

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

EFFECTO DEL ENTRENAMIENTO FÍSICO SOBRE LA
MITOCONDRIOGÉNESIS Y LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS
ANTIOXIDANTES EN EL MÚSCULO DE ANIMALES
JÓVENES, VIEJOS Y KNOCKOUT DE PGC-1 ALPHA.

ANA LUCÍA NASCIMENTO

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 22 d'octubre de 2010 davant un tribunal format per:

- Dr. Federico Pallardó Calatayud
- Dr. Manuel Castillo Garzón
- Dr. Josep Antoni Tur Mari
- Dra. Asunción Gandía Balaguer
- Dra. M^a Jesús Sanz Ferrando

Va ser dirigida per:

Dr. José Viña Ribes

Dra. M^a Carmen Gómez Cabrera

©Copyright: Servei de Publicacions
Ana Lucía Nascimento

Dipòsit legal: V-3436-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-7983-7

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA



**EFFECTO DEL ENTRENAMIENTO FÍSICO
SOBRE LA MITOCONDRIOGÉNESIS Y LA
EXPRESIÓN DE ENZIMAS
ANTIOXIDANTES EN EL MÚSCULO DE
ANIMALES JÓVENES, VIEJOS Y
KNOCKOUT DE PGC-1 α .**

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

Ana Lúcia Nascimento

DIRIGIDA POR:

PROF. D. JOSÉ VIÑA RIBES

PROF. DÑA. MARI CARMEN GÓMEZ-CABRERA

VALENCIA, 2010



FACULTAD DE MEDICINA Y
ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

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

Prof. **D. Mari Carmen Gómez Cabrera**, Profesora Ayudante Doctor de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que Dña. Ana Lucia Nascimento, Licenciada en Fisioterapia por la "Fundação para o Desenvolvimento das Ciências" (Salvador de Bahía, Brasil) ha realizado bajo su dirección la presente tesis titulada.

"EFECTO DEL ENTRENAMIENTO FÍSICO SOBRE LA MITOCONDRIOGÉNESIS Y LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN EL MÚSCULO DE ANIMALES JÓVENES, VIEJOS Y KNOCKOUT DE PGC-1 α "

para la obtención del título de Doctora.

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

Valencia, a de de 2010

Fdo. Prof. D. José Viña Ribes

Fdo. Prof. D. Mari Carmen Gómez Cabrera

A Meri

A Tom

AGRADECIMIENTOS

El apartado más especial de la tesis está en los agradecimientos. Es como hacer una película de todo lo que ha pasado durante los 3 años del doctorado y recordar la influencia de cada persona en esta larga caminata. Innumerables personas han contribuido al desarrollo de mi tesis: al responder una duda, al ayudar en algún cálculo, en la parte experimental, en los momentos de ocio (tan importantes cuando estamos lejos de casa), y hasta en el abrazo y apoyo cuando creemos que no seremos capaces de seguir adelante. Muchas gracias a todos los miembros del Departamento de Fisiología.

En particular, me gustaría agradecer:

Al **Dr. Viña**, por haber sido tan amable y receptivo al responder a mis primeros correos. Gracias por haberme dejado formar parte de tu grupo. He aprendido muchas cosas en las reuniones de los viernes, tanto sobre investigación como sobre la vida. Ha sido una experiencia inolvidable Pepe.

A **M.Carmen**. Meri, es extremadamente difícil agradecerte toda tu ayuda en tan pocas líneas. Tuve suerte en convivir contigo durante estos 3 años. Me has impresionado con tu sentido de organización en el trabajo, por tu dinamismo y espíritu de grupo, siempre preocupada con cada uno de nosotros. Además de una excelente jefa, has sabido equilibrar la balanza en ambas direcciones, nos has sabido enfocar en nuestros objetivos. Siempre te has mostrado amiga, comprensiva y con una humor contagiante.

Gracias Meri por todo tu cariño y ayuda. Tienes un sitio especial en mi corazón.

Al **MARAVILLOSO** grupo del ejercicio. **Lele**, gran parte de esa tesis debo a ti. Tus enseñanzas sobre las técnicas de laboratorio, los aburridos entrenamientos, la biogénesis mitocondrial, los puzzles de membranas de western fueron extraordinarios. En cada página de esta tesis hay un poco de todo eso, hay un poco de ti. Tú siempre has estado muy próxima, muy preocupada por mi, has sido una amiga. Gracias por dedicarte tanto tiempo a mi. Muchos "muas". **Vladi**, puedo decir que tengo un GRAN AMIGO sudamericano en tierras europeas. Compartimos muchas cosas durante estos 3 años. Desde sacrificio de animales, experimentos, entrenamientos, pruebas de resistencia donde he aprendido algo de estadística, poesía y filosofía (somos energía), hasta el piso. Fue genial estar contigo tanto en el laboratorio como en el piso. Si ninguna tesis hubiera sido escrita durante este tiempo, el hecho de haberte conocido ya habría valido mi estancia en Valencia. Eres muy especial para mi. **Fabián**, tienes el corazón del tamaño de Brasil. Muchísimas gracias por los consejos, por ayudarme con las becas, por haber sido tan generoso y gentil conmigo. He aprendido mucho compartiendo el lab contigo, la ciencia te necesita en el mundo de la investigación. Tu tienes el dom. Ojalá que tengas algún Tour en Brasil y vengas a visitarnos en breve. **Fred**, fueron pocos meses conviviendo contigo pero tu ayuda fue fundamental para finalizar mi tesis. He disfrutado de compartir los experimentos contigo, de discutir

sobre el futuro de Brasil y del mundo, de conocer un poco más sobre la cultura francesa y de las infintas risas de tu VALE, VALE. Fuíste muy amable conmigo. Gracias.

A **Fede Pallardó y a Juan Sastre**, por la atención y por preocuparse por mi. Siempre me habéis recibido con una sonrisa. Gracias por ser tan gentiles.

A **Juan Gambini**, te agradezco tu paciencia en mis inicios, tus enseñanzas sobre fisiología y radicales libres. Lo único que no echaré de menos del tiempo que he pasado contigo es lo de hacer las papillas de moscas y las papillas de vino. Fuiste el primero en introducirme en el encantador mundo de la fisiología. Te lo agradezco mucho.

A **Raúl**, gracias por enseñarme otra idioma, el andaluz. Me ha encantado trabajar contigo, compartir los momentos de ciencia y los momentos de desayuno. Las clases de doctorado no serían tan divertidas sin ti. **Rubén**, me enseñaste los cuidados de las ratas y a perder el miedo a cogerlas. Compartimos también muchos cafés entre el montaje de las ruedas de ejercicio voluntario. Gracias por tu paciencia y cuidado.

A **Jelena**, por tu ayuda con los experimentos de linfocitos. Gracias a ellos nació una gran amistad. Muchas gracias por el oído y hombro amigo, por escucharme y aconsejarme. He aprendido mucho contigo. A **Nancy**, por toda la ayuda con el entramado de números y datos estadísticos. Gracias por estar siempre receptiva, por tu ayuda y tus enseñanzas.

A **José Luis y a Carme** gracias por haberme hecho disfrutar de momentos de relax fuera del laboratorio. Los desayunos y comidas fueron muy especiales a vuestro lado.

A **Chelo, Ana Lloret, Soraya, Marco y Alessandro** muchas gracias por vuestra receptividad en el grupo y por estar siempre dispuestos a solucionar una duda.

A las **secres**, el puente entre Brasil y España. Gracias por haber respondido desde el principio a todos mis correos tan amablemente. Desde entonces siempre he creído que los españoles son muy majos.

A **Consuelo y a los técnicos del laboratorio**, siempre encantadoras y alegres conmigo. Me enseñasteis la importancia del orden en el trabajo.

A **Angel y Sonia**, por el tiempo que han dedicado a poner a punto el protocolo del músculo en el confocal. Habéis sido muy atentos. Gracias!

Aos amigos brasileiros que estão na Espanha, **Edi e Felão, Julie e Luizão**. Vocês foram o combustível para essa tese, afinal o que seriam os meus finais de semana sem tê-los por perto? Sentirei saudade dos infinitos bons momentos que passamos juntos. Voltem logo. A meus amigos brasileiros que estão no Brasil, **Juli, Carol, Cissa, Isa, Tiara, Dênia e Carla**. Por estarem sempre do meu lado, ainda que distante, por apoiarem minhas decisões e pelo carinho ao longo desses anos que estive ausente. Amo vocês.

A minha família. A meus **pais**, pelo apoio financeiro e por entender a importância que era para mim fazer o doutorado. A minha irmã **Liu**, pelo incentivo incessante em estudar em outro país, pelo carinho e paz de espírito que me passava nos momentos de desespero e impaciência. A meu irmão **Juju**, pela alegria e bom humor que sempre me recebeu, por estar sempre do meu lado. A minha cunhada linda, **Mil**, sempre preocupada e atenciosa comigo. A **Mano**, por ter reaparecido em um momento muito especial na minha vida. Não quero te perder de vista nunca mais. A meu sogro, **Tuninho**, e a minha sogra, **Nanja**, que mesmo com as lágrimas nas despedidas sempre me apoiaram a estudar e a terminar o doutorado.

Aos meus dois amores, **Tom e Guilherme**. Nada disso seria possível, estaria concretizado se eu não tivesse você, Tom, a meu lado. Sempre me deixou livre para escolher o melhor para mim, me apoiando nas minhas decisões. Quero envelhecer a teu lado. Guiga, você mudou o sentido da minha vida, ser sua mãe foi a coisa mais especial que poderia ter me acontecido. Amo vocês.

ÍNDICE GENERAL

I-INTRODUCCIÓN	1-73
1-Radicales Libres	1-16
1.1- Concepto de Radical Libre	1-2
1.2- Clases de Radicales Libres	2-3
1.3- Génesis de las ERO	3-16
1.3.1- Fuentes Exógenas	4-5
1.3.2- Fuentes Endógenas	5-16
2- Teoría del estrés Oxidativo	16-17
3- Antioxidantes	17-21
3.1- Antioxidantes Enzimáticos	18-20
3.1.1- Superóxido Dismutasa	18-19
3.1.2- Glutación Peroxidasa	19-20
3.1.3- Catalasa	20-21
4- Ejercicio Físico y Estrés Oxidativo	21-39
4.1- Radicales Libres y Ejercicio	22-39
4.1.1- Radicales Libres y Ejercicio Físico Agotador	23-25
4.1.2- Posibles Mecanismo de Generación de Radicales Libres Durante el Ejercicio	26-39

5- La Mitocondria	39-50
5.1- Regulación de la estructura de la organela	40-41
5.2- Biogénesis de la membrana	42-43
5.3- Remodelamiento Mitocondrial en la diferenciación y el desarrollo muscular	43-44
5.4- Biogénesis Mitocondrial	44-50
5.4.1- Regulación de la biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético	44-49
5.4.2- Respuesta de la expresión de genes a la actividad contráctil	49-50
6- PGC-1	50-56
6.1- PGC-1 α y la Termogénesis	52
6.2- PGC-1 α y el Metabolismo de la Glucosa	53-54
6.3- PGC-1 α y el Cambio del Tipo de Fibra Esquelética	55-56
7- NRF-1	56-57
8- Citocromo c	58-60
9- Citocromo c oxidasa	60-61
10- Cadena de Importación de Proteínas	62-63
11- Sarcopenia Senil	63-73

II- OBJETIVOS	74-75
III- MATERIALES Y MÉTODOS	76-101
A-Materiales	76-88
1- Estudio con animales de experimentación	76-85
1.1- Entrenamiento Durante 3 Semanas	76-81
1.1.1- Entrenamiento de Ratas Jóvenes	77-78
1.1.2- Entrenamiento de Ratas Viejas	79-81
1.2- Entrenamiento Durante 5 Semanas	81-85
2- Aparatos	85-87
3- Reactivos	87-88
B- Métodos	89-101
1- Método para determinar la concentración de proteínas: método lowry	89-90
2- extracción de proteínas citoplasmáticas a partir del tejido muscular.	91-92
3- Estudio de la expresión de proteínas relacionadas con la biogénesis mitocondrial; la miogénesis; genes antioxidantes, actina y tubulina, mediante	93-96

electroforesis en geles de poliacrilamida-	
sds y posterior western blotting.	
4- Estudio de la Oxidación de Proteínas en	96-100
Músculo Esquelético y en Plasma.	
5- Análisis estadístico de los Resultados.	100-101
IV- RESULTADOS	102-133
1. Estudio del efecto de un protocolo de	102-104
entrenamiento aeróbico de 3 semanas	
sobre el rendimiento físico en ratas jóvenes	
y viejas.	
1.1- Prueba de resistencia en ratas jóvenes	102-103
entrenadas 3 semanas.	
1.2- Prueba de resistencia en ratas viejas	103-104
entrenadas 3 semanas.	
2- Estudio del estrés oxidativo asociado un	104-111
protocolo de entrenamiento en ratas	
jóvenes y viejas	
2.1- Estudio del efecto del entrenamiento sobre	105-106
la oxidación de proteínas en plasma de ratas	
jóvenes y viejas tras un protocolo de	

entrenamiento aeróbico.	
2.2- Estudio del efecto del entrenamiento sobre la oxidación de proteínas en músculo esquelético de ratas jóvenes y viejas tras un protocolo de entrenamiento aeróbico	106-107
2.3- Estudio del efecto del entrenamiento en la activación de la enzima xantina oxidasa en plasma de ratas jóvenes y viejas sometidas a un entrenamiento aeróbico de 3 semanas.	108-109
2.4- Estudio de la expresión de enzimas antioxidantes en el músculo esquelético de ratas jóvenes y viejas sometidas a un protocolo de entrenamiento aeróbico de 3 semanas, por la técnica del western-blotting.	109-111
2.4.1- Expresión de la Mn-sod.	109-110
2.4.2- Expresión de la catalasa.	111
3- Estudio de la cascada de biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético de ratas jóvenes y viejas sometidas al un protocolo de entrenamiento aeróbico	112-118

durante 3 semanas.

3.1- Estudio de la expresión de PGC-1 α .	112-113
3.2- Estudio de la expresión de NRF-1.	113-114
3.3- Estudio de la expresión de Tfam.	115
3.4- Estudio de la expresión de citocromo c.	116-117
3.5- Estudio de la expresión de la COX I.	117-118

4- Estudio del efecto del entrenamiento sobre la miogénesis en el músculo sóleo y gastrocnemio de ratas jóvenes y viejas sometidas a un protocolo de entrenamiento aeróbico de 3 semanas.

4.1- Expresión de mio D.	118-120
4.2- Expresión de miogenina.	120-122

5- Estudio del efecto de un protocolo de entrenamiento aeróbico de 5 semanas sobre el rendimiento físico de ratones silvestres y KO de PGC-1 α .

5.1- Prueba de resistencia en ratones silvestres.	122-123
5.2- Prueba de resistencia en ratones KO de PGC-1 α .	123-124

6- Estudio del efecto del entrenamiento sobre la oxidación de proteínas en gastrocnemio de ratones silvestres y KO de PGC-1α sometidas a un protocolo de entrenamiento aeróbico de 5 semanas.	124-125
7- Estudio de la expresión de enzimas antioxidantes en el músculo de ratones silvestres y KO de PGC-1α sometidos a un protocolo de entrenamiento aeróbico de 5 semanas.	126-127
7.1- Expresión de la Mn-sod.	126
7.2- Expresión de la catalasa.	127
8- Estudio de la biogénesis mitocondrial en los músculos de ratones silvestres y KO de PGC-1α sometidos al un protocolo de entrenamiento aeróbico durante 5 semanas.	128-133
8.1- Estudio de la expresión de PGC-1 α .	128-129
8.2- Estudio de la expresión de NRF-1.	129-130
8.3- Estudio de la expresión de Tfam.	130-131

8.4- Estudio de la expresión de citocromo c.	131-132
8.5- Estudio de la expresión de la Cox I.	132-133
V- DISCUSIÓN	134-178
1- Envejecimiento y Mitocondriogénesis.	134-137
2- Mitocondriogénesis y ejercicio físico.	138-139
Papel de las EROS como señales.	
3- Disfunción de PGC-1α asociado al envejecimiento en el músculo esquelético. Comparación con el modelo de animales KO de PGC-1α.	140-154
4- Entrenamiento aeróbico y rendimiento en animales viejos y KO de PGC-1α.	154-158
5- Estrés oxidativo muscular y envejecimiento. Comparación con el modelo de animales KO de PGC-1α.	159-163
6- Entrenamiento aeróbico y expresión de enzimas antioxidantes en animales viejos y KO de PGC-1α.	163-169
7- Fuentes de radicales libres en el músculo esquelético de los animales	169-173

jóvenes y viejos durante el entrenamiento físico.

8- Estudio del efecto del entrenamiento 174-178

sobre la miogénesis en el músculo sóleo y

gastrocnemio de ratas jóvenes y viejas

sometidas a un entrenamiento aeróbico de

3 semanas.

VI- CONCLUSIONES 179-180

VII- BIBLIOGRAFIA 181-223

ÍNDICE DE TABLAS

I- INTRODUCCIÓN

Tabla I.1- Principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.	3
---	---

II- OBJETIVOS

III- MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla III.1: Protocolo de adaptación al tapiz rodante para ratas jóvenes	77
--	----

Tabla III.2: Protocolo de 3 semanas de entrenamiento con ratas jóvenes.	78
---	----

Tabla III.3: Protocolo de adaptación al tapiz rodante para ratas viejas.	79
--	----

Tabla III.4: Protocolo de 3 semanas de entrenamiento con ratas viejas.	80
--	----

Tabla III.5: Protocolo de adaptación al tapiz rodante para ratones	83
--	----

Tabla III.6: Protocolo de entrenamiento de ratones silvestres y KO de PGC-1 α .	84
--	----

IV- RESULTADOS

V- DISCUSIÓN

VI- CONCLUSIÓN

VII- BIBLIOGRAFIA

ÍNDICE DE FIGURAS

I- INTRODUCCIÓN

Figura I.1- La cadena de transporte electrónico mitocondrial.	5
Figura I.2- Sistemas de degradación de purinas.	12
Figura I.3- Sistemas antioxidantes celulares.	21
Figura I.4- Producción de radicales libres por la mitocondria en el ejercicio físico.	23
Figura I.5- Imagen esquematizada de una mitocondria con sus estructuras principales.	27
Figura I.6- Concepto de integración de estímulos fisiológicos a respuestas fenotípicas.	45
Figura I.7- Mejora de la sensibilidad de la respiración mitocondrial al ADPI debido al entrenamiento o a otros modelos de actividad contráctil crónica.	47
Figura I.8- Importancia de PGC-1 α en la biología celular.	51

Figura I.9: Representación gráfica de la expresión de citocromo c en el músculo durante la actividad contráctil. 59

Figura I.10: MRFs y su actuación en el desarrollo muscular. 72

II- OBJETIVOS

III- MATERIALES Y MÉTODOS

IV- RESULTADOS

Figura IV.1: Prueba de resistencia: ratas jóvenes entrenadas 3 semanas. 103

Figura IV.2: Prueba de resistencia: ratas viejas entrenadas 3 semanas. 104

Figura IV.3: Proteínas oxidadas en plasma de ratas jóvenes y viejas entrenadas 3 semanas. 106

Figura IV.4: Proteínas oxidadas en gastrocnemio de ratas jóvenes y viejas entrenadas 3 semanas. 107

Figura IV.5: Xantina oxidasa de ratas jóvenes y viejas entrenadas 3 semanas. 109

Figura IV.6: Mn-SOD en gastrocnémio de ratas jóvenes y viejas entrenadas 3 semanas.	110
Figura IV.7: Catalasa en gastrocnémio de ratas jóvenes y viejas entrenadas 3 semanas.	111
Figura IV.8: Expresión de PGC-1 α en músculo esquelético de ratas jóvenes y viejas entrenadas 3 semanas.	113
Figura IV.9: Expresión de NRF-1 en músculo esquelético de ratas jóvenes y viejas entrenadas 3 semanas.	114
Figura IV.10: Expresión de Tfam en músculo esquelético de ratas jóvenes y viejas entrenadas 3 semanas.	115
Figura IV.11: Expresión de citocromo c en músculo esquelético de ratas jóvenes y viejas entrenadas 3 semanas.	117
Figura IV.12: Expresión de COX I en músculo esquelético de ratas jóvenes y viejas entrenadas 3 semanas.	118
Figura IV.13: Expresión de Mio D en sóleo de ratas jóvenes y viejas entrenadas 3 semanas.	119

Figura IV.14: Expresión de Mio D en gastrocnémio de ratas jóvenes y viejas entrenadas 3 semanas.	120
Figura IV.15: Expresión de miogenina en sóleo de ratas jóvenes y viejas entrenadas 3 semanas.	121
Figura IV.16: Expresión de miogenina en gastrocnémio de ratas jóvenes y viejas entrenadas 3 semanas.	122
Figura IV.17: Prueba de resistencia en ratones silvestres de PGC-1 α .	123
Figura IV.18: Prueba de resistencia en ratones knockout de PGC-1 α .	124
Figura IV.19: Expresión de proteínas oxidadas en gastrocnemio de ratones silvestres y knockout de PGC-1 α .	125
Figura IV.20: Expresión de Mn-SOD en músculo esquelético de ratones silvestres y knockout de PGC-1 α .	126
Figura IV.21: Expresión de catalasa en músculo esquelético de ratones silvestres y knockout de PGC-1 α .	127

Figura IV.22: Expresión de PGC-1 α en músculo esquelético de ratones silvestres y knockout de PGC-1 α .	129
Figura IV.23: Expresión de NRF-1 en músculo esquelético de ratones silvestres y knockout de PGC-1 α .	130
Figura IV.24: Expresión de Tfam en músculo esquelético de ratones silvestres y knockout de PGC-1 α .	131
Figura IV.25: Expresión de citocromo c en músculo esquelético de ratones silvestres y knockout de PGC-1 α .	132
Figura IV.26: Expresión de COX II en músculo esquelético de ratones silvestres y knockout de PGC-1 α .	132

V- DISCUSIÓN

Figura V.1: Gráficas representativas de la expresión de PGC-1 α en animales jóvenes y viejos, silvestres y KO de PGC-1 α .	143
Figura V.2: Gráficas representativas de la expresión de NRF-1 en animales jóvenes y viejos, silvestres y	145

KO de PGC-1 α .

Figura V.3: Gráficas representativas de la expresión de Tfam en animales jóvenes y viejos, silvestres y KO de PGC-1 α . 148

Figura V.4: Gráficas representativas de la expresión de citocromo c en animales jóvenes y viejos, silvestres y KO de PGC-1 α . 151

Figura V.5: Gráficas representativas de la expresión de COX I en animales jóvenes y viejos, silvestres y KO de PGC-1 α . 153

Figura V.6: Gráficas representativas de la prueba de resistencia en animales jóvenes y viejos 156

Figura V.7: Gráficas representativas de la prueba de resistencia en animales silvestres y knockout de PGC-1 α 157

Figura V.8: Esquema del efecto del entrenamiento aeróbico sobre la cascada de señalización implicada en el proceso biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético en animales KO de PGC-1 α y animales viejos. 158

Figura V.9: Gráficas representativas de la carbonilación de proteínas musculares en animales jóvenes y viejos, silvestres y KO de PGC-1 α .	163
Figura V.10: Gráficas representativas de la expresión de la Mn-SOD y catalasa en animales jóvenes y viejos.	166
Figura V.11: Gráficas representativas de la expresión de Mn-SOD y catalasa en animales silvestres y KO de PGC-1 α .	168
Figura V.12: Gráficas representativas de la expresión de MioD y miogenina en el músculo sóleo de animales jóvenes y viejos.	176
Figura V.13: Gráficas representativas de la expresión de MioD y miogenina en el músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.	177

VI- CONCLUSIONES

VII- BIBLIOGRAFIA

ABREVIATURAS

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- ADP:** Adenosín-5'-difosfato.
- ADNmt:** ADN mitocondrial.
- AICAR:** 5'-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside.
- AMP:** Adenosín-5'-monofosfato.
- AMPK:** Protein kinasa estimulada por el AMP.
- APS:** Persulfato amónico.
- ARN:** Ácido ribonucleico.
- ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero.
- ARNr:** Ácido ribonucleico ribosomal.
- ARNt:** Ácido ribonucleico de transferencia.
- ATP:** Adenosín-5'-trifosfato.
- BSA:** Albúmina Suero Bovino.
- BSO:** L-Butionina-(S,R)-Sulfoximina.
- CDNB:** Cloro dinitrobenceno.
- CHES:** 2-(N-hidroxietil)piperacina-N'-(2-ácido etanosulfónico).
- CK:** Creatin Kinasa.
- CK2:** Caseín kinasa II.
- COMPLEJO TIM:** Complejo receptor translocasa de la membrana interna mitocondrial.
- COMPLEJO TOM:** Complejo receptor translocasa de la membrana externa mitocondrial.
- COX:** Citocromo oxidasa.
- Cu,Zn-SOD:** Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc.
- DMSO:** Dimetil sulfóxido.
- DTT :** _{DL}-Ditionitrosol.
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético.
- EF:** Ejercicio físico.
- Erk1/2^{MAPK}:** Kinasas activadas por señales extracelulares 1 y 2.
- ERN:** Especies Reactivas de Nitrógeno.
- ERO:** Especies Reactivas de Oxígeno.
- FAD:** Flavín adenín dinocluótido.
- Fe-SOD:** Superóxido dismutasas dependientes de hierro.
- GLUT:** Transportadores de glucosa

- GPx:** Glutación peroxidasa.
- GS:** Glutación sintetasa.
- GSH:** Glutación reducido.
- GSSG:** Glutación oxidado.
- H₂O₂:** Peróxido de hidrógeno.
- HEPES:** N-(2-hidroexietil)piperacina-N'-(2-ácido etanosulfónico).
- HOCl:** Ácido hipocloroso.
- HSP:** Proteína de estrés térmico.
- IGF-1:** Factor de crecimiento insulínico.
- IL-1:** Interleucina-1.
- IL-6:** Interleucina-6.
- IMP:** Inosina monofosfato.
- ID:** Inhibidores de la diferenciación.
- JNK^{MAPK}:** c-Jun NH2-Terminal Kinasa.
- Kb:** Kilobase.
- Kd:** Kilodalton.
- KO:** Deficientes.
- KOH:** Hidróxido potásico.
- MAPK:** Proteína kinasas activadas por mitógenos
- MEK1:** MAPK/ERK kinasa.
- MHC:** Cadena pesada de la miosina.
- mmHg:** Milímetros de mercurio.
- Mn-SOD:** Superóxido dismutasa dependiente de manganeso.
- MPP:** Peptidasa procesadora mitocondrial.
- MRF:** Factores reguladores de la miogénesis.
- MSF:** Factor estimulador de proteínas.
- NEM:** N-etilmaleimida.
- NO^{*}:** Óxido nítrico.
- NO₂^{*}:** Radical nitrógeno dióxido
- NO₂Cl:** Cloro nitrilo.
- NOS:** Óxido nítrico sintasa (e-NOS, NOS endotelial; iNOS, NOS inducible; nNOS, NOS neuronal).
- NRF 1 y 2:** Factor de respiración mitocondrial 1 y 2.
- ¹O₂:** Oxígeno singlete.

- O₂^{•-}** : Anión superóxido.
- OH[•]**: Radical hidroxilo.
- ONOO⁻**: Peroxinitrito.
- OR**: Óxidoreductasa.
- p38^{MAPK}**: Protein kinasa activada por estrés.
- PBS**: Tampón fosfato salino.
- PGC-1 α** : Coactivador-1 α del receptor- γ activado por proliferación del peroxisoma PPAR γ .
- PLA₂** : Fosfolipasa A₂.
- RL**: Radicales libres.
- ROO[•]**: Radical peroxilo.
- RPE**: Resonancia Paramagnética de electrones.
- SBF**: Suero bovino fetal.
- SDS**: Sodio dodecil sulfato
- SOD**: Superóxido dismutasa.
- TBS**: Tris tampón salino.
- TBS-T**: Tris Tampón Salino con Tween 20.
- TEMED**: N,N,N,N'-tetrametilnetilenodiamina.
- Tfam**: Factor de transcripción mitocondrial A.
- TRIS**: 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol.
- Tween 20**: Polioxietileno sorbitan monoleato.
- v/v**: volumen/volumen.
- VO₂máx**: Consumo máximo de oxígeno.
- XDH**: Xantina deshidrogenasa.
- XO**: Xantina oxidasa.
- XOR**: Xantina oxidoreductasa.

INTRODUCCIÓN

1-RADICALES LIBRES

1.1. CONCEPTO DE RADICAL LIBRE

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

Estas moléculas o átomos tremendamente reactivos, se encuentran implicados en el inicio y desarrollo de diversas enfermedades (Gutteridge, 1993). La evidencia del papel patológico de estos compuestos ha dado lugar a numerosas vías de investigación con el fin de desarrollar captadores, inhibidores enzimáticos o moduladores de los mismos. En el medio biológico, los radicales libres son compuestos generalmente oxigenados y se les llaman especies reactivas de oxígeno (ERO). Debido a que los organismos existen y se desarrollan en presencia de oxígeno, están asociados con la generación de estas ERO, que son tóxicas y se consideran responsables del daño oxidativo de macromoléculas biológicas como el ADN, lípidos, carbohidratos y proteínas (Halliwell & Gutteridge, 1989; Sies, 1993; Halliwell, 1996). Se han visto implicadas en muchos procesos patológicos como algunos cánceres, diabetes (Okamoto, 1985; Reardon *et al.*, 1992), patologías cardiovasculares (Byers, 1993), procesos reumáticos (Wolf *et al.*, 1986), patologías gastroentéricas y afecciones

broncopulmonares (Slade *et al.*, 1993), así como en procesos neurodegenerativos como la Enfermedad de Alzheimer (Cross *et al.*, 1987). También están implicados en procesos fisiológicos como en el envejecimiento (Pacifi & Davies, 1991; Bondy, 1992), el daño causado por el ejercicio físico agotador (Sastre *et al.*, 1992), y otros.

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

1.2. 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.1. Principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

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

1.3. GÉNESIS DE LAS ERO

Todos los radicales libres descritos anteriormente corresponden a especies cuya formación es endógena, pero el organismo también está expuesto a radicales libres procedentes de fuentes externas. Con la dieta son ingeridos muchos compuestos de naturaleza prooxidante, el humo del tabaco da lugar a radicales libres, así como la polución ambiental, el ozono, etc. (Ames, 1983; Pryor *et al.*, 1995; Rock *et al.*, 1996). Las especies reactivas del oxígeno pueden tener un origen endógeno o exógeno (Freeman & 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).

1.3.1. FUENTES EXÓGENAS.

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

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

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

1.3.1.3. Factores ambientales, como contaminantes aéreos fotoquímicos, hiperoxia, pesticidas, humo del tabaco, solventes, anestésicos e hidrocarburos aromáticos. Estos

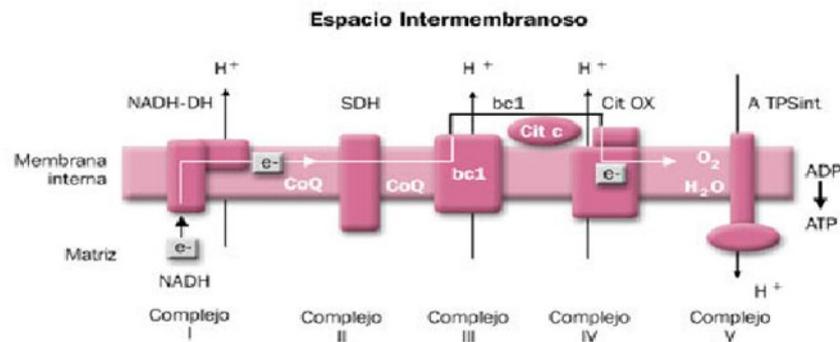
agentes, o bien poseen radicales libres, como el humo del tabaco, o bien se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación (Trush et al, 1982).

1.3.2. FUENTES ENDÓGENAS

1.3.2.1. 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.

Figura I.1- Cadena de transporte electrónico mitocondrial



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

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

El citocromo a_3 del complejo IV de la cadena respiratoria es capaz de mantener estrechamente unidas a su centro activo todas las especies parcialmente reducidas del oxígeno hasta que se completa la transferencia de 4 electrones y 4 protones al O_2 y con ello la formación de H_2O (Benzi & 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 & Moretti, 1995). Así pues, se produce $\cdot O_2^-$, que puede dismutar a su vez generando peróxido de hidrógeno, el cual es capaz de atravesar las membranas y salir al citoplasma, donde puede reaccionar con otras

especies formando diversos tipos de radicales libres (Boveris *et al.*, 1972). La producción mitocondrial del peróxido de hidrógeno fue inicialmente descrita por Jensen en 1966 (Jensen 1966). Estudios posteriores demostraron que la mayor parte del peróxido de hidrógeno mitocondrial, procedía de la dismutación del radical superóxido (Boveris *et al.* 1975).

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

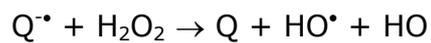
El estado 3 de la cadena de respiración mitocondrial se define como el consumo de oxígeno en presencia de sustrato y ADP, es decir, cuando tiene lugar transporte de electrones y síntesis de ATP. El estado 4 se alcanza cuando el ADP ha sido consumido, y el gradiente electroquímico generado por la cadena de transporte

electrónico no puede ser empleado en sintetizar ATP. El mantenimiento del Control Respiratorio depende de la integridad de la membrana mitocondrial, si ésta recibe algún daño, se desacopla el transporte de electrones y la síntesis de ATP. Las mitocondrias que consumen la misma cantidad de oxígeno en estado 3 que en estado 4 están desacopladas (Rickwood et al, 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 $\cdot O_2^-$ (Skulachev, 1996). Puesto que se postula que las mitocondrias se encuentran en un estado intermedio entre el estado 3 y el estado 4 (Brand & 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 $O_2\cdot^-$ por autooxidación en medios oxigenados, por lo que se propuso

que la ubisemiquinona mitocondrial era una de las fuentes de ion superóxido (Cadenas et al, 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):



1.3.2.3. 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

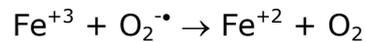
Fe^{+2} (reactivo de Fenton). Fueron Haber y Weiss quien dieron una primera explicación del mecanismo de reacción: el Fe^{+2} reduce al H_2O_2 , que a su vez se descompone en el radical hidroxilo y el ion hidroxilo (Haber & Weiss, 1932). Esto puede representarse como sigue:



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 & Gutteridge, 1986). Pero el ion férrico puede ser reducido por el ascorbato (Rawley & 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 & Klausner, 1996).

1.3.2.4. El sistema hipoxantina/xantina oxidasa

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

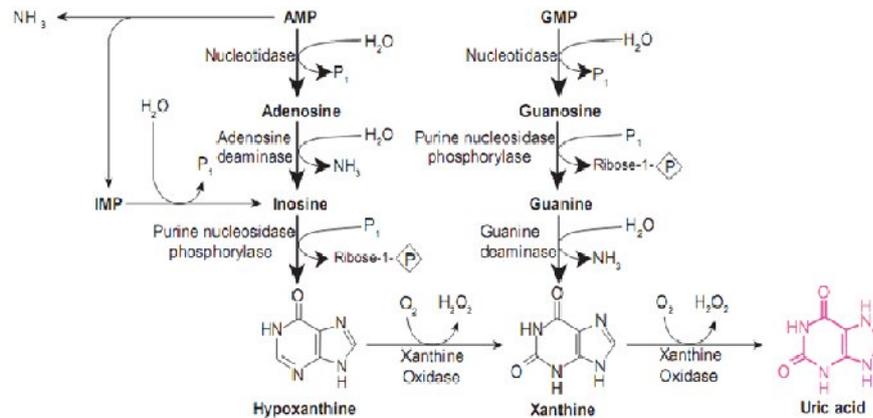
1.3.2.4.1. Estructura y función.

La XOR es un dímero consistente en dos monómeros de 150 kDa. Cada monómero contiene un dominio N-terminal monómero de 20 kDa con dos centros Fe-S, un dominio intermedio de 20 kDa que contiene FAD y

un dominio C-terminal de 85 kDa que contiene el cofactor molibdenopterina y el sitio de unión al sustrato (Hille & Massey, 1981). La XOR posee en las distintas especies un peso molecular y una estructura similar de los centros de oxidación-reducción (Hille & Nishino, 1995)

La xantina óxidoreductasa es sintetizada como xantina deshidrogenasa (XDH) y se mantiene mayoritariamente como tal en la célula, pero puede convertirse rápidamente en la forma oxidasa (XO) mediante oxidación de los residuos sulfhidrilo o mediante proteólisis. En tejidos sanos, entre un 10 y un 30% de la actividad total de la enzima procede de la forma oxidasa (Chambers *et al.*, 1985), pero en determinadas circunstancias se puede producir una conversión de la forma deshidrogenasa a la oxidasa.

Figura I.2: Sistema de degradación de purinas



1.3.2.5. Los sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico.

Estos sistemas de membrana contienen los citocromos P_{450} y b_5 , que pueden oxidar ácidos grasos insaturados (Capdevila *et al.*, 1981) y xenobióticos (Aust *et al.*, 1993). Bajo la denominación de citocromos P_{450} se engloba un número muy elevado de proteínas con grupos hemo ampliamente distribuidas entre los seres vivos. Son los más poderosos oxidantes *in vivo*, aunque también pueden actuar como agentes reductores. Son monooxigenasas que actúan activando el oxígeno molecular a especies electrofílicas de oxígeno (bien radicales o bien generadoras a su vez de radicales) que pueden ser liberadas en la célula (Dolphin, 1988; Foster & Estabrook, 1993).

1.3.2.6. Fagocitos activados.

Los fagocitos activados (neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos) poseen diversas enzimas que les permiten generar $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 como uno de los mecanismos para defenderse de los microorganismos (Babior, 1978).

1.3.2.7. Microsomas o peroxisomas.

Los microsomas o peroxisomas son una fuente importante de peróxido de hidrógeno. Poseen una

concentración elevada de oxidasas, como la D-aminoácido oxidasa y la acil-CoA oxidasa, enzimas utilizadas en la degradación de ácidos grasos y amino ácidos, que producen peróxido de hidrógeno como producto de la reacción que catalizan (Boveris *et al.*, 1972). La catalasa peroxisomal metaboliza la mayor parte del peróxido de hidrógeno formado en ellos (Freeman & Crapo, 1982; Frei, 1994). Por otro lado, el citocromo P₄₅₀ tiene un papel importante en los microsomas en la detoxificación de xenobióticos (Philpot, 1991).

1.3.2.8. Autooxidación de pequeñas moléculas.

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

1.3.2.9. Enzimas solubles y proteínas.

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

1.3.2.10. Membrana plasmática.

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

La enzima NAD(P)H-oxidasa presente en la membrana plasmática de las células fagocíticas, es una importante fuente biológica de producción de radicales

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

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

2. TEORÍA DEL ESTRÉS OXIDATIVO

La formación de cierta tasa de radicales libres es un proceso normal e inevitable (Slater, 1984), ya que son producto de infinidad de reacciones químicas imprescindibles para la vida celular. Estas especies tan reactivas, no causan daño oxidativo en condiciones normales debido a que la célula está provista de gran cantidad de mecanismos antioxidantes. Sin embargo, cuando la capacidad de los mecanismos antioxidante se ve superada por las agresiones oxidativas, nos encontramos ante un estrés oxidativo. En estas circunstancias, para paliar el daño que los pro-

oxidantes pueden causar en el organismo, está indicado protegerlo incrementando su capacidad antioxidante. Uno de los modos en que se puede conseguir esto, consiste en la administración de antioxidantes bien como fármacos, bien como complemento dietético (Ames, 1983).

3. ANTIOXIDANTES

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

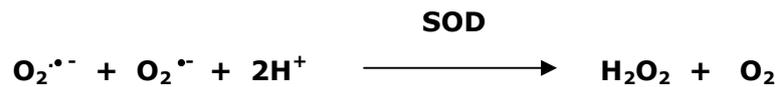
Una forma de clasificar a los antioxidantes, muy utilizada en la literatura, es desde un punto de vista bioquímico. Así, podríamos clasificarlos en antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos. Dada la importancia que en esta tesis tiene los antioxidantes enzimáticos dedicamos un apartado de la introducción a su descripción.

3.1. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

3.1.1. SUPERÓXIDO DISMUTASA

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

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



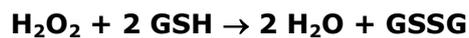
Cabe destacar que el radical superóxido es inestable en medio acuoso y dismuta espontáneamente formando H_2O_2 . Sin embargo, la velocidad de dismutación espontánea no enzimática es relativamente baja (a pH fisiológico, está alrededor $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). La catálisis de la reacción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

3.1.2. GLUTATIÓN PEROXIDASA

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

- Glutatión 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 *et al.*, 1978). Su actividad se ve muy afectada por el contenido en selenio de la dieta (Ketterer, 1986).



- Glutatión peroxidasa no selenio dependiente: sólo tiene actividad frente a peróxidos orgánicos (Ketterer, 1986). La mayor parte de la actividad glutatión peroxidasa se

encuentra en el citosol, aunque también está presente en la matriz mitocondrial (Ketterer, 1986).

3.1.3. CATALASA

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

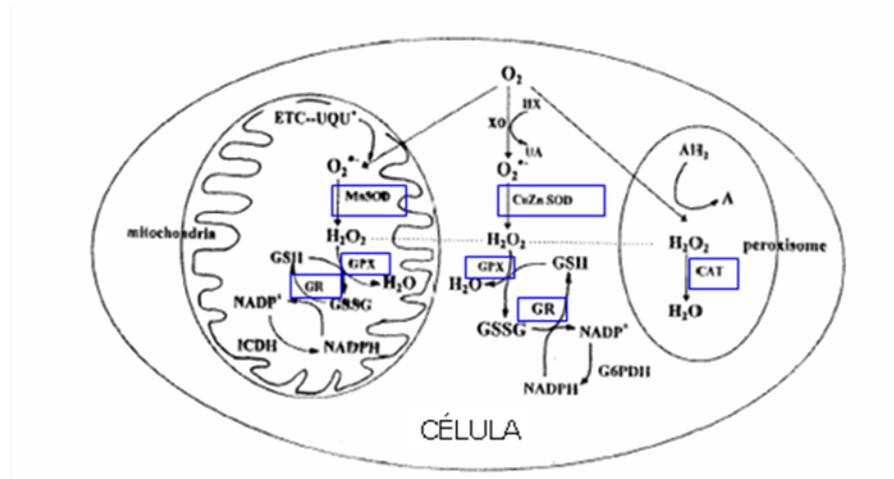


También es capaz de catalizar ciertas reacciones de peroxidación en presencia de H_2O_2 , actuando sobre algunos alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos como sustratos (Aruoma *et al.*, 1989).



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

Figura I.3- Sistemas antioxidantes celulares



4. EJERCICIO FÍSICO Y ESTRÉS OXIDATIVO.

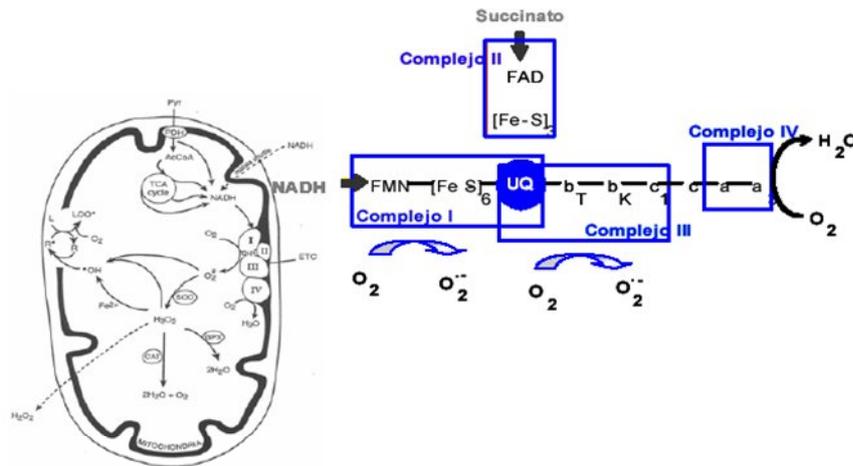
El ejercicio físico (EF) es una subcategoría de la actividad física, que al ser planificada, estructurada y repetida mantiene o mejora las funciones del organismo. Entre los efectos beneficiosos del EF podemos citar: la reducción del riesgo de enfermedades coronarias (Walther *et al.*, 2008), de diabetes mellitas tipo 2 (Colberg, 2007), obesidad (Martins *et al.*, 2008), hipertensión arterial (Vasiliauskas *et al.*, 2007) y distintos tipos de cáncer (Hoffman-Goetz, 1998); mejora la función del músculo esquelético (Dupont-Versteegden *et al.*, 1994) y sus propiedades tales como las adaptaciones vasculares y el mantenimiento de la masa muscular (Laughlin *et al.*, 1990). Por último también se ha demostrado efectos del EF sobre la longevidad. Concretamente en un estudio publicado en 1998

se demostró que en ratones sometidos a entrenamiento se produce un aumento de la vida media de los animales en un 9% (Holloszy, 1998). Recientemente se ha demostrado que los efectos del ejercicio físico pueden afectar también a la vida máxima de los animales (Navarro *et al.*, 2004). Todos los beneficios del EF aparecen desde un nivel moderado de actividad (150Kcal/día o 1.000 Kcal/semana) y se relacionan directamente con la cantidad de ejercicio realizado, lo que permite hacer un balance entre la duración e intensidad del ejercicio.

4.1. RADICALES LIBRES Y EJERCICIO.

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

Figura I.4- Producción de radicales libres por la mitocondria en el ejercicio físico



4.1.1. RADICALES LIBRES Y EJERCICIO FÍSICO AGOTADOR.

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

A principios de los años 50, Commoner y colaboradores (Commoner *et al.*, 1954) fueron los primeros en detectar radicales libres en el músculo esquelético. En 1978, Dillard y colaboradores estudiaron el efecto del ejercicio físico sobre el daño oxidativo tisular (Dillard *et al.*, 1978). Este grupo comprobó que en humanos el ejercicio físico intenso aumentaba el contenido de pentano (producto de lipoperoxidación) en aire expirado. Cuatro años más tarde el grupo de Kelvin Davies en California detectó una señal RPE en homogenados de músculo gastrocnemio de rata. Ellos observaron que el ejercicio hasta el agotamiento en tapiz rodante doblaba la señal RPE (Davies *et al.*, 1982).

Las medidas fueron también hechas en animales que habían sido ejercitados únicamente durante la mitad del tiempo necesario para llevarlos al agotamiento; la señal de la RPE obtenida de los músculos fue la intermedia entre el grupo ejercitado hasta el agotamiento y el grupo reposo. En 1985, en la Universidad de Liverpool, el grupo de Jackson midió señales RPE en músculo congelado, de la pierna, de ratones y ratas y en músculo abdominal de humanos. Detectaron un 70% de aumento en la señal RPE en el gastrocnemio de los animales que habían sido estimulados eléctricamente durante 30 minutos con contracciones repetitivas. Este régimen de contracciones indujo daño en la membrana de las células musculares medido por la actividad en plasma de la enzima creatinquinasa (Jackson *et al.*, 1985).

Estas publicaciones promovieron una serie de trabajos que intentaron clarificar si los radicales libres podían ser responsables del daño muscular que se observa después del ejercicio físico intenso. Desde entonces son muchos los artículos en los que se recoge un incremento en la producción de radicales libres durante el ejercicio. Éste se manifiesta en un daño oxidativo a distintos niveles: músculo esquelético, cardíaco, hígado y sangre (Jenkins, 1988; Sjodin *et al.*, 1990; McArdle *et al.*, 1999a; McArdle *et al.*, 1999b). Uno de los marcadores de estrés oxidativo más utilizados ha sido el cociente GSSG/GSH, cuyo aumento se ha constatado tanto en músculo esquelético (Lew *et al.*, 1985) como en sangre y no sólo en animales, sino también

en humanos (Duthie *et al.*, 1990; Sastre *et al.*, 1992; Sen *et al.*, 1994).

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

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

Los radicales libres afectan también al ADN, y el ejercicio físico agudo aumenta el daño al ADN, tal como se evidencia por el aumento de 8oxodG. Sin embargo, en seres humanos, el entrenamiento previene dicho aumento (Ames, 1983).

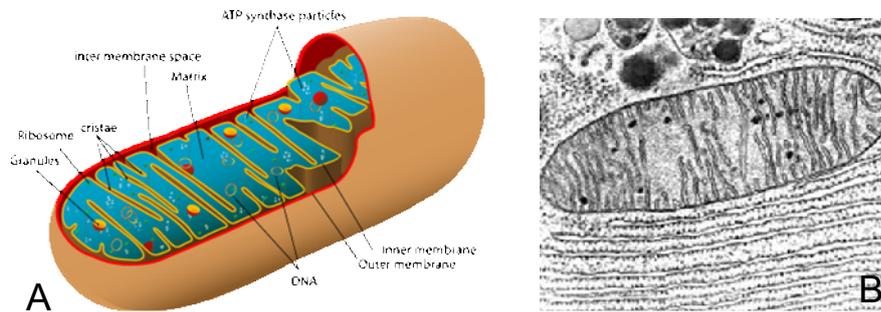
4.1.2. POSIBLES MECANISMOS DE GENERACIÓN DE RADICALES LIBRES DURANTE EL EJERCICIO.

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

4.1.2.1. La mitocondria

El 90 % del oxígeno utilizado por la célula se consume en la cadena de transporte electrónico, actuando éste como aceptor de electrones en el proceso de respiración mitocondrial (Shigenaga *et al.*, 1994). De él, un 2-5% sufre una reducción, dando lugar al radical superóxido. Una segunda reducción de este superóxido da lugar a la formación de peróxido de hidrógeno, el cual es liberado por la mitocondria (Boveris & Chance, 1973). Para evitar el daño oxidativo, la mitocondria está dotada de una enzima mitocondrial específica, la superóxido dismutasa que previene el daño que podría producir el radical superóxido. Asimismo, también se ha evidenciado la presencia de radical hidroxilo en la mitocondria del músculo esquelético ejercitado, el cual parece estar relacionado con la tensión desarrollada por el músculo (Barclay & Hansel, 1991).

Figura I.5: A- imagen esquematizada de una mitocondria con sus estructuras principales. B- mitocondria vista por microscopia electrónica.



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

pliométrico provenga de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (McArdle *et al.*, 1999b).

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

Por otra parte, se ha apuntado hacia la fosfolipasa A₂ (PLA₂) como una de las fuentes adicionales de producción de radical superóxido en el músculo esquelético. Es importante señalar que su localización no es exclusiva de la mitocondria sino que también se encuentra en sarcolema. La PLA₂ se ha relacionado el aumento de la cantidad de RL intracelular durante contracciones musculares continuas (Nethery *et al.*, 1999) y depende de la entrada de Ca⁺²

extracelular por canales tipo L (Supinski, 1998). Las mitocondrias de animales control liberan peróxido de hidrógeno; esta señal es estimulada por el Ca^{+2} y el AMP y disminuida por inhibidores del PLA_2 . Estas observaciones señalan a la mitocondria como una de las fuentes principales de generación de RL en el músculo esquelético e identifican a PLA_2 como regulador de la producción de RL. Estos resultados coinciden con los publicados por otro grupo que también apuntó a la mitocondria como principal fuente de RL en células musculares estimuladas con TNF- α (Li *et al.*, 1999).

4.1.2.2. Células fagocíticas.

Las células sanguíneas blancas con función fagocítica producen grandes cantidades de oxidantes, generando especies reactivas que eliminan los agentes patógenos. Los neutrófilos pueden infiltrarse en el tejido muscular dañado tras un ejercicio agotador o excéntrico. El daño muscular inducido por el ejercicio físico puede desatar el proceso inflamatorio. Pocas horas después de la realización del ejercicio (1-6h) aumenta la cantidad de neutrófilos en el tejido muscular dañado (Orimo *et al.*, 1991). Este incremento está facilitado por moléculas de adhesión y citoquinas (TNF α , IL-1, IL-6). Son varios los estudios en los que se aportan evidencias de la implicación de los radicales libres, generados por neutrófilos, en el daño

muscular (Crinnion *et al.*, 1996). Por otra parte, se ha demostrado que el pretratamiento con SOD minimiza el daño muscular asociado al ejercicio físico excéntrico en animales viejos. Este efecto es debido a la atenuación de la señal quimiotáctica para la infiltración neutrofílica del tejido dañado (Zerba *et al.*, 1990).

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

4.1.2.3. Xantina oxidasa.

Pese a que varios grupos de investigación han señalado a la mitocondria como principal fuente generadora de ERO en el ejercicio, en estas observaciones ya se hace un problema conceptual. El radical superóxido producido por los músculos en contracción puede ser detectado en el espacio

extracelular (Reid *et al.*, 1992; Zuo *et al.*, 2000) y en el compartimento vascular (Lee & Okabe, 1995; Stofan *et al.*, 2000). El anión superóxido generado en la mitocondria es muy poco probable que pueda ser medido fuera de la célula. Esto supondría que especies reactivas y cargadas eléctricamente, escapasen a los sistemas antioxidantes en la matriz mitocondrial y difundiesen a través de la membrana mitocondrial interna y externa, citosol y sarcolema sin implicarse en ninguna reacción química. La difusión a través del endotelio capilar en el compartimento vascular todavía parece menos probable (Reid, 2001). La xantina oxidasa representa una fuente alternativa de ERO con soporte experimental. En músculo esquelético, la xantina oxidasa se localiza principalmente en el endotelio vascular (Linder *et al.*, 1999). La administración de inhibidores de la enzima disminuye la liberación de radical superóxido en el espacio vascular en los músculos en contracción (Stofan *et al.*, 2000) y parcialmente inhibe la fatiga *in vivo* (Barclay & Hansel, 1991). En oposición a lo que ocurre con la mitocondria que genera RL en un estado basal, las ERO derivadas de la xantina oxidasa cobran importancia en cuatro procesos: en la respuesta inflamatoria al ejercicio físico excéntrico, en el ejercicio físico de alta intensidad, en el ejercicio prolongado (Hellsten *et al.*, 1997) o en el daño causado por los procesos de isquemia-reperfusión (Kadambi & Skalak, 2000). Se han encontrado niveles más elevados de ARNm para XDH/XO en músculos dañados frente a controles, acompañados con un

aumento de la actividad XDH/XO (Hellsten-Westing, resultados no publicados).

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

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

La inopina, como la hipoxantina, son muy permeables y atraviesan las membranas con gran facilidad. Los niveles de hipoxantina del plasma pueden servir de

sustrato para la XOR en la pared de los vasos de los distintos órganos. Considerando la localización de la XOR, la formación de xantina y ácido úrico debe suceder tras la salida de la hipoxantina de la célula muscular y cuando ésta alcanza la pared del vaso sanguíneo del mismo músculo o de cualquier otro tejido vía sanguínea.

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

En 1981, Granger y colaboradores (Granger *et al.*, 1981) demostraron que el tratamiento del intestino de felino con superóxido dismutasa, previo al proceso de isquemia, atenuaba el daño durante la subsiguiente reperusión, lo que apuntaba hacia el radical superóxido como responsable del daño tisular. Estos autores propusieron que la fase de isquemia producía una conversión de las XDH a XO y una

degradación de los nucleótidos de adenina a hipoxantina. De esta forma con la re-introducción del oxígeno molecular durante la reperfusión, una considerable cantidad de radical superóxido, podría ser generada en la reacción catalizada por la XO.

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

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

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

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

4.1.2.5. Prostaglandinas.

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

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

4.1.2.6. NAD(P)H oxidasa.

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

4.1.2.7. Catecolaminas.

La liberación de catecolaminas está aumentada durante el ejercicio. Las catecolaminas pueden autooxidarse formando radicales libres (Jewett *et al.*, 1989). La oxidación

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

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

La alteración en la homeostasis del Ca^{+2} se considera un paso clave en el proceso degenerativo asociado al daño muscular inducido por el ejercicio físico (McArdle *et al.*, 1992). Este fallo en la homeostasis del Ca^{+2} parece ser secundario al aumento en la generación de radicales libres en varios tejidos pero, diversos grupos de investigación, no consideran que esto ocurra en el músculo esquelético (McArdle *et al.*, 1994).

Existen diferentes vías por las que los radicales libres podrían alterar la homeostasis del Ca^{+2} pues, como hemos visto en apartados anteriores, son capaces de dañar todo tipo de biomoléculas. Nicotera y colaboradores (Nicotera *et al.*, 1985) publicaron un trabajo en el observaron cómo las ERO eran responsables de la

inactivación de las bombas de la membrana plasmática responsables de eliminar el Ca^{+2} . Este mismo daño puede hacerse extensivo a organelas intracelulares responsables de secuestrar el exceso de calcio citosólico (Bellomo *et al.*, 1982).

Si se considera que el fallo en la homeostasis del calcio es el evento inicial en el daño muscular asociado al ejercicio físico, éste puede llevar a un aumento en la generación de radicales libres. El incremento de los niveles de Ca^{+2} intracelulares puede activar enzimas proteolíticas y la fosfolipasa lo que supone una liberación de los ácidos grasos y una alteración de las estructuras de la membrana interna. Además, en un intento de tamponar el aumento en los niveles de Ca^{+2} , la mitocondria puede acumular cantidades significativas. Este Ca^{+2} puede ir acompañado por el fosfato y al formar fosfato cálcico, precipitar en la mitocondria. Por otra parte los aumentos en el contenido de Ca^{+2} se ha visto que inhiben la respiración mitocondrial (Wrogemann & Pena, 1976). La alteración en la producción de ATP puede inducir aumento en la producción de radical superóxido. La situación de estrés oxidativo secundaria al aumento en la concentración de Ca^{+2} intracelular debe estar causada por un ejercicio físico agotador.

4.1.2.9. Los peroxisomas.

Los peroxisomas son organelas celulares relacionadas con la oxidación de ácidos grasos y aminoácidos. En condiciones fisiológicas, los peroxisomas contribuyen a la producción de H_2O_2 pero no del $O_2^{\cdot -}$ (Chance *et al.*, 1979). El ayuno prolongado se ha demostrado que supone un aumento en la generación de H_2O_2 debido, principalmente, al aumento en la oxidación de los ácidos grasos por esta organela (Godin & Wohaieb, 1988). Como los ácidos grasos son la fuente principal de energía para el miocardio y el músculo esquelético durante el ejercicio físico prolongado, los peroxisomas pueden ser sitios potenciales de producción de radicales libres. El incremento, en músculo, en la actividad de la catalasa tras un ejercicio físico agotador, parece apoyar esta hipótesis (Ji & Fu, 1992). Sin embargo, no existen evidencias directas de que el ejercicio aumente la producción de ERO por el peroxisoma.

5. LA MITOCONDRIA

La mitocondria utiliza la fosforilación oxidativa para producir gran parte de la energía requerida por los tejidos aeróbicos. Además de su papel bioenergético, las mitocondrias desempeñan un papel catabólico y biosintético en la biología celular en eucariotas. Por tanto alteraciones tanto generales y como específicas en la mitocondria

contribuyen al desarrollo de innumerables patologías cardiovasculares (Williams, 1995) y neuromusculares (Moyes *et al.*, 1998). Del mismo modo variaciones cuantitativas y cualitativas en la mitocondria también son importantes elementos en las adaptaciones fisiológicas.

La mitocondria es única en el hecho de que tiene múltiples pequeñas copias de ADN circular que contiene 16,659 nucleótidos. Esto es minúsculo en comparación a los tres billones de nucleótidos encontrados en el genoma nuclear. El ADNmt contiene 13 ARNm, 22 ARNt y 2 ARNr que son esenciales para las funciones mitocondriales. Los trece ARNm codifican componentes proteicos de la cadena respiratoria responsables del transporte de electrones y de la síntesis de ATP.

5.1. REGULACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA ORGANELA

Las propiedades metabólicas de la mitocondria muscular dependen de la regulación activa de la estructura del orgánulo. La mitocondria, en muchos tejidos, existe como una red dinámica constantemente en fusión.

Estrategias de adaptación que culminan en un aumento de la capacidad oxidativa combinan el control de la síntesis de enzimas con cambios ultra estructurales de la organela. En todos los vertebrados, el tipo de músculo más oxidativo es el músculo cardíaco, en el cual

aproximadamente 30-50% del volumen muscular lo ocupan las mitocondrias.

Las mitocondrias se dividen durante el ciclo de división celular. No obstante, hay circunstancias en las cuales las divisiones mitocondriales no están relacionadas con el ciclo celular. Por ejemplo, la mitocondria muscular podrá proliferar durante la miogénesis, pero también como resultado de ejercicio físico (Brunk, 1981; Moyes *et al.*, 1997).

La división mitocondrial puede ser inducida por una variedad de sustancias, incluyendo benzodiazepinas, inhibidores de la fosforilación oxidativa y por el calcio (Bereiter-Hahn & Voth, 1994) entre otros. En vertebrados, el número de mitocondrias es controlado por hormonas tiroideas, como T3 que induce la división mitocondrial (Goglia *et al.*, 1999).

En la membrana interna de la mitocondria se encuentran aproximadamente el 80% de las proteínas, entre las que destaca el complejo de la fosforilación oxidativa. Aunque todos los músculos estriados contienen mitocondrias con extensivas crestas, algunas células presentan mitocondrias con una morfología más sencilla. Estudios con mutantes han demostrado que la producción de las crestas depende de importantes proteínas, incluyendo proteínas de la membrana externa (Hobbs *et al.*, 2001) y de subunidades del complejo V (Paumard *et al.*, 2002).

5.2. BIOGÉNESIS DE LA MEMBRANA

El crecimiento y remodelamiento mitocondrial requiere la adición de fosfolípidos. Casi todos los fosfolípidos de la membrana interna y externa son sintetizados en el retículo sarcoplásmico. Las mitocondrias de la membrana interna son ricas en cardiolipina, un fosfolípido altamente ácido y hidrofóbico que es esencial para la función de muchos procesos y proteínas mitocondriales. Algunos estudios han demostrado que la mutación en la síntesis del gen de la cardiolipina deteriora el crecimiento, la importación de proteínas, el potencial de membrana mitocondrial y la actividad de la ATPasa y citocromo c oxidasa (Jiang *et al.*, 2000; Koshkin & Greenberg, 2000). Además, una variación en los niveles de cardiolipina es evidente cuando se compara la población de mitocondrias, tipos de fibras musculares y como resultado de diferentes condiciones de desarrollo y fisiológicas. Por ejemplo, cambios en los niveles de cardiolipina ocurren como resultado de alteración en los niveles de hormonas tiroideas (Paradies *et al.*, 1997), actividad contráctil crónica (Takahashi & Hood, 1993) y el envejecimiento (Paradies & Ruggiero, 1990).

La modulación de los perfiles de los lípidos se relaciona con frecuencia con estrategias de compensación asociadas al ejercicio, dieta y condiciones ambientales. Los perfiles de los fosfolípidos tienen un potencial que alteran la fluidez de la membrana y el movimiento de las proteínas de

las membranas y la movilidad de los electrones. El remodelamiento de la membrana también puede alterar la permeabilidad a protones y propiedades catalíticas de las enzimas.

5.3. REMODELAMIENTO MITOCONDRIAL EN LA DIFERENCIACIÓN Y EL DESARROLLO MUSCULAR.

La demanda de energía muscular cambia durante la vida de un organismo, y los músculos son esenciales en ese remodelamiento energético. Prioritariamente en la diferenciación, los mioblastos poseen mitocondrias que contribuyen aportando un 40% del ATP para el metabolismo (Leary *et al.*, 1998). La miogénesis se inicia por cambios en las condiciones hormonales y la proliferación y remodelamiento mitocondrial son integrados en ese programa miogénico durante el cual la actividad de las enzimas mitocondriales aumenta muy significativamente (Moyes *et al.*, 1997).

Después que el programa miogénico se complete, los músculos retienen una modesta capacidad para el remodelamiento en respuesta a los niveles de actividad. La reducción en la actividad muscular, como por ejemplo, en la inmovilización, denervación o microgravedad reduce el contenido mitocondrial (Moyes & Hood, 2003). Por el contrario, un programa regular de entrenamiento de resistencia puede suponer una expansión del retículo

mitocondrial (Hood, 2001). Esa adaptación es particularmente evidente en regiones subsarcolémicas de las células musculares, y estas alteraciones tienen un importante efecto metabólico durante el ejercicio agudo.

En resumen, el contenido de mitocondrias en el músculo esquelético se establece durante la diferenciación y el desarrollo, y puede ser mantenido o modificado durante la vida del animal.

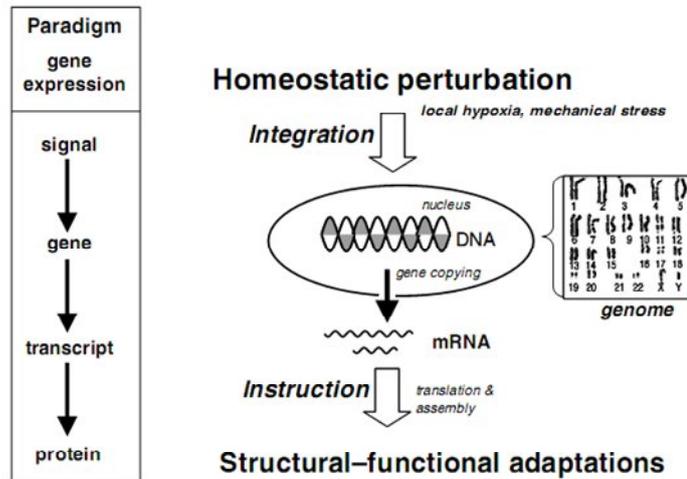
5.4. BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL.

5.4.1. REGULACIÓN DE LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

El músculo esquelético exhibe una marcada respuesta adaptativa en respuesta a condiciones tanto fisiológicas como fisiopatológicas. Una de las alteraciones fenotípicas más visibles se produce en la mitocondria en respuesta al ejercicio o a la actividad contráctil a largo plazo. 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).

Las actividades contráctiles que inducen las adaptaciones mitocondriales en el músculo son dependientes del tipo de ejercicio (resistencia vs. fuerza) así como de su frecuencia, intensidad y duración.

Figura I.6: Concepto de integración de estímulos fisiológicos en respuestas fenotípicas.

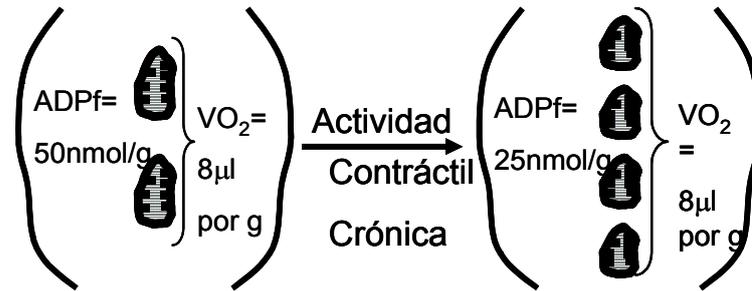


Hace años que se sabe que el tamaño, número y el volumen de mitocondrias pueden cambiar en respuesta a estímulos fisiológicos (Holloszy, 1967). Cambios en la plasticidad mitocondrial producida por el ejercicio son resultados de múltiples eventos moleculares (Hood, 2001). El mecanismo está parcialmente adscrito a la activación y unión de factores de transcripción a secuencias específicas de ADN 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 (Tfam), el factor de respiración nuclear 1 y 2 (NRF-1 y NRF-2), PPAR α y PPAR γ (Hood, 2001). Tras la unión al ADN de los factores de transcripción y co-activadores, sus genes diana se transcriben en el núcleo y el ARN se traslada a los ribosomas que se

encuentran en el citoplasma. Las proteínas destinadas a la mitocondria son transportadas a estos compartimientos vía maquinaria de importación de proteínas. Una vez dentro de la matriz mitocondrial, el factor de transcripción mitocondrial, Tfam, es dirigido directamente al genoma mitocondrial y actúa como factor clave en la transcripción y regulación del ADN mitocondrial.

Un mayor contenido mitocondrial hace que una concentración menor de ADP (50nmol/g vs 25nmol/g) sea requerida para consumir la misma cantidad de oxígeno (VO_2) por gramo de músculo. Un pequeño aumento en la concentración de ADP aumentará la glicólisis y la formación de ácido láctico, lo que supone un descenso de las reservas de fosfocreatina (CrP). Un mayor contenido mitocondrial, como resultado del ejercicio crónico, reducirá el consumo de CrP lo que atenuará la glucólisis, la producción de ácido láctico, reducirá la formación de AMP y NH_3 , mejorará la fracción de energía obtenida aeróbicamente y atenuará la activación de AMPK. También supone que la cadena de transporte electrónico opere a una fracción más baja de su máximo para producir el mismo VO_2 que antes de que se produjese esta adaptación. Todo esto supone una reducción del daño potencial por las especies reactivas del oxígeno (ERO) con el mismo consumo por gramo de músculo

Figura I.7- Mejora de la sensibilidad de la respiración mitocondrial al ADP debido al entrenamiento o a otros modelos de actividad contráctil crónica.



Los eventos moleculares que participan del proceso inicial de señalización inicial para la biogénesis mitocondrial son:

- CALCIO

Como resultado de la despolarización inducida por la motoneurona alfa, el calcio es liberado por el retículo sarcoplásmico y eso permite la interacción entre la actina y miosina. Cambios en los niveles de calcio intracelular modifican las actividades de las proteínas kinasas y fosfatasas dependientes del calcio (Irrcher *et al.*, 2003). Entre ellas podemos citar las proteínas kinasas dependiente del calmodulina, proteína kinasa C y calcineurina, entre otras (Hood, 2001).

Estos datos sugieren que el calcio liberado en el retículo sarcoplásmico durante cada potencial de acción puede servir como un importante mensajero en el proceso

de biogénesis mitocondrial. Entre tanto, la amplitud y duración de los señales de calcio necesarios para promover cada cambio necesita ser establecido en el contexto fisiológico de la contracción muscular.

- RECAMBIO DE ATP

El ejercicio aumenta la proporción del recambio de ATP en las células musculares. Eso altera la proporción de ATP/ADP libre y estimula el metabolismo muscular. Experimentos utilizando el ácido β -guanidopropiónico que consigue depleción de los compuestos altamente energéticos de fosfato (fosfocreatina y ATP) induce un aumento en la expresión de enzimas mitocondriales (Taivassalo *et al.*, 2001). Como resultado del acelerado recambio de ATP, el ejercicio físico aumenta los niveles de AMP y disminuye los niveles de fosfocreatina en el músculo. Por este motivo cambios en el estado de energía celular asociados con esas adaptaciones se han relacionado con la activación de las AMPKs. Las AMPKs pueden ser activadas fisiológicamente por la disminución en los niveles de fosfocreatina y ATP, y farmacológicamente usando el análogo 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR), que es frecuentemente usado para mimetizar los efectos del ejercicio crónico (Irrcher *et al.*, 2003). La directa activación de la AMPKs usando el AICAR también mimetiza muchos de los cambios metabólicos evidenciados como resultados del

ejercicio crónico, como aumento en los niveles de la actividad del citrato sintasa, ácido γ -aminolevulínico sintasa y el desacoplamiento mitocondrial (Hayashi *et al.*, 1998; Putman *et al.*, 2003). Al ser sensible al estado de energía de la célula muscular, las AMPKs parecen ser también un importante regulador del contenido mitocondrial.

5.4.2- RESPUESTA DE LA EXPRESIÓN DE GENES A LA ACTIVIDAD CONTRÁCTIL

La actividad contráctil regula la fosforilación/defosforilación de factores de transcripción que pueden mediar la expresión de genes mitocondriales y nucleares. Diversos factores de transcripción se han implicado en el proceso de biogénesis mitocondrial, como por ejemplo, NRF-1 y 2, PPAR α , PPAR γ , Sp1, c-jun y c-fos (Hood, 2001; Scarpulla, 2002b). Esa variedad de factores de transcripción es importante teniendo en cuenta las diferencias en la secuencia del ADN que aparecen en la región promotora de genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales (Nelson *et al.*, 1995).

NRF-1 se considera un importante componente en el proceso de biogénesis mitocondrial. NRF-1 aumenta su expresión en respuesta a la actividad contráctil en cultivos celulares (Xia *et al.*, 1998) y como resultado del ejercicio físico en modelos *in vivo* (Murakami *et al.*, 1998). NRF-1 también activa Tfam (Scarpulla, 2002b), una proteína

responsable de la regulación de la transcripción del ADN mitocondrial y de su replicación (Puigserver *et al.*, 1998).

El factor de transcripción PGC-1 α juega un papel muy importante en el metabolismo de la glucosa, la biogénesis mitocondrial, en la especialización de las fibras musculares y en la adaptación a la termogénesis (Lin *et al.*, 2002). En el músculo esquelético, el aumento de PGC-1 α aumenta el número de copias de ADN mitocondrial y estimula la proliferación de mitocondrias. Una sobre 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, Tfam, UCP-2, subunidades nucleares y mitocondriales que codifican COX y citocromo c.

6- PGC-1 α

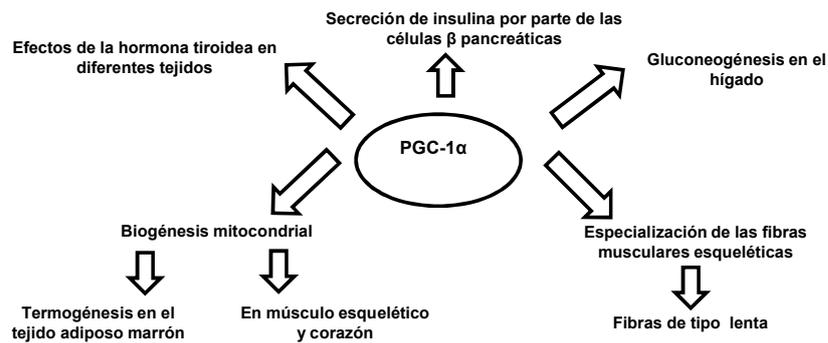
El descubrimiento de PGC-1 α representó un gran avance en el esclarecimiento de los mecanismos moleculares que conllevan a la biogénesis mitocondrial. PGC-1 α está implicado en el proceso regulador de las adaptaciones celulares debido a que el incremento en su expresión está regulado en respuesta a estímulos nutricionales y ambientales (Lin *et al.*, 2004).

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 *et al.*, 2006). Eso incluye proteínas que alteran la actividad transcripcional de PGC-1 α por medio de modificaciones post-translacionales o interacciones proteínas-proteínas.

La actividad de PGC-1 α en el músculo esquelético está positivamente regulada por la activación de la MAPK p38. Puigserver *et al.* describieron que la MAPK p38 media la fosforilación de PGC-1 α (Puigserver *et al.*, 2001). Por tanto la fosforilación y activación de p38 son esenciales para la inducción del proceso de biogénesis mitocondrial por la contracción muscular.

Figura I.8- Importancia de PGC-1 α en la biología celular



6.1- PGC-1 α Y LA TERMOGÉNESIS

La termogénesis adaptativa, tanto en el tejido adiposo marrón como en el músculo esquelético, produce la estimulación de la biogénesis mitocondrial, aumento en la oxidación de los ácidos grasos y desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Como ya hemos descrito previamente en esta sección de la tesis, el aumento de PGC-1 α induce la transcripción de NRF-1 y 2 generando un aumento en la expresión de Tfam (Wu *et al.*, 1999) así como de la β -ATP-sintasa, citocromo c y citocromo c oxidasa (Scarpulla, 2002a, 2002b). PGC-1 α también interactúa con otros receptores nucleares como el PPAR α y el receptor de la hormona tiroidea en el tejido adiposo marrón incrementando la expresión de la proteína desacopladora UCP-1 (Cassard-Doulcier *et al.*, 1994; Barbera *et al.*, 2001).

La adaptación a los cambios en la temperatura corporal en ratones está relacionada con el tejido adiposo marrón, que genera calor, en gran parte, por la expresión de la UCP-1 (Bouillaud *et al.*, 1985; Jacobsson *et al.*, 1985). Análisis de la expresión génica del tejido adiposo marrón revela que la inducción de UCP-1 en ratones deficientes (KO) de PGC-1 α fue reducida en aproximadamente 45% en relación con los silvestres (Lin *et al.*, 2004).

6.2- PGC-1 α Y EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA

El mantenimiento de la homeostasis de la glucosa es vital para la supervivencia de los mamíferos, y, como resultado, los niveles de glucosa son regulados en respuesta a condiciones nutricionales y señales hormonales (Liang & Ward, 2006).

La expresión de PGC-1 α está inducida en el hígado en respuesta al ayuno, un estado metabólico caracterizado por activar la glucogenólisis, gluconeogénesis y oxidación de los ácidos grasos (Aoki, 1981). Bajo condiciones normales, de libre acceso a la comida, PGC-1 α está expresado a niveles muy bajos en el hígado (Puigserver *et al.*, 1998). Durante el ayuno, la expresión de PGC-1 α está activada por el glucagón y catecolaminas vía la estimulación de cAMP y el factor de transcripción de CREB. PGC-1 α , entonces, coactiva una variedad de factores de transcripción como el factor nuclear hepático- 4 α , el receptor glucocorticoide y el FOXO1 (forhead box O1). Estos factores de transcripción se unen a regiones en los genes que codifican enzimas gluconeogénicas como la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pase) (Liang & Ward, 2006).

Para determinar si PGC-1 α es esencial para la expresión del programa citado previamente, un grupo de investigadores (Lin *et al.*, 2004) aisló hepatocitos primarios de ratones PGC-1 $\alpha^{+/+}$ y de ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$ y evaluaron la expresión de los genes de PEPCK y G6Pase en respuesta a

tratamientos hormonales. Los niveles basales de ARNm de PEPCK y G6Pase fueron similares en los dos modelos de ratones. Tratando estos hepatocitos con glucocorticoides los ratones PGC-1 α ^{+/+} exhibieron un aumento dosis-dependiente de ARNm de la PEPCK y de la G6Pase. En cambio, la inducción de la expresión de ARNm de PEPCK y G6Pase disminuyó significativamente en los hepatocitos aislados de ratones PGC-1 α ^{-/-} tratados en las mismas condiciones. Estos resultados demuestran que PGC-1 α es un mediador esencial en la activación de la transcripción de genes gluconeogénicos en respuesta a la estimulación hormonal en hepatocitos aislados.

Bajo condiciones de libre acceso a la comida, el músculo esquelético es el tejido que más requiere de glucosa. El músculo esquelético capta la glucosa utilizando transportadores (Gluts) localizados en la membrana celular. Existen dos tipos de Gluts en el músculo esquelético:

- Insensible a insulina: Glut 1 y Glut 3
- Sensible a insulina: Glut 4

PGC-1 α ha demostrado aumentar la expresión de Glut 4 en células musculares en cultivo y en el músculo esquelético (Michael *et al.*, 2001; Baar *et al.*, 2002). Sorprendentemente, PGC-1 α no parece aumentar la captación de glucosa en el músculo esquelético *in vivo*, aunque induzca este aumento en células de músculo esquelético (Michael *et al.*, 2001).

6.3- PGC-1 α Y EL CAMBIO DEL TIPO DE FIBRA MUSCULAR ESQUELÉTICA

Las fibras del músculo esquelético se clasifican en 4 tipos: tipo I, tipo IIa, tipo IIx y IIb. Las fibras lentas tipo I y tipo IIa contienen más mitocondrias y muestran un metabolismo oxidativo. En contraste, las fibras IIx y IIb contienen pocas mitocondrias y son metabólicamente glucolíticas (Guth & Samaha, 1969).

Se sabe que PGC-1 α induce al remodelamiento de la composición de las fibras en el músculo esquelético. La sobre expresión de PGC-1 α resulta en la conversión de fibras rápidas tipo IIb en tipo IIa y fibras oxidativas tipo I (Liang & Ward, 2006).

Los niveles de AMPK fosforilada y acetil-coA carboxilasa, un conocido sustrato que activa AMPK, están significativamente aumentados en el músculo esquelético de ratones deficientes en PGC-1 α . Estos datos demuestran que PGC-1 α es esencial para una expresión normal de genes mitocondriales y para el metabolismo energético del músculo esquelético.

La activación de las AMP kinasas parece ser un mecanismo por el cual el ejercicio estimula el transporte de glucosa muscular (Hayashi *et al.*, 1998). El transporte de glucosa en el músculo es normalmente proporcional a la cantidad de de contenido de Glut 4 (Henriksen *et al.*, 1990).

Por tanto PGC-1 α se puede considerar que regula la capacidad muscular en captar la glucosa y oxidarla.

Mortenson et al. (Mortensen *et al.*, 2006) recientemente han demostrado que la sobre expresión de PGC-1 α en células musculares primarias de ratas conllevan a un aumento de los niveles de ARNm de la isoforma de MHC asociada a un metabolismo lento oxidativo y una disminución de los niveles de ARNm de la isoforma de MHC asociada con un metabolismo rápido glucolítico, MHC IIX y MHC IIB. Por el contrario, ratones deficientes en PGC-1 α exhiben una disminución del número de mitocondrias y de la capacidad respiratoria en fibras musculares lentas, así como, reducida capacidad para ejercicio y reducida resistencia a fatiga (Leone *et al.*, 2005).

7- NRF-1

El factor de respiración nuclear-1 (NRF-1) es uno de los factores reguladores que coordinan la expresión de genes nucleares y mitocondriales para la biogénesis mitocondrial. La primera identificación de como las proteínas mitocondriales son controladas viene de la identificación de los NRF-1 y NRF-2 por Scarpulla y colaboradores (Scarpulla, 2002a).

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 ADN mitocondrial (Scarpulla, 2002a). 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 & Scarpulla, 2001). Estos datos sugieren que NRF-1 juega un papel crucial en el mantenimiento del ADNmt y en la función de la cadena respiratoria en las primeras fases de la vida.

Una sobreexpresión de NRF-1 en el músculo esquelético, en modelos de ratones transgénicos, aumenta la capacidad de transporte de glucosa por aumento en la expresión del transportador de glucosa Glut4 (Murakami *et al.*, 1998). Esa inducción ocurre antes del aumento de la capacidad oxidativa mitocondrial, sugiriendo que la elevación de NRF-1 debido a múltiples series de ejercicio, puede estar relacionada con la biogénesis mitocondrial inducida por el ejercicio.

Para determinar la función de los NRF-1 en la biogénesis mitocondrial, un ratón transgénico que sobreexpresa NRF-1 en el músculo esquelético ha sido recientemente generado (Baar *et al.*, 2003). Estos ratones tienen aumentados los niveles de citocromo c. Sin embargo, ni los niveles de citrato sintasa ni el consumo de O₂ de los músculos aparecen aumentados. Estos datos sugieren que solamente NRF-1 es insuficiente para inducir el proceso completo de biogénesis mitocondrial y que otros factores y cofactores son requeridos para ese proceso.

8- 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 *et al.*, 1987).

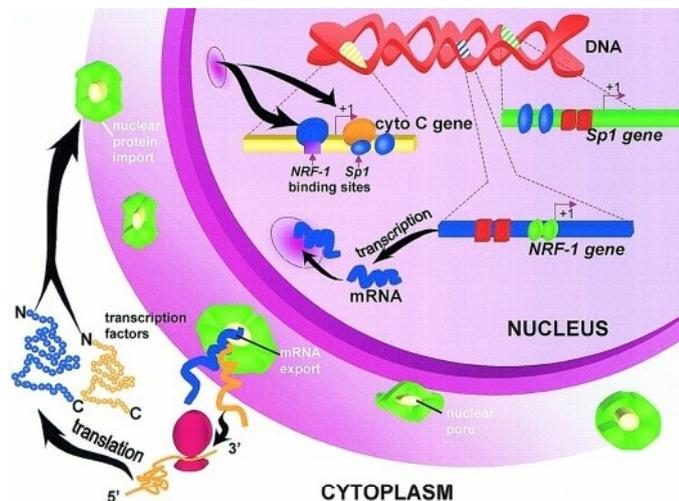
Para llegar a entender la regulación en la expresión de citocromo c debido a la actividad contráctil, se han utilizado medidas como la de la estimulación eléctrica de miocitos neonatales cardíacos (Xia *et al.*, 1997). Se han descrito aumentos en la activación transcriptional de citocromo c a las 12 horas de la estimulación. Sin embargo el efecto de la estimulación se atenúa cuando el sitio de unión de NRF-1 o de CRE se encuentra mutado (Xia *et al.*, 1997).

Utilizando células del músculo esquelético C2C12, se ha probado que la actividad contráctil aumenta la transcripción de citocromo c y está acompañado de un aumento del nivel de la proteína Sp1 y de la unión al ADN después de cuatro días de estimulación (Connor *et al.*, 2000). Otros estudios *in vivo* también han indicado que la expresión de citocromo c puede estar regulada por la estabilidad del ARN mensajero.

El grupo de Freyssenet (Freyssenet *et al.*, 1999) inyectó plásmidos de ADN para introducir el promotor de citocromo c acompañado con una acetiltransferasa de

cloramfenicol en el tibial anterior de ratas, y éstos fueron sometidos a estimulación eléctrica tres horas al día durante 7 días. Con esta técnica, se pudieron observar los cambios dependientes del tiempo en la actividad transcripcional y en la estabilidad del ARNm. Los resultados indicaron que el aumento en el ARNm de citocromo c se debe al aumento de la estabilidad del ARNm durante los 2 y 4 días y que este hecho fue seguido por la activación transcripcional a los 5 días de estimulación crónica. Este hecho enfatiza la importancia de la estabilidad del ARNm como una pieza importante en los cambios en la expresión de genes como resultado de la actividad contráctil en el músculo esquelético.

Figura I.9: Representación gráfica de la expresión de citocromo c en el músculo esquelético durante la actividad contráctil.



Como observamos en la figura previa, una señal estimula la transcripción del factor nuclear 1 (NRF-1) y/o de la proteína específica 1 (Sp1). Los ARNm derivados de estos genes son exportados desde el núcleo al citosol a través de los poros nucleares. Estos ARNm se traducen a proteína en el citosol y vuelven a ser trasladados al núcleo. Se sabe que la actividad contráctil aumenta la expresión y la unión al ADN de NRF-1 y de Sp1, de ese modo aumenta la transcripción del gen de citocromo c. Otros genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales son también activados por NRF-1 y Sp-1 con lo que se demuestra la importancia que tienen estos factores de transcripción para la biogénesis mitocondrial.

9- CITOCROMO C OXIDASA

La citocromo c oxidasa (COX) es una enzima terminal de la cadena de transporte electrónico en eucariotas y algunos procariotas (Khalimonchuk & Rodel, 2005). La COX está compuesta por 13 subunidades (mamíferos) de las cuales la COX I, II y II son codificadas por genes mitocondriales.

La COX es una enzima multimérica del interior de la membrana mitocondrial interna, que cataliza el último paso de la respiración, la transferencia de electrones desde el citocromo c al oxígeno. La COX también contribuye a la conservación de energía en la forma de gradiente

electroquímico que será utilizado para el sistema de fosforilación oxidativa para la síntesis de ATP

La COX I es la más grande e hidrofóbica de las subunidades de la enzima y juega un papel importante en la generación del flujo de energía (Capaldi, 1990). La determinación de la actividad de la COX I puede reflejar la capacidad oxidativa mitocondrial lo que se considera un importante marcador de la función mitocodrial.

Análisis en el tejido cardíaco de animales jóvenes y viejos ha revelado regiones focales de manchas débiles referentes a la enzima mitocondrial COXI (Muller-Hocker, 1990). Eso puede representar defectos en el ADNmt, resultando en un deterioro en la fosforilación oxidativa. Por su parte, el músculo esquelético de ratas y primates viejos, muestra un aumento en el número de fibras que contienen defectos en la actividad de la COX I combinado con un aumento en la actividad de la succinato deshidrogenasa (Aspnes *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998; Lopez *et al.*, 2000; Wanagat *et al.*, 2001). Estos cambios histológicos son similares a las "ragged red fibers" típicamente observadas en pacientes con miocardiopatía mitocondrial que afecta especialmente a las mitocondrias subsarcolémicas (Muller-Hocker, 1990; Rifai *et al.*, 1995).

10- CADENA DE IMPORTACIÓN DE PROTEÍNAS

Dada la limitada capacidad de codificar proteínas por el ADNmt (13 proteínas), muchas de las proteínas encontradas en la mitocondria son derivadas del genoma nuclear.

La biogénesis mitocondrial depende de la incorporación de proteínas codificadas en el núcleo (Irrcher *et al.*, 2003). Eso ocurre debido al complejo conocido como cadena de importación de proteínas, que está compuesto por translocasas en la membrana externa (Complejo Tom) y de translocasas en la membrana interna (Complejo Tim). Las proteínas de la matriz interactúan con una chaperona citosólica. Ejemplos de chaperonas citosólicas son: HSP70 y el factor estimulador de proteínas (MSF). Los receptores de proteínas encontrados en el complejo Tom transfieren las proteínas precursoras a las proteínas en el complejo Tim. La proteína que se une a la HSP70 es la Tim 44 que ancla la chaperona de la matriz, la cual actúa empujando al precursor hacía la matriz. Después de que llegue a la matriz, la secuencia señal NH2 terminal se dirige a una peptidasa procesadora mitocondrial (MPP) para formar la proteína madura.

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

- La presencia de un potencial de membrana interno negativo para ayudar a la entrada de la carga positiva de la pre secuencia dentro de la matriz.

- La disponibilidad de ATP tanto en la matriz como en el citosol (Connor *et al.*, 1996).

Agentes desacopladores que disipan el potencial de membrana interno reducen la importación de proteínas y las reducciones en los niveles de ATP celular como los que se producen debido la actividad contráctil severa o bien por defectos en la producción de ATP, como en células con mutaciones en el ADNmt, pueden afectar a la importación de proteínas.

11- SARCOPENIA SENIL

La masa muscular constituye aproximadamente el 40% de la masa del cuerpo humano y su mantenimiento es de gran importancia para el desarrollo de una vida saludable e independiente. Su contribución en el mantenimiento de la salud es evidente ya que se sabe, su pérdida, redundando en un aumento en la incidencia de muerte (Metter *et al.*, 2002). Por otra parte el envejecimiento de la población, uno de los problemas socioeconómicos más graves de las sociedades avanzadas, es además un gran problema individual, ya que casi todos queremos vivir muchos años pero con alta calidad de vida. El proceso básico del envejecimiento, que afecta a

todos nuestros órganos, células y moléculas, da lugar a la amenaza constante de sufrir diversas enfermedades, muchas de ellas graves como cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, osteoporosis, enfermedades infecciosas, o las de Parkinson o Alzheimer, pudiendo disminuir la independencia e integración social del individuo (Warburton et al., 2006). El deterioro con la edad de la función muscular es uno de los principales factores que influyen en la disminución de la capacidad de vida independiente de las personas. Las fuerzas máxima y explosiva son necesarias para poder realizar muchas tareas de la vida cotidiana como, subir escaleras, levantarse de una silla o pasear. También se cree que la reducción con la edad de la capacidad del sistema neuromuscular para generar fuerza favorece el riesgo de caídas y resbalones, aspecto que lleva a considerar su valoración y su mejora con cada vez más interés. Además del envejecimiento *per se*, uno de los factores que mejor explican la reducción en la fuerza y la masa muscular con la edad, es la drástica reducción que se observa con el paso de los años en la cantidad y calidad de actividad física diaria realizada. La interrupción de este ciclo es de vital importancia para el mantenimiento de la calidad de vida y la salud de las personas mayores. El proceso de envejecimiento está asociado no sólo con la reducción de la fuerza máxima, sino también con el descenso en la capacidad del sistema neuromuscular para producir la fuerza explosiva. Esta disminución es incluso más drástica que la

observada en la producción de fuerza máxima para el mismo grupo muscular y llega a ser aproximadamente de un 3,5% de pérdida al año, entre los 65 y 84 años (Young & Skelton, 1994). El deterioro de la fuerza con la edad se produce esencialmente por una pérdida progresiva de masa muscular (sarcopenia). Rosenberg (Rosenberg, 1997) fue el primer autor en acuñar el término sarcopenia. Procede del griego y, literalmente, significa "pobreza de carne".

La sarcopenia engloba multitud de factores que contribuyen a las alteraciones musculares asociadas a la edad: pérdida de motoneuronas, alteración hormonal, efectos inflamatorios y las alteraciones en la ingesta calórica (proteica) asociadas a la edad (Doherty, 2003).

Además de la reducción de la masa muscular, con la edad, los mecanismos involucrados en el proceso de contracción muscular también se ven afectados, así como la composición y el contenido mitocondrial (Orlander *et al.*, 1978; Short *et al.*, 2005). Con el envejecimiento se observa una mayor disminución de la proporción del área ocupada por las fibras musculares de contracción rápida (% área II/I y % área fibras tipo II) en comparación con las que ocupan las fibras musculares de contracción lenta (tipo I) (Orlander *et al.*, 1978). Con respecto al contenido mitocondrial, el envejecimiento se ha asociado a una reducción de la capacidad oxidativa muscular debido, fundamentalmente, a una disminución tanto del contenido como de la función mitocondrial (Short *et al.*, 2005). Recientemente se ha

relacionado el fenómeno de la sarcopenia con el estrés oxidativo (Fulle et al., 2004). Durante el envejecimiento la producción de ERO aumenta de forma drástica por una alteración de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y por una disminución de la eficacia de la defensa antioxidante (Harman, 1956). La mitocondria juega un papel básico en el metabolismo, la apoptosis y el proceso de envejecimiento (Lezza et al., 2001; Vina et al., 2007). La disminución de la disponibilidad de ATP debido a una alteración de la fosforilación oxidativa puede interferir en la expresión génica y provocar una disminución de la síntesis de proteínas miofibrilares lo que lleva a una disminución en el número de sarcómeros que redundará en una atrofia muscular (Lezza et al., 2001). Se necesitan estudios moleculares más detallados para determinar el papel de la mitocondria en la activación del proceso de atrofia muscular relacionado con los protocolos de inmovilización (Lezza et al., 2001).

El ejercicio físico regular y aeróbico se sabe que provoca una inducción de la defensa antioxidante, al igual que un aumento en el contenido mitocondrial a nivel muscular (Short et al., 2005; Warburton et al., 2006). Por otra parte la bibliografía demuestra la efectividad de los programas de entrenamiento de fuerza de corta duración en la prevención de la pérdida de masa muscular (Laughlin et al., 1990). De hecho, se han descrito ganancias en la sección

transversal del músculo superiores al 10% con este tipo de programas (Hakkinen et al., 1998).

El envejecimiento es un proceso complejo que en el músculo está asociado con una disminución de la masa, fuerza y velocidad de contracción. Entre las causas de la sarcopenia, destacamos:

- Degeneración neuronal

El envejecimiento está asociado con una progresiva pérdida de neuronas motoras y como consecuencia las fibras se tornan desnervadas. Afortunadamente, muchas fibras son re-inervadas por otras motoneuronas minimizando la pérdida funcional de las fibras musculares. No obstante, ese proceso es insuficiente para compensar la denervación resultando en una atrofia y progresiva pérdida de fibras musculares (Lexell, 1997).

Las motoneuronas rápidas parecen que son preferentemente afectadas y con el pasar del tiempo el proceso de denervación/re-inervación puede resultar en pérdida y atrofia de fibras del tipo II y crecimiento de fibras tipo I especialmente (Lexell *et al.*, 1988).

- Desuso

Los niveles de actividad física declina con el envejecimiento (Edstrom & Ulfhake, 2005) y el desuso contribuye para el decline de la masa muscular y función (Degens & Alway, 2006).

En adición, ancianos altamente activos, como nadadores y atletas másteres todavía presentan pérdida de masa muscular y fuerza cuando comparados con controles jóvenes (Klitgaard *et al.*, 1990). Además, atletas másteres de corridas de alta intensidad y corta duración presentan disminución y decline en la tensión específica de fibras tipo I y IIa (Larsson *et al.*, 1997; Korhonen *et al.*, 2006).

Por tanto, parece que otros factores además del desuso contribuyen para el deterioro muscular y disfunción durante el envejecimiento.

- Hormonales

Un decline en las hormonas, principalmente las hormonas de crecimiento y hormonas sexuales, pueden estar implicados en la etiopatogénesis de la sarcopenia. Existe también una evidencia epidemiológica soportando la relación entre envejecimiento con la caída de los niveles de testosterona en machos. Tanto la testosterona como las hormonas andróginas adrenales declinan con la edad, logrando un decline en la masa muscular, fuerza y estatus funcional (Korenman *et al.*, 1990).

- Radicales Libres

Los radicales libres causan importantes daños si no son rápidamente eliminados por la acción de los agentes antioxidantes y la producción de ERO aumenta rápidamente

con el envejecimiento. Ese aumento se debe básicamente por dos factores:

- una alteración en la cadena respiratoria
- funcionamiento insuficiente de los mecanismos de defensa antioxidantes

Hepple y colaboradores (Hepple *et al.*, 2003) relataron una disminución en la capacidad oxidativa asociada con el envejecimiento en el músculo esquelético de ratas, llevando a un decline en la máxima actividad aeróbica. Ese encontrado puede estar relacionado con la disminución de la actividad respiratoria mitocondrial con el avanzar de la edad.

Las mitocondrias son consideradas el centro de producción de ERO durante el metabolismo aeróbico y por lo tanto también son los marcadores primarios de daño oxidativo. Muchos estudios demuestran un aumento en el daño oxidativo en la mitocondria senescente y un aumento en la producción de ERO (Lee & Wei, 2001). Estos datos indican que la mitocondria ejerce un papel crítico en el envejecimiento de los tejidos, particularmente del músculo esquelético conjuntamente con el cerebro.

- Radicales Libres y actividad muscular

La actividad física proporciona enumerados efectos beneficiosos en la salud física y psíquica de sujetos jóvenes y viejos. El ejercicio, además de disminuir el riesgo de importantes enfermedades crónicas puede también disminuir

el riesgo del decline funcional muscular y pérdida de masa (sarcopenia).

Sin embargo, el músculo en senescencia se presenta más susceptible al estrés oxidativo durante el ejercicio debido a cambios ultraestructurales y bioquímicos que facilita la formación de ERO. Además, la reparación muscular y capacidad de regeneración están reducidas con el envejecimiento y eso puede potencialmente elevar el daño oxidativo celular. El envejecimiento aumenta la incidencia de daño muscular, especialmente daño causado por contracción excéntrica en ejercicios dinámicos intensos, con una respuesta inflamatoria causando estrés oxidativo (Ji, 2001; Evans, 2002).

Por lo tanto, es posible que ejercicio, especialmente ejercicio agotador, esté asociado con una producción anormal de ERO, debido al consumo de antioxidantes endógenos y daño en la biología de las moléculas y componentes celulares claves. Todavía, ancianos que son físicamente activos se benefician de las adaptaciones inducidas por el ejercicio, incrementando los mecanismos musculares, fuerza y resistencia que hacen que sean menos vulnerables a las lesiones agudas y inflamación crónicas. Por lo tanto, el equilibrio entre los efectos beneficiosos y nocivos del ejercicio puede ser de particular importancia en personas mayores, en la cual las deficiencias nutricionales y un estilo de vida comúnmente sedentario conlleva a una depleción de las reservas antioxidantes

corporales y a un concomitante aumento en la susceptibilidad del estrés oxidativo (Ji, 2002).

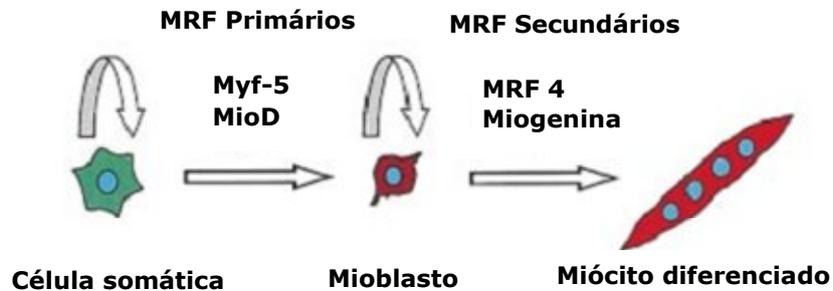
Sin embargo no es tarea fácil la de formular un protocolo de ejercicio estándar adecuado para cada individuo debido a que el establecimiento de la frecuencia, duración y carga en el ejercicio puede variar significativamente de un individuo para otro, entre hombres y mujeres; y entre un año y otro en un mismo individuo.

Los factores reguladores de la miogénesis (MRFs) desempeñan un importante papel en la transcripción de específicos genes musculares y, por lo tanto, en la síntesis de proteínas musculares específicas.

Las células satélites musculares son esenciales en la regeneración muscular. Aunque la capacidad de proliferación de las células satélite se mantiene durante el envejecimiento, su número y capacidad para diferenciarse está disminuida (Charge *et al.*, 2002; Charge & Rudnicki, 2004; Conboy *et al.*, 2005). Durante el proceso de regeneración, las células satélites se dividen y se diferencian, y la inducción de MRFs es crucial para ese proceso (Charge & Rudnicki, 2004). Los MRFs son una familia de 4 factores de transcripción: myf-5, MioD, miogenina y MRF4 que regulan la expresión de genes musculares específicos durante las varias etapas de diferenciación del tejido muscular. Éstos ejercen su función por dimerización con la proteína E, permitiendo su unión al ADN 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.

Figura I.10: MRFs y su actuación en el desarrollo muscular.



Myf5 y MioD se expresan en mioblastos proliferativos antes de iniciarse la diferenciación, mientras que la Miogenina y MRF4 se expresan únicamente en células diferenciadas. Los ratones que carecen de MioD y Myf5 no presentan diferenciación de la musculatura esquelética y, por otro lado, carecen de una población de células precursoras de mioblastos (Charge & Rudnicki, 2004). Aunque elevados niveles de ARNm de MRFs sugieren que el conductor a la regeneración está intacto en el músculo viejo (Alway *et al.*, 2002; Edstrom & Ulfhake, 2005), la diferenciación está deteriorada indicando que el desgaste muscular en el envejecimiento está, al menos parcialmente, relacionado con el fracaso la capacidad de diferenciarse (Edstrom & Ulfhake, 2005). Se han descrito niveles musculares de MRFs reducidos durante el envejecimiento

incluso en presencia de elevados niveles de ARNm (Alway *et al.*, 2002). Además, la cantidad de proteína E, una pieza obligatoria para la dimerización de los MRFs, está disminuida y puede contribuir a la reducida transcripción de genes musculares específicos bajo el control de los MRFs (Alway *et al.*, 2002). Por último se sabe que hay un aumento en la expresión de proteínas inhibidoras de la diferenciación (ID), y aunque éstas estimulan a la proliferación de las células satélites (Yokota & Mori, 2002), pueden inhibir su diferenciación.

Las proteínas ID pueden causar atrofia por deterioro en la actividad de los MRFs por 3 vías. Primero, las proteínas ID dimerizan la proteína E promocionando la disminución de su disponibilidad para los MRFs, lo que es un prerrequisito para la actividad transcripcional de los MRFs (Sun *et al.*, 1991). Segundo, las proteínas ID pueden formar heterodímeros con los MRFs, impidiendo la unión de los MRFs al ADN (Sun *et al.*, 1991). Tercero, la heterodimerización de los MRFs con la proteína ID torna los MRFs más vulnerables separándola de su camino (Reid, 2005).

OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis consiste en la determinación del posible papel de PGC-1 α en la prevención de los efectos del envejecimiento sobre la masa muscular, el contenido mitocondrial y la defensa antioxidante en animales de experimentación.

Los objetivos específicos son:

1- Determinar el efecto del ejercicio físico aeróbico regular sobre distintos marcadores de estrés oxidativo en el músculo de animales jóvenes y viejos, silvestres y deficientes en PGC-1 α , sometidos a un protocolo de entrenamiento aeróbico.

2- Determinar el efecto del ejercicio físico aeróbico regular sobre la expresión de genes antioxidantes en animales jóvenes y viejos, silvestres y deficientes en PGC-1 α

3- Determinar el efecto del ejercicio físico aeróbico regular sobre el proceso de biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético en animales jóvenes y viejos, silvestres y deficientes en PGC-1 α .

4- Determinar el efecto del ejercicio físico regular sobre el proceso de miogénesis en el músculo esquelético de animales jóvenes y viejos.

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.

MATERIALES Y MÉTODOS

A- MATERIALES

1-ESTUDIO CON ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Este estudio ha sido realizado de acuerdo con lo establecido en el Real Decreto 1201/2005, del 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE 21 de octubre de 2005). En ningún momento, los animales experimentaron dolor o angustia, es posible que un ligero estrés en el momento de la inyección del anestésico. El control de la profundidad de la anestesia se realizó con la valoración de los reflejos palpebral y podal.

1.1- ENTRENAMIENTO DURANTE 3 SEMANAS

Se emplearon 22 ratas Wistar macho; 11 de 3 meses de edad y 11 de 24 meses de edad. Las ratas se mantuvieron en el animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina, bajo condiciones constantes de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa (60%) y ciclos de luz y oscuridad de 12h-12h. El acceso al agua y a la comida fue libre, siendo la dieta pienso estándar comercializada por PANLAB S.L. cuyo valor calórico es de 3.100 Kcal/Kg. Los animales fueron revisados diariamente y tanto su peso, la cantidad de comida consumida, como los kilómetros recorridos fueron registrados semanalmente.

Las ratas se dividieron aleatoriamente en 4 grupos:

- Grupo reposo joven (n=6)
- Grupo entrenado joven (n=5)
- Grupo reposo viejo (n= 6)
- Grupo entrenado viejo (n=5)

1.1.1- ENTRENAMIENTO DE RATAS JÓVENES

El entrenamiento duró 3 semanas y se realizó durante 5 días a la semana. El protocolo empleado para el entrenamiento consistió en una modificación del descrito por Davies (Davies, Packer et al. 1981).

Las ratas jóvenes fueron previamente adaptadas al tapiz, según la siguiente tabla:

Tabla III.1: Protocolo de adaptación al tapiz rodante para ratas jóvenes.

1º día de adaptación	2º día de adaptación	3º día de adaptación
0% de inclinación 5'-5 m/min 10'-10m/min	5% de inclinación 5'-5 m/min 5'-12m/min	10% de inclinación 5'-5 m/min 5'-15m/min

Después de los 3 días de adaptación al tapiz, las ratas fueron entrenadas, empezando el primer día con 5 minutos de calentamiento a 15 m/min y 20 minutos de entrenamiento a 26,8 m/min. La inclinación del tapiz empleada durante todo el protocolo de entrenamiento fue del 15°.

Cada día se aumentó el tiempo de carrera 5 minutos hasta un tiempo total de 60 minutos que se alcanzó el primer día de la tercera semana. La velocidad de carrera se estableció en 30m/min para las ratas jóvenes.

El resumen del protocolo de entrenamiento se presenta en la siguiente tabla:

Tabla III.2: Protocolo de 3 semanas de entrenamiento con ratas jóvenes.

LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES
				5° inclinación 5'-15 m/min 20'- 26.8 m/min
15° inclinación 5'-15 m/min 20'- 26.8 m/min	15° inclinación 5'-15 m/min 20'- 30 m/min	15° inclinación 5'-15 m/min 25'- 30 m/min	15° inclinación 5'-15 m/min 30'- 30 m/min	15° inclinación 5'-15 35'- 30 m/min
15° inclinación 5'-15 m/min 35'- 30 m/min	15° inclinación 5'-15 m/min 40'- 30 m/min	15° inclinación 5'-15 m/min 45'- 30 m/min	15° inclinación 5'-15 m/min 50'- 30 m/min	15° inclinación 5'-15 m/min 55'- 30 m/min
15° inclinación 5'-15 m/min 60'- 30 m/min	5° inclinación 5'-15 m/min 60'- 30 m/min	Prueba de Resistencia	DESCANSO	SACRIFICIO

1.1.2- ENTRENAMIENTO DE RATAS VIEJAS

El entrenamiento duró 3 semanas y se realizó durante 5 días a la semana. El protocolo de entrenamiento se ajustó a los previamente publicados por otros grupos de investigación (Lawler, Powers et al. 1993). Las ratas viejas fueron previamente adaptadas al tapiz, según la siguiente tabla:

Tabla III.3: Protocolo de adaptación al tapiz rodante para ratas viejas.

1º día adaptación	2º día de adaptación	3º día de adaptación
5% de inclinación	5% de inclinación	5% de inclinación
5'-9 m/min	5'-9 m/min	5'-9 m/min
5'-12m/min	5'-12m/min	5'-12m/min
5'-17 m/min	5'-17 m/min	5'-17 m/min
2'-20 m/min	2'-20 m/min	2'-20 m/min

Después de los 3 días de adaptación al tapiz, las ratas fueron entrenadas, siempre al 5º de inclinación con un calentamiento previo de 2 minutos a 9 m/min y de 2 minutos a 11 m/min. Cada día se aumentó el tiempo total de carrera en 2 minutos hasta alcanzar 37 minutos. La velocidad de carrera se estableció en 15m/min para las ratas viejas. El grupo reposo fue ejercitado durante 5 minutos 1 vez a la semana durante las 3 semanas.

El resumen del protocolo de entrenamiento se presenta en la siguiente tabla:

Tabla III.4: Protocolo de 3 semanas de entrenamiento con ratas viejas.

LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES
				5° de inclinación 5'-9 m/min 5'- 11 m/min 10'- 17 m/min 2'-20 m/min
5° de inclinación 5'-9 m/min 5'- 11 m/min 15'- 15 m/ min	5° de inclinación 5'-9 m/min 5'- 11 m/min 17'- 15 m/ min	5° de inclinación 5'-9 m/min 5'- 11 m/min 19'- 15 m/ min	5° de inclinación 5'-9 m/min 5'- 11 m/min 5'- 17 m/min 21'- 15 m/ min	5° de inclinación 5'-9 m/min 5'- 11 m/min 23'- 15 m/ min
5° de inclinación 5'-9 m/min 5'- 11 m/min 25'- 15 m/ min	5° de inclinación 5'-9 m/min 5'- 11 m/min 27- 15 m/ min	5° de inclinación 5'-9 m/min 5'- 11 m/min 29'- 15 m/ min	5° de inclinación 5'-9 m/min 5'- 11 m/min 31'- 15 m/ min	5° de inclinación 5'-9 m/min 5'- 11 m/min 33- 15 m/ min
5° de inclinación 5'-9 m/min 5'- 11 m/min 35'- 15 m/ min	5° de inclinación 5'-9 m/min 5'- 11 m/min 37- 15 m/ min	Prueba de Resistencia	DESCANSO	SACRIFICIO

En todos los estudios sobre entrenamiento:

- a) los animales reposo fueron ejercitados durante 5 minutos, 1 vez a la semana, durante las 3 semanas.
- b) los animales fueron entrenados a una intensidad aproximada del 75% del VO_{2max} (Davies, Packer et al. 1981)
- c) los animales fueron sacrificados 24 horas después de la prueba de resistencia.

PRUEBA DE RESISTENCIA

La prueba de resistencia se basa en la cantidad máxima de tiempo que la rata puede correr en el tapiz rodante hasta el agotamiento, a una velocidad constante. El agotamiento del animal se determinó por su incapacidad para enderezarse al colocarlo sobre su costado (Davies, Packer et al. 1981).

En el caso del grupo de ratas jóvenes, se realizó un calentamiento de 5 min a 15 m/min y posteriormente se elevó la velocidad a 30 m/min. Esta velocidad se mantuvo hasta el agotamiento del animal. La inclinación del tapiz durante todo el protocolo fue del 15%.

En el grupo de ratas viejas, se realizó un calentamiento de 5 min a 9 m/min y se elevó la velocidad a 15 m/min hasta el agotamiento del animal. La inclinación del tapiz durante todo el protocolo fue del 5%.

1.2- ENTRENAMIENTO DURANTE 5 SEMANAS

Se emplearon 20 ratones de la cepa C57BL/6 macho de 6 meses de edad; siendo 10 ratones silvestres y 10 ratones knockout de PGC-1 α . Los ratones, procedentes del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, se mantuvieron en el animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina, bajo condiciones constantes de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad

relativa (60%) y ciclos de luz y oscuridad de 12h-12h. El acceso a agua y comida fue libre, siendo la dieta pienso estándar comercializada por PANLAB S.L. cuyo valor calórico es de 3.100 Kcal/Kg. Los animales fueron revisados diariamente y tanto su peso, la cantidad de comida consumida, como los kilómetros recorridos fueron registrados semanalmente.

Los ratones se dividieron aleatoriamente en 4 grupos:

- Grupo reposo silvestre (n=3)
- Grupo entrenado silvestre (n=7)
- Grupo reposo knockout de PGC-1 α (n= 4)
- Grupo entrenado knockout PGC-1 α (n=6)

El entrenamiento duró 5 semanas y se realizó durante 6 días a la semana. El protocolo empleado para el entrenamiento consistió en una modificación del descrito por Davies (Davies, Packer et al. 1981).

Los ratones fueron previamente adaptados al tapiz, según la siguiente tabla:

Tabla III.5: Protocolo de adaptación al tapiz rodante para ratones

1º día adaptación	2º día de adaptación	3º día de adaptación
0% de inclinación 5'-5 m/min 10'-10m/min	5% de inclinación 5'-5 m/min 5'-12m/min	10% de inclinación 5'-5 m/min 5'-15m/min

Transcurridos los 3 días de adaptación al tapiz, los ratones fueron entrenados, empezando el primero día con 5 minutos de calentamiento a 5 m/min y 20 minutos de entrenamiento a 15 m/min. La inclinación del tapiz empleada durante todo el protocolo de entrenamiento fue al 10°.

Cada día se aumentó el tiempo de carrera 5 minutos hasta un tiempo total de 60 minutos que se alcanzó el penúltimo día de la segunda semana. La velocidad de carrera que se estableció fue de 20 m/min. El grupo reposo fue ejercitado durante 10 minutos 1 vez a la semana durante las 5 semanas. Los animales fueron entrenados a una intensidad del 75% del VO_{2max} .

Los animales fueron sacrificados 24 h después de la prueba de resistencia.

El resumen del protocolo de entrenamiento se presenta en la siguiente tabla:

Tabla III.6: Protocolo de entrenamiento de ratones silvestres y KO de PGC-1a.

LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES	SABADO
		10° de inclinación 5' - 5m/min 20' - 15m/min	10° de inclinación 5' - 5m/min 25' - 16m/min	10° de inclinación 5' - 5m/min 30' - 17m/min	10° de inclinación 5' - 5m/min 35' - 18m/min
10° de inclinación 5' - 5m/min 40' - 19m/min	10° de inclinación 5' - 5m/min 45' - 20m/min	10° de inclinación 5' - 5m/min 50' - 20m/min	10° de inclinación 5' - 5m/min 55' - 20m/min	10° de inclinación 5' - 5m/min 60' - 20m/min	10° de inclinación 5' - 5m/min 60' - 20m/min
10° de inclinación 5' - 5m/min 60' - 20m/min					
10° de inclinación 5' - 5m/min 60' - 20m/min					
10° de inclinación 5' - 5m/min 60' - 20m/min					
10° de inclinación 5' - 5m/min 60' - 20m/min	10° de inclinación 5' - 5m/min 60' - 20m/min	Prueba de Resistencia	Descanso	Sacrificio	

PRUEBA DE RESISTENCIA

La prueba de resistencia se basa en la cantidad máxima de tiempo que el animal puede correr en el tapiz rodante hasta el agotamiento, a una velocidad constante. El agotamiento del animal se determinó por su incapacidad para enderezarse al colocarlo sobre su costado.

SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

Tras prueba de resistencia, los animales fueron sacrificados administrándoles una sobredosis de pentotal sódico (50mg/Kg de peso).

Los tejidos recogidos fueron: cerebro, corazón, hígado, riñón, bazo, músculo gastrocnemio y músculo sóleo. La sangre fue extraída por punción venosa.

Todos los tejidos fueron recogidos con la técnica del "freeze-clamping", en la que utilizando unas pinzas previamente sumergidas en nitrógeno líquido, se aplasta el

tejido y se congela en nitrógeno preservando así todas sus características bioquímicas. Los tejidos fueron posteriormente conservados a una temperatura de -80°C.

2- APARATOS

2.1- CENTRÍFUGAS

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

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

2.2- ESPECTROFOTÓMETRO

Se utilizó un aparato de la marca Cecil, modelo CE 3021 3000 series.

2.3- ESPECTOFOTÓMETRO DE LUMINESCENCIA

Se utilizó un aparato de la marca Perkim Elmer, modelo LS50B.

2.4- PHMETRO

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

2.5- BALANZAS

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

2.6- EQUIPO DE ESTERILIZACIÓN:

- a) Autoclave Selecta;
- b) Estufa de secado Heraus Instruments- D6450 Hanau

2.7- CUBETAS DE ELECTROFORESIS

Marca BIORAD, modelo Mini-PROTEAN 3 Cell.

2.8- CUBETAS PARA ELECTROTRANSFERENCIA

Marca BIORAD, modelo Mini Trans-Blot Cell.

2.9- FUENTES DE ALIMENTACIÓN PARA LA ELECTROFORESIS

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

2.10- SISTEMA DE ANÁLISIS DE IMÁGENES

Marca FUJIFILM, modelo LAS-1000 plus.

2.11- TAPIZ RODANTE

Para someter a las ratas al protocolo de ejercicio físico se utilizó un tapiz rodante Treadmill 3R 6 y el modelo de tapiz Quinton para roedores.

3- REACTIVOS

- **DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS**

La cantidad de proteínas en las muestras biológicas analizadas se determinó utilizando el método de Lowry (Lowry, Rosebrough et al. 1951).

- **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.

- **OTROS REACTIVOS**

Los reactivos enlistados a continuación se obtuvieron de las siguientes firmas: Sigma-Aldrich Química (España), Boehringer Mannheim S.A. (Alemania), Panreac, Merck Biochemical (Alemania). Hidróxido potásico (KOH), tris, glicina, SDS, azul de bromofenol, azul de comassie, acrilamida, mercaptoetanol, TEMED, APS, DTT, metanol, Tween 20, IGEPAL, fosfato potásico, CDNB, cloruro sódico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), HEPES, bisacrilamida, sacarosa, ácido clorhídrico, SDS, azul de bromofenol, azul de comassie, BSA, sodio deoxicolato, pirofosfato sódico, ortovanato de sodio e inhibidor de proteasas.

B- MÉTODOS

1- MÉTODO PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE LOWRY.

1.1- FUNDAMENTO.

Se utilizó el Protein Assay Kit, basado en una modificación de Peterson del método de Lowry (Lowry, Rosebrough et al. 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 interactuar con el tartrato da lugar a un compuesto de color azul (Lowry, Rosebrough et al. 1951).

El método de Lowry es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se 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.

1.2- 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.

1.3- 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.

1.4- 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- EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS A PARTIR DE TEJIDO MUSCULAR.

2.1- FUNDAMENTO

Consiste en la extracción de proteínas citoplasmáticas del tejido muscular con la utilización de un tampón y la ayuda de un homogeneizador.

2.2- REACTIVOS

a) Tampón para obtención de extractos citoplasmático en el músculo:

- 1% Nonidet- P40
- 50mM NaCl
- Tris 10 mM pH 7.5
- 5 mM EDTA
- 0.25 M de sacarosa
- 30 mM de Pirofosfato Sódico
- 0.25% de Sodium deoxycholate
- 50mM NAF
- 100 μ M Ortovanadato de Sodio
- 5 μ L x mL de tampón de un combinado de los principales inhibidores de proteasas

2.3- PROTOCOLO

- Se parte de fragmentos de músculos esqueléticos de entre 80 a 100 mg, que son previamente lavados en PBS.

- Tras el lavado, se corta en pequeños trozos en tampón de lisis frío (1mL por cada 100 mg de tejido). Se transfiere al músculo a un homogeneizador tipo Dounce de vidrio (Afora S.A., España) introducido en hielo.

- La suspensión se somete a diez pases de homogeneización con el émbolo.

- El producto inicial se pasa a tubos de microcentrífuga y se centrifuga durante 15 minutos a 12.000 x g a 4°C.

- El sobrenadante que contiene los extractos proteicos citoplasmáticos es alicuotado y almacenado a -80°C hasta su valoración y utilización.

2.4- CUANTIFICACIÓN

En los extractos citoplasmáticos, los valores de concentración de proteínas fueron obtenidos con el método de Lowry.

3- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL; LA MIOGÉNESIS Y GENES ANTIOXIDANTES, MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS Y POSTERIOR WESTERN BLOTTING.

3.1- 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 sin la organización tridimensional característica de su función biológica. La combinación de un detergente desnaturizante (SDS) y un agente reductor (β -mercaptoetanol) es lo 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 8mM, las proteínas unen 1.4g de SDS por gramo de proteínas, lo que equivale a la unión de una molécula de SDS por cada 2 aminoácidos. Las

cargas propias de las proteínas quedan así enmascaradas o anuladas. Como cada molécula de SDS proporciona una carga negativa (del grupo SO_4^-), los complejos proteína/SDS están cargados negativamente de forma uniforme. La separación, por tanto, depende de un parámetro físico-químico, la masa molecular, que se puede calcular.

Mediante la utilización de esta técnica se valoró la expresión de las proteínas relacionadas con la biogénesis mitocondrial, miogénesis y la capacidad antioxidante. Todas ellas se valoraron utilizando como referencia los niveles de α -actina en los extractos citosólicos musculares.

3.2- CONDICIONES DEL GEL Y TRANSFERENCIA

Para detectar la expresión de proteínas, se cargaron 50 μg de proteína citoplasmática en geles discontinuos al 12% de acrilamida (29:1 Acrilamida:Bisacrilamida) con un 0.1% de SDS, sobre los que se aplicó un campo eléctrico de voltaje constante de 100 Voltios durante al menos 2 horas en tampón Tris-Glicina (25mM Tris, 200mM Glicina, 0.1% SDS, pH 8.3).

Una vez finalizado el desplazamiento electroforético, el gel es transferido a una membrana nitrocelulosa (Schelider & Schuel, USA), mediante electrotransferencia en condiciones húmedas por medio del sistema Miniprotean II (Bio.Rad, USA).

El proceso se desarrolla durante 90 minutos, a una temperatura de 4°C, una intensidad constante de 240 mili Amperios y en tampón de transferencia (25mM Tris, 192mM Glicina, Metanol 20% v/v, pH 8.3).

3.3- VISUALIZACIÓN

- Tras la transferencia, las membranas se incuban 60 minutos a temperatura ambiente en tampón bloqueo: 5% p/v de leche desnatada en polvo, 0.1% Tween-20 en 1XTBS (20mM Tris, 137mM NaCl, pH 7.6);

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

- 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 1 x TBS) y con la correspondientes diluciones de anticuerpos primarios (Cell Signaling Technology, Santa Cruz y Sigma);

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

- Las membranas son incubadas 60 minutos con el anticuerpo secundario que se disuelve en tampón de bloqueo y con la dilución específica de cada uno;

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

- 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;

- Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante un programa informático de la casa Fujifilm mediante el cual se realizó la densitometría de las bandas. Los valores de las proteínas estudiadas se expresaron en función de los valores de expresión de α -actina en los extractos citosólicos musculares.

4- ESTUDIO DE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS EN MÚSCULO ESQUELÉTICO Y EN PLASMA.

4.1- FUNDAMENTO

Las modificaciones oxidativas de las proteínas por acción de los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno como el hidroxinonenal ocurren tanto en procesos fisiológicos como patológicos. Como consecuencia de las modificaciones, los grupos carbonilo son introducidos en el interior de las cadenas de aminoácidos de forma específica.

Los grupos carbonilo son derivatizados a 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP-hidrazona) por su reacción con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Las muestras derivatizadas son separadas mediante electroforesis en gel de acrilamida seguida por un Western Blotting y la inmunodetección.

4.2- PREPARADO DEL LISADO PROTEICO.

1- Se parte de fragmentos de músculos esquelético de 100 mg, que son en primer lugar, lavados en PBS.

2- Tras el lavado se cortan en pequeños trozos en tampón de lisis frío (1 mL por cada 100 mg de tejido). El tampón consta de: 50 mM NaCl; Tris 10 mM pH 7.5; 5 mM EDTA; Sucrosa 0,25 M; Pirofosfato Sódico 30 mM; Ortovanadato Sódico 100 mM; 50 mM NaF; 50mM DTT; 1mM PMSF; 3mM Benzamidina; 10 mM Leupeptina; 10 mg/mL Aprotinina; 5 mM 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 producto inicial se transfiere a tubos de microcentrífuga y se centrifuga durante 15 minutos a 12.000 g y a 4°C.

6- El sobrenadante es almacenado a -80°C hasta su valoración y utilización.

4.3- DERIVATIZACIÓN DE LA MUESTRA

Para la derivatización de la muestra se utilizaron los reactivos presentes en el kit (Oxyblot Protein Oxidation Kit, Intergen Company) así como el protocolo aconsejado por el fabricante.

1.- Se parte de entre 15-20 µg de proteínas que son desnaturalizadas con SDS 12% para alcanzar una concentración final de SDS 6%.

2.- La muestra se derivatiza añadiéndole una solución 1 x DNPH. El volumen añadido es idéntico al que suman la proteína con el SDS.

3.- Los tubos se incuban a temperatura ambiente durante 15 minutos.

4.- La muestra se neutraliza con la Solución de Neutralización del Kit.

4.4- CONDICIONES DEL GEL Y TRANSFERENCIA.

Una vez neutralizadas las muestras, están preparadas para cargar en el gel de poliacrilamida. Para valorar la oxidación de proteínas en músculo esquelético se cargaron 30 µg en geles discontinuos al 12% de Acrilamida (29:1 Acrilamida:Bisacrilamida) con un 0,1% de SDS, sobre los que se aplicó un campo eléctrico de voltaje constante de 100 Voltios durante al menos 2 horas en tampón Tris-Glicina (25 mM Tris, 200 mM Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3). Una vez finalizado el desplazamiento electroforético el gel es transferido (Western Blotting) a una membrana de Nitrocelulosa (Schelider & Schuel, USA), mediante electrotransferencia en condiciones húmedas por medio del sistema Mini-protean II (Bio-Rad, USA). El proceso se desarrolla durante 2 horas, a una temperatura de 4°C, una

intensidad constante de 300 mAmperios, en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20% v/v, pH 8,3).

4.5- VISUALIZACIÓN.

1.- Tras la transferencia las membranas se incuban 60 minutos a temperatura ambiente en tampón de bloqueo: 5% p/v de leche desnatada en polvo, 0,1% Tween-20 en 1XTBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6).

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

3.- Las membranas se incuban 60 minutos a temperatura ambiente, con agitación orbital, en tampón de anticuerpo (5% BSA, 0,1 % Tween-20 en 1XTBS) y con una dilución 1:150 de anticuerpo primario (Anti-DNP de conejo)

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

5.- Las membranas se incuban 60 minutos a temperatura ambiente, con agitación orbital, en tampón de bloqueo y con una dilución 1:300 de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, anti IgG de conejo preparado en cabra.

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

7.- La membrana se incubó 1 minuto con reactivo ECL (Amersham Pharmacia, USA) e inmediatamente se expone a autorradiografía con films de fotografía (KODAK X-OMAT).

4.6- CUANTIFICACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Las imágenes obtenidas fueron escaneadas y mediante el programa PrestoPage manager para EPSON, almacenadas en formato digital TIF para poder ser densitometradas utilizando el software " Analysis 3".

5- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

La estadística descriptiva utilizada muestra la mediana como medida de tendencia central y la desviación típica como medida de dispersión. Para el análisis estadístico de los resultados, primero se realizó un análisis de la varianza. La hipótesis nula fue aceptada para todos los valores de aquellos grupos en los cuales el valor de H no fue significativa para un valor de $p < 0,05$. La normalidad de la distribución se comprobó con el test de Kolmogorov y la homogeneidad de la varianza fue probada por la estadística de Levene.

Para analizar el efecto del entrenamiento sobre el rendimiento se utilizó una ANOVA de dos factores por medidas repetidas con los factores Tiempo (antes y después) y tratamiento (control y entrenada). Luego, el grupo de

datos para los que H fue significativa, se realizaron comparaciones múltiples de las medianas de los grupos con el post hoc test de Newmann´s Keuls.

Para analizar el efecto del entrenamiento y de la edad sobre los parámetros bioquímicos, se realizó un ANOVA de dos factores, con los factores tratamiento (control y entrenamiento) y edad (joven y viejo, silvestre y deficientes de PGC-1 α). Luego, el grupo de datos para los que H fue significativa, se realizaron comparaciones múltiples de las medianas de los grupos con el test de Bonferroni

Todo el tratamiento estadístico de los resultados se realizó con hojas de cálculo de Microsoft Excel y con el software SPSS, versión 13.

RESULTADOS

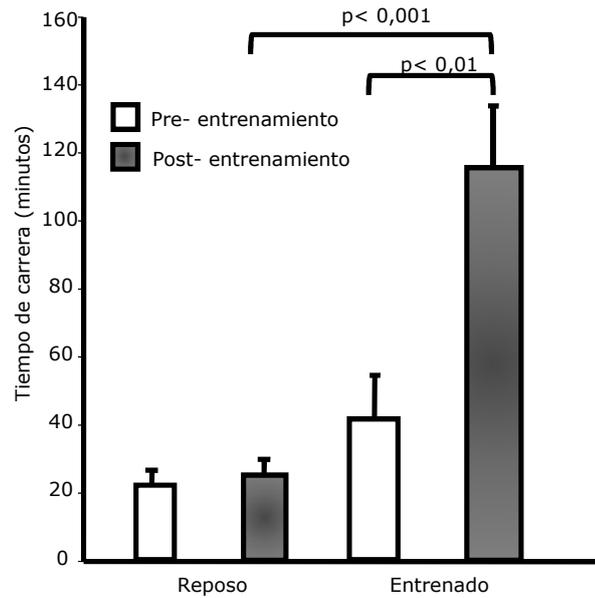
1. ESTUDIO DEL EFECTO DE UN PROTOCOLO DE ENTRENAMIENTO AERÓBICO DE 3 SEMANAS SOBRE EL RENDIMIENTO FÍSICO EN RATAS JÓVENES Y VIEJAS.

El rendimiento de los animales, tras el periodo de entrenamiento, se determinó mediante la aplicación de una prueba de resistencia en tapiz rodante. En ella se midió el tiempo de carrera antes y después de iniciarse el entrenamiento. La resistencia es una cualidad física básica muy modificable con el entrenamiento y se cree que está muy relacionada con el número de mitocondrias en el músculo esquelético. De hecho, la fosforilación oxidativa se considera uno de los factores limitantes para la resistencia en carrera en tapiz rodante. El tiempo de carrera (en minutos) hasta el agotamiento, antes y después del entrenamiento, fue el parámetro estudiado.

1.1- PRUEBA DE RESISTENCIA EN RATAS JÓVENES ENTRENADAS 3 SEMANAS.

Nuestros resultados muestran una mejora significativa del tiempo de carrera después del protocolo de entrenamiento aeróbico de 3 semanas de duración.

Figura IV.1: Prueba de resistencia: ratas jóvenes entrenadas durante 3 semanas.

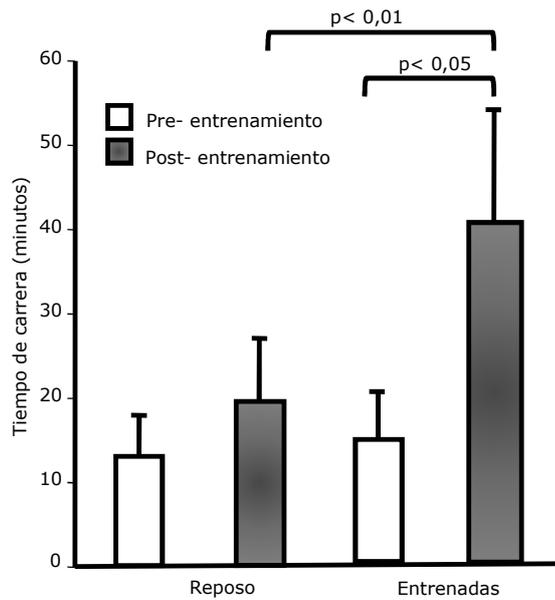


Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n= 6$ en grupo reposo; $n= 5$ en grupo entrenado.

1.2- PRUEBA DE RESISTENCIA EN RATAS VIEJAS ENTRENADAS 3 SEMANAS.

Nuestros resultados muestran una mejora significativa del tiempo de carrera, después del protocolo de entrenamiento aeróbico de 3 semanas de duración, en el grupo de animales viejos.

Figura IV.2: Prueba de resistencia: ratas viejas entrenadas durante 3 semanas.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n= 6$ en grupo reposo; $n= 5$ en grupo entrenado.

2. ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO ASOCIADO A UN PROTOCOLO DE ENTRENAMIENTO EN RATAS JÓVENES Y VIEJAS.

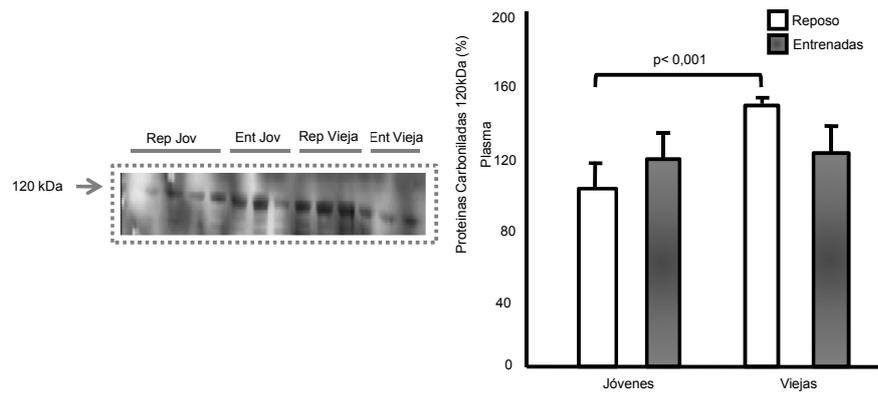
Los efectos nocivos de los radicales libres generados durante el ejercicio físico agotador están muy bien documentados (Ver introducción). Sin embargo, el ejercicio físico, sobre todo cuando no es agotador, resulta una práctica claramente beneficiosa para la prevención y tratamiento de muchas enfermedades (Pedersen & Saltin, 2006). Los efectos indeseables del ejercicio agotador se

evitan, al menos en parte, con el entrenamiento. Éste reduce la susceptibilidad del músculo a los radicales libres (Salminen & Vihko, 1983) e induce la expresión de enzimas antioxidantes (Gomez-Cabrera *et al.*, 2008). El ejercicio físico regular genera una adaptación frente al estrés oxidativo evidenciado por un descenso del daño al ADN, niveles mantenidos de oxidación proteica y un aumento de la resistencia frente a la administración crónica de peróxido de hidrógeno (Radak *et al.*, 1999; Radak *et al.*, 2000).

2.1. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ENTRENAMIENTO SOBRE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS EN PLASMA DE RATAS JÓVENES Y VIEJAS TRAS UN PROTOCOLO DE ENTRENAMIENTO AERÓBICO.

Con la técnica del Western Blotting detectamos los derivados carbonilo formados en plasma por su reacción con la 2,4-dinitrofenilhidracina (Nakamura & Goto, 1996). En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas (Stadman, 1992). En el plasma, encontramos cambios significativos en las proteínas correspondientes a un peso molecular aproximado 120 kDa. En esta banda de proteínas encontramos una diferencia significativa entre el grupo viejo reposo frente al joven reposo.

Figura IV.3: Proteínas oxidadas en plasma de ratas jóvenes y viejas entrenadas durante 3 semanas.



Western Blot representativo de proteínas carboniladas. Las muestras estudiadas fueron los plasmas de ratas jóvenes reposo (Rep Jov), ratas jóvenes entrenadas (Ent Jov), ratas reposo viejas (Rep Vieja) y ratas entrenadas viejas (Ent Vieja).

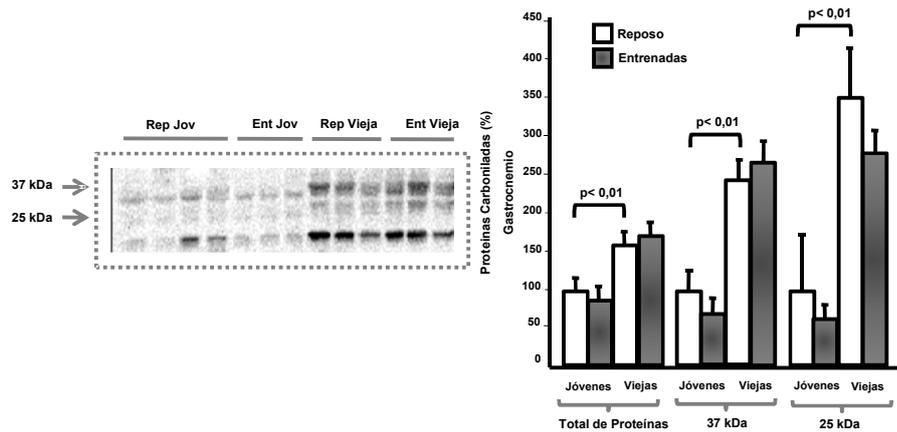
Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 4 en grupo reposo jóvenes; N= 3 en grupo entrenado jóvenes; N=3 en grupo reposo vieja; N=3 en grupo entrenada vieja.

2.2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ENTRENAMIENTO SOBRE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATAS JÓVENES Y VIEJAS TRAS UN PROTOCOLO DE ENTRENAMIENTO AERÓBICO.

En los procesos de daño oxidativo a proteínas se consideran aminoácidos con especial susceptibilidad la lisina, prolina y arginina (Stadman, 1992). Éste suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína (Grant *et al.*, 1993). Este hecho es importante ya que las proteínas modificadas por estrés oxidativo pierden su función fisiológica y presentan una mayor tendencia a la degradación. La acumulación de estas proteínas puede

condicionar procesos fisiológicos vitales (Radak *et al.*, 1999). En nuestro estudio determinamos la oxidación de proteínas en músculo de rata y encontramos una diferencia significativa en la banda correspondiente a un peso molecular de 25 y 37 kDa en el grupo reposo vieja frente a los animales reposo jóvenes.

Figura IV.4: Proteínas oxidadas en gastrocnemio de ratas jóvenes y viejas entrenadas durante 3 semanas.



Western Blot representativo de proteínas carboniladas. Los extractos fueron preparados con músculo gastrocnemio de ratas jóvenes reposo (Rep Jov), ratas jóvenes entrenadas (Ent Jov), ratas reposo viejas (Rep Vieja) y ratas entrenadas viejas (Ent Vieja).

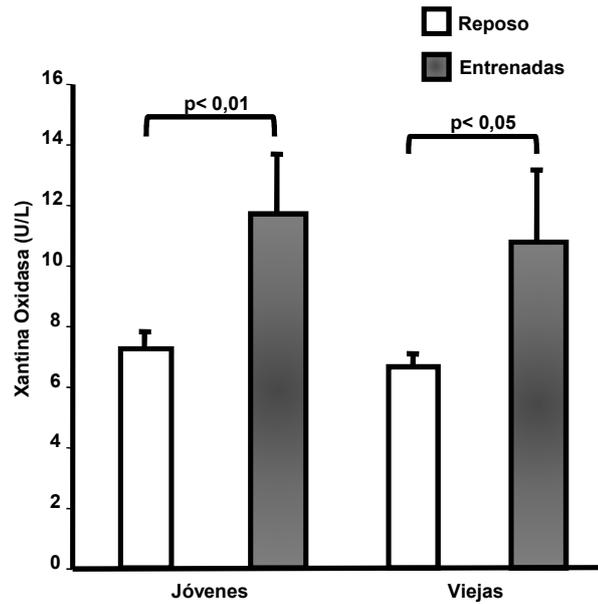
Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 4 en grupo reposo jóvenes; N= 3 en grupo entrenado jóvenes; N=3 en grupo reposo vieja; N=3 en grupo entrenada vieja.

2.3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ENTRENAMIENTO EN LA ACTIVACIÓN DE LA ENZIMA XANTINA OXIDASA EN PLASMA DE RATAS JÓVENES Y VIEJAS SOMETIDAS A UN ENTRENAMIENTO AERÓBICO DE 3 SEMANAS.

La xantina oxidasa (XO) es una enzima que cataliza la hidroxilación de una amplia gama de sustratos como purinas, pirimidinas, pterinas y aldehídos. Contiene molibdeno y hierro e interviene en la degradación de los nucleótidos del tipo purina. La xantina-oxidasa cataliza la oxidación de la hipoxantina a xantina y puede seguir catalizando la oxidación de la xantina a ácido úrico, generando radicales libres en el proceso (Gomez-Cabrera *et al.*, 2008).

Nuestros resultados muestran un aumento en la actividad de la xantina oxidasa en plasma de ratas jóvenes entrenadas frente a reposo y de ratas viejas entrenadas frente a viejas reposo.

Figura IV.5: Xantina oxidasa de ratas jóvenes y viejas entrenadas durante 3 semanas.



Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=4$ en grupo reposo jóvenes; $n=3$ en grupo entrenado jóvenes; $n=3$ en grupo reposo vieja; $n=3$ en grupo entrenado vieja.

2.4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATAS JÓVENES Y VIEJAS SOMETIDAS A UN PROTOCOLO DE ENTRENAMIENTO AERÓBICO DE 3 SEMANAS.

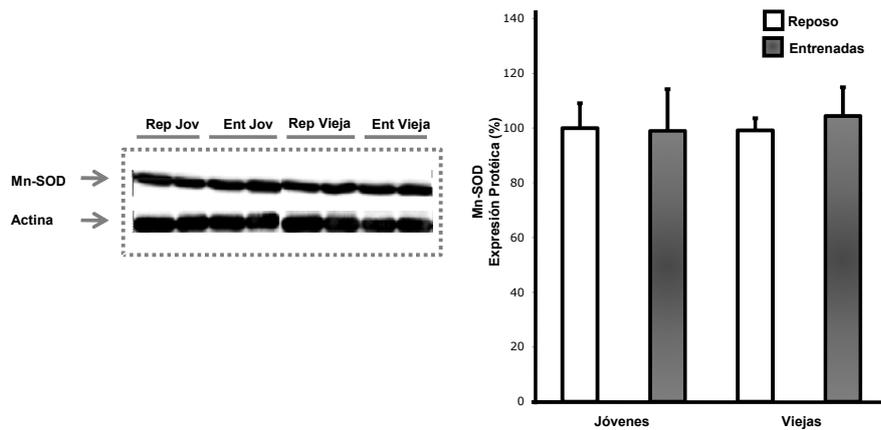
2.4.1. EXPRESIÓN DE LA Mn-SOD.

La superóxido dismutasa es una enzima antioxidante que juega un papel importante en la dismutación del radical

superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno (McCord & Fridovich, 1969).

Observamos en nuestros resultados que la expresión de la enzima en el músculo esquelético no experimentó ningún cambio significativo en ninguno de los grupos experimentales.

Figura IV.6: Mn-SOD en músculo esquelético de ratas jóvenes y viejas entrenadas durante 3 semanas.



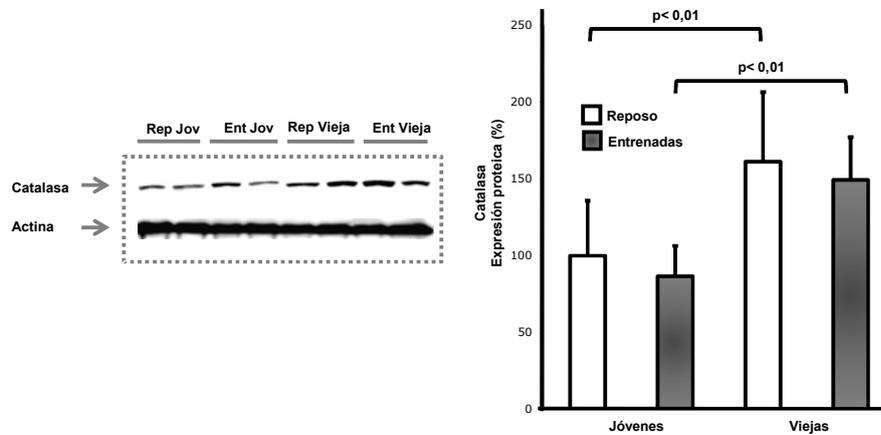
Western Blot representativo de Mn-SOD. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo esquelético de ratas jóvenes reposo (Rep Jov), ratas jóvenes entrenadas (Ent Jov), ratas reposo viejas (Rep Vieja) y ratas entrenadas viejas (Ent Vieja).

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 6 en grupo reposo jóvenes; N= 5 en grupo entrenado jóvenes; N=6 en grupo reposo vieja; N=6 en grupo reposo vieja; N=5 en grupo entrenada vieja.

2.4.2. EXPRESIÓN DE LA CATALASA.

La catalasa es una enzima antioxidante de defensa primaria que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno dando lugar a agua y a una molécula de oxígeno (Chance *et al.*, 1979). Como muestra la siguiente figura nuestros datos demuestran un incremento significativo en los niveles de la proteína en el músculo esquelético de los animales viejos cuando se comparan con los jóvenes.

Figura IV.7: Catalasa en músculo esquelético de ratas jóvenes y viejas entrenadas durante 3 semanas.



Western Blot representativo de catalasa. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo esquelético de ratas jóvenes reposo (Rep Jov), ratas jóvenes entrenadas (Ent Jov), ratas reposo viejas (Rep Vieja) y ratas entrenadas viejas (Ent Vieja).

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 6 en grupo reposo jóvenes; N= 5 en grupo entrenado jóvenes; N=6 en grupo reposo vieja; N=6 en grupo reposo vieja; N=5 en grupo entrenada vieja.

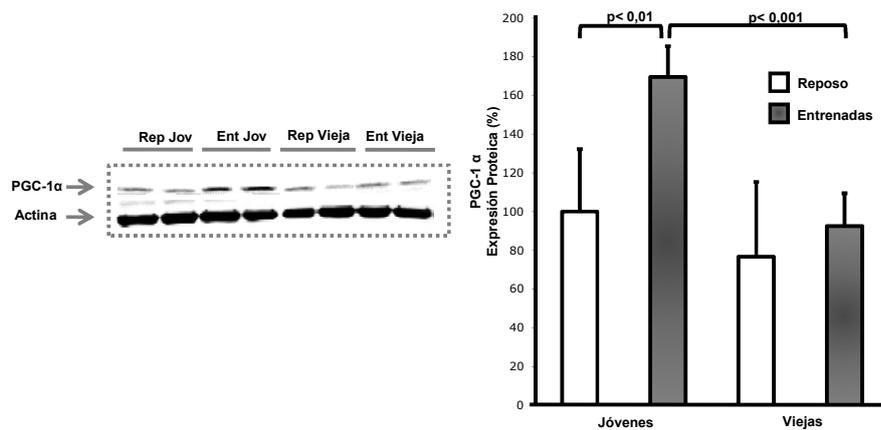
3. ESTUDIO DE LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATAS JÓVENES Y VIEJAS SOMETIDAS AL UN PROTOCOLO DE ENTRENAMIENTO AERÓBICO DURANTE 3 SEMANAS.

3.1. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PGC-1 α .

PGC-1 α es un co-activador transcripcional que juega un papel muy importante en la regulación del proceso de biogénesis mitocondrial y, en general, en la regulación de la transcripción de genes que codifican proteínas relacionadas con el metabolismo oxidativo (Lin *et al.*, 2005).

Nuestros resultados muestran un incremento significativo en la expresión de PGC-1 α en el grupo de animales jóvenes entrenados frente al grupo de animales jóvenes reposo y al grupo de animales viejos entrenados.

Figura IV.8: Expresión de PGC-1 α en músculo esquelético de ratas jóvenes y viejas entrenadas durante 3 semanas.



Western Blot representativo de PGC-1 α . Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo esquelético de ratas jóvenes reposo (Rep Jóv), ratas jóvenes entrenadas (Ent Jóv), ratas reposo viejas (Rep Vieja) y ratas entrenadas viejas (Ent Vieja).

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 6 en grupo reposo jóvenes; N = 5 en grupo entrenado jóvenes; N=6 en grupo reposo vieja; N=5 en grupo entrenada vieja.

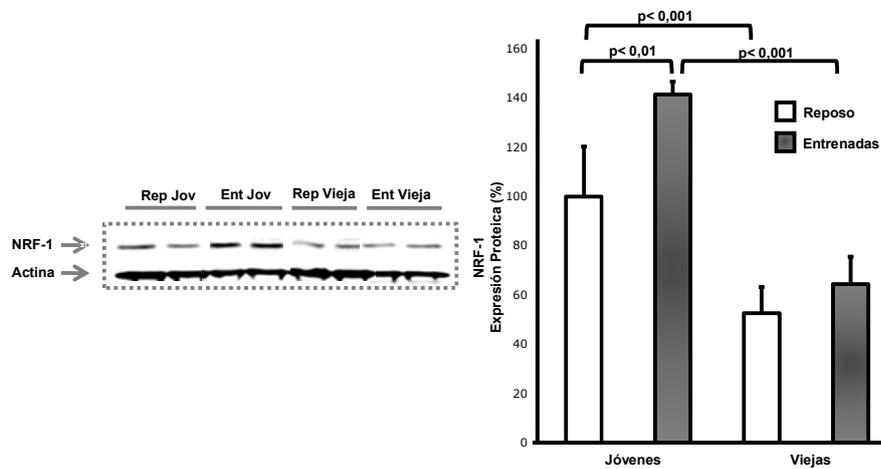
3.2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE NRF-1.

NRF-1 es un importante factor de transcripción en la cascada de señalización que conduce al proceso de biogénesis mitocondrial (Scarpulla, 2002). NRF-1 ejerce un importante papel en la activación, conjuntamente con PGC-1 α , de un factor de transcripción mitocondrial: Tfam. En el músculo esquelético, el aumento de su expresión se traducirá en un aumento en la proteína Tfam y por lo tanto un aumento en el número de copias de ADNmt, estimulando el aumento del número de mitocondrias. Tfam ha sido muy estudiado y se considera el factor de transcripción más

importante, en mamíferos, en la regulación de la transcripción del ADNmt (Virbasius *et al.*, 1993).

Nuestros resultados muestran un aumento significativo en la expresión de NRF-1 en los músculos de los animales jóvenes entrenados frente a los jóvenes reposo. Del mismo modo encontramos una disminución significativa en los niveles de NRF-1 en los músculos de los animales viejos, reposo y entrenado, frente a los músculos de animales jóvenes, reposo y entrenados respectivamente.

Figura IV.9: Expresión de NRF-1 en músculo esquelético de ratas jóvenes y viejas entrenadas durante 3 semanas.



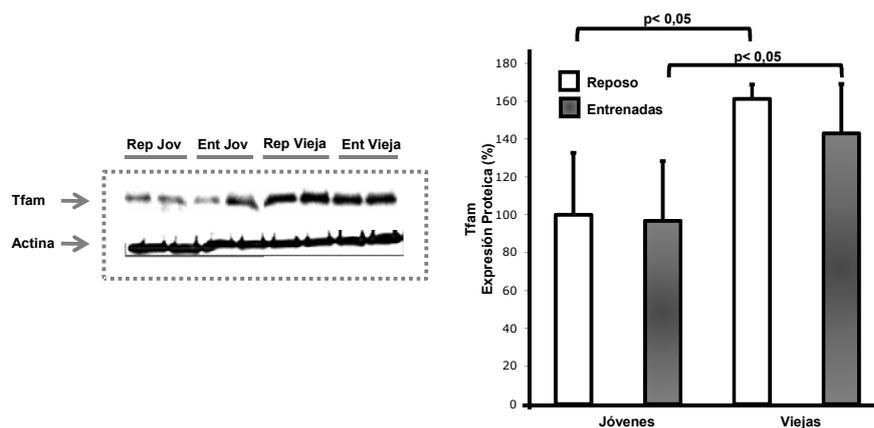
Western Blot representativo de NRF-1. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo esquelético de ratas jóvenes reposo (Rep Jov), ratas jóvenes entrenadas (Ent Jov), ratas reposo viejas (Rep Vieja) y ratas entrenadas viejas (Ent Vieja).

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 6 en grupo reposo jóvenes; N= 5 en grupo entrenado jóvenes; N=6 en grupo reposo vieja; N=5 en grupo entrenada vieja.

3.3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE TFAM.

Uno de los factores de transcripción más conocidos en la coordinación y regulación de proteínas mitocondriales es el factor de transcripción mitocondrial A. En la mitocondria, Tfam es el responsable de la transcripción y replicación del ADN mitocondrial (Wu *et al.*, 1999). En nuestros resultados observamos que en el músculo esquelético se produce un incremento de Tfam en el grupo de las ratas viejas frente a las jóvenes. Sin embargo no hay diferencias significativas con el entrenamiento en los niveles de este factor de transcripción.

Figura IV.10: Expresión de Tfam en músculo esquelético de ratas jóvenes y viejas entrenadas durante 3 semanas.



Western Blot representativo de Tfam. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo esquelético de ratas jóvenes reposo (Rep Jov), ratas jóvenes entrenadas (Ent Jov), ratas reposo viejas (Rep Vieja) y ratas entrenadas viejas (Ent Vieja).

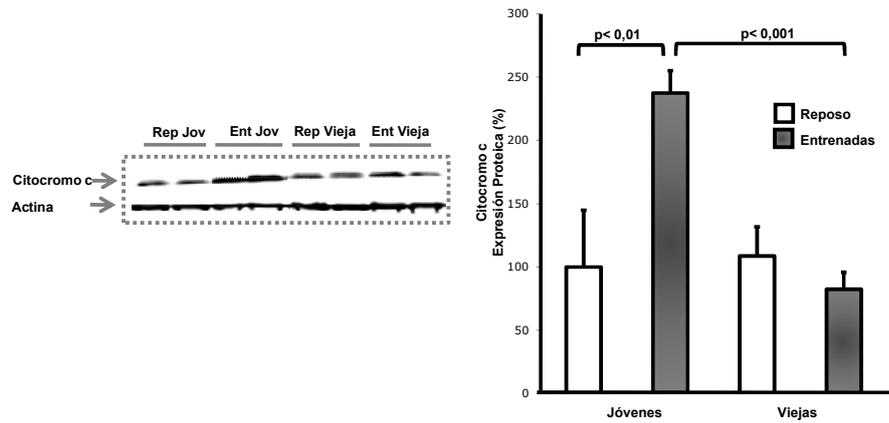
Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 6 en grupo reposo jóvenes; N= 5 en grupo entrenado jóvenes; N=6 en grupo reposo vieja; N=5 en grupo entrenada vieja.

3.4- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE CITOCROMO C.

El citocromo c es una proteína de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y sus niveles se han utilizado como marcador de contenido mitocondrial (Hood, 2001). Su variación se sabe que está influenciada por modificaciones en la contracción muscular (Booth, 1977; Morrison *et al.*, 1987).

En el músculo esquelético, nuestros resultados indican un incremento significativo en los niveles de citocromo c en las ratas jóvenes entrenadas frente a las jóvenes reposo y frente a los animales viejos entrenados. Sin embargo no observamos ninguna diferencia significativa entre los grupos de ratas viejas.

Figura IV.11: Expresión de citocromo c en músculo esquelético de ratas jóvenes y viejas entrenadas durante 3 semanas.



Western Blot representativo de Citocromo c. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo esquelético de ratas jóvenes reposo (Rep Jov), ratas jóvenes entrenadas (Ent Jov), ratas reposo viejas (Rep Vieja) y ratas entrenadas viejas (Ent Vieja).

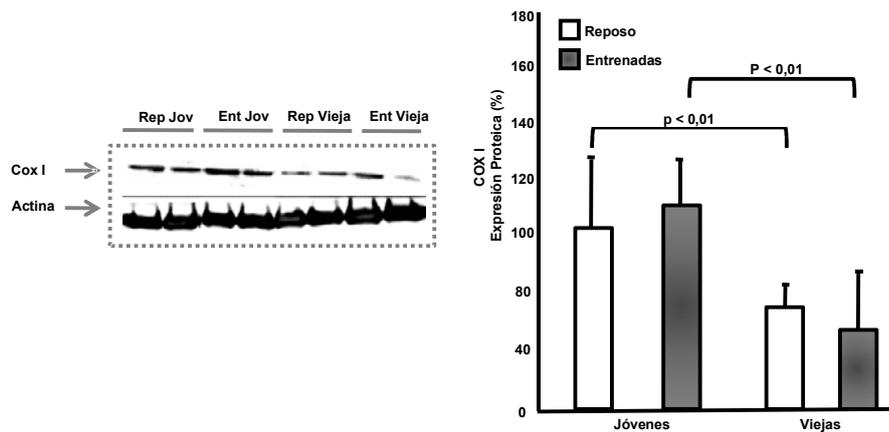
Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 6 en grupo reposo jóvenes; N= 5 en grupo entrenado jóvenes; N=6 en grupo reposo vieja; N=6 en grupo reposo vieja; N=5 en grupo entrenada vieja.

3.5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA COX I.

La COX I es una subunidad de la citocromo c oxidasa (COX), codificada por el ADN mitocondrial y cuya función está relacionada con procesos catalíticos (Vatner et al. 2009).

En nuestros resultados observamos un aumento significativo de su expresión en los jóvenes reposo frente a los viejos reposo, y un aumento significativo en los jóvenes entrenados frente a los viejos entrenados.

Figura IV.12: Expresión de COX I en músculo esquelético de ratas jóvenes y viejas entrenadas durante 3 semanas.



Western Blot representativo de Cox I. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo esquelético de ratas jóvenes reposo (Rep Jov), ratas jóvenes entrenadas (Ent Jov), ratas reposo viejas (Rep Vieja) y ratas entrenadas viejas (Ent Vieja).

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 6 en grupo reposo jóvenes; N = 5 en grupo entrenado jóvenes; N = 6 en grupo reposo vieja; N = 5 en grupo entrenada vieja.

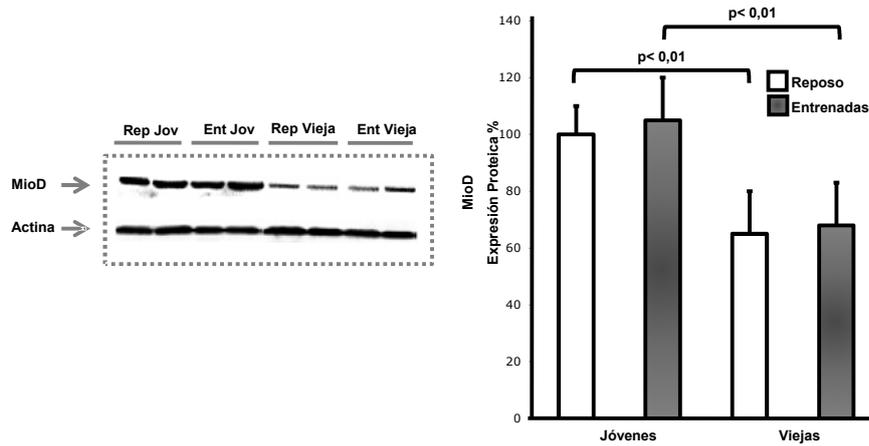
4- ESTUDIO DEL EFECTO DEL ENTRENAMIENTO SOBRE LA MIOGÉNESIS EN EL MÚSCULO SÓLEO Y GASTROCNEMIO DE RATAS JÓVENES Y VIEJAS SOMETIDAS A UN PROTOCOLO DE ENTRENAMIENTO AERÓBICO DE 3 SEMANAS.

4.1- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MIO D.

Mio D también pertenece al grupo de factores de transcripción que regulan la miogénesis y está relacionado con el proceso de activación de las células satélites (Dedkov *et al.*, 2003). En nuestros resultados encontramos un aumento significativo en la expresión de Mio D en sóleo en

los animales jóvenes reposo frente a los viejos reposo, además de una diferencia significativa entre los jóvenes entrenados frente a los viejos entrenados.

Figura IV.13: Expresión de MioD en sóleo de ratas jóvenes y viejas entrenadas durante 3 semanas.

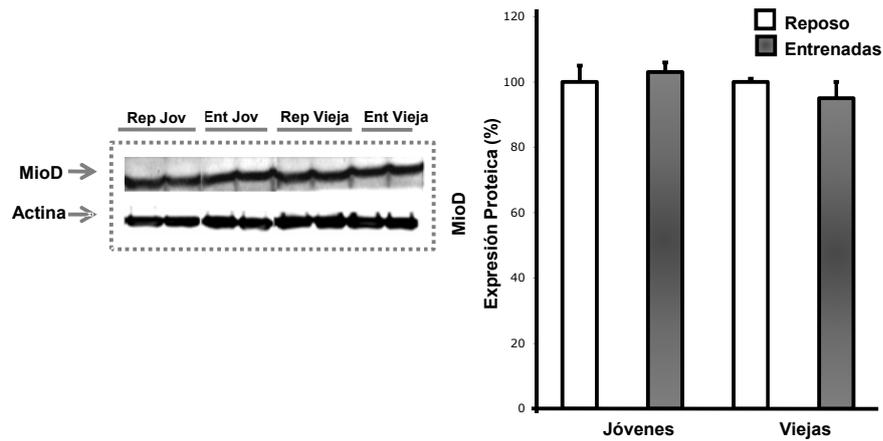


Western Blot representativo de MioD. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo sóleo de ratas jóvenes reposo (Rep Jov), ratas jóvenes entrenadas (Ent Jov), ratas reposo viejas (Rep Vieja) y ratas entrenadas viejas (Ent Vieja).

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 6 en grupo reposo jóvenes; N= 5 en grupo entrenado jóvenes; N=6 en grupo reposo vieja; N=6 en grupo reposo vieja; N=5 en grupo entrenada vieja.

En el músculo gastrocnemio, sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre los grupos estudiados.

Figura IV.14: Expresión de MioD en gastrocnemio de ratas jóvenes y viejas entrenadas durante 3 semanas.



Western Blot representativo de MioD. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo gastrocnemio de ratas jóvenes reposo (Rep Jov), ratas jóvenes entrenadas (Ent Jov), ratas reposo viejas (Rep Vieja) y ratas entrenadas viejas (Ent Vieja).

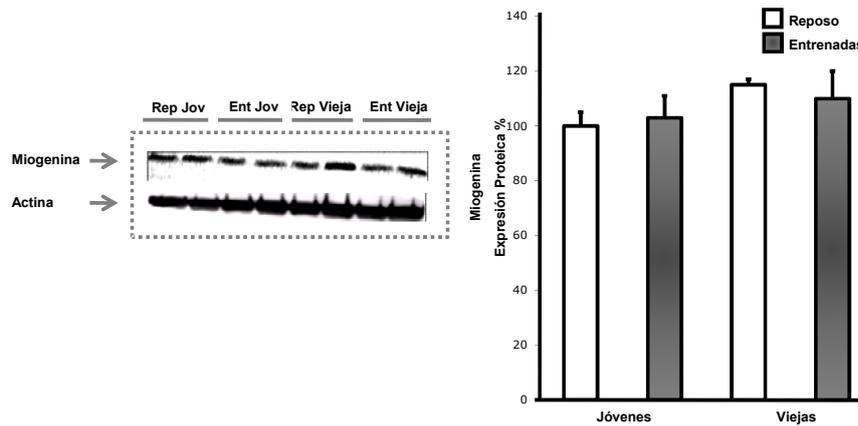
Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 6 en grupo reposo jóvenes; N= 5 en grupo entrenado jóvenes; N=6 en grupo reposo vieja; N=6 en grupo reposo vieja; N=5 en grupo entrenada vieja.

4.2- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MIOGENINA.

La miogenina también forma parte del conjunto de factores de transcripción que regulan la miogénesis. Esta proteína está implicada en la regulación de la MHC (cadena pesada de la miosina) y su expresión es más abundante en músculos en los que predominan las fibras lentas (Siu *et al.*, 2004).

En nuestros resultados en sóleo, no observamos cambios significativos en los grupos estudiados, como tampoco observamos cambios asociados al entrenamiento.

Figura IV.15: Expresión de miogenina en sóleo de ratas jóvenes y viejas entrenadas durante 3 semanas.

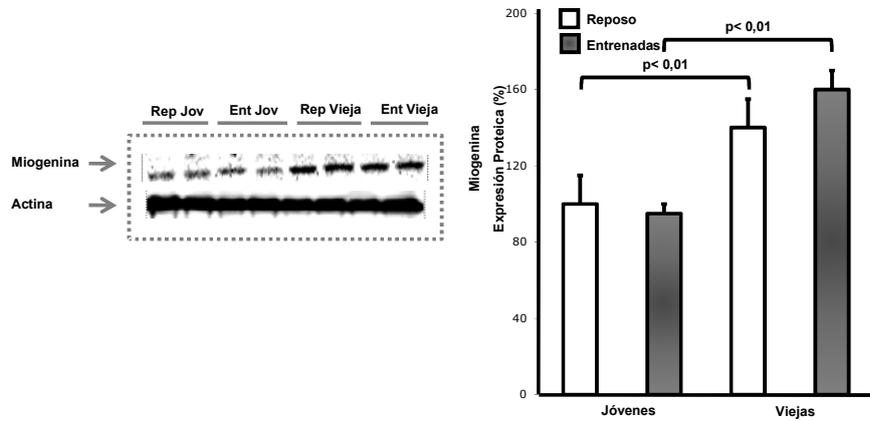


Western Blot representativo de miogenina. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo sóleo de ratas jóvenes reposo (Rep Jov), ratas jóvenes entrenadas (Ent Jov), ratas reposo viejas (Rep Vieja) y ratas entrenadas viejas (Ent Vieja).

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 6 en grupo reposo jóvenes; N= 5 en grupo entrenado jóvenes; N=6 en grupo reposo vieja; N=6 en grupo reposo vieja; N=5 en grupo entrenada vieja.

En el músculo gastrocnemio, encontramos cambios significativos en el grupo reposo viejo frente al reposo joven y en el grupo entrenado viejo frente al entrenado joven.

Figura IV.16: Expresión de miogenina en gastrocnemio de ratas jóvenes y viejas entrenadas durante 3 semanas.



Western Blot representativo de Miogenina. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo gastrocnemio de ratas jóvenes reposo (Rep Jov), ratas jóvenes entrenadas (Ent Jov), ratas reposo viejas (Rep Vieja) y ratas entrenadas viejas (Ent Vieja).

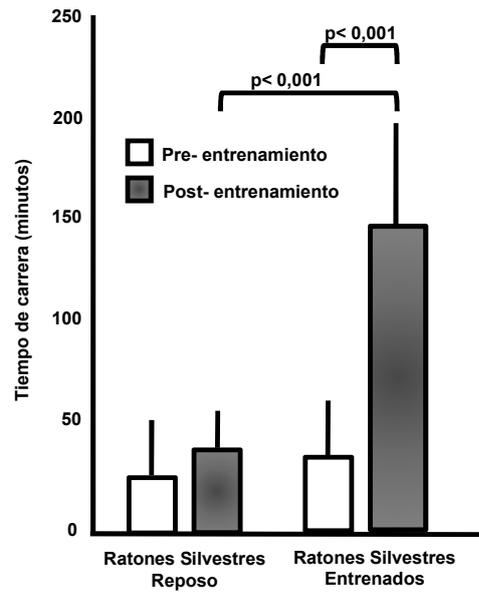
Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 6 en grupo reposo jóvenes; N= 5 en grupo entrenado jóvenes; N=6 en grupo reposo vieja; N=5 en grupo entrenada vieja

5. ESTUDIO DEL EFECTO DE UN PROTOCOLO DE ENTRENAMIENTO AERÓBICO DE 5 SEMANAS SOBRE EL RENDIMIENTO FÍSICO DE RATONES SILVESTRES Y KO DE PGC-1 α .

5.1- PRUEBA DE RESISTENCIA EN RATONES SILVESTRES.

Nuestros resultados muestran una mejora significativa del tiempo de carrera después del protocolo de entrenamiento aeróbico de 5 semanas de duración.

Figura IV.17: Prueba de resistencia en ratones silvestres entrenados durante 5 semanas.

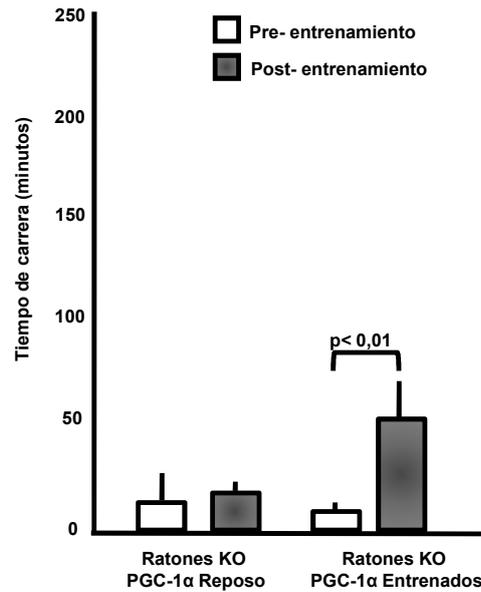


Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n = 6$ en grupo silvestre reposo; $n = 8$ en grupo silvestre entrenado.

5.2- PRUEBA DE RESISTENCIA EN RATONES KO DE PGC-1 α .

Al igual que con los animales silvestres, los KO, también mostraron un aumento significativo en el tiempo de carrera tras el entrenamiento. Sin embargo el porcentaje de mejora fue mayor en los animales silvestres.

Figura IV.18: Prueba de resistencia en ratones KO entrenados durante 5 semanas



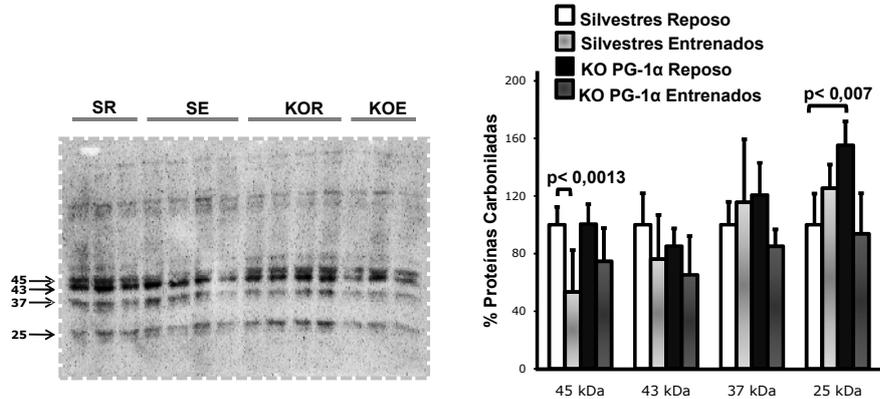
Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. $n=7$ en grupo KO de PGC-1 α reposo; $n=6$ en grupo KO de PGC-1 α entrenado.

6.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL ENTRENAMIENTO SOBRE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS EN GASTROCNEMIO DE RATONES SILVESTRES Y KO DE PGC-1 α SOMETIDOS A UN PROTOCOLO DE ENTRENAMIENTO AERÓBICO DE 5 SEMANAS.

Nuestros resultados muestran una diferencia significativa entre los grupos a 45kDa y 25 kDa. A 45 kDa, vemos una diferencia significativa entre ratones silvestres reposo frente a los silvestres entrenados. A 25kDa,

observamos una diferencia significativa entre los KO reposo frente a los silvestres reposo.

Figura IV.19: Proteínas oxidadas en gastrocnemio de ratones silvestres y KO de PGC-1 α después de 5 semanas de entrenamiento.



Western Blot representativo de proteínas oxidadas. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo gastrocnémio de ratones silvestres reposo (SR), ratones silvestres entrenados (SE), ratones knockout PGC-1 α reposo (KOR) y ratones knockout de PGC-1 α entrenados (KOE).

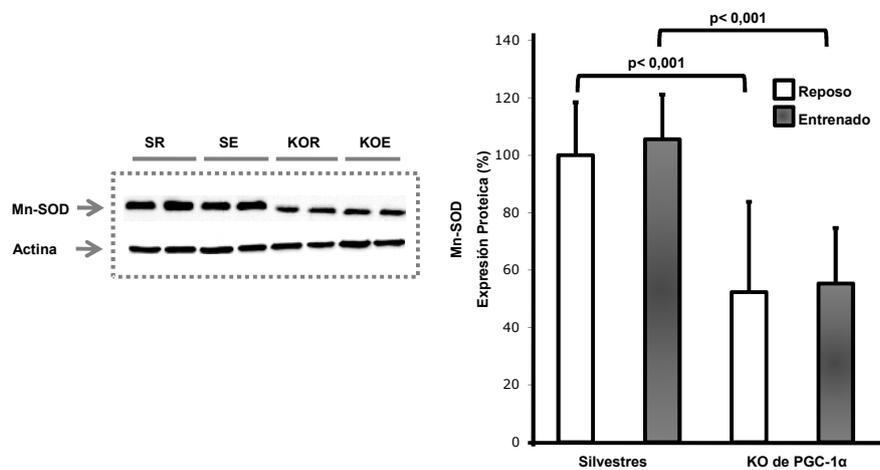
Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 3 en grupo silvestre reposo; n=4 en grupo silvestre entrenados; n= 4 en grupo KO PGC-1 α reposo; n= 4 en grupo KO PGC-1 α entrenado.

7- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN EL MÚSCULO DE RATONES SILVESTRES Y KO SOMETIDOS A UN PROTOCOLO DE ENTRENAMIENTO AERÓBICO DE 5 SEMANAS.

7.1- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA MN-SOD.

Nuestros resultados, utilizando la técnica del western blotting, nos muestran una disminución significativa en el contenido de MnSOD en el músculo esquelético de los animales KO frente a los silvestres.

Figura IV.20: Expresión de Mn-SOD en músculo esquelético de ratones silvestres y KO de PGC-1 α .



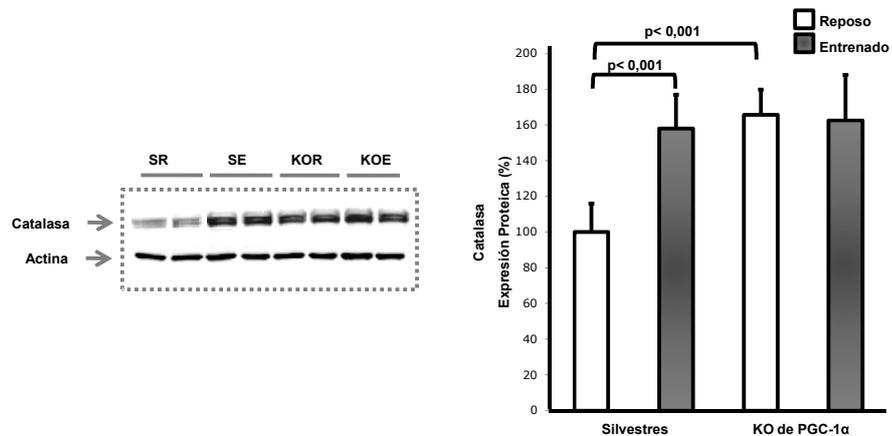
Western Blot representativo de Mn-SOD. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo esquelético de ratones silvestres reposo (SR), ratones silvestres entrenados (SE), ratones KO PGC-1 α reposo (KOR) y ratones KO de PGC-1 α entrenados (KOE).

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 6 en grupo silvestre reposo; n=8 en grupo silvestre entrenados; n= 7 en grupo KO PGC-1 α reposo; n= 6 en grupo KO PGC-1 α entrenado.

7.2- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA CATALASA.

La figura IV.23 muestra un aumento significativo en los niveles de catalasa en el músculo esquelético de los ratones silvestres entrenados frente a los silvestres reposo. Del mismo modo encontramos un aumento significativo de la enzima cuando comparamos ratones KO de PGC-1 α reposo frente a los silvestres reposo.

Figura IV.21: Expresión de catalasa en músculo esquelético de ratones silvestres y KO de PGC-1 α .



Western Blot representativo de catalasa. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo esquelético de ratones silvestres reposo (SR), ratones silvestres entrenados (SE), ratones KO PGC-1 α reposo (KOR) y ratones KO de PGC-1 α entrenados (KOE).

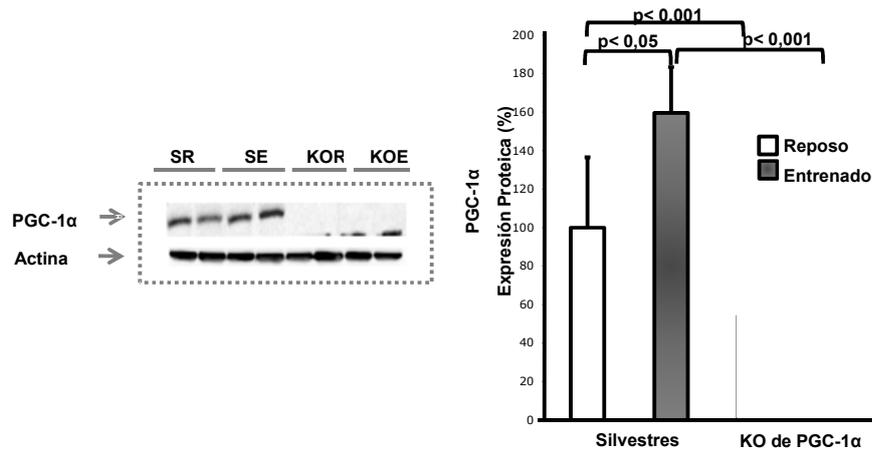
Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 6 en grupo silvestre reposo; n=8 en grupo silvestre entrenados; n= 7 en grupo KO PGC-1 α reposo; n= 6 en grupo KO PGC-1 α entrenado.

8- ESTUDIO DE LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL EN LOS MÚSCULOS DE RATONES SILVESTRES Y KO DE PGC-1 α SOMETIDOS AL UN PROTOCOLO DE ENTRENAMIENTO AERÓBICO DURANTE 5 SEMANAS.

8.1- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PGC-1 α .

Como podemos observar en la figura 24, encontramos un aumento significativo del co-activador PGC-1 α cuando comparamos ratones silvestres entrenados frente a los silvestres reposo. En todos los casos los ratones silvestres mostraron niveles musculares de PGC-1 α significativamente mayores que los animales KO.

Figura IV.22: Expresión de PGC-1 α en músculo esquelético de ratones silvestres y KO de PGC-1 α entrenados durante 5 semanas.



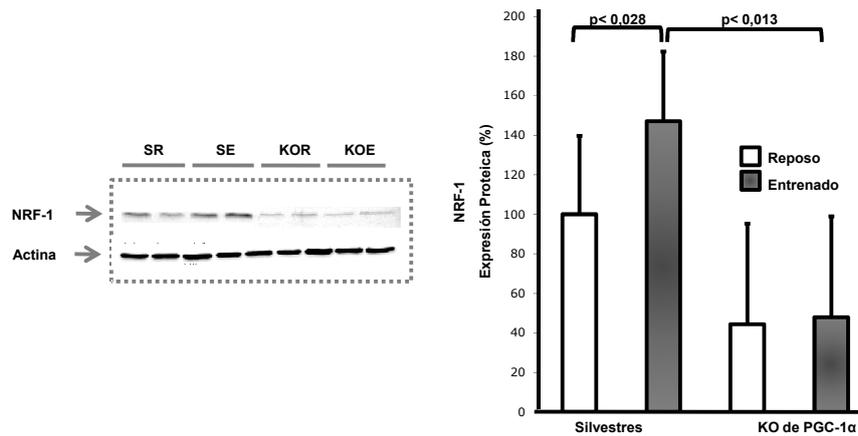
Western Blot representativo de PGC-1 α . Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo esquelético de ratones silvestres reposo (SR), ratones silvestres entrenados (SE), ratones KO PGC-1 α reposo (KOR) y ratones KO de PGC-1 α entrenados (KOE).

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 6 en grupo silvestre reposo; n=8 en grupo silvestre entrenados; n= 7 en grupo KO PGC-1 α reposo; n= 6 en grupo KO PGC-1 α entrenado.

8.2- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE NRF-1.

Como podemos observar en la figura 25, encontramos un aumento significativo en los niveles de NRF-1 en el músculo esquelético en los animales jóvenes silvestres tras el entrenamiento. En los animales KO de PGC-1 α no observamos una inducción del factor respiratorio nuclear con el entrenamiento. Del mismo modo encontramos un aumento significativo en los niveles de NRF-1 cuando comparamos ratones silvestres con ratones KO.

Figura IV.23: Expresión de NRF-1 en músculo esquelético de ratones silvestres y KO de PGC-1 α entrenados durante 5 semanas.



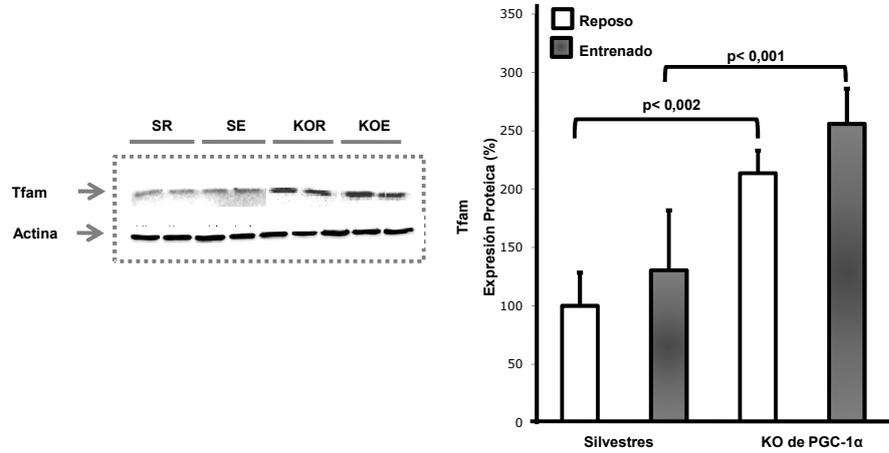
Western Blot representativo de NRF-1. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo esquelético de ratones silvestres reposo (SR), ratones silvestres entrenados (SE), ratones KO PGC-1 α reposo (KOR) y ratones KO de PGC-1 α entrenados (KOE).

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 6 en grupo silvestre reposo; n=8 en grupo silvestre entrenados; n= 7 en grupo KO PGC-1 α reposo; n= 6 en grupo KO PGC-1 α entrenado.

8.3- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE TFAM.

En la figura siguiente, observamos, en el músculo esquelético, un aumento significativo de los niveles de Tfam cuando comparamos los ratones KO reposo frente a los silvestres reposo y entre los KO entrenados frente a los silvestres entrenados.

Figura IV.24: Expresión de Tfam en músculo esquelético de ratones silvestres y KO de PGC-1 α entrenados durante 5 semanas.



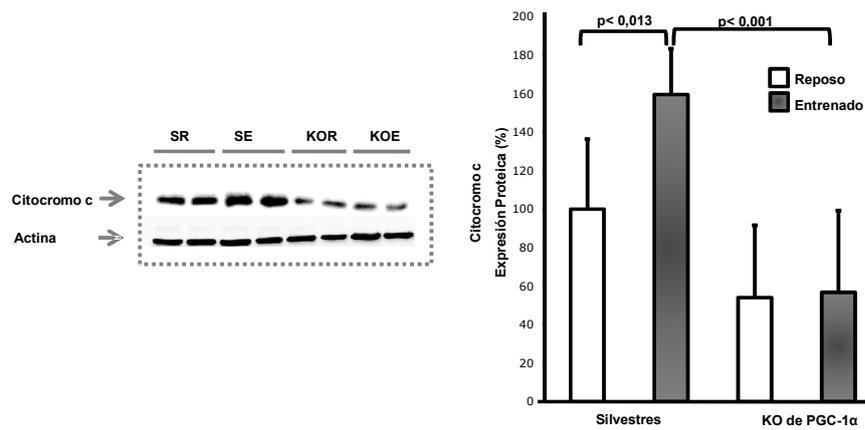
Western Blot representativo de Tfam. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo esqueléticos de ratones silvestres reposo (SR), ratones silvestres entrenados (SE), ratones KO PGC-1 α reposo (KOR) y ratones KO de PGC-1 α entrenados (KOE).

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 6 en grupo silvestre reposo; n=8 en grupo silvestre entrenados; n= 7 en grupo KO PGC-1 α reposo; n= 6 en grupo KO PGC-1 α entrenado.

8.4- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE CITOCROMO C.

En cuanto a la proteína citocromo c, encontramos un aumento significativo en el grupo silvestre entrenado frente al silvestre reposo y un aumento significativo entre los silvestres entrenados frente al KO entrenado.

Figura IV.25: Expresión de citocromo c en músculo esquelético de ratones silvestres y KO de PGC-1 α entrenados durante 5 semanas.



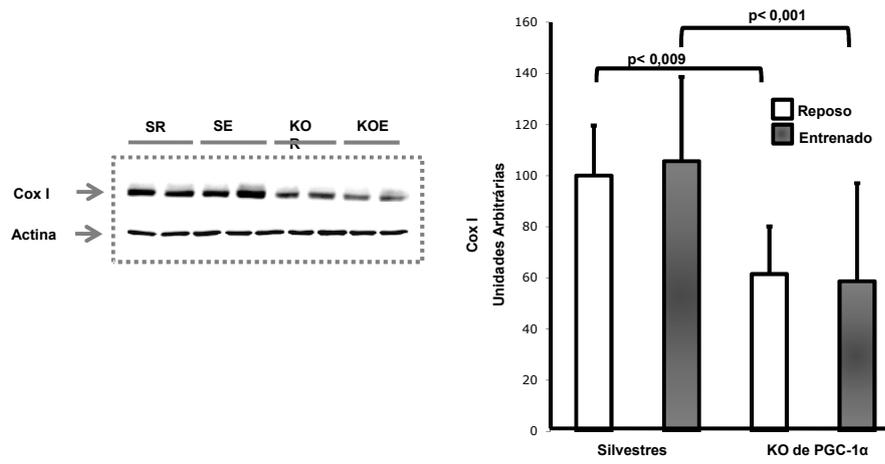
Western Blot representativo de citocromo c. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo esquelético de ratones silvestres reposo (SR), ratones silvestres entrenados (SE), ratones KO PGC-1 α reposo (KOR) y ratones KO de PGC-1 α entrenados (KOE).

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 6 en grupo silvestre reposo; n=8 en grupo silvestre entrenados; n= 7 en grupo KO PGC-1 α reposo; n= 6 en grupo KO PGC-1 α entrenado.

8.5- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE COX I.

En nuestro estudio, observamos un aumento significativo en la expresión de la COX I en los ratones silvestres reposo frente a los reposos KO de PGC-1 α y entre los silvestres entrenados frente a los KO de PGC-1 α entrenados.

Figura IV.26: Expresión de COXI en músculo esquelético de ratones silvestres y KO de PGC-1 α entrenados durante 5 semanas.



Western Blot representativo de cox I. Los extractos citosólicos fueron preparados con músculo esquelético de ratones silvestres reposo (SR), ratones silvestres entrenados (SE), ratones KO PGC-1 α reposo (KOR) y ratones KO de PGC-1 α entrenados (KOE).

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 6 en grupo silvestre reposo; n=8 en grupo silvestre entrenados; n= 7 en grupo KO PGC-1 α reposo; n= 6 en grupo KO PGC-1 α entrenado.

DISCUSIÓN

1- ENVEJECIMIENTO Y MITOCONDRIOGÉNESIS.

El envejecimiento humano está asociado a una pérdida de masa muscular que se inicia en la cuarta década de la vida con una pérdida de la fuerza de un 1% al año y que se acelera con en el transcurso de los años (Doherty, 2003). La debilidad funcional asociada a la sarcopenia afecta aproximadamente al 7% de los adultos de más de 70 años, y al 20% de los mayores de 80 años (Melton *et al.*, 2000; Castillo *et al.*, 2003). El costo derivado de los problemas de salud relacionados con la sarcopenia en USA se estima que es superior a los 18 billones de dólares anuales (Janssen *et al.*, 1993).

Las causas del envejecimiento del organismo son complejas. Una amplia variedad de procesos se considera que están implicados en el declive de los distintos aparatos y sistemas con el paso de los años. Entre los factores implicados en la pérdida de funcionalidad del músculo esquelético podemos destacar: la muerte celular programada, el estrés oxidativo, alteraciones en la síntesis de proteínas, inflamación, alteraciones hormonales, desuso, y disfunción mitocondrial (Janssen *et al.*, 1993; Melton *et al.*, 2000; Balagopal *et al.*, 2001; Castillo *et al.*, 2003; Doherty, 2003). Diversos autores han relacionado la disfunción mitocondrial, con el acumulo de alteraciones en el ADN mitocondrial y la sarcopenia, tanto en seres humanos como en animales (Melov *et al.*, 1995; Melov *et al.*, 1997;

Colman *et al.*, 2005; Bua *et al.*, 2006; Hacker *et al.*, 2006). El envejecimiento, por tanto, se ha asociado a nivel mitocondrial y en el músculo esquelético con: a) Una reducción en la actividad de la fosforilación oxidativa; b) Mutaciones en el ADN mitocondrial; c) Reducciones en el contenido del ADN mitocondrial; d) Alteraciones en la señalización en el proceso de apoptosis (Marzetti *et al.*, 2008) e) Disminución de la actividad de la cadena de transporte electrónico (Navarro & Boveris, 2007) y, por último, aumento de la producción mitocondrial de radicales libres (Figueiredo *et al.*, 2008; Johnston *et al.*, 2008). El papel de la mitocondria como generadora y diana de ERO lo postuló Jaime Miquel en la década de los 70 (Rockstein *et al.*, 1975; Miquel *et al.*, 1980). Sin embargo Jaime Miquel y sus colaboradores no aportaron evidencias contundentes de que la mitocondria estaba dañada en las células de animales viejos. Estudios llevados a cabo, de forma independiente, tanto por nuestro grupo de investigación (Sastre *et al.*, 1996) como por el grupo dirigido por el profesor Bruce Ames (Hagen *et al.*, 1997), utilizando la citometría de flujo, demostraron el anterior postulado. De hecho nuestros resultados mostraron que las mitocondrias están dañadas en el interior de las células y que no es durante su aislamiento y preparación cuando ocurre dicho daño.

Recientemente se ha sugerido que el envejecimiento puede estar asociado con una disminución de

la biogénesis mitocondrial (Lopez-Lluch *et al.*, 2008). El motivo por el que se produce una disminución de la biogénesis mitocondrial durante el envejecimiento todavía se desconoce (Lopez-Lluch *et al.*, 2008), sin embargo se especula con las alteraciones en la cascada de señalización que conducen al proceso de mitocondriogénesis como un mecanismo relevante para explicar dicha disminución (Reznick *et al.*, 2007). Nosotros hipotetizamos, en un trabajo publicado recientemente (Vina *et al.*, 2009), que PGC-1 α podría ser un factor importante en la disminución observada en el proceso de mitocondriogénesis durante el envejecimiento. La biogénesis mitocondrial es un proceso complejo. Éste engloba cambios en la expresión de más de 100 genes, la cooperación de dos genomas y la alteración de aproximadamente un 20% de los niveles de proteínas celulares (Ryan & Hoogenraad, 2007). A parte de los genes nucleares (que codifican más del 95% de las proteínas mitocondriales), la mitocondriogénesis requiere la participación del genoma mitocondrial. Recientemente se ha demostrado que la transcripción afecta tanto al genoma nuclear como al mitocondrial, que necesitan trabajar coordinadamente para producir nuevas mitocondrias (Roy *et al.*, 2009). En mamíferos, la regulación de la biogénesis mitocondrial y la proliferación está influenciada por factores externos como nutrientes, hormonas, temperatura, ejercicio e hipoxia (Freyssenet *et al.*, 1999; Kujoth *et al.*, 2005; Floyd *et al.*, 2007).

Pese a la complejidad de las vías de señalización implicadas en la regulación de la biogénesis mitocondrial, todas ellas parece que comparten un componente clave, el co-activador PGC-1 α . PGC-1 α es un factor crucial tanto en la activación del programa de mitocondriogénesis como en la respiración. PGC-1 α parece ser el gran regulador del metabolismo y de la biogénesis mitocondrial por integrar y coordinar la actividad de múltiples factores de transcripción como NRF-1, PPAR γ y Tfam (Puigserver *et al.*, 1998). La necesidad del PGC-1 α en el metabolismo energético, la biogénesis mitocondrial, el desarrollo y el crecimiento puede ser evaluada diseñando modelos experimentales caracterizados por las pérdidas de sus funciones estratégicas. Este es el motivo por el que en la presente tesis doctoral hemos estudiado el papel de PGC-1 α en la disfuncionalidad mitocondrial en animales viejos y KO de PGC-1 α . Pretendemos de esta forma determinar la importancia de la mitocondria en la pérdida de masa muscular asociada a la edad, así como el posible papel del ejercicio como estrategia de intervención para el tratamiento de la sarcopenia senil. La hipótesis directriz de nuestro trabajo, basada en los resultados obtenidos en la figura IV.8 es que el envejecimiento provoca una disminución de la reactividad de PGC-1 α al estímulo del ejercicio físico.

2. MITOCONDRIOGÉNESIS Y EJERCICIO. PAPEL DE LAS ERO COMO SEÑALES.

El ejercicio físico produce radicales libres. El grupo de Lester Packer en California, utilizando RPE, demostró que las ERO son generadas durante la contracción muscular (Ermak & Davies, 2002). En este relevante trabajo, los autores ya postularon en la discusión la posible estimulación del proceso de mitocondriogénesis por ERO en el músculo esquelético (Davies *et al.*, 1982). Nuestro grupo de investigación aportó las primeras evidencias contundentes de que el ejercicio genera estrés oxidativo únicamente cuando se realiza hasta el agotamiento (Gomez-Cabrera *et al.*, 2003). Actualmente existen múltiples evidencias procedentes de diversos laboratorios que muestran que el ejercicio agotador implica una sobreproducción de ERO que tiene como consecuencia un aumento del estrés oxidativo. En este sentido, en el año 2003, demostramos este hecho con los ciclistas del US Postal Team durante el Tour de Francia 2001. En este estudio además pudimos comprobar la importancia de la enzima xantina oxidasa en la generación de ERO durante el ejercicio de muy alta intensidad (Gomez-Cabrera *et al.*, 2003). Sin embargo, evidencias recientes demuestran que durante el ejercicio moderado, las ERO producidas no generan estrés oxidativo sino que actúan como señales que permiten la adaptación del músculo al ejercicio (Gomez-Cabrera *et al.*, 2008; Jackson, 2008). Si

esto es así, la prevención de la formación o de la acción de las ERO, podría estar relacionada con una menor respuesta adaptativa al ejercicio o al entrenamiento. En el año 2008 demostramos este hecho (Gomez-Cabrera *et al.*, 2008). Determinamos el rendimiento aeróbico, tanto en animales como en humanos, tras un periodo de entrenamiento y encontramos que el tratamiento con elevadas dosis de vitamina C previene diversas adaptaciones musculares y reduce el rendimiento (Ristow *et al.*, 2009). Del mismo modo, el grupo de Michael Ristow en Alemania (Ristow *et al.*, 2009) demostró que el tratamiento con dosis moderadas de vitaminas C y E, previene adaptaciones musculares al ejercicio así como el aumento de la sensibilidad a la insulina (fundamental para el tratamiento de la diabetes) asociado al entrenamiento físico. Finalmente el grupo del profesor Richardson demostró recientemente que en humanos sometidos a un protocolo de entrenamiento, la suplementación aguda con vitaminas C y E, prevenía la vasodilatación asociada al ejercicio, lo que se relacionaba con un aumento de la hipertensión y con una disminución de la angiogénesis inducida por ejercicio (Wray *et al.*, 2009). Por tanto, las ERO juegan un papel claro en el ejercicio como moléculas implicadas en la señalización celular. En este sentido los radicales libres se han señalado como elementos importantes para comprender tanto el rendimiento como algunos de los efectos beneficiosos de la práctica de ejercicio físico.

3. DISFUNCIÓN DE PGC-1 α ASOCIADA AL ENVEJECIMIENTO EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO. COMPARACIÓN CON EL MODELO DE ANIMALES KO DE PGC-1 α .

PGC-1 α , como hemos comentado anteriormente, es una molécula crítica para entender el proceso de mitocondriogénesis durante el ejercicio. Kang y colaboradores (Kang *et al.*, 2009) han mostrado evidencias claras de que la activación de PGC-1 α en el ejercicio es redox sensible. La ausencia de reactividad demostrada por PGC-1 α en los músculos de animales viejos, nos llevó a pensar que la mitocondriogénesis podría estar alterada durante el ejercicio en el envejecimiento. Esta es una cuestión muy relevante en medicina, particularmente en geriatría, ya que uno de los mayores problemas a los que se enfrentan los geriatras hoy en día es la prevención de la fragilidad. La fragilidad es un síndrome complejo que engloba no solo aspectos físicos, sino psicológicos y sensitivos. Sin duda, un músculo que no haya perdido la capacidad para sintetizar nuevas mitocondrias con plena funcionalidad, es una garantía importante para la prevención de la fragilidad (Fiatarone *et al.*, 1994). Por tanto, uno de los objetivos más importantes de la presente tesis fue el de determinar el papel del co-activador PGC-1 α en la regulación de la mitocondriogénesis en los músculos de los animales viejos.

La región amino-terminal de PGC-1 α interactúa con proteínas que contienen actividad histona acetiltransferasa (HAT) (Finck & Kelly, 2006). La actividad de la HAT de ese complejo remodela las histonas y eso supone un aumento del acceso de la maquinaria transcripcional a los genes diana (Finck & Kelly, 2006). Por lo tanto, PGC-1 α es un co-activador transcripcional que traduce muchos estímulos fisiológicos a programas metabólicos específicos, usualmente por estimulación de la actividad mitocondrial. Entre las funciones, conocidas hasta el momento, de PGC-1 α se encuentran: regulación de la termogénesis adaptativa en tejido adiposo marrón (Puigserver & Spiegelman, 2003); β oxidación y gluconeogénesis en el hígado (Herzig *et al.*, 2000; Yoon *et al.*, 2001; Puigserver & Spiegelman, 2003) y regulación de los mecanismos de defensa antioxidante en neuronas (Kujoth *et al.*, 2005). En el músculo esquelético PGC-1 α se ha relacionado con la conversión de fibra rápida a lenta (Baar *et al.*, 2002), la biogénesis mitocondrial (Lin *et al.*, 2005), así como la captación de glucosa y oxidación de ácidos grasos (Liang & Ward, 2006).

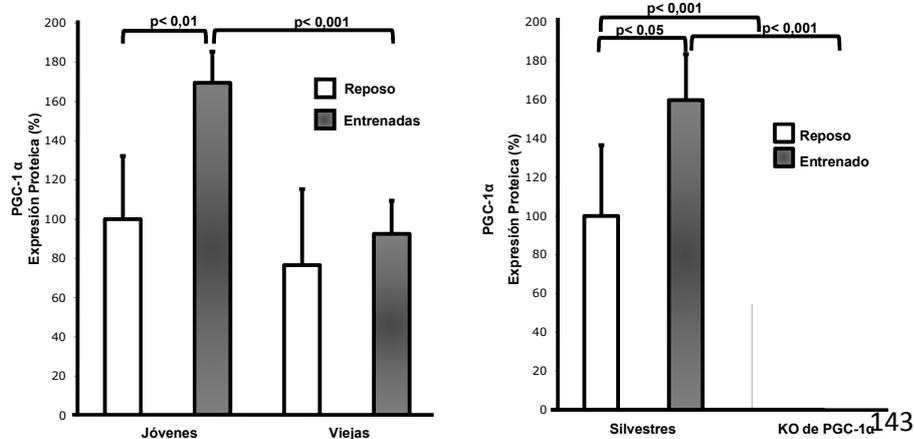
Numerosos estudios han demostrado, en animales jóvenes, el efecto de PGC-1 α en el músculo y el impacto del entrenamiento en su expresión (Baar *et al.*, 2002; Wright *et al.*, 2007; Gomez-Cabrera *et al.*, 2008; Leick *et al.*, 2008). El músculo esquelético es un tejido plástico que se adapta al uso/desuso. Una actividad física regular es necesaria para

mantener la capacidad oxidativa del músculo esquelético (Williams *et al.*, 1986). Estudios en modelos de roedores indican que un corto tiempo de entrenamiento activa la expresión de PGC-1 α en músculo esquelético (Baar *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2005; Terada *et al.*, 2005). Del mismo modo estudios en humanos han evidenciado una marcada inducción de PGC-1 α en repeticiones agudas de ejercicio o en entrenamientos aeróbicos (Pilegaard *et al.*, 2003; Russell *et al.*, 2003). La importancia de PGC-1 α en los programas metabólicos se demostró con la generación de ratones KO de PGC-1 α . Estos ratones presentan una reducida expresión basal de muchos genes mitocondriales en hígado, cerebro, músculo esquelético y corazón cuando son comparados con ratones silvestres (Lin *et al.*, 2004; Arany *et al.*, 2005; Leone *et al.*, 2005). Los KO de PGC-1 α son unos animales muy sensibles al frío (Handschin & Spiegelman, 2006) y muestran una capacidad cardiaca debilitada (Arany *et al.*, 2005; Leone *et al.*, 2005). Sin embargo varios grupos de investigación los han utilizado para estudiar su respuesta tanto al ejercicio físico como al entrenamiento (Arany *et al.*, 2005; Handschin & Spiegelman, 2006; Handschin *et al.*, 2007; Leick *et al.*, 2008; Geng *et al.*, 2009).

Como podemos comprobar en la figura V.1, la mitocondriogénesis está considerablemente afectada en los animales deficientes en PGC-1 α , así como en los animales viejos. El entrenamiento provoca un aumento en el contenido de PGC-1 α en el músculo esquelético de los

animales silvestres. Ese aumento está en concordancia con los resultados encontrados en la literatura, donde un entrenamiento aeróbico de corta duración modula la activación y expresión de PGC-1 α en el músculo esquelético de ratas jóvenes. Sin embargo, tal y como era previsible en los ratones KO de PGC-1 α , no detectamos niveles de esta proteína ni en reposo ni tras 5 semanas de entrenamiento (Ver figura V.1). Cuando pasamos a comparar el efecto del entrenamiento en los grupos viejos con los animales KO de PGC-1 α , vimos que en ambos modelos (ratas viejas entrenadas y KO de PGC-1 α entrenados) se reproduce el patrón, la ausencia de reactividad del co-activador al estímulo de la contracción muscular. Eso puede sugerir que hay un fallo en la adaptación del músculo esquelético frente al ejercicio físico en animales viejos, al igual que ocurre en los KO de PGC-1 α .

Figura V.1: Gráficas representativas de la expresión de PGC-1 α en animales jóvenes y viejos, silvestres y KO de PGC-1 α .

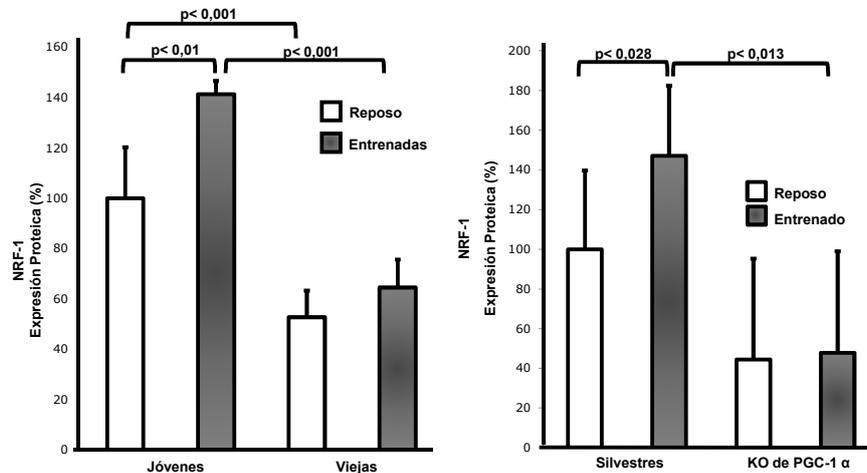


Una sobreexpresión de PGC-1 α induce morfológicamente un aumento del contenido mitocondrial así como la expresión de ARNm de genes nucleares en células musculares incluyendo NRF-1 y NRF-2 (Leone *et al.*, 2005). NRF-1 fue inicialmente identificado como un activador de la expresión de citocromo c (Xia *et al.*, 1997), y en la actualidad está bien establecido que NRF-1 desempeña un importante papel en el aumento de los niveles de esta proteína inducidos por estímulos tales como la electroestimulación de miocitos cardiacos (Xia *et al.*, 1997). NRF-1 juega un papel integrador entre el núcleo y la mitocondria. Sin embargo, los sitios de unión para NRF-1 no están generalizados y definidos, por ejemplo, no todos las subunidades nucleares que codifican la COX tienen un sitio de unión para NRF-1 en sus extremos reguladores (Lenka *et al.*, 1998).

El entrenamiento supone una respuesta adaptativa en el músculo esquelético que incluye una auto-regulación de NRF-1 y de su co-activador PGC-1 α (Hoppeler & Fluck, 2003; Baar, 2004). Nuestros resultados muestran (Figura V.2) un aumento significativo en la expresión de NRF-1 en el grupo de animales jóvenes entrenados, frente a sus respectivos controles (grupo reposo). Este fenómeno se reproduce y, en similares proporciones, en los ratones silvestres entrenados. Sin embargo, no fueron observados cambios significativos en los niveles de NRF-1 el grupo de

ratas viejas tras entrenamiento, así como en los animales KO de PGC-1 α entrenados.

Figura V.2: Gráficas representativas de la expresión de NRF-1 en animales jóvenes y viejos, silvestres y KO de PGC-1 α .



Diversos autores han descrito sitios de unión para NRF-1 en el promotor del gen de Tfam (Baar *et al.*, 2003). Tfam es una proteína de 25 kDa cuya función está relacionada con la regulación del número de copias de ADN mitocondrial. En ratones, la ausencia de Tfam ocasiona una letalidad embrionaria y diabetes por depleción del ADNmt y pérdida de la fosforilación oxidativa (Clayton, 1998; Li *et al.*, 2000). La expresión de Tfam está coordinada y regulada por factores de transcripción, entre los que destacan NRF-1 y 2 (Virbasius *et al.*, 1993).

La actividad contráctil crónica se sabe que aumenta el número de copias del ADNmt (Williams *et al.*,

1986). En un estudio de Hood y colaboradores (Hood *et al.*, 2000), los autores encontraron que la estimulación de los músculos flexor digitorum brevis y tibial anterior de ratas ,durante 14 días, producía un aumento en los niveles del ARNm de Tfam (55%) a partir del cuarto día de estimulación. Del mismo modo observaron un aumento en la importación de Tfam (52%) en mitocondrias intermiofibrilares. Del mismo modo se detectó un aumento del 49% del complejo de formación del ADNmt y un 65% de aumento en los niveles de transcripción mitocondrial.

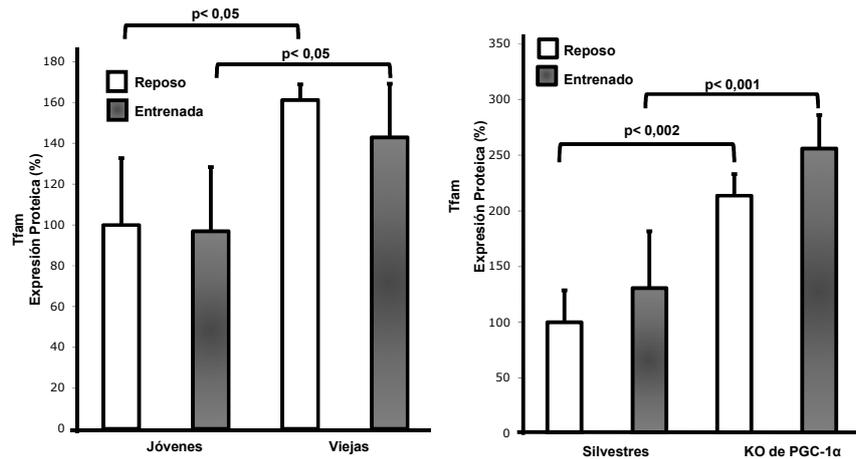
Nuestros resultados muestran un sorprendente aumento de la expresión de Tfam en el grupo de animales viejos reposo frente al joven reposo. Sin embargo, en ninguno de los grupos experimentales utilizados, encontramos un efecto sobre Tfam, del entrenamiento (Ver figura V.3). Estos resultados contrastan con los presentados en párrafos anteriores (PGC-1 α y NRF-1). Sin embargo este aumento en los niveles de Tfam en el músculo de animales viejos, en condiciones basales, ha sido demostrado previamente por dos grupos de investigación independientes, el grupo del profesor Hood (Canadá) y el grupo de la profesora Gadaleta (Italia). Gadaleta y colaboradores demostraron que la expresión de Tfam aumenta, en el músculo esquelético tanto en sujetos viejos como en animales viejos, frente a los jóvenes (Lezza *et al.*, 2001; Pesce *et al.*, 2005) .Del mismo modo David Hood en

un estudio reciente (Chabi *et al.*, 2008) encontró un incremento en los niveles de factor de transcripción mitocondrial A en el músculo de ratas de 36 meses de edad cuando se compararon con animales adultos de 6 meses. Los paradójicos aumentos en la expresión de este importante factor de transcripción mitocondrial, pueden ser indicativos de la existencia de un mecanismo de compensación orientado a atenuar la caída en la actividad enzimática mitocondrial, así como en el contenido de ADNmt que acompañan al proceso de envejecimiento (Hood *et al.*, 2000; Lezza *et al.*, 2001). Curiosamente, y continuando con el paralelismo encontrado al comparar a los animales viejos con los KO de PGC-1 α , los niveles de Tfam aparecían significativamente aumentados en los ratones KO de PGC-1 cuando los comparamos con los silvestres, en condiciones basales. De nuevo en este caso y, como hemos comentado anteriormente, no encontramos un aumento significativo de los mismos, tras el entrenamiento, en ninguno de los grupos experimentales (Ver figura V.3). Eso reafirma la hipótesis planteada en apartados anteriores, la gran similitud entre los animales KO de PGC-1 α y los viejos.

El aumento de Tfam en el grupo de animales viejos y KO de PGC-1 α , nos hace suponer que otras vías de señalización, a parte de la regulada por PGC-1 α y que implica a NRF-1, pueden estar activas en el músculo durante el envejecimiento. NRF-1 es el factor de transcripción que

presenta una mayor actividad transcripcional sobre Tfam. Sin embargo la importancia tanto de NRF-2 y Sp1 en el control de la expresión de Tfam ha sido previamente demostrada (Virbasius and Scarpulla 1994).

Figura V.3: Gráficas representativas de la expresión de Tfam en animales jóvenes y viejos, silvestres y KO de PGC-1 α .



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

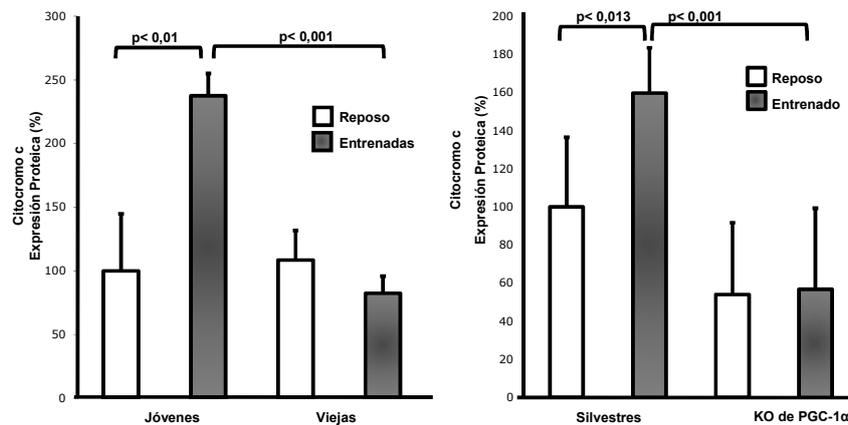
2001). Tfm también se ha visto que aumenta los niveles de citocromo c (Freyssenet *et al.*, 1999).

Desde hace mucho tiempo se señala al citocromo c como marcador del contenido mitocondrial, de hecho, existen varios estudios que establecen una relación entre ejercicio y niveles de citocromo c (Holloszy, 1967; Booth, 1977; Morrison *et al.*, 1987). En 1981 Davies (Davies *et al.*, 1981) realizó una investigación que corroboró los resultados anteriores, la inducción del citocromo c y otros elementos de la cadena respiratoria mitocondrial, con el entrenamiento de resistencia. En ese mismo año y en otro estudio, Hickson (Hickson, 1981) señaló al citocromo c como marcador de contenido mitocondrial y apuntó a la mitocondria como orgánulo limitante para el rendimiento en el entrenamiento. Como hemos comentado en la introducción de la presente tesis, el gen de la proteína citocromo c, presenta una secuencia de unión para NRF-1 (Evans & Scarpulla, 1989). Existen varios estudios en los que se demuestra que tras la inducción de NRF-1 se produce un aumento en la transcripción y posterior cantidad proteica de citocromo c (Xia *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 1998), de hecho en estudios en los que la secuencia de unión para NRF-1 en el gen de citocromo c se encuentra mutado, existe una menor expresión de citocromo c. Del mismo modo se ha comprobado que el citocromo c aumenta en ratones que sobreexpresan NRF-1, confirmando la relación que existe entre estas dos proteínas (Oscail & Holloszy, 1971).

En nuestro estudio encontramos un aumento significativo del citocromo c, únicamente en el músculo de los animales jóvenes, tras el entrenamiento. Estos datos concuerdan no sólo con la cascada de señalización de la biogénesis mitocondrial descrita anteriormente, sino que también coinciden con la bibliografía consultada (Holloszy *et al.*, 1970; Hoppeler, 1986; Baar *et al.*, 2002; Baar *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2007).

Del mismo modo pudimos verificar que los datos de los animales silvestres y KO de PGC-1 α también presenta las mismas diferencias encontradas en el modelo de jóvenes y viejos, un aumento significativo en los niveles de citocromo c en los entrenados frente a los reposo, únicamente entre los ratones silvestres. Estos datos concuerdan con los publicados por otros autores (Lin *et al.*, 2002; Spiegelman & Heinrich, 2004; Leone *et al.*, 2005) pero contrastan con un estudio muy similar al nuestro (Leick *et al.*, 2008) en el que se evaluó la expresión de citocromo c en ratones silvestres y KO de PGC-1 α después de entrenarlos siguiendo un protocolo de ejercicio aeróbico. Estos autores constataron que, en el músculo cuádriceps, el ejercicio produjo un aumento en los niveles de ARNm de citocromo c, tanto en los ratones silvestres como en los ratones KO de PGC-1 α . Sin embargo no determinaron la cantidad de la proteína, como en nuestro caso.

Figura V.4: Gráficas representativas de la expresión de citocromo c en animales jóvenes y viejos, silvestres y KO de PGC-1 α .



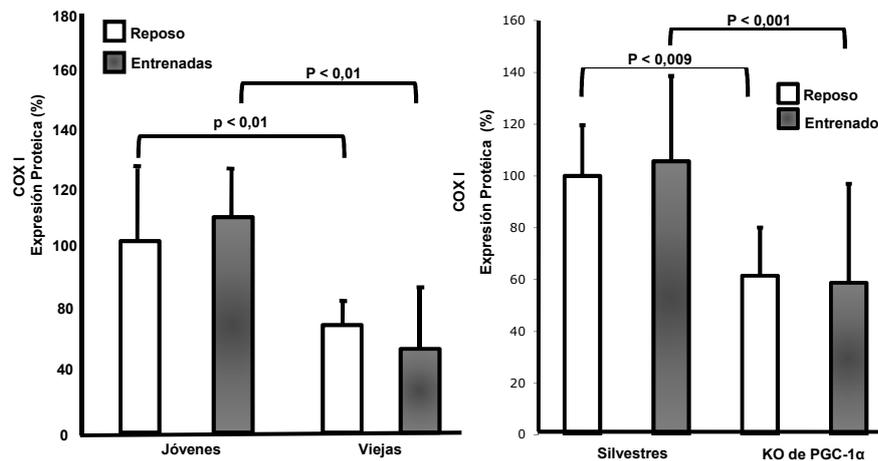
Como hemos comentado en la introducción de la presente tesis, una sobre-expresión de PGC-1 α induce morfológicamente un aumento de los índices de contenido mitocondrial así como la expresión de genes nucleares en células musculares, incluyendo NRF-1, NRF-2, Tfam, UCP-2 y subunidades nucleares y mitocondriales que codifican además del citocromo c, la COX. Estructuralmente, la citocromo c oxidasa, es una proteína integral de membrana que incluye varios grupos prostéticos metálicos así como 13 subunidades, en mamíferos. De estas 13, diez están codificadas por genes situados en el genoma nuclear y tres en el mitocondrial. Durante la actividad contráctil del músculo se induce la biogénesis mitocondrial *in vivo* en un periodo aproximado de siete días. La secuencia de

acontecimientos se inicia con un aumento de los niveles de ARNm para Tfam, seguido por una mayor tasa de importación de Tfam dentro de la mitocondria y de su unión al material genético mitocondrial. Este fenómeno va seguido de un aumento en los niveles de ARNm de la COX, así como de su actividad enzimática (Gordon *et al.*, 2001). La subunidad I de la COX está específicamente codificada por el ADN mitocondrial y se ha considerado una proteína marcadora de contenido mitocondrial por diversos autores (Hood *et al.*, 2003).

En nuestro estudio encontramos una disminución significativa en los niveles de COXI en el grupo de animales viejos con respecto a los jóvenes. Estas modificaciones han sido recientemente descritas incluso en el músculo esquelético de humanos (Crane *et al.*). Sin embargo no encontramos una inducción de la expresión de la citocromo oxidasa con el entrenamiento en ninguno de los grupos experimentales (animales jóvenes y viejos). Diversos autores han descrito incrementos en la actividad de la COX tras un periodo de entrenamiento tanto en animales jóvenes como en animales viejos (Betik *et al.*, 2008). En todos los casos, sin embargo, emplearon periodos de entrenamiento mayores a los utilizados en la presente tesis. Del mismo modo pudimos verificar que los resultados obtenidos con los animales silvestres y KO de PGC-1 α también presenta las mismas diferencias encontradas en el modelo de jóvenes y

viejos, una disminución significativa en los niveles de COXI en el grupo de animales KO. En este caso el entrenamiento tampoco indujo un aumento en los niveles de citocromo oxidasa, fenómeno que achacamos a la duración del mismo.

Figura V.5: Gráficas representativas de la expresión de COXI en animales jóvenes y viejos, silvestres y KO de PGC-1 α .



Recientemente se ha demostrado que la expresión de distintas kinasas relacionadas con la señalización celular en el proceso de biogénesis mitocondrial tiende a ser más elevada en fibras musculares con bajo contenido mitocondrial, y que este fenómeno se acentúa en los animales y sujetos viejos (Mylabathula *et al.*, 2006; Thomson & Gordon, 2006; Ljubicic & Hood, 2009). Nuestros resultados concuerdan con estos estudios y muestran un paralelismo sorprendente entre los resultados obtenidos en los experimentos realizados con animales viejos cuando los

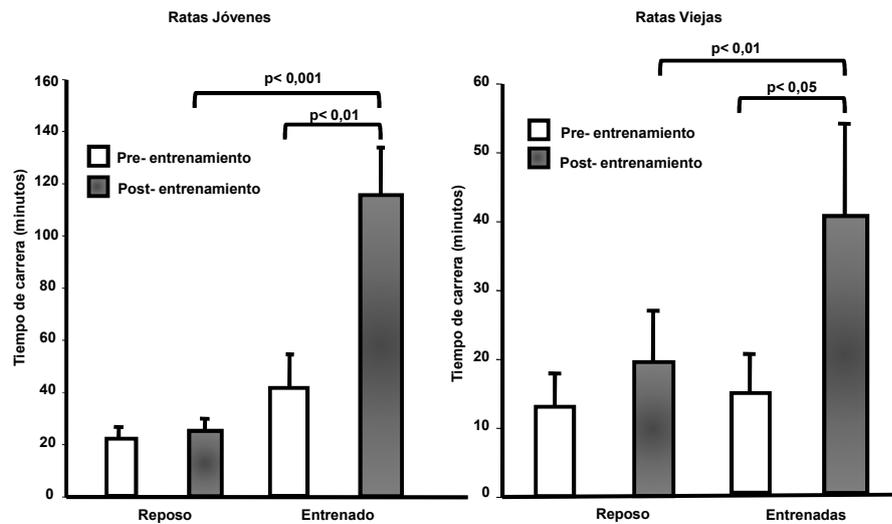
comparamos con los animales KO de PGC-1 α . La vía que hemos estudiado es la siguiente: PGC1 α - NRF1 - Tfam - COXI/citocromo c.

4. ENTRENAMIENTO AERÓBICO Y RENDIMIENTO EN ANIMALES VIEJOS Y KO DE PGC-1 α .

El entrenamiento aeróbico aumenta el volumen de mitocondrias subsarcolémicas en una proporción mayor que la fracción de mitocondrias intermiofibrilares (Hoppeler, 1986). Diversos autores señalan como responsables de estas diferencias, entre las dos poblaciones mitocondriales, al sistema de importación de proteínas (Takahashi & Hood, 1996) así como a la síntesis y degradación de las mismas (Hoppeler, 1986). En un estudio clásico de Hoppeler y colaboradores (Hoppeler, 1986), sujetos inicialmente sedentarios fueron entrenados durante 6 semanas, 5 veces por semana, 30 minutos, en bicicleta estática. La densidad total de mitocondrias aumentó en un 40% en el músculo vasto lateral lo que se relacionó con el aumento en el consumo máximo de oxígeno (Davies *et al.*, 1982). Unos años antes, Davies y colaboradores (Davies *et al.*, 1981) realizaron un estudio en el que se sometió a un grupo de ratas a un entrenamiento aeróbico de diez semanas y en las que se determinó el contenido mitocondrial, la capacidad oxidativa del músculo, el consumo máximo de oxígeno y la resistencia. Los resultados mostraron una mejora de la capacidad oxidativa muscular de un 100% frente a un 14%

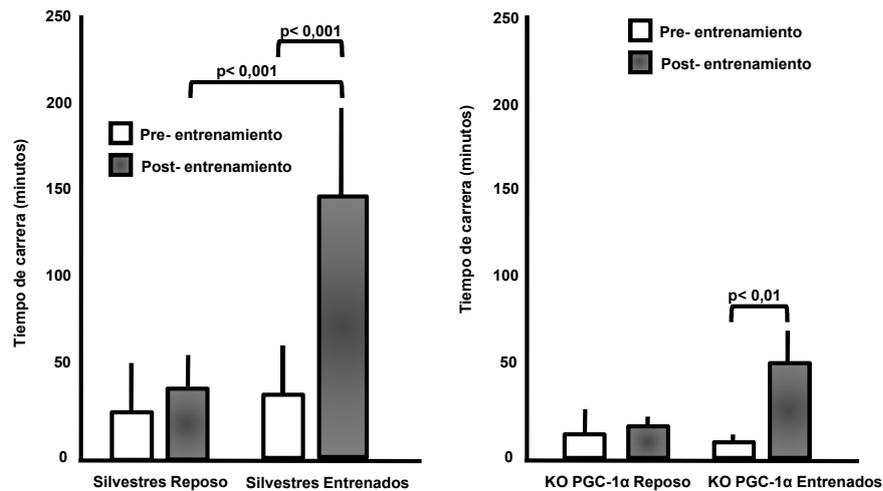
de mejora en el consumo máximo de oxígeno. Los autores concluyeron que diversos factores (sistémicos y/o locales) intervienen para prevenir la completa utilización de la capacidad oxidativa del músculo y que, por tanto, ésta no era el factor limitante para el consumo máximo de oxígeno. Aunque el consumo máximo de oxígeno está indirectamente relacionado con la resistencia, no se puede considerar un predictor de la misma. Esta afirmación explica las sutiles mejoras en el consumo máximo de oxígeno asociadas con el entrenamiento en el estudio de Davies (Davies *et al.*, 1981) y que contrastan con las significativas modificaciones del contenido mitocondrial del músculo esquelético. Ese hecho justifica, que en nuestro modelo de estudio, utilicemos una prueba de resistencia (Ver materiales y métodos) para demostrar la mejora en el rendimiento de nuestros animales tras el periodo de entrenamiento. Como muestra la figura V.6, los animales entrenados jóvenes evidenciaron una mejora significativa en el tiempo de carrera en la prueba de resistencia, frente al grupo reposo joven. En las ratas viejas, también observamos una mejora de las entrenadas frente a las reposo. Esta mejora en el tiempo de carrera tras el protocolo de entrenamiento indica que el ejercicio físico induce adaptaciones en el músculo esquelético, preferiblemente, en las mitocondrias, como se ha observado en diversos estudios previos (Hepple *et al.*, 2003; Wada *et al.*, 2003; Gomez-Cabrera *et al.*, 2008).

Figura V.6: Gráficas representativas de la prueba de resistencia en animales jóvenes y viejos.



En el caso de los ratones silvestres y KO de PGC-1 α observamos una mejora en el tiempo de carrera en el grupo de los silvestres entrenados antes y después del entrenamiento. Pese que el entrenamiento también supuso una mejora en el tiempo de resistencia en los animales KO de PGC-1 α el porcentaje de mejora fue significativamente menor que el mostrado por los animales silvestres tras el entrenamiento.

Figura V.7: Gráficas representativas de la prueba de resistencia en animales silvestres y KO de PGC-1 α .

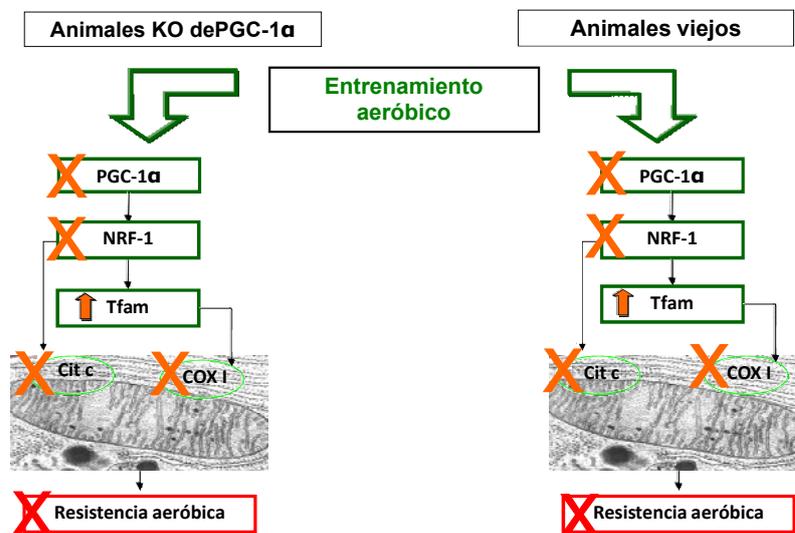


Otro dato que consideramos importante comentar en este apartado es el que hace referencia a los tiempos de carrera en la prueba de resistencia que realizaron los animales silvestres y KO de PGC-1 α antes del periodo de entrenamiento. La ausencia del co-activador PGC-1 α no parece interferir en el resultado de la prueba de resistencia cuando ésta se realiza en animales sedentarios. Sin embargo cuando el músculo esquelético es estimulado con el entrenamiento, si que observamos una diferencia muy significativa entre los animales silvestres y KO de PGC-1 α (tras el entrenamiento).

Los resultados obtenidos al comparar animales KO de PGC-1 y animales viejos muestran que, en cierta medida, podríamos considerar que los animales viejos se comportan

como un KO de PGC-1 α , lo que indica que la disfuncionalidad de este co-activador podría ser la causa de las alteraciones mitocondriales que se producen en el proceso de envejecimiento (Ver figura V.8). Del mismo modo hemos podido comprobar que el entrenamiento aeróbico de corta duración no supone un estímulo suficiente para la activación del proceso de biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético del animal viejo.

Figura V.8: Esquema del efecto del entrenamiento aeróbico sobre la cascada de señalización implicada en el proceso biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético de animales KO de PGC-1 α y animales viejos.



5. ESTRÉS OXIDATIVO MUSCULAR Y ENVEJECIMIENTO. COMPARACIÓN CON EL MODELO DE ANIMALES KO DE PGC-1a.

Teniendo en cuenta los dos primeros objetivos de la presente tesis doctoral, nos planteamos estudiar el efecto del entrenamiento sobre la oxidación de proteínas musculares, así como la expresión de enzimas antioxidantes, en los distintos modelos experimentales planteados. La figura V.9 muestra las densitometrías de los westerns relativos al estudio de la carbonización de proteínas, tanto en los animales KO de PGC-1 como en los jóvenes y viejos. La modificación oxidativa de proteínas por ERO ocurre en situaciones tanto fisiológicas como patológicas. Como consecuencia de dicha modificación, se introducen grupos carbonilo en las proteínas por un mecanismo específico. Los aminoácidos lisina, prolina y arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas (Stadman, 1992). Otros aminoácidos como histidina, cisteína y metionina, también sufren daño oxidativo, pero no forman derivados de tipo carbonilo (Stadman, 1992). El daño oxidativo suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína (Grant *et al.*, 1993).

Nuestros resultados muestran como el envejecimiento supuso un aumento en la oxidación de

proteínas musculares. Estos datos refuerzan la relación entre el envejecimiento y el aumento del estrés oxidativo que estableció, a mitad de siglo XX, Rebeca Gershmán. Esta investigadora argentina, propuso que el envejecimiento se asociaba a alteraciones moleculares debidas a los radicales libres. Esa teoría fue elaborada por Denham Harman. Harman postuló la Teoría de los Radicales Libres en el Envejecimiento en 1956 (Harman, 1956). La contribución de Harman fue proponer una teoría coherente y completa sobre el envejecimiento basándose en la acción deletérea de los radicales libres. Esta teoría fue posteriormente refinada por Jaime Miquel. Miquel propuso que las mitocondrias eran a su vez causa de la producción de radicales y diana de las acciones deletéreas de los mismos (Miquel *et al.*, 1980). La teoría mitocondrial del envejecimiento sustenta el objetivo 3 de la presente tesis y ha sido objeto de estudio por nuestro grupo de investigación desde hace más de dos décadas (Vina *et al.*, 1990). Las señales de oxidación proteica que encontramos fueron especialmente visibles en proteínas con pesos moleculares de 37 y 25 kDa. Esto indica que algunas proteínas son más sensibles a la formación de derivados carbonilo, bajo nuestras condiciones experimentales, que otras. También sugiere que cierta forma de daño oxidativo tiene lugar selectivamente, sin embargo la identificación de las proteínas oxidadas en músculo requeriría más investigación. Este hecho puede tener sus consecuencias fisiológicas, si se considera que el daño oxidativo debe ser

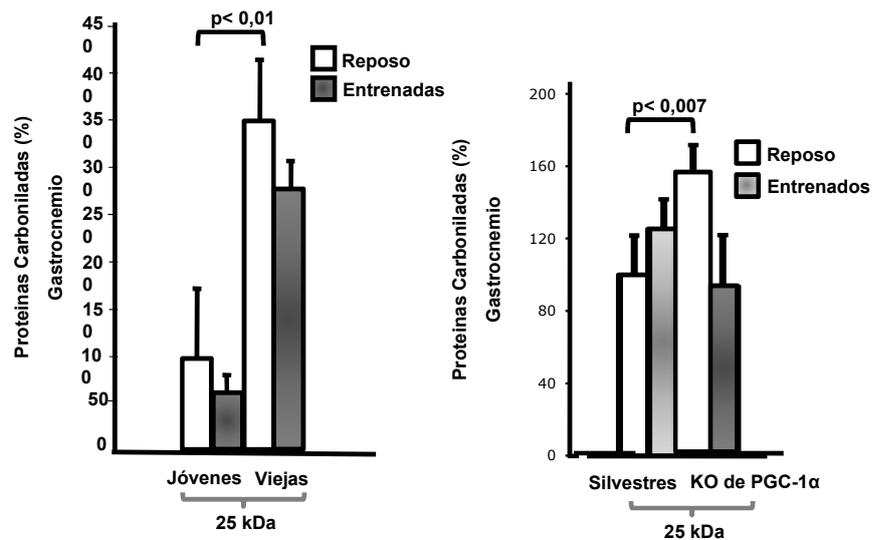
el primer paso en la respuesta adaptativa al ejercicio (Davies *et al.*, 1982; Rajguru *et al.*, 1994). Volviendo a la figura V.9, observamos que el entrenamiento no incrementó significativamente la carbonilación de proteínas en ninguno de los grupos de animales estudiados (jóvenes y viejos). Sin embargo, los animales viejos, en condiciones basales, si que mostraron niveles de carbonilación superiores a los animales jóvenes. La evidencia de que el entrenamiento no aumenta el estrés oxidativo se ha consolidado en los últimos tiempos. De hecho, nosotros hemos observado que el ejercicio físico puede ser considerado un antioxidante, ya que provoca un aumento de la expresión de las enzimas antioxidantes (Gomez-Cabrera *et al.*, 2008). En este sentido nuestros resultados son coherentes con resultados previos de nuestro grupo de investigación en los que demostramos que pequeños niveles de radicales libres generados durante el entrenamiento, lejos de dañar el músculo esquelético, activan cascadas de señalización celular que median algunas de las adaptaciones al ejercicio físico (Gomez-Cabrera *et al.*, 2008; Ji *et al.*, 2009). El músculo esquelético es uno de los tejidos con mayor masa del cuerpo, está formado por células postmitóticas por lo que presenta una mayor tendencia a acumular daño oxidativo (Radak *et al.*, 2001). El hecho de que el entrenamiento no aumente la vulnerabilidad del músculo al daño oxidativo es muy importante ya que las proteínas modificadas por estrés oxidativo pierden su función fisiológica y presentan una mayor tendencia a la

degradación. La acumulación de estas proteínas puede condicionar procesos fisiológicos vitales. Radak y colaboradores demostraron en 1999 que el entrenamiento tiende a aumentar la actividad del proteasoma lo que sugiere que la degradación de las proteínas modificadas oxidativamente es más efectiva en los músculos de ratas entrenadas jóvenes (Radak *et al.*, 1999). Nuestros datos muestran esta misma tendencia en los animales jóvenes entrenados aunque no llega a alcanzar significatividad estadística.

En relación a los animales KO de PGC-1 α , el entrenamiento no supuso un aumento de la oxidación de proteínas ni en los animales silvestres ni en los modificados genéticamente. Sin embargo los animales KO mostraron en condiciones basales unos valores de carbonilación de proteínas significativamente superiores a los silvestres reposo, i.e., el mismo patrón observado para los animales viejos. El aumento del estrés oxidativo en los animales deficientes en PGC-1 α ha sido descrito previamente por diversos grupos de investigación. Una de las funciones descritas para PGC-1 α es la de la estimulación de la defensa antioxidante celular (St-Pierre *et al.*, 2006). La regulación por parte de PGC-1 α de la expresión de enzimas antioxidantes (Kukidome *et al.*, 2006) y de las proteínas desacoplantes (Valle *et al.*, 2005) se evidencia por el aumento de las ERO y del daño cerebral en los animales KO

de PGC-1 α . El entrenamiento, sin embargo, no supuso un incremento en los niveles de proteínas carboniladas en los animales modificados genéticamente. De nuevo, y en este caso, observamos un paralelismo entre los resultados obtenidos en el modelo de animales KO y animales viejos.

Figura V.9 Gráficas representativas de la carbonilación de proteínas musculares en animales jóvenes y viejos, silvestres y KO de PGC-1 α .



6. ENTRENAMIENTO AERÓBICO Y EXPRESIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN ANIMALES VIEJOS Y KO DE PGC-1 α .

El músculo esquelético es muy heterogéneo y la actividad de las enzimas antioxidantes varía de acuerdo con el tipo de fibra. Por ejemplo, las fibras musculares oxidativas tipo I poseen mayor actividad de todas las enzimas

antioxidantes que las fibras musculares tipo IIa y IIb (Powers *et al.*, 1994a). El tipo de fibra muscular es un importante factor en la determinación del posible efecto del entrenamiento en la actividad de las enzimas antioxidantes, reflejando el reclutamiento de fibras durante el ejercicio y la capacidad antioxidante intrínseca de cada fibra (McArdle *et al.*, 2000).

Las principales ERO producidas por el músculo esquelético, durante la contracción son el radical superóxido (que se dismuta a peróxido de hidrógeno con mucha rapidez) y el óxido nítrico (Leeuwenburgh *et al.*, 1997).

Las enzimas antioxidantes suponen un sistema importante de mantenimiento del estado redox en la célula. Diversos autores han demostrado un aumento en su actividad en respuesta al ejercicio físico crónico en ratas jóvenes (Leeuwenburgh *et al.*, 1997; Fulle *et al.*, 2004). Algunos estudios han evaluado el efecto del entrenamiento aeróbico en ratas viejas y los resultados sugieren que existe una incapacidad para regular la expresión de las enzimas antioxidantes con el paso de los años (Fulle *et al.*, 2004). Sin embargo, otros estudios (Powers *et al.*, 1993) muestran lo contrario, un aumento en la actividad de la catalasa en músculo esquelético de humanos y roedores con el envejecimiento. En este mismo sentido, un entrenamiento intenso de natación se ha demostrado que induce la SOD en miocardio y diafragma de ratas (Powers *et al.*, 1994b; Lambertucci *et al.*, 2007). En el estudio de Lambertucci y

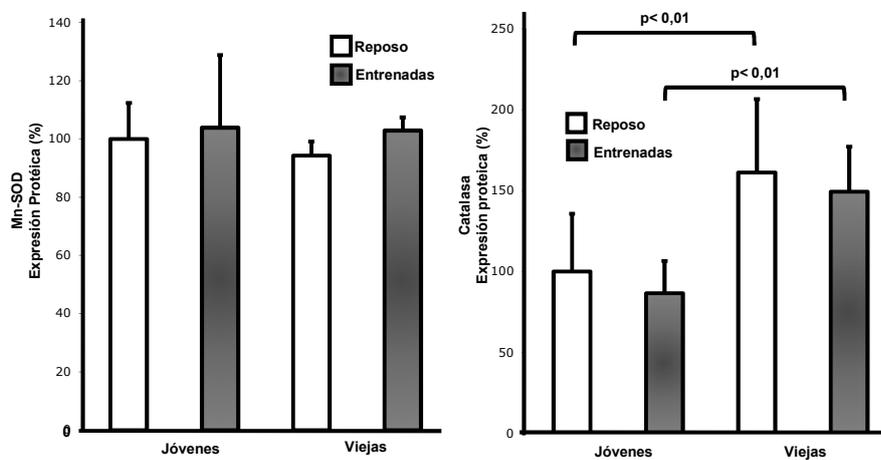
cols. (Lambertucci *et al.*, 2007), los autores entrenaron grupos de ratas de 2 y 21 meses de edad durante 12 semanas. Analizando el músculo sóleo de estos animales, tras el protocolo de entrenamiento, encontraron que la actividad de la enzima Mn-SOD fue entre 3 y 4 veces mayor en los músculos de ratas viejas controles frente a las jóvenes controles. En los grupos jóvenes observaron un incremento de 2 a 3 veces en la actividad de la Mn-SOD al comparar los grupos entrenados y reposo. Sin embargo cuando compararon los grupos viejos, entrenados y reposo, no observaron cambios en la actividad enzimática de la Mn-SOD.

Otro reciente estudio que evaluó la respuesta de la Mn-SOD al entrenamiento ha sido el del grupo de Gonzalez-Gallego (Garcia-Lopez *et al.*, 2007). En su modelo de estudio, ellos analizaron el efecto de la expresión de enzimas antioxidantes en células sanguíneas mononucleadas periféricas en dos modelos: sujetos sometidos a un entrenamiento aeróbico y sujetos sometidos a entrenamiento de fuerza. Tras 21 días de entrenamiento se analizaron tanto la actividad enzimática como los niveles de ARNm de las enzimas antioxidantes. Sus resultados muestran un aumento en los niveles de ARNm en los dos grupos tras el entrenamiento, mientras que la actividad enzimática de la Mn-SOD no presentó cambios en ninguno de los grupos. El tiempo de entrenamiento fue suficiente para estimular los niveles de ARNm, sin embargo

alteraciones en su estabilidad y en la eficiencia de la translación del ARNm, explicarían la ineffectividad en el aumento de la expresión de la Mn-SOD.

En nuestros resultados no encontramos cambios en la expresión de la enzima Mn-SOD en los grupos jóvenes y viejos, entrenados y reposo. Sin embargo, en la expresión de la catalasa encontramos un aumento significativo con la edad y ningún efecto del entrenamiento, como en otros trabajos citados previamente.

Figura V.10: Gráficas representativas de la expresión de Mn-SOD y catalasa en animales jóvenes y viejos.



Las divergencias de resultados observadas en la literatura son debidas al tipo de animal, la edad y/o el músculo esquelético utilizado para los experimentos. Existen numerosos estudios que han demostrado que la actividad de la Mn-SOD y el contenido de la proteína están aumentados

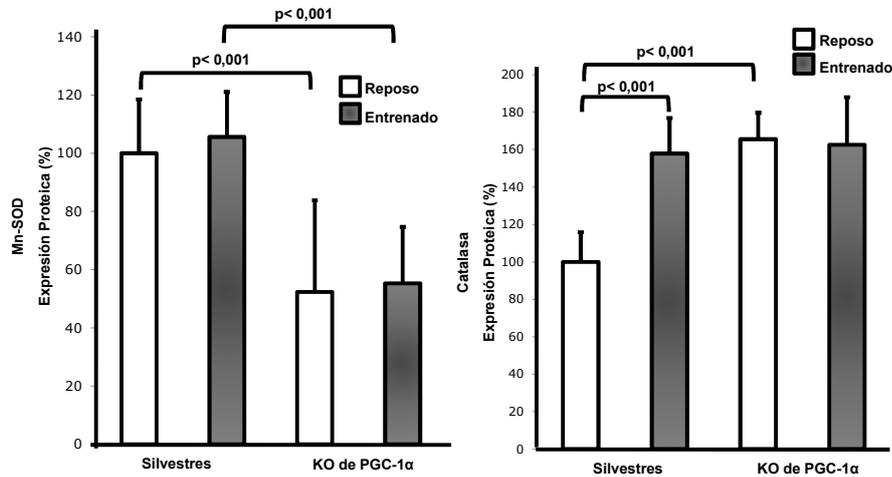
con el entrenamiento aeróbico en el músculo esquelético, mientras los niveles de ARNm no se ven afectados (Oh-ishi *et al.*, 1997; Hollander *et al.*, 1999). Por su parte el aumento de la expresión de la catalasa con la edad, puede ser entendida como un intento en equilibrar el estado redox que se sabe se altera con el envejecimiento.

Estudios previos, ya mencionados en este apartado de la tesis, han demostrado que PGC-1 α juega un importante papel en el mantenimiento del estado redox intracelular debido a su regulación en la expresión de enzimas tales como la SOD y las proteínas desacoplantes (St-Pierre *et al.*, 2006). Los datos de St. Pierre y colaboradores también indican que el H₂O₂ es un estímulo directo para el aumento de la expresión de PGC-1 α . Además, se sabe que durante el ejercicio (sobre todo el que se realiza hasta el agotamiento) se produce un aumento en la producción de radicales libres en el músculo esquelético (Reid & Durham, 2002; Hellsten *et al.*, 2007), mientras que el entrenamiento es capaz de aumentar la defensa antioxidante muscular (Ji, 2002).

Nuestros resultados muestran una diferencia significativa en el contenido en músculo esquelético de la proteína Mn-SOD en los animales silvestres cuando se comparan con los KO de PGC-1 α . No observamos, sin embargo, ningún efecto en relación al entrenamiento. Con relación a la expresión de la catalasa, observamos un aumento significativo en los ratones silvestres entrenados

frente a los reposo y un aumento significativo entre los KO de PGC-1 α reposo frente a los silvestres reposo.

Figura V.11: Gráficas representativas de la expresión de Mn-SOD y catalasa en animales silvestres y deficientes en PGC-1 α .



En un estudio publicado recientemente (Leick *et al.*, 2008), los autores entrenaron ratones silvestres y KO de PGC-1 α durante 5 semanas. Al evaluar la expresión del ARNm de la Mn-SOD, en el músculo cuádriceps de estos animales, encontraron un aumento significativo del ARNm en los entrenados frente a sus respectivos reposo, tanto en los animales silvestres como en los KO. Sin embargo estos autores no determinaron los niveles de la proteína en su estudio. Nuestros resultados muestran, sin embargo, una diferencia significativa, en cuanto a los niveles de la enzima Mn-SOD, entre los animales silvestres y KO de PGC-1 α y ningún efecto del entrenamiento. Nuestra principal

conclusión en relación a los resultados obtenidos, es que PGC-1 α es un co-activador clave para el mantenimiento de la defensa antioxidante en el músculo esquelético. Del mismo modo concluimos que un entrenamiento de 5 semanas, aunque es suficiente para aumentar la expresión del ARNm de la Mn-SOD, es insuficiente para inducir un aumento en la expresión de la proteína.

7. FUENTES DE RADICALES LIBRES EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LOS ANIMALES JÓVENES Y VIEJOS DURANTE EL ENTRENAMIENTO FÍSICO.

La enzima xantina óxidoreductasa es una enzima descrita originalmente como una aldehído oxidasa en 1902 (Zimmerman *et al.*, 1988). La xantina óxidoreductasa es sintetizada como xantina deshidrogenasa (XDH) y se mantiene mayoritariamente como tal en la célula, pero puede convertirse rápidamente en la forma oxidasa (XO) mediante oxidación de los residuos sulfhidrilo o mediante proteólisis. En tejidos sanos, entre un 10 y un 30% de la actividad total de la enzima procede de la forma oxidasa (Chambers *et al.*, 1985), pero en determinadas circunstancias se puede producir una conversión de la forma deshidrogenasa a la oxidasa. La XO utiliza hipoxantina y oxígeno (como aceptor de electrones), para dar lugar a xantina (eventualmente ácido úrico) y a radical superóxido; mientras que la XDH, que es la forma predominante en

condiciones fisiológicas, utiliza xantina y NAD^+ (como aceptor de electrones) (Zimmerman *et al.*, 1988). Su actividad en plasma ha sido estudiada durante años por nuestro grupo de investigación. Se sabe que cuando la enzima es liberada al plasma, se convierte inmediatamente en XO (Tan *et al.*, 1993). Por lo tanto, tanto la liberación de la enzima a la circulación como la subsiguiente unión a las células promueven la producción de ERO. La unión de la enzima a la superficie celular está respaldada por la demostración de las consecuencias de su actividad en tejidos que originalmente presentan poca actividad XOR, de forma que tras aumentar la liberación de esta enzima en otros órganos, aquellos presentan un incremento de daño producido por la XOR transportada a través de la sangre (Terada *et al.*, 1991; Terada *et al.*, 1992), y además son protegidos por inhibidores de la XOR (Grum *et al.*, 1986). Así pues, la XOR liberada desde órganos isquémicos es capaz de producir efectos en órganos a distancia, como el pulmón (Weinbroum *et al.*, 1995).

Resultados publicados por nuestro grupo de investigación, en diversos modelos experimentales, demuestran un incremento en la actividad xantina oxidasa en plasma en animales sometidos a un protocolo de ejercicio físico agotador. Dicho aumento se previene completamente cuando tratamos a los animales con alopurinol (Radak *et al.*, 1995; Vina *et al.*, 2000; Gomez-Cabrera *et al.*, 2005). Varios

grupos de investigación, a parte del nuestro, han descrito este aumento en la actividad XO en plasma tras el ejercicio (Radak *et al.*, 1995). Parece claro que este incremento en la actividad de la enzima es un reflejo del daño a las células endoteliales. Radak y colaboradores (Radak *et al.*, 1995) consideran el endotelio vascular no solo una fuente de radicales libres, durante el ejercicio físico intenso, sino uno de los tejidos diana más sensible a los mismos. Se ha relacionado un aumento en la producción de radical superóxido en el lecho vascular con el aumento de la actividad xantina oxidasa durante el ejercicio (Hopson *et al.*, 1995). La enzima interactúa con glicosaminoglicanos en la superficie de las células endoteliales (White & Heckler, 1990). Adachi y cols. (1993) (Adachi *et al.*, 1993) demostraron que la XO se une electrostáticamente a los glicosaminoglicanos en la superficie de células endoteliales en cultivo, y que esta unión puede ser revertida por el tratamiento con heparina. Por otra parte también hemos visto que la inhibición de la XO con alopurinol previene el daño muscular asociado a la práctica de ejercicio físico agotador tanto en animales (Gomez-Cabrera *et al.*, 2003) como en humanos (Gomez-Cabrera *et al.*, 2003). Estudios más recientes se han centrado en el papel de las ERO derivadas de la XO y su importancia en los procesos de señalización celular y las adaptaciones al ejercicio físico (Ji *et al.*, 2004; Gomez-Cabrera *et al.*, 2005).

En la presente tesis doctoral nos planteamos determinar el papel de la xantina oxidasa en la generación de radicales en un modelo de entrenamiento aeróbico tanto en animales jóvenes como viejos. Con este propósito determinamos la actividad XO en plasma de nuestros animales y observamos un aumento significativo en los dos grupos de edad, asociados al entrenamiento, mientras que no hallamos diferencias significativas entre los animales jóvenes y viejos en los grupos reposo. En un trabajo publicado en el año 2007 por nuestro grupo de investigación (Aranda *et al.*, 2007) si que se observó una tendencia al incremento en la actividad de esta enzima en el plasma de animales viejos, sin embargo nuestros resultados no confirman este hallazgo. En un trabajo previo, los autores encontraron un aumento de la actividad XO, así como de su expresión, en animales viejos reposo, pero en este caso en anillos aórticos (Newaz *et al.*, 2006). La distinta edad de los animales podrían explicar las diferencias encontradas.

La producción de ERO derivadas de fuentes intracelulares durante el ejercicio ha sido ampliamente descrita (Pattwell *et al.*, 2004), sin embargo nuestros datos muestran el posible papel de la XO situada en el endotelio vascular como generadora de radicales libres durante el proceso de entrenamiento, como vemos en la figura IV.5 de nuestros resultados. La contracción muscular puede aumentar las fuerzas de cizallamiento a las que se somete el

lecho vascular muscular y es posible que este estímulo induzca un aumento de la liberación de xantina oxidasa al plasma así como de la producción de radical superóxido por esta vía (Stofan *et al.*, 2000). En un trabajo publicado en 1996 los autores demostraron un aumento significativo en la actividad XO en animales jóvenes y viejos sometidos a un entrenamiento de natación (Oh-ishi *et al.*, 1996). Sin embargo, en este caso, las determinaciones fueron realizadas en el músculo diafragma y la especie estudiada fueron ratones.

Se han descrito múltiples fuentes de radicales libres en el ejercicio físico. Aunque la XO sea una fuente que no contribuye a la producción de ERO en cualquier circunstancia, el significativo incremento en su actividad tras el entrenamiento muestra que esta vía puede ser relevante para su producción no sólo tras un protocolo de ejercicio agotador sino también durante el entrenamiento físico (Ji *et al.*, 2009).

8- ESTUDIO DEL EFECTO DEL ENTRENAMIENTO SOBRE LA MIOGÉNESIS EN EL MÚSCULO SÓLEO Y GASTROCNEMIO DE RATAS JÓVENES Y VIEJAS SOMETIDAS A UN PROTOCOLO DE ENTRENAMIENTO AERÓBICO DE 3 SEMANAS.

MioD y Miogenina son dos miembros de la familia de factores reguladores de la miogénesis (FRM). Se sabe que ambos, tanto MioD como Miogenina, son importantes para el desarrollo del músculo en el período embrionario y neonatal (Edmondson & Olson, 1993). Más recientemente, se ha demostrado su función reguladora en el proceso de plasticidad, adaptación y generación de células en músculo maduros (Buonanno *et al.*, 1998; Sabourin & Rudnicki, 2000). MioD y Miogenina están expresadas, a niveles relativamente altos, durante el primer mes después del nacimiento y son detectables en músculo esquelético de animales adultos (Duclert *et al.*, 1991; Eftimie *et al.*, 1991; Witzemann & Sakmann, 1991; Musaro *et al.*, 1995).

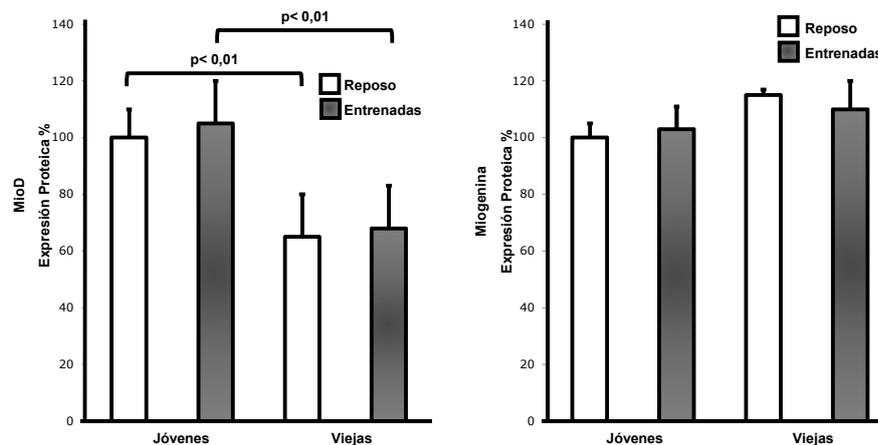
Algunas de las alteraciones en el músculo relacionadas con el envejecimiento se desconocen y representan un evento complejo que puede desembocar en una alteración de la homeostasis tanto a nivel molecular como celular. La ausencia de una innervación apropiada en algunas fibras musculares y la activación de las células satélite constituyen parte de los cambios que se producen con el envejecimiento (Larsson, 1982; Carlson, 1995;

Faulkner *et al.*, 1995). Sin embargo, se desconoce si la denervación y/o activación de células satélites son estímulos capaces de alterar la expresión de MioD y Miogenina en el músculo del animal viejo.

Los grupos de Musaro (Musaro *et al.*, 1995) y Kostrominova (Kostrominova *et al.*, 2000) han demostrado el acúmulo de miogenina en los núcleos de las células musculares en animales viejos. Tres años después (Dedkov *et al.*, 2003), se analizó la expresión de MioD y Miogenina en el músculo esquelético de animales seniles y su relación con la pérdida de fuerza muscular. Estos autores constataron un aumento en la expresión de miogenina en el músculo gastrocnemio de ratas con el paso de los años. Sin embargo, la expresión de MioD, no mostró diferencias significativas con la edad.

En nuestro estudio en el músculo sóleo, como podemos observar en las figura V.12, encontramos un aumento en la expresión de MioD en los jóvenes reposo frente a los viejos reposo y entre los jóvenes entrenados frente a los viejos entrenados. Sin embargo, no encontramos ningún cambio significativo en la expresión de miogenina.

Figura V.12: Gráficas representativas de la expresión de MioD y miogenina en el músculo sóleo de animales jóvenes y viejos.

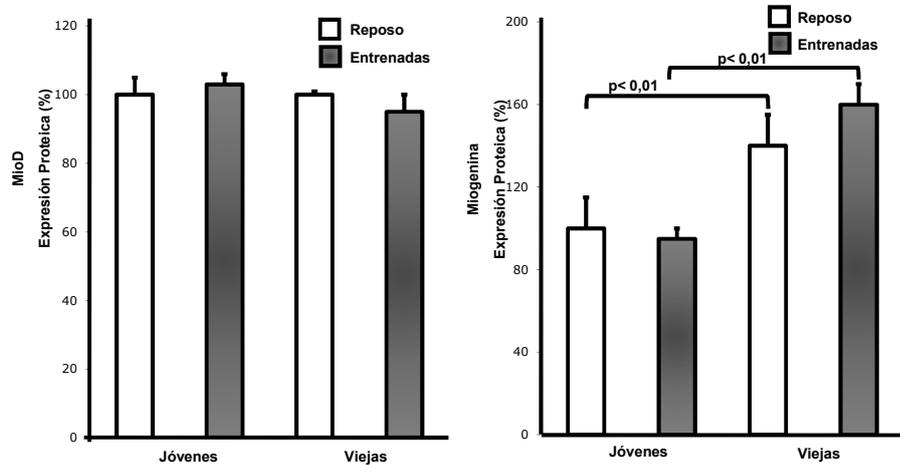


Tras una exhaustiva búsqueda bibliográfica no hemos encontrado ningún trabajo publicado en el que se relacione el entrenamiento de animales o sujetos jóvenes y viejos con la expresión de MioD y miogenina. De nuestros resultados deducimos que los animales jóvenes poseen una mejor plasticidad y capacidad de activación de células satélites debido a un aumento en la expresión de MioD. Sin embargo, no observamos ninguna diferencia, en este factor miogénico en relación con el entrenamiento, en ninguno de los grupos estudiados. Esto nos lleva a pensar que el tiempo de entrenamiento fue corto para constatar alteraciones en la expresión de ambos factores reguladores de la miogénesis.

En el músculo gastrocnemio, observamos resultados contrarios a los obtenidos en sóleo. Encontramos un aumento significativo en la expresión de Miogenina en los

viejos reposo frente a los jóvenes reposo y un aumento significativo en los viejos entrenados frente a los jóvenes entrenados.

Figura V.13: Gráficas representativas de la expresión de MioD y miogenina en el músculo gastrocnemio de animales jóvenes y viejos.



Al igual que en el caso de MioD, existen muy pocos trabajos en los que se hayan estudiado los niveles proteicos de la miogenina en el músculo esquelético (Kostrominova *et al.*, 2000; Alway *et al.*, 2002; Dedkov *et al.*, 2003). La expresión de este gen, sin embargo, si que se ha determinado tanto en ratas como ratones analizando las modificaciones en el ARNm (Musaro *et al.*, 1995) (Dedkov *et al.*, 2001) (Lowe *et al.*, 1998). En el estudio de Dedkov y colaboradores (Dedkov *et al.*, 2003), se demostró que la expresión de la miogenina en el músculo gastrocnemio de ratas aumenta con la edad, lo que coincide con nuestros resultados. Consideramos, por tanto, que el aumento en la

expresión de miogenina en el grupo de los animales viejos frente a los jóvenes, es un efecto compensatorio de edad, una manera de minimizar las pérdidas de las células musculares asociadas al envejecimiento. Del mismo modo concluimos que un entrenamiento de 3 semanas es insuficiente para producir cambios tanto en el músculo sóleo como en el gastrocnemio.

CONCLUSIONES

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

- 1- En referencia a la mitocondriogénesis, los animales viejos se comportan como los animales deficientes en PGC-1 α . La cascada de señalización que se activa durante la mitocondriogénesis, PGC1 α \rightarrow NRF1 \rightarrow Tfam \rightarrow COXI/citocromo c, se encuentra significativamente alterada, tanto en los músculos de animales viejos, como en los de animales deficientes en PGC-1 α . La disfuncionalidad de PGC-1 α podría ser la causa de las alteraciones mitocondriales que se producen en el proceso de envejecimiento.
- 2- El entrenamiento aeróbico no supone un estímulo suficiente para la activación del proceso de biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético de los animales viejos ó deficientes en PGC-1 α .
- 3- La carbonilación de proteínas de bajo peso molecular, se encuentra significativamente incrementada en el músculo esquelético, tanto de los animales viejos como en el de los animales deficientes en PGC-1 α . El entrenamiento aeróbico, aunque induce un aumento en la actividad de la enzima xantina oxidasa, sin embargo, no supone un incremento de los niveles de

oxidación proteica en ninguno de los grupos experimentales.

- 4- La expresión de la enzima antioxidante catalasa se encuentra significativamente incrementada en los músculos de los animales viejos y deficientes en PGC-1 α lo que puede reflejar un mecanismo de adaptación al aumento del estrés oxidativo demostrado en ambos modelos. El entrenamiento aeróbico únicamente induce un incremento en los niveles de catalasa en los animales silvestres.
- 5- El envejecimiento supone una alteración en la expresión de los factores miogénicos: miogenina y mioD. Mientras que los niveles musculares de miogenina se encuentran aumentados en los animales viejos, los de mioD están significativamente disminuidos. Este fenómeno es fibro-específico y no se ve afectado por el entrenamiento aeróbico.
- 6- El entrenamiento aeróbico resulta insuficiente para prevenir la disfunción mitocondrial asociada al proceso de envejecimiento muscular.

BIBLIOGRAFIA

- Adachi T, Fukushima T, Usami Y & Hirano K. (1993). Binding of human xanthine oxidase to sulphated glycosaminoglycans on the endothelial-cell surface. *Biochem J* **289** (Pt 2), 523-527.
- Aleman V & Handler P. (1967). Dihydroorotate dehydrogenase. I. General properties. *J Biol Chem* **242**, 4087-4096.
- Alessio HM, Goldfarb AH & Cutler RG. (1988). MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. *Am J Physiol* **255**, C874-877.
- Alway SE, Degens H, Krishnamurthy G & Smith CA. (2002a). Potential role for Id myogenic repressors in apoptosis and attenuation of hypertrophy in muscles of aged rats. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**, C66-76.
- Alway SE, Degens H, Lowe DA & Krishnamurthy G. (2002b). Increased myogenic repressor Id mRNA and protein levels in hindlimb muscles of aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **282**, R411-422.
- Ames BN. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* **221**, 1256-1264.
- Ames BN, Shigenaga MK & Hagen TM. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 7915-7922.
- Aoki TT. (1981). Metabolic adaptations to starvation, semistarvation, and carbohydrate restriction. *Prog Clin Biol Res* **67**, 161-177.
- Apple FS, Hyde JE, Ingersoll-Stroubos AM & Theologides A. (1991). Geographic distribution of xanthine oxidase, free radical scavengers, creatine kinase, and lactate dehydrogenase enzyme systems in rat heart and skeletal muscle. *Am J Anat* **192**, 319-323.
- Arabadjis PG, Tullson PC & Terjung RL. (1993). Purine nucleoside formation in rat skeletal muscle fiber types. *Am J Physiol* **264**, C1246-1251.

- Aranda R, Domenech E, Rus AD, Real JT, Sastre J, Vina J & Pallardo FV. (2007). Age-related increase in xanthine oxidase activity in human plasma and rat tissues. *Free Radic Res* **41**, 1195-1200.
- Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O, Ahmad F, Matsui T, Chin S, Wu PH, Rybkin II, Shelton JM, Manieri M, Cinti S, Schoen FJ, Bassel-Duby R, Rosenzweig A, Ingwall JS & Spiegelman BM. (2005). Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab* **1**, 259-271.
- Aruoma OI, Halliwell B, Laughton MJ, Quinlan GJ & Gutteridge JM. (1989). The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. *Biochem J* **258**, 617-620.
- Aspnes LE, Lee CM, Weindruch R, Chung SS, Roecker EB & Aiken JM. (1997). Caloric restriction reduces fiber loss and mitochondrial abnormalities in aged rat muscle. *Faseb J* **11**, 573-581.
- Aust SD, Chignell CF, Bray TM, Kalyanaraman B & Mason RP. (1993). Free radicals in toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol* **120**, 168-178.
- Baar K. (2004). Involvement of PPAR gamma co-activator-1, nuclear respiratory factors 1 and 2, and PPAR alpha in the adaptive response to endurance exercise. *Proc Nutr Soc* **63**, 269-273.
- Baar K, Song Z, Semenkovich CF, Jones TE, Han DH, Nolte LA, Ojuka EO, Chen M & Holloszy JO. (2003). Skeletal muscle overexpression of nuclear respiratory factor 1 increases glucose transport capacity. *Faseb J* **17**, 1666-1673.
- Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, Kelly DP & Holloszy JO. (2002). Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *Faseb J* **16**, 1879-1886.

- Babior BM. (1978). Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N Engl J Med* **298**, 659-668.
- Balagopal P, Schimke JC, Ades P, Adey D & Nair KS. (2001). Age effect on transcript levels and synthesis rate of muscle MHC and response to resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E203-208.
- Bangsbo J, Sjodin B & Hellsten-Westing Y. (1992). Exchange of hypoxanthine in muscle during intense exercise in man. *Acta Physiol Scand* **146**, 549-550.
- Barbera MJ, Schluter A, Pedraza N, Iglesias R, Villarroya F & Giralt M. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem* **276**, 1486-1493.
- Barclay J & Hansel M. (1991). Free radicals may contribute to oxidative skeletal muscle fatigue. *Can J Physiol Pharmacol* **69:279**.
- Bellomo C, Jewel SA, Thor H & Orrenius S. (1982). Regulation of intracellular calcium compartmentation: Studies with isolated hepatocytes and t-butylhydroperoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**, 6842-6846.
- Benzi G & Moretti A. (1995). Age and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Rad Biol Med* **19**, 77-101.
- Bereiter-Hahn J & Voth M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* **27**, 198-219.
- Bergeron R, Ren JM, Cadman KS, Moore IK, Perret P, Pypaert M, Young LH, Semenkovich CF & Shulman GI. (2001). Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**, E1340-1346.

- Betik AC, Baker DJ, Krause DJ, McConkey MJ & Hepple RT. (2008). Exercise training in late middle-aged male Fischer 344 x Brown Norway F1-hybrid rats improves skeletal muscle aerobic function. *Exp Physiol* **93**, 863-871.
- Bondy SC. (1992). Reactive oxygen species: relation to aging and neurotoxic damage. *Neurotoxicology* **13**, 87-100.
- Booth F. (1977). Effects of endurance exercise on cytochrome C turnover in skeletal muscle. *Ann N Y Acad Sci* **301**, 431-439.
- Bouillaud F, Ricquier D, Thibault J & Weissenbach J. (1985). Molecular approach to thermogenesis in brown adipose tissue: cDNA cloning of the mitochondrial uncoupling protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 445-448.
- Boveris A & Cadenas E. (1975). Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett* **54**, 311-314.
- Boveris A & Chance BC. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* **143**, 707-716.
- Boveris A, Oshino N & Chance B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxyde. *Biochem J* **128**, 617-630.
- Braidotti G, Borthwick IA & May BK. (1993). Identification of regulatory sequences in the gene for 5-aminolevulinate synthase from rat. *J Biol Chem* **268**, 1109-1117.
- Bresolin N, Moggio M, Bet L, Gallanti A, Prella A, Nobile-Orazio E, Adobbati L, Ferrante C, Pellegrini G & Scarlato G. (1987). Progressive cytochrome c oxidase deficiency in a case of Kearns-Sayre syndrome: morphological, immunological, and biochemical studies in muscle biopsies and autopsy tissues. *Ann Neurol* **21**, 564-572.

- Brunk CF. (1981). Mitochondrial proliferation during myogenesis. *Exp Cell Res* **136**, 305-309.
- Bua E, Johnson J, Herbst A, DeLong B, McKenzie D, Salamat S & Aiken JM. (2006). Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. *Am J Hum Genet* **79**, 469-480.
- Bua EA, McKiernan SH, Wanagat J, McKenzie D & Aiken JM. (2002). Mitochondrial abnormalities are more frequent in muscles undergoing sarcopenia. *J Appl Physiol* **92**, 2617-2624.
- Buonanno A, Cheng J, Venepally P, Weis J & Calvo S. (1998). Activity-dependent regulation of muscle genes: repressive and stimulatory effects of innervation. *Acta Physiol Scand* **163**, S17-26.
- Byers T. (1993). Vitamin E supplements and coronary heart disease. *Nutr Rev* **51**, 333-345.
- Cadenas E, Boveris A, Ragan CI & Stoppani AOM. (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.
- Capaldi RA. (1990). Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu Rev Biochem* **59**, 569-596.
- Capdevila J, Chacos N, Werringloer J, Prough RA & Estabrook RW. (1981). Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 5362-5366.
- Carlson BM. (1995). Factors influencing the repair and adaptation of muscles in aged individuals: satellite cells and innervation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **50 Spec No**, 96-100.
- Cassard-Doulcier AM, Larose M, Matamala JC, Champigny O, Bouillaud F & Ricquier D. (1994). In vitro interactions between nuclear proteins and uncoupling protein gene promoter reveal several putative

- transactivating factors including Ets1, retinoid X receptor, thyroid hormone receptor, and a CACCC box-binding protein. *J Biol Chem* **269**, 24335-24342.
- Castillo EM, Goodman-Gruen D, Kritz-Silverstein D, Morton DJ, Wingard DL & Barrett-Connor E. (2003). Sarcopenia in elderly men and women: the Rancho Bernardo study. *Am J Prev Med* **25**, 226-231.
- Clayton DA. (1998). Nuclear-mitochondrial intergenomic communication. *Biofactors* **7**, 203-205.
- Colberg SR. (2007). Physical activity, insulin action, and diabetes prevention and control. *Curr Diabetes Rev* **3**, 176-184.
- Colman RJ, McKiernan SH, Aiken JM & Weindruch R. (2005). Muscle mass loss in Rhesus monkeys: age of onset. *Exp Gerontol* **40**, 573-581.
- Commoner B, Townsend J & Pake GE. (1954). Free radicals in biological materials. *Nature* **174**, 689-691.
- Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL & Rando TA. (2005). Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* **433**, 760-764.
- Connor MK, Bezborodova O, Escobar CP & Hood DA. (2000). Effect of contractile activity on protein turnover in skeletal muscle mitochondrial subfractions. *J Appl Physiol* **88**, 1601-1606.
- Cooper CE, Vollaard NB, Choueiri T & Wilson MT. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* **30**, 280-285.
- Crane JD, Devries MC, Safdar A, Hamadeh MJ & Tarnopolsky MA. The effect of aging on human skeletal muscle mitochondrial and intramyocellular lipid ultrastructure. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **65**, 119-128.

- Crinnion JN, Homer-Vanniasinkam S, Parkin SM & Gough MJ. (1996). Role of neutrophil-endothelial adhesion in skeletal muscle reperfusion injury. *Br J Surg* **83**, 251-254.
- Cross AJ, Slater P, Simpson M, Royston C, Deakin JF, Perry RH & Perry EK. (1987). Sodium dependent D-[3H]aspartate binding in cerebral cortex in patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neurosci Lett* **79**, 213-217.
- Chabi B, Ljubicic V, Menzies KJ, Huang JH, Saleem A & Hood DA. (2008). Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. *Aging Cell* **7**, 2-12.
- Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S, Parmley LF & Downey JM. (1985). Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* **17**, 145-152.
- Chan DC. (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* **125**, 1241-1252.
- Chance B, Sies H & Boveris A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* **59**, 527-605.
- Charge SB, Brack AS & Hughes SM. (2002). Aging-related satellite cell differentiation defect occurs prematurely after Ski-induced muscle hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**, C1228-1241.
- Charge SB & Rudnicki MA. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* **84**, 209-238.
- Charlat MI, O'Neill PG, Egan JM, Abernethy DR, Michael LH, Myers ML, Roberts R & Bolli R. (1987). Evidence for a pathogenetic role of xanthine oxidase in the "stunned" myocardium. *Am J Physiol* **252**, H566-577.

- Davies KJ, Packer L & Brooks GA. (1981). Biochemical adaptation of mitochondria, muscle, and whole-animal respiration to endurance training. *Arch Biochem Biophys* **209**, 539-554.
- Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA & Packer L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* **107**, 1198-1205.
- Dedkov EI, Kostrominova TY, Borisov AB & Carlson BM. (2001). Reparative myogenesis in long-term denervated skeletal muscles of adult rats results in a reduction of the satellite cell population. *Anat Rec* **263**, 139-154.
- Dedkov EI, Kostrominova TY, Borisov AB & Carlson BM. (2003). MyoD and myogenin protein expression in skeletal muscles of senile rats. *Cell Tissue Res* **311**, 401-416.
- Degens H & Alway SE. (2006). Control of muscle size during disuse, disease, and aging. *Int J Sports Med* **27**, 94-99.
- Dillard CJ, Litov RE & Tappel AL. (1978). Effects of dietary vitamin E, selenium, and polyunsaturated fats on in vivo lipid peroxidation in the rat as measured by pentane production. *Lipids* **13**, 396-402.
- Doherty TJ. (2003). Invited review: Aging and sarcopenia. *J Appl Physiol* **95**, 1717-1727.
- Dolphin D. (1988). The generation of radicals during the normal and abnormal functioning of cytochromes P450. In *Oxygen radicals in biology and medicine*, ed. Simic MG, Taylor KA, Ward JF & Sonntag C, pp. 491-500. Ed. Plenum Press., New York.
- Doroshov JH & Davies KJ. (1983). Comparative cardiac oxygen radical metabolism by anthracycline antibiotics, mitoxantrone, bisantrene, 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide, and neocarzinostatin. *Biochem Pharmacol* **32**, 2935-2939.

- Downey JM, Hearse DJ & Yellon DM. (1988). The role of xanthine oxidase during myocardial ischemia in several species including man. *J Mol Cell Cardiol* **20 Suppl 2**, 55-63.
- Duclert A, Piette J & Changeux JP. (1991). Influence of innervation of myogenic factors and acetylcholine receptor alpha-subunit mRNAs. *Neuroreport* **2**, 25-28.
- Dudley GA, Tullson PC & Terjung RL. (1987). Influence of mitochondrial content on the sensitivity of respiratory control. *J Biol Chem* **262**, 9109-9114.
- Dupont-Versteegden EE, McCarter RJ & Katz MS. (1994). Voluntary exercise decreases progression of muscular dystrophy in diaphragm of mdx mice. *J Appl Physiol* **77**, 1736-1741.
- Duthie GG, Robertson JD, Maughan RJ & Morrice PC. (1990). Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. *Arch Biochem Biophys* **282**, 78-83.
- Edmondson DG & Olson EN. (1993). Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. *J Biol Chem* **268**, 755-758.
- Edstrom E & Ulfhake B. (2005). Sarcopenia is not due to lack of regenerative drive in senescent skeletal muscle. *Aging Cell* **4**, 65-77.
- Eftimie R, Brenner HR & Buonanno A. (1991). Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1349-1353.
- Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B & van der Vliet A. (1998). Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* **391**, 393-397.
- Ermak G & Davies KJ. (2002). Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol* **38**, 713-721.

- Evans MJ & Scarpulla RC. (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**, 35-41.
- Evans MJ & Scarpulla RC. (1989). Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *J Biol Chem* **264**, 14361-14368.
- Faulkner JA, Brooks SV & Zerba E. (1995). Muscle atrophy and weakness with aging: contraction-induced injury as an underlying mechanism. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **50 Spec No**, 124-129.
- Fenton HJH. (1894). Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J Chem Soc Trans* **65**, 899-910.
- Fiatarone MA, O'Neill EF, Ryan ND, Clements KM, Solares GR, Nelson ME, Roberts SB, Kehayias JJ, Lipsitz LA & Evans WJ. (1994). Exercise training and nutritional supplementation for physical frailty in very elderly people. *N Engl J Med* **330**, 1769-1775.
- Figueiredo PA, Mota MP, Appell HJ & Duarte JA. (2008). The role of mitochondria in aging of skeletal muscle. *Biogerontology* **9**, 67-84.
- Finck BN & Kelly DP. (2006). PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* **116**, 615-622.
- Floyd ZE, Kilroy G, Wu X & Gimble JM. (2007). Effects of prolyl hydroxylase inhibitors on adipogenesis and hypoxia inducible factor 1 alpha levels under normoxic conditions. *J Cell Biochem* **101**, 1545-1557.
- Forstrom JW, Zakowski JJ & Tappel AL. (1978). Identification of the catalytic site of the rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry* **17**, 2639-2644.
- Foster RE & Estabrook RW. (1993). Is oxygen an essential nutrient? *Annu Rev Nutr* **13**, 383-403.

- Freeman BA & Crapo J. (1982). Biology of disease: Free radicals and tissue injure. *Lab Invest* **47**, 412-426.
- Frei B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *Am J Med* **97**, 5S-13S.
- Freyssenet D, Connor MK, Takahashi M & Hood DA. (1999). Cytochrome c transcriptional activation and mRNA stability during contractile activity in skeletal muscle. *Am J Physiol* **277**, E26-32.
- Fridovich I. (1974). Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **41**, 35-97.
- Fulle S, Protasi F, Di Tano G, Pietrangelo T, Beltramin A, Boncompagni S, Vecchiet L & Fano G. (2004). The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing. *Exp Gerontol* **39**, 17-24.
- Funai K, Parkington JD, Carambula S & Fielding RA. (2006). Age-associated decrease in contraction-induced activation of downstream targets of Akt/mTor signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**, R1080-1086.
- Garcia-Lopez D, Hakkinen K, Cuevas MJ, Lima E, Kauhanen A, Mattila M, Sillanpaa E, Ahtiainen JP, Karavirta L, Almar M & Gonzalez-Gallego J. (2007). Effects of strength and endurance training on antioxidant enzyme gene expression and activity in middle-aged men. *Scand J Med Sci Sports* **17**, 595-604.
- Geng T, Li P, Okutsu M, Yin X, Kwek J, Zhang M & Yan Z. (2009). PGC-1{alpha} plays a functional role in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*.
- Giresi PG, Stevenson EJ, Theilhaber J, Koncarevic A, Parkington J, Fielding RA & Kandarian SC. (2005). Identification of a molecular signature of sarcopenia. *Physiol Genomics* **21**, 253-263.

- Godin DV & Wohaieb SA. (1988). Nutritional deficiency, starvation, and tissue antioxidant status. *Free Radic Biol Med* **5**, 165-176.
- Goglia F, Moreno M & Lanni A. (1999). Action of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target. *FEBS Lett* **452**, 115-120.
- Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Ji LL & Vina J. (2005). Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol* **567**, 113-120.
- Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Romagnoli M, Arduini A, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J & Vina J. (2008). Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr* **87**, 142-149.
- Gomez-Cabrera MC, Pallardo FV, Sastre J, Vina J & Garcia-del-Moral L. (2003). Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France. *Jama* **289**, 2503-2504.
- Gordon JA. (1991). Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol* **201**, 477-482.
- Gordon JW, Rungi AA, Inagaki H & Hood DA. (2001). Effects of contractile activity on mitochondrial transcription factor A expression in skeletal muscle. *J Appl Physiol* **90**, 389-396.
- Goto M, Terada S, Kato M, Katoh M, Yokozeki T, Tabata I & Shimokawa T. (2000). cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats. *Biochem Biophys Res Commun* **274**, 350-354.
- Granger DN, Rutili G & McCord JM. (1981). Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* **81**, 22-29.
- Grant AJ, Jessup W & Dean RT. (1993). Inefficient degradation of oxidized regions of protein molecules. *Free Radic Res Commun* **18**, 259-267.

- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD & Alexander RW. (1994). Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **74**, 1141-1148.
- Grum CM, Ragsdale RA, Ketai LH & Schlafer M. (1986). Absence of xanthine oxidase or xanthine dehydrogenase in the rabbit myocardium. *Biochem Biophys Res Commun* **141**, 1104-1108.
- Guth L & Samaha FJ. (1969). Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp Neurol* **25**, 138-152.
- Gutteridge JMC. (1993). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. In *The place of oxygen free radicals in HIV infections*, ed. Favier A, pp. 133-140. Elsevier Science Ireland.
- Haber F & Weiss J. (1932). Uber die Katalyse des Hydroperoxydes. *Naturweiss* **20**, 948.
- Hacker TA, McKiernan SH, Douglas PS, Wanagat J & Aiken JM. (2006). Age-related changes in cardiac structure and function in Fischer 344 x Brown Norway hybrid rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**, H304-311.
- Hagen TM, Yowe DL, Bartholomew JC, Wehr CM, Do KL, Park JY & Ames BN. (1997). Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3064-3069.
- Halliwell B. (1985). Use of desferrioxamine as a 'probe' for iron-dependent formation of hydroxyl radicals. Evidence for a direct reaction between desferal and the superoxide radical. *Biochem Pharmacol* **34**, 229-233.
- Halliwell B. (1989). Mechanism of action of ibuprofen. In *Ibuprofen - where next?: clinical and pharmacological application of higher dosage*

- schedules*, ed. Hazleman B, pp. 20-23. Royal Society of Medicine, Duxford.
- Halliwell B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* **91**, 14S-22S.
- Halliwell B. (1996). Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochemical Society Transactions* **24**, 1023-1027.
- Halliwell B & Auroma OI. (1991). DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism of action and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* **281**, 9-19.
- Halliwell B & Gutteridge JM. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* **18**, 125-126.
- Halliwell B & Gutteridge JMC. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* **246**, 501-514.
- Handschin C, Chin S, Li P, Liu F, Maratos-Flier E, Lebrasseur NK, Yan Z & Spiegelman BM. (2007). Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals. *J Biol Chem* **282**, 30014-30021.
- Handschin C & Spiegelman BM. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev* **27**, 728-735.
- Harman D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**, 298-300.
- Hayashi T, Hirshman MF, Kurth EJ, Winder WW & Goodyear LJ. (1998). Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes* **47**, 1369-1373.

- Hellsten-Westing Y, Kaijser L, Ekblom B & Sjodin B. (1994). Exchange of purines in human liver and skeletal muscle with short-term exhaustive exercise. *Am J Physiol* **266**, R81-86.
- Hellsten-Westing Y, Norman B, Balsom PD & Sjodin B. (1993). Decreased resting levels of adenine nucleotides in human skeletal muscle after high-intensity training. *J Appl Physiol* **74**, 2523-2528.
- Hellsten-Westing Y, Sollevi A & Sjodin B. (1991). Plasma accumulation of hypoxanthine, uric acid and creatine kinase following exhausting runs of differing durations in man. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **62**, 380-384.
- Hellsten Y. (1994). Xanthine dehydrogenase and purine metabolism in man. With special reference to exercise. *Acta Physiol Scand Suppl* **621**, 1-73.
- Hellsten Y, Frandsen U, Orthenblad N, Sjodin B & Richter EA. (1997). Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation. *J Physiol* **498 (Pt 1)**, 239-248.
- Hellsten Y, Nielsen JJ, Lykkesfeldt J, Bruhn M, Silveira L, Pilegaard H & Bangsbo J. (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**, 353-361.
- Henriksen EJ, Bourey RE, Rodnick KJ, Koranyi L, Permutt MA & Holloszy JO. (1990). Glucose transporter protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscles. *Am J Physiol* **259**, E593-598.
- Hepple RT, Hagen JL, Krause DJ & Jackson CC. (2003). Aerobic power declines with aging in rat skeletal muscles perfused at matched convective O₂ delivery. *J Appl Physiol* **94**, 744-751.
- Herzig RP, Scacco S & Scarpulla RC. (2000). Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial

- respiration through the induction of cytochrome c. *J Biol Chem* **275**, 13134-13141.
- Hickson RC. (1981). Skeletal muscle cytochrome c and myoglobin, endurance, and frequency of training. *J Appl Physiol* **51**, 746-749.
- Hille R & Massey V. (1981). Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase. *J Biol Chem* **256**, 9090-9095.
- Hille R & Nishino T. (1995). Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *Faseb J* **9**, 995-1003.
- Hobbs AE, Srinivasan M, McCaffery JM & Jensen RE. (2001). Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability. *J Cell Biol* **152**, 401-410.
- Hofmann MA, Schiekofer S, Kanitz M, Klevesath MS, Joswig M, Lee V, Morcos M, Tritschler H, Ziegler R, Wahl P, Bierhaus A & Nawroth PP. (1998). Insufficient glycemic control increases nuclear factor-kappa B binding activity in peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* **21**, 1310-1316.
- Hollander J, Fiebig R, Gore M, Bejma J, Ookawara T, Ohno H & Ji LL. (1999). Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific adaptation to endurance training. *Am J Physiol* **277**, R856-862.
- Holloszy JO. (1967). Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* **242**, 2278-2282.
- Holloszy JO. (1998). Longevity of exercising male rats: effect of an antioxidant supplemented diet. *Mech Ageing Dev* **100**, 211-219.

- Holloszy JO & Booth FW. (1976). Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu Rev Physiol* **38**, 273-291.
- Holloszy JO, Oscai LB, Don IJ & Mole PA. (1970). Mitochondrial citric acid cycle and related enzymes: adaptive response to exercise. *Biochem Biophys Res Commun* **40**, 1368-1373.
- Hood DA. (2001). Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* **90**, 1137-1157.
- Hood DA, Adhihetty PJ, Colavecchia M, Gordon JW, Irrcher I, Joseph AM, Lowe ST & Rungi AA. (2003). Mitochondrial biogenesis and the role of the protein import pathway. *Med Sci Sports Exerc* **35**, 86-94.
- Hood DA, Irrcher I, Ljubicic V & Joseph AM. (2006). Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp Biol* **209**, 2265-2275.
- Hood DA, Takahashi M, Connor MK & Freyssenet D. (2000). Assembly of the cellular powerhouse: current issues in muscle mitochondrial biogenesis. *Exerc Sport Sci Rev* **28**, 68-73.
- Hoppeler H. (1986). Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Int J Sports Med* **7**, 187-204.
- Hoppeler H & Fluck M. (2003). Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. *Med Sci Sports Exerc* **35**, 95-104.
- Hopson SB, Lust RM, Sun YS, Zeri RS, Morrison RF, Otaki M & Chitwood WR, Jr. (1995). Allopurinol improves myocardial reperfusion injury in a xanthine oxidase-free model. *J Natl Med Assoc* **87**, 480-484.
- Huo L & Scarpulla RC. (2001). Mitochondrial DNA instability and peri-implantation lethality associated with targeted disruption of nuclear respiratory factor 1 in mice. *Mol Cell Biol* **21**, 644-654.
- Inashima S, Matsunaga S, Yasuda T & Wada M. (2003). Effect of endurance training and acute exercise on sarcoplasmic reticulum function in

- rat fast- and slow-twitch skeletal muscles. *Eur J Appl Physiol* **89**, 142-149.
- Irrcher I, Adhihetty PJ, Joseph AM, Ljubicic V & Hood DA. (2003). Regulation of mitochondrial biogenesis in muscle by endurance exercise. *Sports Med* **33**, 783-793.
- Jackson MJ. (1987). Muscle damage during exercise: possible role of free radicals and protective effect of vitamin E. *Proc Nutr Soc* **46**, 77-80.
- Jackson MJ. (2008). Free radicals generated by contracting muscle: by-products of metabolism or key regulators of muscle function? *Free Radic Biol Med* **44**, 132-141.
- Jackson MJ, Edwards RH & Symons MC. (1985). Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* **847**, 185-190.
- Jacobsson A, Stadler U, Glotzer MA & Kozak LP. (1985). Mitochondrial uncoupling protein from mouse brown fat. Molecular cloning, genetic mapping, and mRNA expression. *J Biol Chem* **260**, 16250-16254.
- Janssen YMW, Van Houten B, Borm PAJ & Mossman BT. (1993). Biology of disease: Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest* **69**, 261-274.
- Jenkins RR. (1988). Free radicals chemistry: Relationship to exercise. *Sport Med* **5**, 156-170.
- Jewett SL, Eddy LJ & Hochstein P. (1989). Is the autoxidation of catecholamines involved in ischemia-reperfusion injury? *Free Radic Biol Med* **6**, 185-188.
- Ji LL. (1995). Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. *Exerc Sport Sci Rev* **23**, 135-166.

- Ji LL. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med* **222**, 283-292.
- Ji LL. (2002). Exercise-induced modulation of antioxidant defense. *Ann N Y Acad Sci* **959**, 82-92.
- Ji LL. (2008). Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radic Biol Med* **44**, 142-152.
- Ji LL & Fu R. (1992). Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J Appl Physiol* **72**, 549-554.
- Ji LL, Fu R & Mitchell EW. (1992). Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol* **73**, 1854-1859.
- Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Steinhafel N & Vina J. (2004). Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. *Faseb J* **18**, 1499-1506.
- Ji LL, Gomez-Cabrera MC & Vina J. (2009). Role of Free Radicals` and Antioxidant Signaling in Skeletal Muscle Health and Pathology. *Infect Disord Drug Targets In Press*.
- Jiang F, Ryan MT, Schlame M, Zhao M, Gu Z, Klingenberg M, Pfanner N & Greenberg ML. (2000). Absence of cardiolipin in the crd1 null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J Biol Chem* **275**, 22387-22394.
- Johnston AP, De Lisio M & Parise G. (2008). Resistance training, sarcopenia, and the mitochondrial theory of aging. *Appl Physiol Nutr Metab* **33**, 191-199.
- Jones OT. (1994). The regulation of superoxide production by the NADPH oxidase of neutrophils and other mammalian cells. *Bioessays* **16**, 919-923.

- Kadambi A & Skalak TC. (2000). Role of leukocytes and tissue-derived oxidants in short-term skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**, H435-443.
- Kang C, O'Moore KM, Dickman JR & Ji LL. (2009). Exercise activation of muscle peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha signaling is redox sensitive. *Free Radic Biol Med* **47**, 1394-1400.
- Kelly DP & Scarpulla RC. (2004). Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* **18**, 357-368.
- Ketterer B. (1986). Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica* **16**, 957-973.
- Khalimonchuk O & Rodel G. (2005). Biogenesis of cytochrome c oxidase. *Mitochondrion* **5**, 363-388.
- Klitgaard H, Mantoni M, Schiaffino S, Ausoni S, Gorza L, Laurent-Winter C, Schnohr P & Saltin B. (1990). Function, morphology and protein expression of ageing skeletal muscle: a cross-sectional study of elderly men with different training backgrounds. *Acta Physiol Scand* **140**, 41-54.
- Korhonen MT, Cristea A, Alen M, Hakkinen K, Sipila S, Mero A, Viitasalo JT, Larsson L & Suominen H. (2006). Aging, muscle fiber type, and contractile function in sprint-trained athletes. *J Appl Physiol* **101**, 906-917.
- Koshkin V & Greenberg ML. (2000). Oxidative phosphorylation in cardiolipin-lacking yeast mitochondria. *Biochem J* **347 Pt 3**, 687-691.
- Kostrominova TY, Macpherson PC, Carlson BM & Goldman D. (2000). Regulation of myogenin protein expression in denervated muscles from young and old rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, R179-188.

- Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, Hofer T, Seo AY, Sullivan R, Jobling WA, Morrow JD, Van Remmen H, Sedivy JM, Yamasoba T, Tanokura M, Weindruch R, Leeuwenburgh C & Prolla TA. (2005). Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* **309**, 481-484.
- Kukidome D, Nishikawa T, Sonoda K, Imoto K, Fujisawa K, Yano M, Motoshima H, Taguchi T, Matsumura T & Araki E. (2006). Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes* **55**, 120-127.
- Lambertucci RH, Levada-Pires AC, Rossoni LV, Curi R & Pithon-Curi TC. (2007). Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats. *Mech Ageing Dev* **128**, 267-275.
- Larsson L. (1982). Physical training effects on muscle morphology in sedentary males at different ages. *Med Sci Sports Exerc* **14**, 203-206.
- Laughlin MH, Simpson T, Sexton WL, Brown OR, Smith JK & Korthuis RJ. (1990). Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training. *J Appl Physiol* **68**, 2337-2343.
- Lawler JM, Powers SK, Visser T, Van Dijk H, Kordus MJ & Ji LL. (1993). Acute exercise and skeletal muscle antioxidant and metabolic enzymes: effects of fiber type and age. *Am J Physiol* **265**, R1344-1350.
- Leary SC, Battersby BJ, Hansford RG & Moyes CD. (1998). Interactions between bioenergetics and mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1365**, 522-530.
- Lee C & Okabe E. (1995). Hydroxyl radical-mediated reduction of Ca(2+)-ATPase activity of masseter muscle sarcoplasmic reticulum. *Jpn J Pharmacol* **67**, 21-28.

- Lee CM, Aspnes LE, Chung SS, Weindruch R & Aiken JM. (1998). Influences of caloric restriction on age-associated skeletal muscle fiber characteristics and mitochondrial changes in rats and mice. *Ann N Y Acad Sci* **854**, 182-191.
- Leeuwenburgh C, Hollander J, Leichtweis S, Griffiths M, Gore M & Ji LL. (1997). Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am J Physiol* **272**, R363-369.
- Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM & Kelly DP. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest* **106**, 847-856.
- Leick L, Wojtaszewski JF, Johansen ST, Kiilerich K, Comes G, Hellsten Y, Hidalgo J & Pilegaard H. (2008). PGC-1alpha is not mandatory for exercise- and training-induced adaptive gene responses in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**, E463-474.
- Lenka N, Vijayarathy C, Mullick J & Avadhani NG. (1998). Structural organization and transcription regulation of nuclear genes encoding the mammalian cytochrome c oxidase complex. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **61**, 309-344.
- Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, Courtois M, Wozniak DF, Sambandam N, Bernal-Mizrachi C, Chen Z, Holloszy JO, Medeiros DM, Schmidt RE, Saffitz JE, Abel ED, Semenkovich CF & Kelly DP. (2005). PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol* **3**, e101.
- Lew H, Pyke S & Quintanilha A. (1985). Changes in the glutathione status of plasma, liver and muscle following exhaustive exercise in rats. *FEBS Lett* **185**, 262-266.
- Lezza AM, Pesce V, Cormio A, Fracasso F, Vecchiet J, Felzani G, Cantatore P & Gadaleta MN. (2001). Increased expression of mitochondrial

transcription factor A and nuclear respiratory factor-1 in skeletal muscle from aged human subjects. *FEBS Lett* **501**, 74-78.

- Li H, Wang J, Wilhelmsson H, Hansson A, Thoren P, Duffy J, Rustin P & Larsson NG. (2000). Genetic modification of survival in tissue-specific knockout mice with mitochondrial cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3467-3472.
- Li ZW, Chu W, Hu Y, Delhase M, Deerinck T, Ellisman M, Johnson R & Karin M. (1999). The IKKbeta subunit of I kappa B kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappa B activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med* **189**, 1839-1845.
- Liang H & Ward WF. (2006). PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ* **30**, 145-151.
- Lin J, Handschin C & Spiegelman BM. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* **1**, 361-370.
- Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R & Spiegelman BM. (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* **418**, 797-801.
- Lin J, Wu PH, Tarr PT, Lindenberg KS, St-Pierre J, Zhang CY, Mootha VK, Jager S, Vianna CR, Reznick RM, Cui L, Manieri M, Donovan MX, Wu Z, Cooper MP, Fan MC, Rohas LM, Zavacki AM, Cinti S, Shulman GI, Lowell BB, Krainc D & Spiegelman BM. (2004). Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell* **119**, 121-135.
- Linder N, Rapola J & Raivio KO. (1999). Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Lab Invest* **79**, 967-974.
- Ljubivic V & Hood DA. (2009a). Diminished contraction-induced intracellular signaling towards mitochondrial biogenesis in aged skeletal muscle. *Aging Cell* **8**, 394-404.

- Ljubicic V & Hood DA. (2009b). Specific attenuation of protein kinase phosphorylation in muscle with a high mitochondrial content. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**, E749-758.
- Lopez-Lluch G, Irusta PM, Navas P & de Cabo R. (2008). Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Exp Gerontol* **43**, 813-819.
- Lopez ME, Van Zeeland NL, Dahl DB, Weindruch R & Aiken JM. (2000). Cellular phenotypes of age-associated skeletal muscle mitochondrial abnormalities in rhesus monkeys. *Mutat Res* **452**, 123-138.
- Lowe DA, Lund T & Alway SE. (1998). Hypertrophy-stimulated myogenic regulatory factor mRNA increases are attenuated in fast muscle of aged quails. *Am J Physiol* **275**, C155-162.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Madsen K, Ertbjerg P, Djurhuus MS & Pedersen PK. (1996). Calcium content and respiratory control index of skeletal muscle mitochondria during exercise and recovery. *Am J Physiol* **271**, E1044-1050.
- Martins C, Robertson MD & Morgan LM. (2008). Effects of exercise and restrained eating behaviour on appetite control. *Proc Nutr Soc* **67**, 28-41.
- Marzetti E, Wohlgemuth SE, Lees HA, Chung HY, Giovannini S & Leeuwenburgh C. (2008). Age-related activation of mitochondrial caspase-independent apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle. *Mech Ageing Dev* **129**, 542-549.
- McArdle A, Edwards RH & Jackson MJ. (1992). Accumulation of calcium by normal and dystrophin-deficient mouse muscle during contractile activity in vitro. *Clin Sci (Lond)* **82**, 455-459.

- McArdle A, Edwards RH & Jackson MJ. (1994). Release of creatine kinase and prostaglandin E2 from regenerating skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol* **76**, 1274-1278.
- McArdle A, Khera G, Edwards RH & Jackson MJ. (1999a). In vivo microdialysis-A technique for analysis of chemical activators of muscle pain. *Muscle Nerve* **22**, 1047-1052.
- McArdle A, van der Meulen JH, Catapano M, Symons MC, Faulkner JA & Jackson MJ. (1999b). Free radical activity following contraction-induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats. *Free Radic Biol Med* **26**, 1085-1091.
- McCord JM & Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase . An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* **244**, 6049-6055.
- McCord JM, Keele BB & Fridovich Y. (1974). An enzyme based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* **41**, 35-97.
- McKelvey TG, Hollwarth ME, Granger DN, Engerson TD, Landler U & Jones HP. (1988). Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney. *Am J Physiol* **254**, G753-760.
- Melov S, Hinerfeld D, Esposito L & Wallace DC. (1997). Multi-organ characterization of mitochondrial genomic rearrangements in ad libitum and caloric restricted mice show striking somatic mitochondrial DNA rearrangements with age. *Nucleic Acids Res* **25**, 974-982.
- Melov S, Lithgow GJ, Fischer DR, Tedesco PM & Johnson TE. (1995). Increased frequency of deletions in the mitochondrial genome with age of *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res* **23**, 1419-1425.

- Melton LJ, 3rd, Khosla S, Crowson CS, O'Connor MK, O'Fallon WM & Riggs BL. (2000). Epidemiology of sarcopenia. *J Am Geriatr Soc* **48**, 625-630.
- Metter EJ, Talbot LA, Schrager M & Conwit R. (2002). Skeletal muscle strength as a predictor of all-cause mortality in healthy men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **57**, B359-365.
- Meydani M, Evans WJ, Handelman G, Biddle L, Fielding RA, Meydani SN, Burrill J, Fiatarone MA, Blumberg JB & Cannon JG. (1993). Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. *Am J Physiol* **264**, R992-998.
- Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, Kelly DP & Spiegelman BM. (2001). Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3820-3825.
- Miquel J, Economos AC, Fleming J & Johnson JE, Jr. (1980). Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* **15**, 575-591.
- Miura S, Tomitsuka E, Kamei Y, Yamazaki T, Kai Y, Tamura M, Kita K, Nishino I & Ezaki O. (2006). Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1alpha leads to muscle atrophy with depletion of ATP. *Am J Pathol* **169**, 1129-1139.
- Morrison PR, Montgomery JA, Wong TS & Booth FW. (1987). Cytochrome c protein-synthesis rates and mRNA contents during atrophy and recovery in skeletal muscle. *Biochem J* **241**, 257-263.
- Mortensen OH, Frandsen L, Schjerling P, Nishimura E & Grunnet N. (2006). PGC-1alpha and PGC-1beta have both similar and distinct effects on myofiber switching toward an oxidative phenotype. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**, E807-816.
- Moyes CD, Battersby BJ & Leary SC. (1998). Regulation of muscle mitochondrial design. *J Exp Biol* **201**, 299-307.

- Moyes CD & Hood DA. (2003). Origins and consequences of mitochondrial variation in vertebrate muscle. *Annu Rev Physiol* **65**, 177-201.
- Moyes CD, Mathieu-Costello OA, Tsuchiya N, Filburn C & Hansford RG. (1997). Mitochondrial biogenesis during cellular differentiation. *Am J Physiol* **272**, C1345-1351.
- Muller-Hocker J. (1990). Cytochrome c oxidase deficient fibres in the limb muscle and diaphragm of man without muscular disease: an age-related alteration. *J Neurol Sci* **100**, 14-21.
- Murakami T, Shimomura Y, Yoshimura A, Sokabe M & Fujitsuka N. (1998). Induction of nuclear respiratory factor-1 expression by an acute bout of exercise in rat muscle. *Biochim Biophys Acta* **1381**, 113-122.
- Musaro A, Cusella De Angelis MG, Germani A, Ciccarelli C, Molinaro M & Zani BM. (1995). Enhanced expression of myogenic regulatory genes in aging skeletal muscle. *Exp Cell Res* **221**, 241-248.
- Mylabathula DB, Rice KM, Wang Z, Uddemarri S, Kinnard RS & Blough ER. (2006). Age-associated changes in MAPK activation in fast- and slow-twitch skeletal muscle of the F344/NNiaHSD X Brown Norway/BiNia rat model. *Exp Gerontol* **41**, 205-214.
- Nakamura A & Goto S. (1996). Analysis of protein carbonyls with 2,4-dinitrophenyl hydrazine and its antibodies by immunoblot in two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of biochemistry* **119**, 768-774.
- Navarro A & Boveris A. (2007). The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C670-686.
- Navarro A, Gomez C, Lopez-Cepero JM & Boveris A. (2004). Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**, R505-511.

- Nelson BD, Luciakova K, Li R & Betina S. (1995). The role of thyroid hormone and promoter diversity in the regulation of nuclear encoded mitochondrial proteins. *Biochim Biophys Acta* **1271**, 85-91.
- Nethery D, Stofan D, Callahan L, DiMarco A & Supinski G. (1999). Formation of reactive oxygen species by the contracting diaphragm is PLA(2) dependent. *J Appl Physiol* **87**, 792-800.
- Newaz MA, Yousefipour Z & Oyekan A. (2006). Oxidative stress-associated vascular aging is xanthine oxidase-dependent but not NAD(P)H oxidase-dependent. *J Cardiovasc Pharmacol* **48**, 88-94.
- Nicotera P, Moore M, Mirabelli F, Bellomo G & Orrenius S. (1985). Inhibition of hepatocyte plasma membrane Ca²⁺-ATPase activity by menadione metabolism and its restoration by thiols. *FEBS Lett* **181**, 149-153.
- Oh-ishi S, Kizaki T, Nagasawa J, Izawa T, Komabayashi T, Nagata N, Suzuki K, Taniguchi N & Ohno H. (1997). Effects of endurance training on superoxide dismutase activity, content and mRNA expression in rat muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **24**, 326-332.
- Oh-ishi S, Toshinai K, Kizaki T, Haga S, Fukuda K, Nagata N & Ohno H. (1996). Effects of aging and/or training on antioxidant enzyme system in diaphragm of mice. *Respir Physiol* **105**, 195-202.
- Okamoto H. (1985). Molecular basis of experimental diabetes degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic b-cells os islets of Langerhans. *Bioassays* **2**, 15-21.
- Orimo S, Hiyamuta E, Arahata K & Sugita H. (1991). Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupivacaine-induced myonecrosis. *Muscle Nerve* **14**, 515-520.
- Orlander J, Kiessling KH, Larsson L, Karlsson J & Aniansson A. (1978). Skeletal muscle metabolism and ultrastructure in relation to age in sedentary men. *Acta Physiol Scand* **104**, 249-261.

- Oscari LB & Holloszy JO. (1971). Biochemical adaptations in muscle. II. Response of mitochondrial adenosine triphosphatase, creatine phosphokinase, and adenylate kinase activities in skeletal muscle to exercise. *J Biol Chem* **246**, 6968-6972.
- Pacifi RE & Davies KJ. (1991). Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free radical theory of aging revised. *Gerontology* **37**, 166-180.
- Papa S, Guerrieri F & Capitanio N. (1997). A possible role of slips in cytochrome c oxidase in the antioxidant defense system of the cell. *Bioscience Reports* **17**, 23-31.
- Paradies G, Petrosillo G & Ruggiero FM. (1997). Cardiolipin-dependent decrease of cytochrome c oxidase activity in heart mitochondria from hypothyroid rats. *Biochim Biophys Acta* **1319**, 5-8.
- Paradies G & Ruggiero FM. (1990). Age-related changes in the activity of the pyruvate carrier and in the lipid composition in rat-heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1016**, 207-212.
- Parkington JD, LeBrasseur NK, Siebert AP & Fielding RA. (2004). Contraction-mediated mTOR, p70S6k, and ERK1/2 phosphorylation in aged skeletal muscle. *J Appl Physiol* **97**, 243-248.
- Pattwell DM, McArdle A, Morgan JE, Patridge TA & Jackson MJ. (2004). Release of reactive oxygen and nitrogen species from contracting skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med* **37**, 1064-1072.
- Paumard P, Vaillier J, Couly B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, Brethes D, di Rago JP & Velours J. (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *Embo J* **21**, 221-230.
- Pedersen BK & Saltin B. (2006). Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scand J Med Sci Sports* **16 Suppl 1**, 3-63.

- Pesce V, Cormio A, Fracasso F, Lezza AM, Cantatore P & Gadaleta MN. (2005). Age-related changes of mitochondrial DNA content and mitochondrial genotypic and phenotypic alterations in rat hind-limb skeletal muscles. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **60**, 715-723.
- Philpot RM. (1991). Characterization of cytochrome P450 in extrahepatic tissues. *Methods Enzymol* **206**, 623-631.
- Piantadosi CA & Suliman HB. (2006). Mitochondrial transcription factor A induction by redox activation of nuclear respiratory factor 1. *J Biol Chem* **281**, 324-333.
- Pilegaard H, Saltin B & Neufer PD. (2003). Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. *J Physiol* **546**, 851-858.
- Pincemail J, Camus G, Roesgen A, Dreezen E, Bertrand Y, Lismonde M, Deby-Dupont G & Deby C. (1990). Exercise induces pentane production and neutrophil activation in humans. Effect of propranolol. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **61**, 319-322.
- Powers SK, Criswell D, Lawler J, Ji LL, Martin D, Herb RA & Dudley G. (1994a). Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* **266**, R375-380.
- Powers SK, Criswell D, Lawler J, Martin D, Ji LL, Herb RA & Dudley G. (1994b). Regional training-induced alterations in diaphragmatic oxidative and antioxidant enzymes. *Respir Physiol* **95**, 227-237.
- Powers SK, Criswell D, Lawler J, Martin D, Lieu FK, Ji LL & Herb RA. (1993). Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. *Am J Physiol* **265**, H2094-2098.
- Pryor WA, Squadrito GL & Friedman M. (1995). A new mechanism for the toxicity of ozone. *Toxicol Lett* **82-83**, 287-293.

- Puigserver P, Adelmant G, Wu Z, Fan M, Xu J, O'Malley B & Spiegelman BM. (1999). Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* **286**, 1368-1371.
- Puigserver P & Spiegelman BM. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* **24**, 78-90.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M & Spiegelman BM. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829-839.
- Putman CT, Kiricsi M, Pearcey J, MacLean IM, Bamford JA, Murdoch GK, Dixon WT & Pette D. (2003). AMPK activation increases uncoupling protein-3 expression and mitochondrial enzyme activities in rat muscle without fibre type transitions. *J Physiol* **551**, 169-178.
- Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N & Ohno H. (1995). Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *J Appl Physiol* **79**, 129-135.
- Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvari M, Nyakas C & Goto S. (1999a). The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* **27**, 69-74.
- Radak Z, Nakamura A, Nakamoto H, Asano K, Ohno H & Goto S. (1998). A period of anaerobic exercise increases the accumulation of reactive carbonyl derivatives in the lungs of rats. *Pflugers Arch* **435**, 439-441.
- Radak Z, Pucsek J, Mecseki S, Csont T & Ferdinandy P. (1999b). Muscle soreness-induced reduction in force generation is accompanied by increased nitric oxide content and DNA damage in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* **26**, 1059-1063.
- Radak Z, Sasvari M, Nyakas C, Taylor AW, Ohno H, Nakamoto H & Goto S. (2000). Regular training modulates the accumulation of reactive

- carbonyl derivatives in mitochondrial and cytosolic fractions of rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* **383**, 114-118.
- Radak Z, Taylor AW, Ohno H & Goto S. (2001). Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev* **7**, 90-107.
- Rajguru SU, Yeargans GS & Seidler NW. (1994). Exercise causes oxidative damage to rat skeletal muscle microsomes while increasing cellular sulfhydryls. *Life Sci* **54**, 149-157.
- Reardon W, Ross RJ, Sweeney MG, Luxon LM, Pembrey ME, Harding AE & Trembath RC. (1992). Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *Lancet* **340**, 1376-1379.
- Reid M, Haak K & Francheck K. (1992). Reactive oxygen in skeletal muscle: I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J Appl Physiol* **73**:1797.
- Reid MB. (2001). Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* **90**, 724-731.
- Reid MB & Durham WJ. (2002). Generation of reactive oxygen and nitrogen species in contracting skeletal muscle: potential impact on aging. *Ann N Y Acad Sci* **959**, 108-116.
- Resnik ER, Herron JM, Lyu SC & Cornfield DN. (2007). Developmental regulation of hypoxia-inducible factor 1 and prolyl-hydroxylases in pulmonary vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 18789-18794.
- Reznick AZ, Witt EH, Silbermann M & Packer L. (1992). The threshold of age in exercise and antioxidants action. In *Free Radicals and Aging*, ed. Emerit I & Chance B, pp. 423-427. Ed. Birkhäuser Verlag., Basel.

- Rickwood R, Wilson MT & Darley-Usmar VM. (1987). Isolation and characteristics of intact mitochondria. In *Mitochondria, a practical approach*, ed. Rickwood R, Wilson MT & Darley-Usmar VM, pp. 1-16. Ed. IRL Press, Ltd. Reino Unido.
- Rifai Z, Welle S, Kamp C & Thornton CA. (1995). Ragged red fibers in normal aging and inflammatory myopathy. *Ann Neurol* **37**, 24-29.
- Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR & Bluher M. (2009). Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8665-8670.
- Rock CL, Jacob RA & Bowen PE. (1996). Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *J Am Diet Assoc* **96**, 693-702; quiz 703-694.
- Rockstein M, Chesky J, Philpott DE, Takahashi A, Johnson JE, Jr. & Miquel J. (1975). An electron microscopic investigation of age-dependent changes in the flight muscle of *Musca domestica* L. *Gerontologia* **21**, 216-223.
- Rodgers JT, Lerin C, Gerhart-Hines Z & Puigserver P. (2008). Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. *FEBS Lett* **582**, 46-53.
- Rodriguez AM, Carrico PM, Mazurkiewicz JE & Melendez JA. (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**, 801-813.
- Rouault TA & Klausner RD. (1996). The impact of oxidative stress on eukaryotic iron metabolism. *EXS* **77**, 183-197.
- Roy DN, Mandal S, Sen G & Biswas T. (2009). Superoxide anion mediated mitochondrial dysfunction leads to hepatocyte apoptosis

preferentially in the periportal region during copper toxicity in rats. *Chem Biol Interact* **182**, 136-147.

Russell AP, Feilchenfeldt J, Schreiber S, Praz M, Crettenand A, Gobelet C, Meier CA, Bell DR, Kralli A, Giacobino JP & Deriaz O. (2003). Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes* **52**, 2874-2881.

Ryan MT & Hoogenraad NJ. (2007). Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem* **76**, 701-722.

Sabourin LA & Rudnicki MA. (2000). The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet* **57**, 16-25.

Sahlin K. (1991). Control of energetic processes in contracting human skeletal muscle. *Biochem Soc Trans* **19**, 353-358.

Sahlin K, Broberg S & Ren JM. (1989). Formation of inosine monophosphate (IMP) in human skeletal muscle during incremental dynamic exercise. *Acta Physiol Scand* **136**, 193-198.

Salminen A & Vihko V. (1983). Lipid peroxidation in exercise myopathy. *Exp Mol Pathol* **38**, 380-388.

Saltin B & Rowell LB. (1980). Functional adaptations to physical activity and inactivity. *Fed Proc* **39**, 1506-1513.

Sastre J, Asensi M, Gasco E, Pallardo FV, Ferrero JA, Furukawa T & Vina J. (1992). Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol* **263**, R992-995.

Sastre J, Diaz-Rubio E, Blanco J & Cifuentes L. (1996). Experimental study of the protective effect of glutathione against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Oncology Reports* **3**, 1149-1152.

- Sawyer DT. (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. In *Oxygen radicals in biology and medicine*, ed. Simic MG, Taylor KA, Ward JF & Sonntag C, pp. 11-20. Ed. Plenum Press., New York.
- Scarpulla RC. (1997). Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. *J Bioenerg Biomembr* **29**, 109-119.
- Scarpulla RC. (2002a). Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1576**, 1-14.
- Scarpulla RC. (2002b). Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* **286**, 81-89.
- Scarpulla RC. (2006). Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem* **97**, 673-683.
- Schardinger F. (1902). *Z Untersuch Genussmittel* **5**, 1113-1121.
- Schmid P, Simmler M, Walter GF & Kleinert R. (1983). Mitochondrial reaction in skeletal muscle to induced activity. *Int J Sports Med* **4**, 116-118.
- Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, Tavernier G, Langin D & Spiegelman BM. (2007). Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab* **6**, 38-54.
- Sen CK, Atalay M & Hanninen O. (1994). Exercise-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency. *J Appl Physiol* **77**, 2177-2187.
- Shigenaga MK, Hagen TM & Ames BN. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 10771-10778.

- Short KR, Bigelow ML, Kahl J, Singh R, Coenen-Schimke J, Raghavakaimal S & Nair KS. (2005). Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 5618-5623.
- Sies H. (1993). Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutation Research* **299**, 183.
- Silva JP, Kohler M, Graff C, Oldfors A, Magnuson MA, Berggren PO & Larsson NG. (2000). Impaired insulin secretion and beta-cell loss in tissue-specific knockout mice with mitochondrial diabetes. *Nat Genet* **26**, 336-340.
- Sjodin B, Hellsten Westing Y & Apple FS. (1990). Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med* **10**, 236-254.
- Skulachev VP. (1996). Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Quat Rev Biophys* **29**, 169-202.
- Slade R, Crissman K, Norwood J & Hatch G. (1993). Comparison of antioxidant substances in brochoalveolar lavage cells and fluid from humans, guinea pigs, and rats. *Exp Lung Res* **19**, 469-484.
- Slater TF. (1984). Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem J* **222**, 1-15.
- Spiegelman BM & Heinrich R. (2004). Biological control through regulated transcriptional coactivators. *Cell* **119**, 157-167.
- St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R & Spiegelman BM. (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* **127**, 397-408.
- Stadman ER. (1992). Protein oxidation and aging. *Science* **257**, 1220-1224.

- Stofan DA, Callahan LA, Di MA, Nethery DE & Supinski GS. (2000). Modulation of release of reactive oxygen species by the contracting diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med* **161**, 891-898.
- Sun XH, Copeland NG, Jenkins NA & Baltimore D. (1991). Id proteins Id1 and Id2 selectively inhibit DNA binding by one class of helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* **11**, 5603-5611.
- Supinski G. (1998). Free radical induced respiratory muscle dysfunction. *Mol Cell Biochem* **179**, 99-110.
- Taivassalo T, Shoubridge EA, Chen J, Kennaway NG, DiMauro S, Arnold DL & Haller RG. (2001). Aerobic conditioning in patients with mitochondrial myopathies: physiological, biochemical, and genetic effects. *Ann Neurol* **50**, 133-141.
- Takahashi M & Hood DA. (1993). Chronic stimulation-induced changes in mitochondria and performance in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* **74**, 934-941.
- Takahashi M & Hood DA. (1996). Protein import into subsarcolemmal and intermyofibrillar skeletal muscle mitochondria. Differential import regulation in distinct subcellular regions. *J Biol Chem* **271**, 27285-27291.
- Tan S, Yokoyama Y, Dickens E, Cash TG, Freeman BA & Parks DA. (1993). Xanthine oxidase activity in the circulation of rats following hemorrhagic shock. *Free Radic Biol Med* **15**, 407-414.
- Tate CA, Helgason T, Hyek MF, McBride RP, Chen M, Richardson MA & Taffet GE. (1996). SERCA2a and mitochondrial cytochrome oxidase expression are increased in hearts of exercise-trained old rats. *Am J Physiol* **271**, H68-72.
- Taylor EB, Lamb JD, Hurst RW, Chesser DG, Ellingson WJ, Greenwood LJ, Porter BB, Herway ST & Winder WW. (2005). Endurance training increases skeletal muscle LKB1 and PGC-1alpha protein abundance:

effects of time and intensity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **289**, E960-968.

Telford WG, King LE & Fraker PJ. (1992). Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. *Cytometry* **13**, 137-143.

Terada LS, Dormish JJ, Shanley PF, Leff JA, Anderson BO & Repine JE. (1992). Circulating xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* **263**, L394-401.

Terada LS, Rubinstein JD, Lesnefsky EJ, Horwitz LD, Leff JA & Repine JE. (1991). Existence and participation of xanthine oxidase in reperfusion injury of ischemic rabbit myocardium. *Am J Physiol* **260**, H805-810.

Terada S, Kawanaka K, Goto M, Shimokawa T & Tabata I. (2005). Effects of high-intensity intermittent swimming on PGC-1alpha protein expression in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* **184**, 59-65.

Thomson DM & Gordon SE. (2006). Impaired overload-induced muscle growth is associated with diminished translational signalling in aged rat fast-twitch skeletal muscle. *J Physiol* **574**, 291-305.

Tolbert NE & Essner E. (1981). Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. *J Cell Biol* **91**, 271s-283s.

Tonkonogi M, Harris B & Sahlin K. (1998). Mitochondrial oxidative function in human saponin-skinned muscle fibres: effects of prolonged exercise. *J Physiol* **510 (Pt 1)**, 279-286.

Tonkonogi M & Sahlin K. (1999). Actively phosphorylating mitochondria are more resistant to lactic acidosis than inactive mitochondria. *Am J Physiol* **277**, C288-293.

Tonkonogi M & Sahlin K. (2002). Physical exercise and mitochondrial function in human skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev* **30**, 129-137.

- Trush MA, Mimnaugh EG & Gram TE. (1982). Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem Pharmacol* **31**, 3335-3346.
- Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S & Monsalve M. (2005). PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* **66**, 562-573.
- Vasiliauskas D, Benetis R, Jasiukeviciene L, Grizas V, Marcinkeviciene J, Navickas R & Leimoniene L. (2007). Exercise training after coronary angioplasty improves cardiorespiratory function. *Scand Cardiovasc J* **41**, 142-148.
- Vina J, Borras C & Miquel J. (2007). Theories of ageing. *IUBMB Life* **59**, 249-254.
- Vina J, Gimeno A, Sastre J, Desco C, Asensi M, Pallardo FV, Cuesta A, Ferrero JA, Terada LS & Repine JE. (2000a). Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB Life* **49**, 539-544.
- Vina J, Gomez-Cabrera MC, Borras C, Froio T, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello VE & Pallardo FV. (2009). Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. *Adv Drug Deliv Rev* **61**, 1369-1374.
- Vina J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV & Sastre J. (2000b). Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* **50**, 271-277.
- Vina JR, Blay P, Ramirez A, Castells A & Vina J. (1990). Inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase decreases amino acid uptake in human keratinocytes in culture. *FEBS Lett* **269**, 86-88.

- Virbasius CA, Virbasius JV & Scarpulla RC. (1993). NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes Dev* **7**, 2431-2445.
- Virbasius JV & Scarpulla RC. (1994). Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1309-1313.
- von Sonntag C. (1994). Radiation chemistry in the 1990s: pressing questions relating to the areas of radiation biology and environmental research. *Int J Radiat Biol* **65**, 19-26.
- Wada M, Inashima S, Yamada T & Matsunaga S. (2003). Endurance training-induced changes in alkali light chain patterns in type IIB fibers of the rat. *J Appl Physiol* **94**, 923-929.
- Waintrub ML, Terada LS, Beehler CJ, Anderson BO, Leff JA & Repine JE. (1990). Xanthine oxidase is increased and contributes to paraquat-induced acute lung injury. *J Appl Physiol* **68**, 1755-1757.
- Walsh B, Tonkonogi M, Malm C, Ekblom B & Sahlin K. (2001). Effect of eccentric exercise on muscle oxidative metabolism in humans. *Med Sci Sports Exerc* **33**, 436-441.
- Walther C, Mobius-Winkler S, Linke A, Bruegel M, Thiery J, Schuler G & Halbrecht R. (2008). Regular exercise training compared with percutaneous intervention leads to a reduction of inflammatory markers and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* **15**, 107-112.
- Wanagat J, Cao Z, Pathare P & Aiken JM. (2001). Mitochondrial DNA deletion mutations colocalize with segmental electron transport system abnormalities, muscle fiber atrophy, fiber splitting, and oxidative damage in sarcopenia. *Faseb J* **15**, 322-332.

- Warburton DE, Nicol CW & Bredin SS. (2006). Health benefits of physical activity: the evidence. *Cmaj* **174**, 801-809.
- Weinbroum A, Nielsen VG, Tan S, Gelman S, Matalon S, Skinner KA, Bradley E, Jr. & Parks DA. (1995). Liver ischemia-reperfusion increases pulmonary permeability in rat: role of circulating xanthine oxidase. *Am J Physiol* **268**, G988-996.
- White MJ & Heckler FR. (1990). Oxygen free radicals and wound healing. *Clin Plast Surg* **17**, 473-484.
- Williams RS. (1995). Cardiac involvement in mitochondrial diseases, and vice versa. *Circulation* **91**, 1266-1268.
- Williams RS, Salmons S, Newsholme EA, Kaufman RE & Mellor J. (1986). Regulation of nuclear and mitochondrial gene expression by contractile activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* **261**, 376-380.
- Willis WT & Jackman MR. (1994). Mitochondrial function during heavy exercise. *Med Sci Sports Exerc* **26**, 1347-1353.
- Witzemann V & Sakmann B. (1991). Differential regulation of MyoD and myogenin mRNA levels by nerve induced muscle activity. *FEBS Lett* **282**, 259-264.
- Wolf SP, Gamer A & Dean RT. (1986). Free radicals, lipids and protein degeneration. *Trends Bioch Sci* **11**, 27-31.
- Wray DW, Uberoi A, Lawrenson L, Bailey DM & Richardson RS. (2009). Oral antioxidants and cardiovascular health in the exercise-trained and untrained elderly: a radically different outcome. *Clin Sci (Lond)* **116**, 433-441.
- Wright DC, Han DH, Garcia-Roves PM, Geiger PC, Jones TE & Holloszy JO. (2007). Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression. *J Biol Chem* **282**, 194-199.

- Wrogemann K & Pena SD. (1976). Mitochondrial calcium overload: A general mechanism for cell-necrosis in muscle diseases. *Lancet* **1**, 672-674.
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC & Spiegelman BM. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115-124.
- Xia Y, Buja LM & McMillin JB. (1998). Activation of the cytochrome c gene by electrical stimulation in neonatal rat cardiac myocytes. Role of NRF-1 and c-Jun. *J Biol Chem* **273**, 12593-12598.
- Xia Y, Buja LM, Scarpulla RC & McMillin JB. (1997). Electrical stimulation of neonatal cardiomyocytes results in the sequential activation of nuclear genes governing mitochondrial proliferation and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11399-11404.
- Yokota Y & Mori S. (2002). Role of Id family proteins in growth control. *J Cell Physiol* **190**, 21-28.
- Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB & Spiegelman BM. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* **413**, 131-138.
- Young A & Skelton DA. (1994). Applied physiology of strength and power in old age. *Int J Sports Med* **15**, 149-151.
- Zerba E, Komorovsky TE & Faulkner JA. (1990). Free radical injury to skeletal muscles of young, adult and old mice. *Am J Physiol* **258**, C429- C435.
- Zimmerman BJ, Parks DA, Grisham MB & Granger DN. (1988). Allopurinol does not enhance antioxidant properties of extracellular fluid. *Am J Physiol* **255**, H202-206.
- Zuo L, Christofi FL, Wright VP, Liu CY, Merola AJ, Berliner LJ & Clanton TL. (2000). Intra- and extracellular measurement of reactive oxygen

species produced during heat stress in diaphragm muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, C1058-1066.