂." *Free Radic Biol Med* 29(9): 801-13.

Rodriguez, F. A., H. Casas, et al. (1999). "Intermittent hypobaric hypoxia stimulates erythropoiesis and improves aerobic capacity." *Med Sci Sports Exerc* 31(2): 264-8.

Rodriguez, F. A., M. J. Truijens, et al. (2007). "Performance of runners and swimmers after four weeks of intermittent hypobaric hypoxic exposure plus sea level training." *J Appl Physiol* 103(5): 1523-35.

Rodriguez, F. A., J. L. Ventura, et al. (2000). "Erythropoietin acute reaction and haematological adaptations to short, intermittent hypobaric hypoxia." *Eur J Appl Physiol* 82(3): 170-7.

Rokitzki, L., E. Logemann, et al. (1994). "Lipid peroxidation and antioxidative vitamins under extreme endurance stress." *Acta Physiol Scand* 151(2): 149-58.

Rolfs, A., I. Kvietikova, et al. (1997). "Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1." *J Biol Chem* 272(32): 20055-62.

Rotter, R., M. Menshykova, et al. (2008). "Erythropoietin improves functional and histological recovery of traumatized skeletal muscle tissue." *J Orthop Res* 26(12): 1618-26.

Rouault, T. A. and R. D. Klausner (1996). "The impact of oxidative stress on eukaryotic iron metabolism." *EXS*. 77: 183-197.

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.

Salceda, S. and J. Caro (1997). "Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes." *J Biol Chem* 272(36): 22642-7.

Saltin, B. and J. A. Calbet (2006). "Point: in health and in a normoxic environment, VO₂ max is limited primarily by cardiac output and locomotor muscle blood flow." *J Appl Physiol* 100(2): 744-5.

Sanchis-Gomar, F., V. E. Martinez-Bello, et al. (2009). "Effect of intermittent hypoxia on hematological parameters after recombinant human erythropoietin administration." *Eur J Appl Physiol*.

Sanchis-Gomar, F., V. E. Martinez-Bello, et al. (2010). "It is not hypoxia itself, but how you use it." *Eur J Appl Physiol* 109(2): 355-6.

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.

Sato, Y., S. Kamo, et al. (1995). "Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes:

hemolysis by water-soluble radical initiator." *Biochemistry* 34(28): 8940-9.

Saunders, P. U., R. D. Telford, et al. (2004). "Improved running economy in elite runners after 20 days of simulated moderate-altitude exposure." *J Appl Physiol* 96(3): 931-7.

Saunders, P. U., R. D. Telford, et al. (2009). "Improved running economy and increased hemoglobin mass in elite runners after extended moderate altitude exposure." *J Sci Med Sport* 12(1): 67-72.

Savoirey, G., N. Garcia, et al. (1996). "Pre-adaptation, adaptation and de-adaptation to high altitude in humans: cardio-ventilatory and haematological changes." *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 73(6): 529-35.

Savoirey, G., N. Garcia, et al. (1994). "Physiological changes induced by pre-adaptation to high altitude." *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 69(3): 221-7.

Savoirey, G., J. C. Launay, et al. (2004). "Control of erythropoiesis after high altitude acclimatization." *Eur J Appl Physiol* 93(1-2): 47-56.

Sawyer, D. T. (1988). The redox thermodynamics for dioxygen species (O_2 , $O_2\cdot^-$, $HOO\cdot$, H_2O_2 and HOO^-) and monooxygen species (O , $O\cdot^-$, $\cdot OH$, and OH^-) in water and aprotic solvents. *Oxygen radicals in biology and medicine*. M. G. Simic, K. A. Taylor, J. F. Ward and C. Sonntag. New York, Ed. Plenum Press.: 11-20.

Scarpulla, R. C. (2002). "Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis." *Biochim Biophys Acta* 1576(1-2): 1-14.

Schuler, B., M. Arras, et al. (2009). "Optimal hematocrit for maximal exercise performance in acute and chronic erythropoietin-treated mice." *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Schuler, B., M. Arras, et al. (2010). "Optimal hematocrit for maximal exercise performance in acute and chronic erythropoietin-treated mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(1): 419-23.

Scoppetta, C. and F. Grassi (2004). "Erythropoietin: a new tool for muscle disorders?" *Med Hypotheses* 63(1): 73-5.

Sharpe, K., M. J. Ashenden, et al. (2006). "A third generation approach to detect erythropoietin abuse in athletes." *Haematologica* 91(3): 356-63.

Sharpe, K., W. Hopkins, et al. (2002). "Development of reference ranges in elite athletes for markers of altered erythropoiesis." *Haematologica* 87(12): 1248-57.

Shemin, D. and D. Rittenberg (1946). "The life span of the human red blood cell." *J Biol Chem* 166(2): 627-36.

Shigenaga, M. K., T. M. Hagen, et al. (1994). "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 10771-10778.

Sies, H. (1993). "Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection." *Mutation Research* 299(3/4): 183.

Sies, H. (1985). "Oxidative stress: introductory remarks". In H. Sies, (Ed.). *Oxidative Stress*. London: Academic Press. pp. 1-7.

Silveira, L. R., L. Pereira-Da-Silva, et al. (2003). "Formation of hydrogen peroxide and nitric oxide in rat

skeletal muscle cells during contractions." *Free Radic Biol Med* 35(5): 455-64.

Silveira, L. R., H. Pilegaard, et al. (2006). "The contraction induced increase in gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha), mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) and hexokinase II (HKII) in primary rat skeletal muscle cells is dependent on reactive oxygen species." *Biochim Biophys Acta* 1763(9): 969-76.

Sinclair, A. M., A. Coxon, et al. "Functional erythropoietin receptor is undetectable in endothelial, cardiac, neuronal, and renal cells." *Blood* 115(21): 4264-72.

Skulachev, V. P. (1996). "Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants." *Quat. Rev. Biophys* 29: 169-202.

Slade, R., K. Crissman, et al. (1993). "Comparison of antioxidant substances in brochoalveolar lavage cells and fluid from humans, guinea pigs, and rats." *Exp. Lung. Res.* 19: 469-484.

Slater, T. F. (1984). "Free-radical mechanisms in tissue injury." *Biochem J* 222(1): 1-15.

Smith, E. E. and J. W. Crowell (1963). "Influence of Hematocrit Ratio on Survival of Unacclimatized Dogs at Simulated High Altitude." *Am J Physiol* 205: 1172-4.

Sottas, P. E., N. Robinson, et al. "The athlete's biological passport and indirect markers of blood doping." *Handb Exp Pharmacol*(195): 305-26.

Souillard, A., M. Audran, et al. (1996). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin in athletes. Blood sampling and doping control." *Br J Clin Pharmacol* 42(3): 355-64.

St-Pierre, J., J. A. Buckingham, et al. (2002). "Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain." *J Biol Chem* 277(47): 44784-90.

St-Pierre, J., S. Drori, et al. (2006). "Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators." *Cell* 127(2): 397-408.

St-Pierre, J., J. Lin, et al. (2003). "Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells." *J Biol Chem* 278(29): 26597-603.

Stadman, E. R. (1992). "Protein oxidation and aging." *Science* 257: 1220-1224.

Staudte, H. W., G. U. Exner, et al. (1973). "Effects of short-term, high intensity (sprint) training on some contractile and metabolic characteristics of fast and slow muscle of the rat." *Pflugers Arch* 344(2): 159-68.

Sterin-Borda, L., A. C. Barcelo, et al. (2003). "Erythropoietin improves cardiac contractility in post-hypoxic mice." *Br J Haematol* 121(1): 180-6.

Stray-Gundersen, J., R. F. Chapman, et al. (2001). "'Living high-training low" altitude training improves sea level performance in male and female elite runners." *J Appl Physiol* 91(3): 1113-20.

Sugden, M. C. and M. J. Holness (2003). "Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284(5): E855-62.

Sutter, C. H., E. Laughner, et al. (2000). "Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9): 4748-53.

Tadibi, V., C. Dehnert, et al. (2007). "Unchanged anaerobic and aerobic performance after short-term intermittent hypoxia." *Med Sci Sports Exerc* 39(5): 858-64.

Takekura, H. and T. Yoshioka (1990). "Different metabolic responses to exercise training programmes in single rat muscle fibres." *J Muscle Res Cell Motil* 11(2): 105-13.

Tarricone, E., C. Scapin, et al. (2008). "Cellular distribution of Hsp70 expression in rat skeletal muscles. Effects of moderate exercise training and chronic hypoxia." *Cell Stress Chaperones* 13(4): 483-95.

Thevis, M., G. Opfermann, et al. (2000). "Detection of the plasma volume expander hydroxyethyl starch in human urine." *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 744(2): 345-50.

Thomsen, J. J., R. L. Rentsch, et al. (2007). "Prolonged administration of recombinant human erythropoietin increases submaximal performance more than maximal aerobic capacity." *Eur J Appl Physiol* 101(4): 481-6.

Thomson, J. M., J. A. Stone, et al. (1982). "O₂ transport during exercise following blood reinfusion." *J Appl Physiol* 53(5): 1213-9.

Tolbert, N. E. and E. Essner (1981). "Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes." *J Cell Biol* 91(3 Pt 2): 271s-283s.

Truijens, M. J., F. A. Rodriguez, et al. (2008). "The effect of intermittent hypobaric hypoxic exposure and sea level training on submaximal economy in well-trained swimmers and runners." *J Appl Physiol* 104(2): 328-37.

Valle, I., A. Alvarez-Barrientos, et al. (2005). "PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells." *Cardiovasc Res* 66(3): 562-73.

Van Putten, L. M. (1958). "The life span of red cells in the rat and the mouse as determined by labeling with DFP32 in vivo." *Blood* 13(8): 789-94.

Verbrugge, D. J. and L. T. Goodnough (1994). "The effect of recombinant human erythropoietin treatment on the endurance performance of Sprague-Dawley rats." *Scand J Clin Lab Invest* 54(1): 55-9.

Viña, J., M. C. Gomez-Cabrera, et al. (2000). "Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants." *IUBMB Life* 50(4-5): 271-7.

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.

WADA (2008). "The 2008 prohibited list of Substances international standard." www.wada-ama.org: 1-11.

WADA (2011). "The 2011 prohibited list of Substances international standard." www.wada-ama.org: 1-11.

Wagner, P. D. (1996). "Determinants of maximal oxygen transport and utilization." *Annu. Rev. Physiol.* 58: 21-50.

Wang, G. L., B. H. Jiang, et al. (1995). "Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(12): 5510-4.

Wang, L., M. Chopp, et al. (2008). "Neural progenitor cells treated with EPO induce angiogenesis through the production of VEGF." *J Cereb Blood Flow Metab* 28(7): 1361-8.

Wang, L., Z. Zhang, et al. (2004). "Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats." *Stroke* 35(7): 1732-7.

Wehrlin, J. P. and B. Marti (2006). "Live high-train low associated with increased haemoglobin mass as preparation for the 2003 World Championships in two native European world class runners." *Br J Sports Med* 40(2): e3; discussion e3.

Wehrlin, J. P., P. Zuest, et al. (2006). "Live high-train low for 24 days increases hemoglobin mass and red cell volume in elite endurance athletes." *J Appl Physiol* 100(6): 1938-45.

Wilber, R. L. (2007). "Application of altitude/hypoxic training by elite athletes." *Med Sci Sports Exerc* 39(9): 1610-24.

Wilber, R. L. (2007). "Introduction to altitude/hypoxic training symposium." *Med Sci Sports Exerc* 39(9): 1587-9.

Wilber, R. L., J. Stray-Gundersen, et al. (2007). "Effect of hypoxic "dose" on physiological responses and sea-level performance." *Med Sci Sports Exerc* 39(9): 1590-9.

Woo, S., W. Krzyzanski, et al. (2006). "Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of recombinant human erythropoietin after intravenous and subcutaneous administration in rats." *J Pharmacol Exp Ther* 319(3): 1297-306.

Woo, S., W. Krzyzanski, et al. (2007). "Target-mediated pharmacokinetic and pharmacodynamic model of recombinant human erythropoietin (rHuEPO)." *J Pharmacokinetic Pharmacodyn* 34(6): 849-68.

Winearls, C. G., D. O. Oliver, et al. (1986). "Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anaemia of patients maintained by chronic haemodialysis." *Lancet* 2(8517): 1175-8.

Wolf, S. P., A. Gamer, et al. (1986). "Free radicals, lipids and protein degeneration." *Trends Biochem. Sci.* 11: 27-31.

Wood, C. M., R. W. Wilson, et al. (1998). "Responses of an Amazonian teleost, the tambaqui (*Colossoma macropomum*), to low pH in extremely soft water." *Physiol Zool* 71(6): 658-70.

Wozniak, A., G. Drewa, et al. (2001). "Effect of altitude training on the peroxidation and antioxidant enzymes in sportsmen." *Med Sci Sports Exerc* 33(7): 1109-13.

Xiaoxia Li, P. S. (2004). "Effects of intermittent hypoxia training on hematological indices and aerobic performance." *Journal of Exercise Science and Fitness* 2(1): 47-50.

Xiong, Y., A. Mahmood, et al. (2009). "Erythropoietin improves histological and functional outcomes following traumatic brain injury in mice in the absence of the neural erythropoietin receptor." *J Neurotrauma*.

Yang, Y., A. Creer, et al. (2005). "Time course of myogenic and metabolic gene expression in response to acute exercise in human skeletal muscle." *J Appl Physiol* 98(5): 1745-52.

Yoshikawa, T., Y. Furukawa, et al. (1982). "Experimental hypoxia and lipid peroxide in rats." *Biochem Med* 27(2): 207-13.

Zhang, Y., Y. Xiong, et al. (2009). "Therapeutic effects of erythropoietin on histological and functional outcomes following traumatic brain injury in rats are independent of hematocrit." *Brain Res* 1294: 153-64.

Zivny, J., T. Travnicek, et al. (1971). "Effect of exercise on production of erythropoietin in normal and hypoxic rats." *Am J Physiol* 220(2): 329-32.