

2015

MARTA PARRA ORENGA

TESIS DOCTORAL



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de Doctorado

Bioquímica Clínico-médica e Inmunología

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN UN  
MODELO ANIMAL DE EJERCICIO FÍSICO:  
ANÁLISIS CITOMÉTRICO EN MITOCONDRIAS  
AISLADAS Y EN LEUCOCITOS**

Doctoranda: Marta Parra Orensa

Director: José Enrique O'Connor Blasco

Octubre 2015







VNIVERSITAT D VALÈNCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de Doctorado Bioquímica Clínico-médica e  
Inmunología

## **TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN UN  
MODELO ANIMAL DE EJERCICIO FÍSICO: ANÁLISIS  
CITOMÉTRICO EN MITOCONDRIAS AISLADAS Y  
EN LEUCOCITOS**

Doctoranda: Marta Parra Orenga

Director: José Enrique O'Connor Blasco

Octubre 2015





**Dr. José Enrique O'Connor Blasco**, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia

### **CERTIFICA**

Que **Dña. Marta Parra Orenga**, Licenciada en Biología por la Universidad de Valencia ha realizado el trabajo de investigación titulado “***Estudio del estrés oxidativo en un modelo animal de ejercicio físico: análisis citométrico en mitocondrias aisladas y en leucocitos***” bajo mi supervisión, para la obtención del grado de Doctor en Biología por la Universidad de Valencia.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Valencia a 30 de Octubre de 2015.

Fdo. Dr. José Enrique O'Connor Blasco



Este trabajo ha sido financiado por el siguiente proyecto:

Modificaciones electrofisiológicas producidas por el ejercicio físico crónico:  
influencia del sistema nervioso cardiaco y del estrés oxidativo mitocondrial,  
Ministerio de Ciencia e Innovación, DEP2007-73234-C03-03



A mis padres,  
A mi familia y amigos,  
A Jose.



*Tu futuro todavía no está escrito ni el de ninguno,  
tu futuro es el que tú mismo te forjas,*

Regreso al futuro



## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a todos aquellos que han contribuido de una forma o de otra a la realización de este trabajo. Dada mi situación laboral, ha sido un gran esfuerzo, pero sin duda alguna, habrá valido la pena.

Empezaré agradeciéndoselo a mi director de Tesis, el Dr. Jose Enrique O'Connor, con el que me inicié hace ya unos añitos en el mundo de la citometría (¡cómo pasa el tiempo!) y que en estos últimos meses me ha dado el tan necesario empujón final.

Agradecer a todos los que me rodearon en el tiempo que se llevaron a cabo los experimentos en el laboratorio de Citómica del CIPF, en especial a Ali y a Lupe, por su innegable ayuda. Fueron muy buenos tiempos en el que aparte de crecer profesionalmente, me permitió crear un vínculo muy estrecho con las chicas, las "seis Loquillas". Me vienen a la memoria miles de recuerdos con cada una de vosotras que como empiece a escribir me quedo sin papel.

A mis compañeros de mi actual trabajo que me han estado animando a pesar de nuestros tormentos y viajes de cada día.

Al personal del laboratorio de citometría de los hospitales Peset, Arnau y La Fe, por la confianza y apoyo recibido.

Mis agradecimientos también a los compañeros del departamento de fisiología por esperarnos siempre con las muestras preparadas.

A las Biolokas, mis compis de carrera, que aunque ya nos vemos poco, el recuerdo de los buenos años que pasamos juntas siempre está reciente.

A mis amigos de Pinedo, a las chicas del *Pisín* y a mis amigos *Russaferos* y *adyacentes*, por el apoyo recibido y a la salud de esas “cerves” que tenemos pendientes.

Dedicárselo en especial a mi gran familia, por su cariño y confianza que siempre me dan. Sobre todo a mis padres, que se han quedado muchos domingos esperándome con el plato en la mesa y los brazos bien abiertos, a mis hermanos y cuñados, a mi tieta, a mis tíos, a mis primas y sus parejas y a la peque de la casa, a los que ya no están y con los que me hubiera encantado compartir esto y a los que están por llegar...*garbancit@...*Y también a mis suegros, cuñados y sobrinos por los constantes ánimos.

Pero sobre todo a mi chico, Jose, por el apoyo diario que me ha dado. Gracias a él la vida se ve de otra manera y estoy segura de que su buena estrella está a la vuelta de la esquina.

A tod@s vosotr@s, ¡gracias por formar parte de mi vida!

# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	19
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>23</b>
<b>1. LA MITOCONDRIA .....</b>	<b>25</b>
1.1 Origen y estructura .....	25
1.2 Cadena de transporte electrónico y fosforilación oxidativa .....	28
1.3 Control de la fosforilación oxidativa .....	36
1.4 Otras funciones mitocondriales .....	40
<b>2. ESTRÉS OXIDATIVO Y MITOCONDRIA .....</b>	<b>43</b>
2.1 Concepto de estrés oxidativo .....	43
2.2 Principales radicales libres .....	46
2.3 Evidencias de un incremento de ROS durante el ejercicio .....	51
2.4 Fuentes de producción de ROS inducida por el ejercicio .....	55
2.4.1 La cadena de transporte de electrones mitocondrial .....	56
2.4.2 Xantina oxidasa .....	63
2.4.3 Neutrófilos y la respuesta inflamatoria .....	63
2.4.4 Otras rutas de producción de ROS .....	64
2.5 Acciones biológicas de los radicales libres derivados del oxígeno durante el ejercicio físico .....	65
2.6 Protección de los antioxidantes contra las ROS durante el ejercicio .....	62
2.6.1 Sistemas antioxidantes endógenos .....	68
2.6.2 Antioxidantes exógenos .....	70
2.6.3 Otras sustancias antioxidantes .....	73
2.7 Adaptaciones del sistema antioxidante al ejercicio físico .....	74

<b>3. LA CITOMETRIA DE FLUJO COMO MÉTODO DE ESTUDIO</b> .....	79
3.1 Análisis del estrés oxidativo por citometría de flujo o por fluorimetría . .....	82
<b>4. ENSAYOS DE CONSUMO DE OXÍGENO, EL ELECTRODO DE OXÍGENO</b> .....	87
 <b>OBJETIVOS</b> .....	91
 <b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>1. ANIMALES DE ESTUDIO Y ENTRENAMIENTO</b> .....	97
1.1. Animales y grupos experimentales.....	97
1.2. Protocolo de entrenamiento físico .....	99
<b>2. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS</b> .....	101
2.1 Preparación de las soluciones de trabajo.....	102
2.2 Aislamiento de mitocondrias de hígado.....	104
2.3 Aislamiento de mitocondrias de corazón y de diafragma.....	105
<b>3. MÉTODOS ANALÍTICOS</b> .....	107
3.1 Determinación de la concentración de proteínas en los homogenados de mitocondrias: método de Lowry.....	107
3.2 Medidas polarigráficas del consumo de oxígeno o respiración mitocondrial .....	109
3.3 Ensayo del potencial de membrana mitocondrial mediante la captación de JC-1.....	111
3.4 Análisis por citometría de flujo de la producción de especies oxidativas.....	112
3.4.1 En mitocondrias aisladas.....	116
3.4.2 En células mononucleares de sangre periférica .....	117
<b>4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	120

<b>RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL .....</b>	<b>120</b>
1. <b>MEDIDAS POLARIGRÁFICAS DEL CONSUMO DE OXÍGENO .....</b>	<b>123</b>
2. <b>ENSAYO DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL MEDIANTE LA CAPTACIÓN DE JC-1.....</b>	<b>130</b>
3. <b>ÁNÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES OXIDANTES.....</b>	<b>133</b>
3.1 <b>En mitocondrias aisladas.....</b>	<b>133</b>
3.1.1 <b>Comparación Basal vs Inducido .....</b>	<b>133</b>
3.1.2 <b>Comparación C vs FO (efecto atropina); C vs. E (efecto del entrenamiento) y E vs. FO (efecto combinando entrenamiento y atropina).....</b>	<b>147</b>
3.1.3 <b>Especificidad del Miocardio: Comparación tejidos Miocardio vs Diafragma vs Hígado .....</b>	<b>155</b>
3.2 <b>En células mononucleares de sangre periférica .....</b>	<b>158</b>
3.2.1 <b>Comparación Basal vs Inducido .....</b>	<b>158</b>
3.2.2 <b>Comparación C vs FO (efecto atropina); C vs. E (efecto del entrenamiento) y E vs. FO (efecto combinando entrenamiento y atropina).....</b>	<b>161</b>
 <b>CONCLUSIONES.....</b>	 <b>165</b>
 <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	 <b>169</b>



# ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ADP: Adenosín difosfato
- ANT: Antimicina A
- ATP: Adenosín trifosfato
- BSA: Albúmina de suero bovino
- C: Control
- CAT: Catalasa
- CMF: Citometría de flujo
- CMN: Células mononucleares sanguíneas
- DAF: Diaminofluoresceína diacetato
- DCF-DA: Diclorofluoresceína Diacetato 2,7
- DHR123: Dihidrorodamina 123
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- E: Entrenado
- EGTA: Ácido etilenglicol tetra acético
- EPR: Resonancia de spin paramagnético
- FAD: Dinucleótido de flavina y adenina
- FCCP: Carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona
- FL1: Fluorescencia 1 (fluorescencia verde)
- FL3: Fluorescencia 3(fluorescencia naranja)
- FMN: Mononucleótido de flavina
- FO: Falso operado
- FS: Forward Scatter (Dispersión frontal)
- GPX: Glutación peroxidasa

GSH: Glutación en su forma reducida

GSSG: Glutación oxidado

HE: Dihidroetidina

HEPES: Ácido [N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2-etano-sulfónico]

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno

IFM: Intensidad de fluorescencia media

JC-1: Yoduro de 5,5',6,6'-tetraclorotetraetilbenzimidazolilcarbocianina

MDA: Malondialdehído

MOPS: Ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NAO: Naranja de 10-N-nonyl acridina

NOR-1: (±)-(E)-Metil-2-[(E)-hidroximino]-5-nitro-6-metoxi-3-hexanamida

NO: Óxido nítrico

O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: Anión superóxido

OH<sup>•</sup>: Radical hidroxilo

OH<sup>-</sup>: Ion hidróxido

P<sub>i</sub>: Fosfato inorgánico

PB: Plumbagina

PBS: Tampón fosfato salino

PMN: Polimorfonucleótidos

pO<sub>2</sub>: Presión parcial de oxígeno

PTPm: Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial

QH: Ubiquinol

RCR: Ratio de control respiratorio

RH123: Rodamina 123

ROS: Especies reactivas del oxígeno

RNS: Especies reactivas del nitrógeno

SOD: Superóxido dismutasa

SS: Side Scatter (Dispersión lateral)

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TNA: Translocasa de nucleótidos de adenina

t-BHP: Tert-butil hidroperóxido

TMRM: Tetrametil rodamina metiléster

VDAC: Canal de aniones dependiente de voltaje

VO<sub>2</sub>máx: Consumo máximo de oxígeno o capacidad aeróbica

XOD: Xantina oxidasa



## **INTRODUCCIÓN GENERAL**



# 1. LA MITOCONDRIA

## 1.1 *Origen y estructura*

Las mitocondrias son los orgánulos más importantes en la supervivencia de las células aeróbicas eucariotas, ya que son los principales productores de ATP, a partir de sustratos energéticos, mediante un proceso conocido como fosforilación oxidativa. Dentro de ellas tienen lugar importantes funciones vitales como pueden ser la biosíntesis de aminoácidos, el ciclo del ácido cítrico, la oxidación de los ácidos grasos además de la ya citada fosforilación oxidativa entre otras <sup>1</sup>.

Su pequeño tamaño refleja su origen evolutivo, el ahora ampliamente aceptado origen endosimbiótico<sup>2</sup>, que plantea que la mitocondria fue originariamente una bacteria, que fue internada por una célula eucariota en los primeros estadios de la evolución. Su tamaño permite que sean observadas al microscopio óptico, aun así no fueron identificadas por primera vez hasta el siglo XIX.

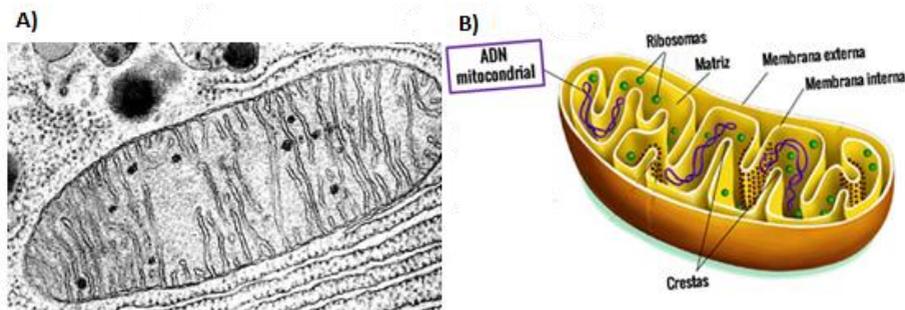
Las mitocondrias existen en una variedad de formas y tamaños pero generalmente son de 1 a 2  $\mu\text{m}$  de longitud y de 0.25 a 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Es importante indicar también que la forma de las mitocondrias es dinámica, produciéndose fenómenos de fisión y fusión apreciables con técnicas de microscopía confocal<sup>3</sup>.

La estructura de la mitocondria está limitada por dos membranas (figura 1), una membrana externa y una interna que define dos compartimentos internos<sup>4</sup>. Estas dos membranas desempeñan un papel crucial en las actividades de las mitocondrias:

- La **membrana mitocondrial externa** es una bicapa lipídica relativamente simple, que contienen estructuras proteicas de transporte llamadas porinas o VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*) que hacen que esta membrana sea permeable a todas las proteínas de peso molecular inferior o igual a 10kDa. Existen otras proteínas en esta membrana que intervienen en la síntesis de lípidos y en la transformación de sustratos lipídicos.
- La **membrana mitocondrial interna** que está organizada en pliegues o **crestas** laminares que incrementan su área superficial. Tiene una composición fosfolipídica inusual que incluye la cardiolipina (difosfatidilglicerol) que es particularmente impermeable a pequeños iones. Contiene proteínas que participan en la oxidación de la cadena respiratoria, la síntesis de ATP y otras proteínas de transporte que regulan el paso de metabolitos hacia la matriz y hacia el exterior manteniendo la homeostasis iónica mitocondrial.

Estas dos membranas definen dos espacios dentro de la mitocondria:

- La **matriz**, que es el espacio que engloba la membrana interna y que contiene ribosomas para la síntesis de proteínas, su propio genoma (ADNmt), las enzimas de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y la mayoría de las enzimas del ciclo de Krebs, así como FAD, NAD, NADP, ADP y ATP.
- El **espacio intermembrana**, que como su propio nombre indica, es el espacio situado entre las dos membranas. Contiene varias enzimas que utilizan el ATP procedente de la matriz para fosforilar otros nucleótidos.

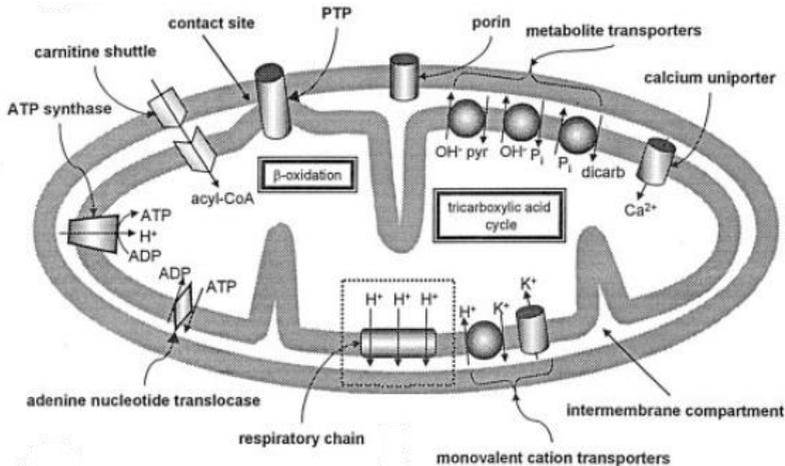


**Figura 1. Representación esquemática de una mitocondria.** Imágenes de una mitocondria por microscopía electrónica A) junto con la estructura de la misma (B). (Fuente: descubrevida.blogspot.com)

Las mitocondrias son muy abundantes en el corazón, por ser un tejido de gran demanda energética, donde constituyen un 20-40% del volumen celular. La producción energética mitocondrial depende de factores genéticos, codificados por el núcleo y por el ADN mitocondrial, que modulan la función mitocondrial normal incluyendo la actividad enzimática y la disponibilidad de cofactores y de factores ambientales, como la disponibilidad de combustibles (ácidos grasos, azúcares y proteínas)<sup>5</sup>.

Diversas vías bioenergéticas interaccionan contribuyendo al metabolismo energético mitocondrial: la oxidación del piruvato, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la beta-oxidación de los ácidos grasos y la vía final común de fosforilación oxidativa, que genera el 80-90% del ATP celular. La fosforilación oxidativa se lleva a cabo a partir de complejos enzimáticos localizados en la membrana mitocondrial interna, que incluyen además de los cuatro complejos de la cadena respiratoria de transporte de electrones, la ATP sintasa y la translocasa de los nucleótidos de adenina (TNA). Los ácidos grasos son el principal sustrato energético para la producción de ATP en el músculo cardíaco a partir de la fosforilación oxidativa. La beta-oxidación de los ácidos grasos y la oxidación de los hidratos de carbono a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos genera la mayor parte del NADH

y del FADH intramitocondriales, que son la fuente directa de electrones para la cadena de transporte electrónico (figura 2).

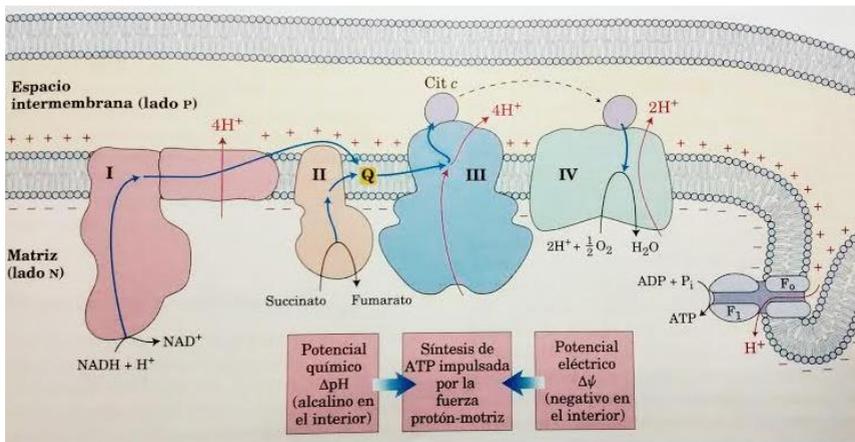


**Figura 2. Vías energéticas mitocondriales y transportadores.** Los complejos enzimáticos de la cadena de transporte electrónico están localizados en la membrana mitocondrial interna, mientras que en el interior de la matriz encontramos los enzimas que participan en las vías de oxidación del piruvato, la beta-oxidación de los ácidos grasos y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. El poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm) asociado con la apoptosis se expone con una de las muchas proteínas descritas: la translocasa de los nucleótidos de adenina (TNA). La vía de transporte de carnitina para el influjo mitocondrial de ácidos grasos, el canal de K<sup>+</sup> y el transportador de Ca<sup>2+</sup> se encuentran localizados en las membranas mitocondriales. (Fuente: Szewczyk<sup>6</sup>)

## 1.2 Cadena de transporte electrónico y fosforilación oxidativa

La mitocondria es el principal lugar de producción de energía química (ATP) en una célula de mamífero en condiciones aeróbicas. Estos orgánulos están especializados en la conversión de energía oxidativa a energía química, mediante el sistema enzimático que configuran la cadena respiratoria (sistema OXPHOS) y la ATP sintasa <sup>7,8</sup>. Este sistema consta de

cinco complejos multiproteicos y dos moléculas<sup>9</sup> que actúan como nexo de unión o lanzadera (coenzima Q o Ubiquinona y Citocromo c), localizados en la membrana mitocondrial interna y organizados según su potencial redox (figura 3). Durante la respiración, los electrones cedidos a la cadena respiratoria por moléculas reductoras producidas durante el metabolismo oxidativo del ciclo de Krebs (NADH y FADH<sub>2</sub>), se transfieren de un complejo a otro adyacente, con potencial redox superior.



**Figura 3. Modelo quimiosmótico.** Esquema del flujo de electrones a través de la cadena respiratoria acoplada a la fosforilación oxidativa: los electrones de NADH se donan al complejo I y los electrones de succinato se donan al complejo II. La ubiquinona acepta los electrones provenientes de ambos complejos y se reduce a ubisemiquinona y ubiquinol. Finalmente, los electrones se transfieren desde el ubiquinol al complejo III, citocromo c y complejo IV para reducir al oxígeno, y tras su unión a protones, formar agua. El flujo electrónico está acompañado de la transferencia de protones a través de la membrana que producen un gradiente químico ( $\Delta\text{pH}$ ) y un gradiente eléctrico ( $\Delta\psi$ ) (ambos gradientes constituyen la fuerza protón-motriz). La membrana mitocondrial interna es impermeable a los protones; éstos sólo pueden volver a penetrar en la matriz a través de canales específicos de protones (F<sub>0</sub>). La fuerza protón-motriz que impulsa el retorno de los protones a la matriz, proporciona la energía para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato y

catalizada por el complejo  $F_1$  asociado con  $F_0$ . (Fuente: Bioquímica. Las bases moleculares de la vida<sup>10</sup>)

Debido a dicha diferencia de potencial redox, la transferencia de electrones va acompañada de liberación de energía. Dicha energía es utilizada por los diferentes complejos para expulsar protones de la matriz al espacio intermembrana y el proceso finaliza con la reducción del oxígeno, y tras su unión a protones, con la formación de agua. De este modo, la matriz mitocondrial se alcaliniza, mientras que el espacio intermembrana y el espacio extramitocondrial se acidifican. A causa de la impermeabilidad de la membrana mitocondrial interna, se crea una diferencia de potencial electroquímico de protones o fuerza protón-motriz. Dicha diferencia tiene, por tanto, dos componentes: uno de concentración ( $\Delta pH$  o diferencia de pH) y otro de carga ( $\Delta p\Psi$  o potencial de membrana).

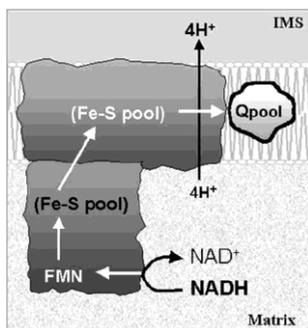
La fuerza protón-motriz es utilizada por la ATP sintasa, que acopla la difusión facilitada de los  $H^+$  a través de la membrana mitocondrial interna a la síntesis de ATP. Este fenómeno denominado **acoplamiento de la fosforilación oxidativa** con la oxidación de sustratos, asegura la coordinación entre las necesidades de ATP y el consumo de sustratos. Este proceso es denominado teoría quimiosmótica, introducida por Peter Mitchell<sup>11</sup> en 1961.

En más detalle, el sistema consta de:

- **Complejo I o NADH-ubiquinona oxidoreductasa o NADH-deshidrogenasa**

Cataliza la transferencia de electrones desde el NADH a la ubiquinona ligado a la translocación de protones. Está formado por al menos 40 subunidades y presenta una estructura con forma de L (figura 4), con un brazo largo embebido en la membrana y otro más corto que se extiende en la matriz mitocondrial. El brazo periférico más corto, que incluye un

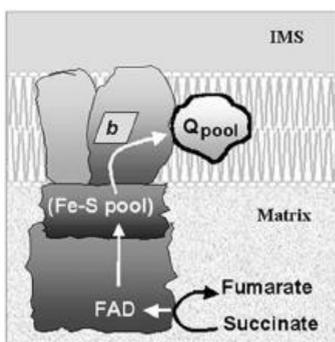
mononucleótido de flavina (FMN) y al menos 4 centros Fe-S, es el que forma la fracción NADH deshidrogenasa y que tiene la capacidad de oxidar el NADH y translocar 4 protones desde la matriz al espacio intermembrana, además de transferir otro protón a la ubiquinona (QH<sub>2</sub>).



**Figura 4. Representación simplificada del complejo I** con los brazos extrínsecos e intrínsecos. La ruta de transferencia de electrones se representa por líneas y flechas. IMS: espacio intermembrana. (Fuente: Barrientos<sup>7</sup>)

- **Complejo II o Succinato-deshidrogenasa**

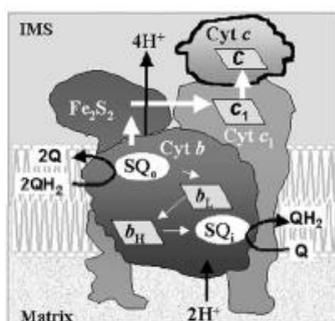
Es un componente del ciclo de Krebs y participa en la cadena de transporte de electrones al transferir electrones del succinato al *pool* de ubiquinona. Posee 4 subunidades: 2 subunidades hacia la matriz (FAD, *Flavin-Adenine Dinucleotide* o dinucleótido de flavina y adenina y varios centros Fe-S) y 2 subunidades integradas en la membrana por un citocromo tipo b (figura 5). Este complejo no transloca protones, solo alimenta de electrones a la cadena de transporte de electrones.



**Figura 5. Representación simplificada del complejo II** mostrando las cuatro subunidades. La ruta de transferencia de electrones se representa por líneas y flechas. IMS: espacio intermembrana. (Fuente: Barrientos<sup>7</sup>)

- **Complejo III o Ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa**

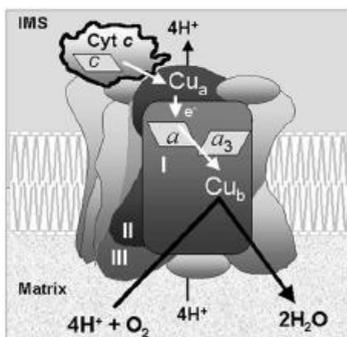
Está formado por tres subunidades catalíticas: citocromo b, citocromo c1 y proteína Fe-S de Rieske y ocho subunidades no catalíticas (figura 6). La enzima cataliza la transferencia de dos electrones desde QH<sub>2</sub> (ubiquinol) a citocromo c, junto al transporte vectorial de protones (H<sup>+</sup>) desde la matriz al espacio intermembrana, por un proceso denominado Ciclo Q. En el primer ciclo, QH<sub>2</sub> del complejo I se une al sitio Q<sub>o</sub> donde transfiere un electrón a la proteína ferro-sulfurada, liberando 2 H<sup>+</sup> al espacio intermembrana y formando la QH (semiquinona). La proteína ferro-sulfurada reduce el cit.c1 y QH transfiere sus electrones al cit.bl, formando Q. El cit.bl reducirá el cit.bh. El Q formado es liberado del sitio Q<sub>o</sub>, y se une al sitio Qi, dónde adquiere el electrón del cit.bh, formándose QH. En el segundo ciclo, otra molécula de QH<sub>2</sub> proveniente del Complejo I, pasa por el proceso anterior, luego 1 electrón reduce la proteína Fe-S y el cit.c1. El otro electrón reduce secuencialmente el cit.bl y el cit.bh. Éste segundo electrón reduce el QH del primer ciclo, formando QH<sub>2</sub>. Los protones consumidos en éste último paso fueron originados de la matriz. La esencia del ciclo Q es que QH<sub>2</sub> pasa por una reoxidación bicíclica en donde QH es un intermediario estable. De esta manera, por cada 2 moléculas de QH<sub>2</sub> que entran al ciclo Q, se regenera 1 QH<sub>2</sub>.



**Figura 6. Representación simplificada del complejo III** mostrando las diferentes subunidades. La ruta de transferencia de electrones se representa por líneas y flechas. IMS: espacio intermembrana. (Fuente: Barrientos<sup>7</sup>)

- **Complejo IV o Citocromo Oxidasa**

Cataliza la transferencia de cuatro electrones desde el citocromo c hasta el oxígeno molecular. Este complejo se localiza en la membrana mitocondrial interna y está formada por 13 subunidades (figura 7). El núcleo catalítico de la enzima consiste en tres subunidades: subunidad II contiene el centro binuclear CuA, que recibe los electrones del citocromo c, subunidad I (hemo a) que acepta los electrones de CuA y los transfiere al centro binuclear formado por hemo  $a_3$  y CuB. En esta última subunidad, el oxígeno molecular se une al grupo hemo  $a_3$  y lo reduce a agua.

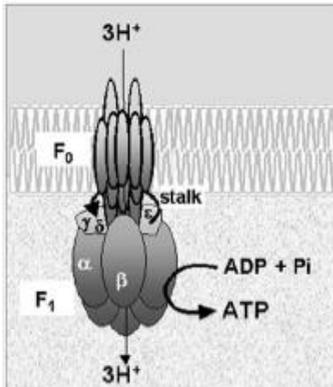


**Figura 7. Representación simplificada del complejo IV** mostrando las tres subunidades que forman el núcleo catalítico de la enzima. La ruta de transferencia de electrones se representa por líneas y flechas. IMS: espacio intermembrana. (Fuente: Barrientos<sup>7</sup>)

- **Complejo V o F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub>-ATP-sintasa**

Es la enzima principal de la síntesis aeróbica de ATP. Está formada por 16 polipéptidos diferentes, cinco de los cuales constituyen el componente catalítico ubicado en la parte extrínseca de la membrana, el F<sub>1</sub> (figura 8). El resto se trata del componente F<sub>0</sub> que consiste en un conjunto de proteínas hidrofóbicas que se encuentran embebidas a la membrana y que catalizan la transferencia vectorial de protones a través de la membrana interna, siendo la dirección dependiente de si la enzima funciona en modo de síntesis de ATP o en modo hidrolítico. Cuatro de las subunidades del componente F<sub>0</sub> forman un tallo que conecta F<sub>1</sub> y F<sub>0</sub>. La ATP sintasa actúa como un motor rotativo. Por tanto, es una enzima funcionalmente reversible ya que a partir

de ADP y Pi puede sintetizar ATP utilizando la fuerza protón motriz generada a través de la membrana interna o puede hidrolizar ATP para bombear protones en contra del gradiente electroquímico.

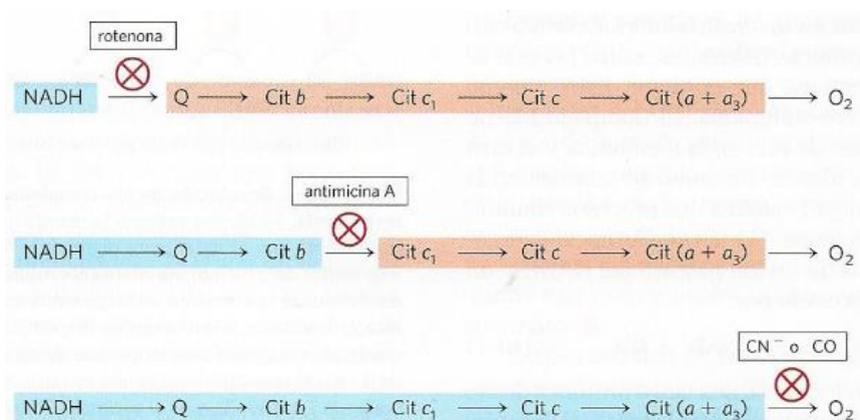


**Figura 8. Representación simplificada del complejo V** mostrando los dos componentes. La ruta de transferencia de electrones se representa por líneas y flechas. IMS: espacio intermembrana. (Fuente: Barrientos<sup>7</sup>)

La ruta seguida por los electrones a través de la cadena de transporte electrónico se conoce, en gran parte, por el uso de inhibidores del transporte electrónico (Figura 9). Algunos de estos **inhibidores**<sup>6,12</sup> son:

- Complejo I: Rotenona (insecticida de origen vegetal) o amital (un fármaco barbitúrico). El uso de estas sustancias genera un déficit o bloqueo que se caracteriza por impedir la oxidación de los sustratos NADH dependiente, como el malato, glutamato o aspartato. Inhiben el flujo electrónico desde los centros Fe-S del Complejo I a la ubiquinona con el consecuente bloqueo del proceso global de la fosforilación oxidativa.
- Complejo II: Malonato, de uso fármaco-químico. El uso de esta sustancia genera un déficit o bloqueo que se caracteriza por una disminución de la oxidación de los sustratos FADH<sub>2</sub> dependiente, como el succinato.

- Complejo III: Antimicina A, un antibiótico de *Streptomyces* que impide la transmisión al citocromo c de electrones procedentes del complejo I o bien de flavoproteínas que contengan FADH<sub>2</sub>.
- Complejo IV: Cianuro, azida sódica y monóxido de carbono, que inhiben la citocromo oxidasa y paralizan toda la cadena de transporte.
- Complejo V: Oligomicina, un antibiótico que bloquea el paso de protones a través del canal protónico de la ATP-sintasa.



**Figura 9. Método para determinar la secuencia de transportadores electrónicos.**

Este método mide el efecto de inhibidores de la transferencia electrónica sobre el estado de oxidación de cada transportador. En presencia de un dador electrónico y O<sub>2</sub>, cada inhibidor da lugar a un patrón característico de transportadores oxidados/reducidos: los anteriores al bloqueo quedan reducidos (azul) mientras que los posteriores al bloqueo quedan oxidados (rojo). (Fuente: Bioquímica. Las bases moleculares de la vida<sup>10</sup>)

### 1.3 *Control de la fosforilación oxidativa*

En condiciones fisiológicas, el transporte electrónico está estrechamente acoplado a la fosforilación: los electrones no fluyen desde las moléculas combustibles hasta el oxígeno, a menos que se necesite sintetizar ATP. La fosforilación oxidativa requiere un suministro de NADH (u otra fuente de electrones de alto potencial), O<sub>2</sub>, ADP y P<sub>i</sub>. El factor más importante a la hora de determinar la velocidad de la fosforilación oxidativa es el nivel de ADP.

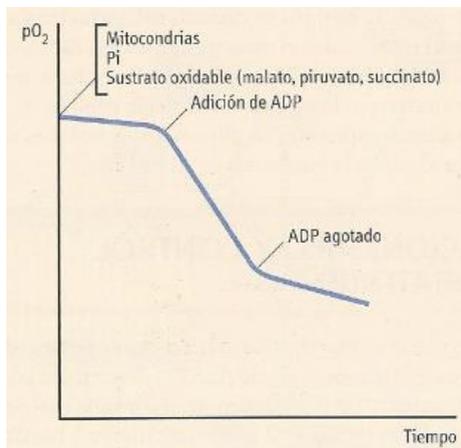
Por tanto, las mitocondrias en reposo, en ausencia de trabajo o consumo de ATP (**estado 4**) consumen oxígeno a una velocidad lenta, pero que puede incrementarse enormemente añadiendo ADP (figura 10). El ADP es captado por las mitocondrias y estimula la ATP-sintasa, que disminuye el gradiente de protones. Entonces aumenta la respiración (**estado 3**), puesto que son estimuladas las bombas de protones para restablecer el gradiente. Cuando se agota el ADP, finaliza la síntesis de ATP y la respiración recupera su velocidad inicial<sup>13</sup>.

La relación entre el estado 3 y 4, denominada **coeficiente de control respiratorio** (RCR, *Respiratory Control Ratio*), es una medida de la fuerza del acoplamiento entre la transferencia electrónica y la fosforilación oxidativa<sup>14,15</sup>.

La relación **P:O** (o moléculas de ATP sintetizadas en relación al consumo de oxígeno en estado 3) es una medida de la eficiencia de la fosforilación oxidativa respecto a la respiración<sup>10,16</sup>. Esta eficiencia no depende únicamente del grado de acoplamiento, sino que también influye la disponibilidad de sustratos y la naturaleza de los mismos. De hecho, sustratos poco energéticos como el succinato, dan lugar a relaciones P:O inferiores que aquellos sustratos que dan lugar a poder reductor en forma de NADH (como glutamato/malato). El succinato genera FADH<sub>2</sub> y éste dona

sus electrones al complejo II que los cede al complejo III directamente, perdiendo la contribución del complejo I al gradiente de protones.

La formación de ATP parece estar fuertemente relacionada con el cociente de acción de masas del ATP ( $[ATP]/[ADP][P_i]$ )<sup>17</sup>. En otras palabras, la ATP sintasa se inhibe por una concentración elevada de su producto (ATP) y se activa cuando las concentraciones de ADP y  $P_i$  son altas. Las cantidades relativas de ATP y de ADP dentro de las mitocondrias están controladas en gran medida por las dos proteínas de transporte de la membrana interna, como ya se han mencionado, el translocador de ADP-ATP (TNA) y transportador de fosfato.



**Figura 10. Efecto del ADP sobre la captación de oxígeno por mitocondrias aisladas mediante un electrodo de oxígeno.** La adición de ADP causa un incremento de la tasa de respiración basal (estado 3). Una vez agotado el ADP añadido e inhibida por tanto la síntesis de ATP, el consumo de oxígeno disminuye (estado 4) ( $pO_2$ =presión parcial de oxígeno). (Fuente: Nelson<sup>18</sup>)

Existen ciertas condiciones y reactivos que desacoplan la oxidación y la fosforilación. Cuando se rompen las mitocondrias intactas mediante tratamiento con detergentes o corte mecánico, los fragmentos membranosos

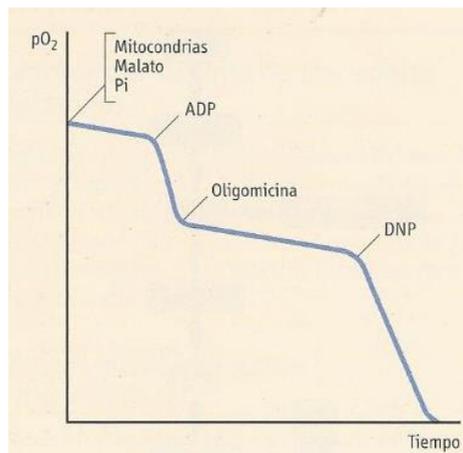
resultantes aún pueden catalizar la transferencia electrónica desde el succinato o el NADH al  $O_2$  pero no hay síntesis de ATP acoplada a esta respiración. Estas preparaciones presentan proporciones de control respiratorio bajas, que indican que se requiere la integridad de la membrana mitocondrial para un acoplamiento ajustado. La capacidad de disociar estos dos procesos, denominada **desacoplamiento**, juega un importante papel en los fenómenos de regulación del metabolismo celular.

El desacoplamiento puede deberse a dos fenómenos: fuga de protones (*proton leak*) o al patinaje de las bombas de protones (*slip*). La fuga de protones se produce como consecuencia de la difusión de protones a través de la membrana mitocondrial interna en forma no asociada a la síntesis de ATP. El patinaje de las bombas de protones hace referencia a la variación de la estequiometría de reacción en los complejos de la cadena respiratoria, lo que provoca la expulsión al espacio intermembrana de un número de protones por electrón inferior al esperable teóricamente. Ambos procesos disminuyen la fuerza protón motriz y con ello la eficiencia de la fosforilación oxidativa<sup>15,19</sup>.

En la figura 11 se ilustra el efecto de los desacopladores e inhibidores del transporte electrónico-fosforilación oxidativa. Después de la adición de ADP, que inicia un estado 3 de rápida velocidad de respiración, se adiciona oligomicina, que es un inhibidor de la secuencia de la fosforilación oxidativa (en realidad de la ATP-sintasa mitocondrial)<sup>20</sup>. Ésta detiene la síntesis de ATP y debido a que el proceso del transporte electrónico y la síntesis de ATP están estrechamente unidos, el transporte electrónico o la respiración se inhiben casi completamente. Después de la inhibición, tanto del consumo de oxígeno como de la síntesis de ATP, la adición de un desacoplador químico de ambos procesos, tal como el 2,4-dinitrofenol (DNP) o el carbonilcianuro-1-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), produce una rápida iniciación del consumo de oxígeno. Estos

desacopladores son ácidos libres con propiedades hidrofóbicas que les permiten difundir fácilmente a través de la membrana mitocondrial. Una vez la forma protonada ha entrado en la matriz mitocondrial puede liberar el protón al encontrar un pH más básico, disipando de este modo el gradiente de protones. Ante una disminución en la fuerza protón motriz no asociada a síntesis de ATP, la actividad de la cadena respiratoria se incrementa para compensar dicha pérdida de gradiente<sup>21</sup>.

La adición de estos compuestos supone el colapso del potencial de membrana, lo que conlleva la aceleración de la cadena respiratoria hasta su capacidad máxima. Dado a la capacidad de estos compuestos de internarse en la membrana mitocondrial interna y afectar así a su estabilidad, un exceso de los mismos puede suponer una inhibición de la actividad de la cadena respiratoria.



**Figura 11. Inhibición y desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en mitocondrias aisladas.** La oligomicina inhibe la captación de oxígeno en las mitocondrias que sintetizan ATP. En las mitocondrias acopladas, la oligomicina inhibe la ATP-sintasa y la captación de oxígeno. Sin embargo, tras la adición de 2,4-dinitrofenol (DNP) se estimula la captación de oxígeno, con lo que se elimina así el gradiente de protones. (Fuente: Nelson<sup>18</sup>)

La regulación de la velocidad de respiración de un tejido por la provisión de un aceptor de fosfato (ADP), es una situación fisiológica normal. Por ejemplo, cuando un músculo realiza ejercicio, el ATP se degrada a ADP y  $P_i$  y la creatina fosfato se convierte en creatina a medida que el enlace de alta energía del fosfato se transfiere al ATP en la reacción de creatina fosfoquinasa. A medida que se acumula el ADP durante la actividad muscular, se activa la respiración o el consumo de oxígeno, y la energía generada de este modo, permite que se vuelvan a rellenar los niveles de ATP y creatina fosfato<sup>10</sup>.

### **1.4 Otras funciones mitocondriales**

Además del papel central en el metabolismo energético dentro de la célula con la síntesis final de ATP, las mitocondrias realizan otras funciones para las que resulta indispensable un **flujo metabólico o intercambio de metabolitos** entre el citosol y la matriz mitocondrial (Ciclo de Krebs,  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, etc.). La membrana mitocondrial interna es una barrera impermeable a la mayoría de estos metabolitos en condiciones fisiológicas normales, lo que permite mantener el gradiente de  $H^+$  necesario para la síntesis de ATP. Sin embargo, bajo condiciones de estrés, se produce la apertura de un complejo dinámico ubicado en los puntos de contacto de la membrana interna y la externa, llamado **poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm)**, que destruye la impermeabilidad de la membrana ya que permite un equilibrio entre los iones de la matriz y del espacio intermembrana mitocondrial, disipando el gradiente de protones y desacoplando la cadena respiratoria<sup>22</sup>. Esto provoca un hinchamiento de la mitocondria debido a una hiperosmolaridad de la matriz con entrada de agua<sup>23</sup>. Como la membrana interna está invaginada en forma de crestas y posee mayor superficie que la membrana externa, al expandirse el volumen de la matriz puede provocar la permeabilidad y/o la ruptura de la membrana

externa<sup>24</sup>, liberando las proteínas del espacio intermembrana mitocondrial que puede provocar diversos efectos cascada.

La mitocondria, también juega un papel activo en el mantenimiento de la **homeostasis del calcio** citosólico<sup>25</sup>. El  $\text{Ca}^{2+}$  entra en la mitocondria a favor de gradiente electroquímico, a través de su transportador en la membrana mitocondrial interna (el “uniporter” de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y sale intercambiándose con  $\text{Na}^+$  a través del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Estos dos sistemas, junto con el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , establecen un transporte cíclico de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana interna de la mitocondria. En condiciones fisiológicas la mitocondria secuestra  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol para que más tarde sea liberado y recaptado por el retículo endoplasmático, existiendo así un continuo intercambio entre ambos orgánulos<sup>26,27</sup>. La acumulación excesiva de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial en determinadas condiciones puede tener un efecto letal para la célula.

Pero entre las funciones más destacadas de la mitocondria se encuentra su papel en los procesos complejos como la apoptosis<sup>3</sup> y la cardioprotección. Una rápida expansión de la literatura también sugiere que las **disfunciones mitocondriales** juegan papeles fundamentales en trastornos neurodegenerativos que van desde la enfermedad del Parkinson hasta la enfermedad de Alzheimer<sup>6</sup>. Además, las mutaciones del ADN, adquiridas o heredadas, causan la alteración del funcionamiento de la cadena respiratoria desarrollando diversas patologías<sup>28,29</sup>. Los defectos en la estructura y función mitocondriales, también se asocian a enfermedades cardiovasculares, como las miocardiopatías hipertrófica y dilatada, defectos en la conducción cardíaca y muerte súbita, miocardiopatías isquémicas y alcohólicas y miocarditis<sup>5</sup>. Debido a la diversidad funcional de las mitocondrias, éstas se encuentran además implicadas en otras patologías como el envejecimiento<sup>30,31</sup> y cáncer<sup>17,33</sup> debido al estado metabólico alterado de las células cancerígenas.

Esto conlleva a la disminución de producción del ATP, formación de radicales libres y alteraciones en el calcio celular. Dichos eventos suponen el inicio de la peroxidación del ADN mitocondrial, proteínas y lípidos y la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, muy vinculado con muerte celular por apoptosis. Las mitocondrias, además, son dianas terapéuticas para drogas como sulfonilureas antidiabéticas, inmunosupresores, algunos agentes antilipémicos, etc.

## 2. ESTRÉS OXIDATIVO Y MITOCONDRIA

### 2.1 *Concepto de estrés oxidativo*

El oxígeno es utilizado por la vasta mayoría de los organismos para extraer energía de moléculas orgánicas debido a las grandes cantidades de energía que pueden generarse, a su amplia disponibilidad y a su facilidad de distribución (en especial en organismos multicelulares). Aproximadamente el 90% del consumo de O<sub>2</sub> se destina a la fosforilación oxidativa. Las enzimas que precisan O<sub>2</sub> para las reacciones de hidroxilación y oxigenación utilizan otra fracción de aproximadamente el 10%. Sin embargo, las ventajas del oxígeno están ligadas a una propiedad peligrosa: el oxígeno puede aceptar electrones individuales para formar derivados inestables que se denominan **especies reactivas de oxígeno** (ROS, *Reactive Oxygen Species*)<sup>34</sup>, que corresponde a una fracción residual de un 1% restante.

La denominación de ROS es un término normalmente utilizado para describir una variedad de moléculas y de radicales libres derivados no solo del oxígeno molecular, sino que incluye otras moléculas que no son radicales libres pero que son reactivas al derivar del oxígeno<sup>35</sup>. Existen además numerosos radicales libres que contienen nitrógeno. Debido a que con frecuencia su síntesis está ligada a la de las ROS, las **especies reactivas de nitrógeno**<sup>36</sup> (RNS, *Reactive Nitrogen Species*) a menudo se clasifican como ROS<sup>10</sup> o incluso con el nombre colectivo junto con las ROS de RONS, el cual incluye tanto a radicales libres como a especies derivadas de radicales libres.

Los **radicales libres** son especies químicas que contienen algún electrón desapareado en su orbital más externo, lo que les confiere un alto poder para reaccionar con otras moléculas cercanas captando o cediendo algún electrón para eliminar ese orbital incompleto. La adquisición de esta forma estable ocurre a expensas de la molécula con la que interacciona, la

cual se queda, a su vez, con una configuración electrónica desestabilizada, convirtiéndose así en una forma reactiva<sup>37,38</sup>. Se nombran convencionalmente con un punto oscuro “•”.

La mayoría de los radicales libres producidos *in vivo* son oxidantes, capaces de oxidar una gama de moléculas biológicas, incluyendo carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos. Como es imposible prevenir la producción *in vivo* de todos los radicales libres, los organismos superiores han desarrollado **sistemas antioxidantes** eficaces a lo largo de la evolución, diferenciándose entre antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos<sup>39,40</sup>. Sin embargo, cuando la capacidad de los mecanismos antioxidantes se ve superada por las agresiones, nos encontramos ante una situación de **estrés oxidativo**<sup>41</sup>. Estos términos se recogen más detallados en la tabla 1.

---

**Tabla 1. Definiciones clave relacionadas con el estrés oxidativo (Fuente: Halliwell<sup>42</sup>)**

---

### **Estrés Oxidativo**

---

En esencia, el término se refiere al desequilibrio entre la producción de especies reactivas y las defensas antioxidantes. Sies<sup>41</sup> la define como la alteración en el balance pro-oxidante-antioxidante en favor de los primeros, lo que lleva a su potencial daño.

El estrés oxidativo puede resultar de una o ambas situaciones:

- 1- Los niveles disminuidos de antioxidantes, por ejemplo, las mutaciones que afectan a las actividades de las enzimas de defensa antioxidante como CuZnSOD o glutatión peroxidasa, o toxinas que destruyen las defensas antioxidantes. Las deficiencias en minerales de la dieta (por ejemplo, Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Se) y / o en antioxidantes también pueden causar estrés oxidativo.
  - 2- Aumento de la producción de especies reactivas, por ejemplo, por la exposición de células u organismos a niveles elevados de O<sub>2</sub> o a otras toxinas que son en sí mismas especies reactivas (por ejemplo, NO<sub>2</sub><sup>•</sup>) o se metabolizan para generar especies reactivas (por ejemplo, paraquat), o la activación excesiva de sistemas "naturales" que producen este tipo de especies (por ejemplo, activación inapropiada de células fagocíticas en enfermedades inflamatorias crónicas).
-

### Daño oxidativo

El término se refiere al daño biomolecular que puede ser causado por el ataque directo de especies reactivas durante el estrés oxidativo.

Entre las consecuencias del estrés oxidativo se pueden incluir:

- 1- Adaptación de la célula u organismo mediante la regulación positiva de los sistemas de defensa, que pueden (a) proteger completamente contra el daño; (b) proteger contra daños en cierta medida, pero no completamente; o (c) sobreproteger, causando resistencias.
- 2- Lesión celular: Esto implica un daño (daño oxidativo) a cualquiera o todos los blancos moleculares: lípidos, ADN, proteínas, carbohidratos, etc. El daño oxidativo también puede ocurrir durante la adaptación (punto 1). No todos los daños causados por el estrés oxidativo provocan daño oxidativo: otros daños a biomoléculas pueden resultar de cambios relacionados con el estrés oxidativo en los niveles de iones (por ejemplo,  $\text{Ca}^{2+}$ ) o activación de las proteasas, por ejemplo.
- 3- La muerte celular: La célula puede (a) recuperarse del daño oxidativo mediante la reparación o sustitución de las moléculas dañadas, o (b) puede sobrevivir con el daño oxidativo persistente o (c) el daño oxidativo, especialmente en el ADN, puede desencadenar la muerte celular, por apoptosis o necrosis.

### Antioxidantes

'Antioxidante' es una palabra ampliamente utilizada pero de modo incorrecto. Para reflejar el hecho de que llamar a algo antioxidante significa poco si no se especifica la metodología de ensayo utilizado, Halliwell<sup>37</sup> definió un antioxidante como cualquier sustancia que, cuando está presente en concentraciones bajas en comparación con las de un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación de dicho sustrato de manera significativa. El término "sustrato oxidable" incluye cada tipo de molécula que se encuentra *in vivo*.

El reconocimiento temprano de que las ROS son capaces de iniciar reacciones de radicales libres dañinas para las células y tejidos, ahora se complementa con el concepto de que tanto el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), son metabolitos cuidadosamente regulados, que desempeñan un papel importante en la comunicación y señalización de los sistemas bioquímicos y genéticos de la célula<sup>43</sup>. Esta regulación redox de la expresión génica y la comunicación intercelular está

empezando a ser entendida como un mecanismo vital en la salud y la enfermedad y es que, en las últimas tres décadas se ha incrementado su interés por el papel que juegan algunos radicales libres derivados del oxígeno, en las enfermedades humanas<sup>12,44</sup>. Además, las ROS desempeñan un papel en las defensas inmunológicas contra la infección, como por ejemplo, la formación de radicales libres por células fagocíticas que permite la muerte de algunas bacterias<sup>44</sup>.

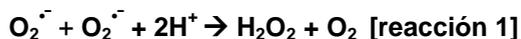
### **2.2 Principales radicales libres**

Algunos de los radicales libres más importantes, tanto basados en el oxígeno como en el nitrógeno, son (tabla 2):

#### **ROS basados en el oxígeno** (figura 12)

**Anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ):** Se genera comúnmente como un intermedio en varias reacciones bioquímicas. El  $O_2^{\cdot-}$  está cargado negativamente y es relativamente impermeable a las membranas celulares. Sin embargo, se ha argumentado que la protonación de superóxido para formar el radical hidropéroxilo ( $HO_2^{\cdot}$ ) se produce a pH fisiológico y que estos radicales  $HO_2^{\cdot}$  pueden cruzar las membranas celulares. En comparación con muchos radicales libres, el anión superóxido tiene un tiempo de vida media relativamente largo que permite la difusión dentro de la célula y, por tanto, el número de dianas celulares sobre las que actuar se incrementa. Muchas células inflamatorias pueden producir cantidades significativas de superóxido en un esfuerzo de protección contra organismos invasores. Aunque este anión se considera que es relativamente no reactivo en comparación con otros radicales, puede reaccionar rápidamente tanto con NO como con grupos ferro-sulfurados de proteínas. El  $O_2^{\cdot-}$  actúa en circunstancias específicas, como oxidante (por ejemplo con el ascorbato) o como reductor (como por ejemplo con el citocromo c) de material biológico. La dismutación del anión superóxido, tanto de manera espontánea como

catalizada por las superóxido dismutasas, ofrece la mayor fuente de peróxido de hidrógeno en las células (reacción 1).



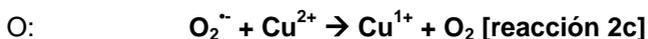
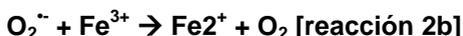
**Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):** El peróxido de hidrógeno no es un radical libre, pero puede desencadenar la formación de radicales libre como el radical hidroxilo OH<sup>•</sup>. El peróxido de oxígeno es estable, pero posee una gran facilidad para difundir a través de las membranas y una vida media relativamente larga. Es un agente oxidante débil pero a altos niveles es citotóxico. Varios sistemas enzimáticos pueden generarlo incluyendo las superóxido dismutasas (SOD) y las oxidasas de aminoácidos. El peróxido de hidrógeno es incapaz de oxidar ADN o lípidos directamente, pero puede inactivar algunas enzimas. La citotoxicidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se debe principalmente a su capacidad para generar radicales hidroxilo a través reacciones catalizadas por metales, tales como la reacción de Fenton (reacción 2).



En biología celular esta reacción es importante como parte de la reacción de Haber-Weiss donde el hierro (o cobre) se mantiene en un estado reducido por el superóxido y por lo tanto, catalizan la formación del radical hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno. La reacción global es:



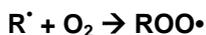
Específicamente, las reacciones celulares implicados son:



**Radical Hidroxilo (OH<sup>•</sup>):** Estos radicales poseen un fuerte potencial oxidante y son altamente reactivos. Los radicales hidroxilos normalmente dañan moléculas cercanas a su sitio de producción. Son las ROS potencialmente más dañinas presentes en materiales biológicos y su reactividad es tal que es prácticamente imposible confirmar su existencia en los organismos vivos tan solo través de la demostración de su presencia por los productos específicos de sus reacciones. De ello se desprende que, debido a su alta reactividad, estos radicales no atraviesan la membrana.

**Oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>):** El oxígeno singlete o singulete, es otra de las ROS que tiene una vida media muy corta, pero tiene gran capacidad de difusión y es permeable a las membranas. El oxígeno singlete es una forma electrónicamente excitada de oxígeno, pero no es un radical, ya que no contiene electrones desapareados. Existe en uno de dos estados: 1) el primer estado excitado (<sup>1</sup>ΔgO<sub>2</sub>); o 2) el segundo estado reactivo más excitado (<sup>2</sup>ΣgO<sub>2</sub>). Esta ROS no tiene ninguna restricción de giro y, por tanto, la capacidad oxidante es relativamente alta. La dismutación del anión superóxido en agua puede conducir a la formación de oxígeno singlete en sistemas biológicos. Actualmente, no se sabe si oxígeno singlete se produce al contraer los músculos esqueléticos durante el ejercicio.

**Radical peroxilo (ROO<sup>•</sup>):** Los radicales peroxilos son probablemente los radicales más abundantes en los sistemas biológicos, no siendo tan reactivos como otras especies de ROS. Se originan a partir de la adición del oxígeno a prácticamente cualquier radical hidrocarbonado. Este radical tiene una vida media relativamente larga (del orden de segundos).



### RNS basados en el nitrógeno

**Óxido nítrico (NO<sup>•</sup>):** El óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) es un gas lipofílico e hidrosoluble que se sintetiza en muchos tipos de células a partir del aminoácido L-arginina. Esta síntesis se produce a través de tres NO sintasas (NOS): (1) la NOS neuronal (NOS1); (2) NOS endotelial (NOS3); y (3) la NOS inducible (NOS2). Cada una de estas NO sintasas convierten la L-arginina en NO y L-citrulina utilizando NADPH.

Juega un papel fundamental en la regulación del flujo sanguíneo local, inhibe la agregación plaquetaria, es un neurotransmisor y se produce por los macrófagos activados contribuyendo a la defensa inmunitaria primaria. Otro efecto reside en su capacidad de reacción con el hierro de proteínas intracelulares, principalmente mitocondriales, siendo inactivadas por él la mayoría de las enzimas que poseen un grupo prostético hemo. Puede reaccionar con ácidos nucleicos dando lugar a mutaciones y roturas del ADN y también puede producir necrosis, entre otros fenómenos. Además, el NO posee una acción antiinflamatoria importante, a la vez que tiene la capacidad de promover la disfunción celular y tisular a través de un efecto proinflamatorio en condiciones de elevada concentración. El óxido nítrico es un agente reductor débil, reacciona con el oxígeno para formar dióxido de nitrógeno y reacciona muy rápidamente con el anión superóxido para producir peroxinitrito.

**Peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>):** La reacción de superóxido con NO para producir peroxinitrito (reacción 3) se produce tres veces más rápido que la dismutación del superóxido para producir peróxido de hidrógeno e incluso más rápido que la reacción de NO con proteínas hemo. De ello se desprende que ésta es la reacción primaria cuando están presentes ambos superóxido y NO. El peroxinitrito (o su forma protonada ONOOH) es un

fuerte agente oxidante que puede conducir a la depleción de los grupos tiol, fragmentación del ADN y nitración de proteínas.

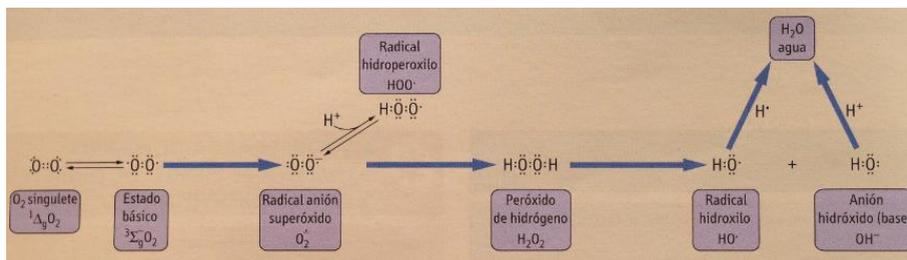


**Hiperclorito:** se forma por la acción de la mieloperoxidasa al utilizar peróxido de hidrógeno (reacción 4). Es común que el hiperclorito se forme por los neutrófilos y puede provocar daños a las biomoléculas por la oxidación de tioles, lípidos, ascorbato, y NADPH con la generación de productos secundarios. Además, cuando se encuentra en la forma ácida (es decir, ácido hipocloroso), éste oxidante puede cruzar las membranas celulares y promover la fragmentación y agregación de proteínas.



Tabla 2. Nomenclatura de las especies reactivas (Fuente: Halliwell<sup>42</sup>)

Especies reactivas del Oxígeno (ROS)	
Radicales	No radicales
Superóxido, $\text{O}_2^{\cdot-}$	Peróxido de Hidrógeno, $\text{H}_2\text{O}_2$
Hidroxilo, $\text{OH}\cdot$	Ácido hipocloroso, HOCl
Peroxilo, $\text{RO}_2\cdot$	Ozono, $\text{O}_3$
Alcoxilo, $\text{RO}\cdot$	Oxígeno singlete, $^1\Delta\text{g}$
Hidroperoxilo, $\text{HO}_2\cdot$	Peroxinitrito, $\text{ONOO}^-$
Especies reactivas del Nitrógeno (RNS)	
Radicales	No radicales
Óxido nítrico, $\text{NO}\cdot$	Nitrosilo, $\text{NO}^+$
Dióxido de nitrógeno, $\text{NO}_2\cdot$	Nitróxido, $\text{NO}^-$
	Ácido nitroso, $\text{HNO}_2$
	Trióxido de dinitrógeno, $\text{N}_2\text{O}_3$
	Tetraóxido de dinitrógeno, $\text{N}_2\text{O}_4$
	Ion nitronio, $\text{NO}_2^+$
	Peroxinitrito, $\text{ONOO}^-$
	Alquil Peroxinitrito, $\text{ROONO}$



**Figura 12. Estructura del oxígeno y de las especies reactivas del oxígeno (ROS).** El oxígeno se muestra en el extremo a la izquierda como la forma incorrecta de dos átomos con doble unión. Esta forma, conocida como oxígeno singlete, existe en cantidad significativa sólo a temperatura elevada o en respuesta a la irradiación. El birradical es la forma básica natural del  $\text{O}_2$  a la temperatura corporal. Las ROS están parcialmente reducidas, las formas reactivas del oxígeno. El primer producto es el anión radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), que está en equilibrio con el ácido débil, radical hidroperoxilo. La reducción del superóxido conduce al hidroperoxido  $\text{O}_2^{-2}$ , en la forma de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  causa una reacción de rotura hemolítica que libera el radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) y el ion hidróxido ( $\text{OH}^-$ ). El agua es el producto final de la reducción completa de  $\text{O}_2$ . (Fuente: Nelson<sup>18</sup>)

### 2.3 Evidencias de un incremento de ROS durante el ejercicio

El beneficio del ejercicio para promover una buena salud y prevenir varias enfermedades es bien conocido. Sin embargo, el ejercicio intenso representa una forma de estrés oxidativo para los organismos<sup>45,46</sup> y por tanto puede alterar el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes. El ejercicio intenso puede provocar alteraciones en el metabolismo muscular influyendo en la función mitocondrial<sup>31,47</sup>. Durante el ejercicio, la producción de ROS se eleva debido a la aceleración de la fosforilación oxidativa, con un aumento del consumo de oxígeno en los tejidos (aumenta entre 10 y 15 veces respecto a niveles de reposo), al descenso de pH a causa de la acumulación de protones y lactato y al aumento de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , provocando fatiga muscular<sup>48</sup>, entre otros efectos. Todos estos factores, además, pueden inducir la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm) lo que puede conducir a la permeabilización de la

membrana mitocondrial externa con la consecuente liberación de factores pro-apoptóticos al citoplasma.

La formación de radicales libres durante el ejercicio ha sido confirmada por numerosos experimentos desde los años 70, siendo el grupo de *Dillard*<sup>49</sup> el primero en demostrar que el ejercicio físico podía conducir a un incremento en la peroxidación lipídica. Observaron un aumento de 1,8 veces en el nivel de pentosas exhaladas (un posible subproducto del daño oxidativo lipídico), tras 60 minutos de ejercicio en bicicleta al 25-75% del  $VO_2$ máx. Desde entonces se han acumulado crecientes evidencias que sostienen la hipótesis de que la actividad física puede aumentar la producción de radicales libres y conducir al estrés oxidativo<sup>50,51</sup>.

El estudio del grupo de *Davis*<sup>45</sup> en 1982 fue el primer intento para establecer una relación causal entre la generación de radicales libres y el daño oxidativo celular en roedores mediante métodos espectroscópicos de resonancia de spin paramagnética (EPR, *Electron Paramagnetic Resonance*). Los resultados del estudio mostraron que las señales de EPR se intensificaron en el homogenado de músculo de rata e hígado tras un ejercicio agudo en cinta de correr hasta el agotamiento.

En condiciones experimentales más controladas, varios estudios han demostrado un aumento de la producción de ROS durante la contracción muscular *in vitro*. Mediante un modelo eléctrico de simulación muscular, el grupo de *Jackson*<sup>52</sup> encontró un incremento del 70 % en señales de EPR de músculos activos en contraposición con músculos en reposo.

Más tarde, un estudio del grupo de *Lovin*<sup>53</sup> demostró que correr en cinta al máximo de la capacidad aumentaba los niveles de malondialdehído (MDA), producto de la peroxidación lipídica, mientras que correr a una intensidad más moderada (70%  $VO_2$  máx) no producía este efecto, y el

correr a baja intensidad (40%  $VO_2$  máx) aún disminuía ese marcador de estrés oxidativo.

Todas estas observaciones han sido confirmadas por otros grupos, incluyendo un estudio del grupo de *Kanter*<sup>54</sup> que demostró que los niveles de pentano expirado aumentaban proporcionalmente con un ejercicio en bicicleta en humanos. No obstante, la validez del uso de hidrocarburos expirados como marcador de peroxidación lipídica *in vivo* todavía necesita ser confirmado. Más tarde, el grupo de *Ashton*<sup>55</sup> mostraba mediante la técnica de ESR junto con la de *spin-trapping* un incremento en la concentración de radicales libres en suero de humanos tras la práctica de ejercicio exhaustivo. Además, demostraron que ésta podía impedirse mediante la suplementación con ácido ascórbico.

En los últimos años, el interés por el estudio de estrés oxidativo vinculado con el ejercicio físico se ha incrementado de manera notable, apareciendo gran cantidad de publicaciones relacionadas sobre todo con la capacidad adaptativa de los sistemas antioxidantes para combatir a estos niveles elevados de ROS<sup>39,56,57,58,59,60,61</sup>, además de la capacidad de adaptación de las propias células musculares<sup>62</sup>.

Medir la producción de radicales libres es difícil, principalmente por la corta vida de estas especies. Ante dicha dificultad, la mayoría de las investigaciones que estudian los efectos del ejercicio sobre el estrés oxidativo se han enfocado en los marcadores de lesión tisular inducido por radicales libres, encontrando señales de daño incrementado en lípidos<sup>49,55</sup>, proteínas<sup>63</sup> y ADN<sup>64</sup>. También han sido estudiados los cambios inducidos por el ejercicio en los niveles de antioxidantes, pero su significación en el estrés oxidativo es difícil de determinar. Mientras que el estrés oxidativo podría causar una primera disminución de los antioxidantes, la movilización de fuentes secundarias de otras partes del cuerpo, podría

resultar en un aparente aumento. Por tanto, el daño de estrés oxidativo durante el ejercicio físico debe determinarse no solo por los niveles de radicales libres generados sino por la capacidad de defensa de los antioxidantes. La relación GSH/GSSG en la sangre ha sido consistentemente demostrada que decrece con el ejercicio<sup>31</sup>, mientras que los niveles plasmáticos de vitamina C y E tienden a incrementarse. Por otra parte, aunque cambios en el estado de oxidación o en la concentración de antioxidantes puedan llegar a deteriorar las defensas antioxidantes, no indican necesariamente daño tisular. No está claro qué causa estos cambios, o en qué medida tienen influencia en el estrés oxidativo.

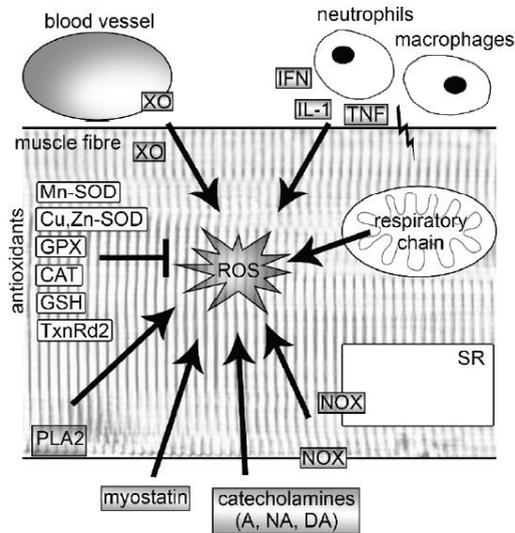
Relacionado con la dificultad de medición de las ROS, parece ser que el mejor método de estudio de las ROS todavía está por esclarecerse. Uno de los métodos de estudio de elección de muchos investigadores se trata de métodos espectroscópicos de resonancia paramagnética de spin (ESR, *electron spin resonance* o EPR, *electron paramagnetic resonance*)<sup>55,65</sup> debido a su alta sensibilidad, especificidad y como método directo. Aun así, son pocos los nuevos trabajos presentados que hacen uso de este método tanto en el ambiente clínico como fisiológico<sup>45,52,55,66,67</sup>. Sin embargo, existen otros métodos de cuantificación de ROS como la quimioluminiscencia<sup>68,69</sup> u otros de mayor precisión como el uso de sondas fluorescentes oxidables por el efecto de determinados radicales libres<sup>70</sup> y que se han visto incrementados durante el ejercicio<sup>31,71,72,73,74</sup>.

En resumen, diversos estudios sugieren de forma convincente de que el ejercicio agotador *in vivo* e *in vitro* en efecto pueden aumentar la producción de ROS en el músculo esquelético<sup>67,75,72,76</sup> y en menor grado de certeza, en el corazón<sup>11,51,59</sup>, hígado<sup>73,78</sup> y diafragma<sup>47,60,79,80</sup>. Sin embargo, los estudios tienen ciertas limitaciones metodológicas y algunas preguntas críticas permanecen por responder. Primero, en algunos estudios de ejercicio *in vivo*<sup>45,81</sup>, la producción de ROS fue medida en homogenados de

tejidos recogidos inmediatamente después del ejercicio, mientras que el ratio real de producción de ROS durante el ejercicio permanece desconocido. Se ha demostrado que la generación de ROS disminuye rápidamente dentro del rango de 1-2 minutos tras el cese de la contracción muscular<sup>82</sup>. Por lo tanto, estos métodos probablemente subestiman la producción real en el tiempo de la formación de ROS durante el ejercicio. Por el contrario, los estudios *in vitro* estiman la producción de ROS en un ambiente artificial y pueden tener una relevancia limitada al ejercicio del cuerpo entero. En segundo lugar, en muchos experimentos citados, el sistema antioxidante celular permaneció intacto. Así, los resultados deben estar influenciados por los cambios en la función antioxidante, como ya se ha mencionado. A todo esto habría que sumarle el uso de diferentes sujetos de estudio, que podría influenciar en los hallazgos de diferentes investigaciones; factores tales como el tipo de entrenamiento<sup>59, 61,79</sup>, el tejido utilizado<sup>51</sup>, la edad<sup>73,81,83,84</sup> y el género también podrían jugar un papel importante. Además, se ha utilizado una amplia variedad de protocolos de ejercicio, pero solamente el ejercicio de alta intensidad o de larga duración parece conducir a un incremento suficientemente grande en la producción de ROS como para sobrepasar las defensas antioxidantes<sup>39,40</sup>.

### **2.4 Fuentes de producción de ROS inducida por el ejercicio**

Las especies reactivas del oxígeno pueden ser producidas durante el ejercicio a partir de varias fuentes celulares potenciales<sup>85,86</sup>. Algunas de estas fuentes son más importantes que otras en ciertos órganos, en un determinado momento o con una modalidad de ejercicio específica. No obstante, estas fuentes no son mutuamente exclusivas y pueden activarse simultáneamente. Un resumen de estas fuentes se recoge en la figura 13.



**Fig. 13. Fuentes de ROS y antioxidantes endógenos en fibras de músculo esquelético.** Después de la práctica de ejercicio, las ROS se producen endógenamente por la mitocondria, NOXs, PLA2 y XO. Además, el ejercicio incrementa también su producción en neutrófilos activados y macrófagos, el endotelio de los vasos sanguíneos y por catecolaminas. El ejercicio regular conlleva también el incremento de antioxidantes endógenos, que son capaces de neutralizar los radicales libres. A, adrenalina; CAT, catalasa; Cu,Zn-SOD, superóxido dismutasa de cobre y zinc; DA, dopamina; GPX, glutatión peroxidasa; GSH, glutatión; IFN, interferón; IL-1, interleuquina 1; Mn-SOD, superóxido dismutasa de manganeso; NA, noradrenalina; NOX, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa; PLA2, fosfolipasa A2; SR, retículo sarcoplásmico; TNF, factor de necrosis tumoral; Txn Rd2, tioredoxina; XO, xantina oxidasa. (Fuente: Steinbacher<sup>86</sup>)

### 2.4.1 La cadena de transporte de electrones mitocondrial

Clásicamente se asocia a la mitocondria como la gran productora de energía del organismo en forma de ATP durante el metabolismo aeróbico, pero también es una fuente importante de producción de ROS durante la transferencia de electrones<sup>36,39,40,51,87,88,89,90,91</sup> jugando un papel muy importante en el envejecimiento y el desarrollo de enfermedades.

La cadena de transporte de electrones mitocondrial, que reduce el  $O_2$  a  $H_2O$ , debe ser una de las fuentes mayoritarias de oxidantes. El complejo I o NADH-uquinona reductasa y el complejo III o citocromo-c ubiquinona reductasa de la cadena de transporte mitocondrial se conocen como los lugares de producción predominantes de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$ . Existen muchos estudios en la literatura encaminados a dilucidar el lugar exacto de la producción del anión superóxido en estos complejos. Todos estos estudios se han realizado con la ayuda de diferentes inhibidores de la cadena de transporte mitocondrial, que según el lugar de inhibición específico en cada complejo, pueden aumentar o no la producción de ROS<sup>90,92</sup>.

Para comprobar estos lugares de generación de ROS, el grupo de *Barja*<sup>12,77</sup> llevó a cabo una serie de experimentos que se resumen en las siguientes afirmaciones: (1) el fuerte incremento de la producción de  $H_2O_2$  en corazón observado después de la adición de antimicina A a la mitocondria suplementada con piruvato/malato indica que el complejo I, III o ambos, deben contener un generador de radical de oxígeno; (2) La producción de  $H_2O_2$  con solo sustratos fue mayor con piruvato/malato que con succinato, lo cual indica que el complejo I está implicado en la generación de radicales de oxígeno ya que la única diferencia en la trayectoria de electrones entre los experimentos con esos dos sustratos es que los electrones fluyen a través de los complejos I con piruvato/malato pero no con succinato; (3) El fuerte aumento de la producción de  $H_2O_2$  provocada por la adición de rotenona con piruvato/malato como sustrato, demuestra inequívocamente que el complejo I genera radicales de oxígeno en las mitocondrias cardíacas funcionales. Esto también se ha observado utilizando otros sustratos del complejo I como glutamato/malato; (4) El alto nivel de producción de  $H_2O_2$  que aún permanece después de la adición de mixotiazol a mitocondrias suplementadas con piruvato/malato y tratadas con

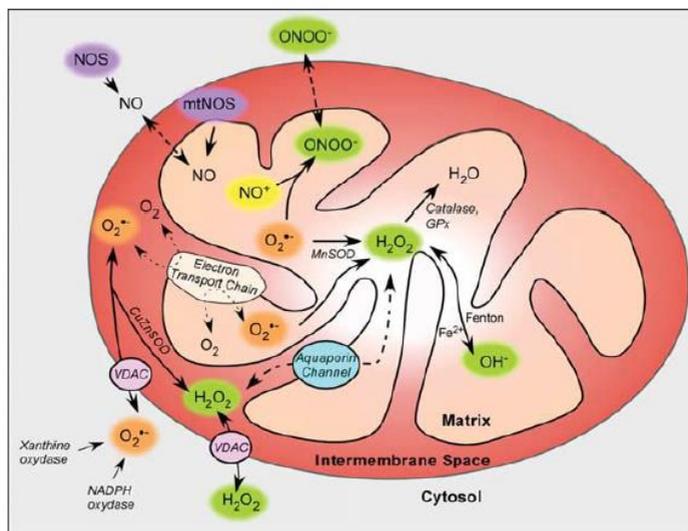
antimicina A; (5) El hecho de que la rotenona aumenta la producción de  $H_2O_2$  de las mitocondrias de corazón de rata con piruvato/malato, pero disminuye con succinato, ha sido encontrado también en otras investigaciones independientes que muestran una vez más que el complejo I participa en la generación de radicales de oxígeno. La disminución inducida por rotenona con succinato como sustrato indica que parte de la generación de radicales de oxígeno de las mitocondrias de corazón de rata se debe al flujo reverso de electrones desde el complejo succinato deshidrogenasa al complejo I.

No obstante, existen estudios adicionales para intentar establecer el lugar exacto y la contribución total de la generación de las ROS en el complejo I como ya se demostró por el grupo de *Turrens*<sup>93,94</sup>. Aunque ciertos investigadores sugieren los grupos ferro-sulfurados como sitios potenciales, otros han propuesto a FMN como el productor de superóxido responsable de la generación de  $H_2O_2$  por las mitocondrias cerebrales<sup>95,96,97</sup>.

Sin embargo, el lugar de producción de anión superóxido en el complejo III de la cadena respiratoria en el centro 'o' del ciclo Q, inhibido por el tratamiento con antimicina A está bien documentado<sup>12,88,98,99,96,100</sup>, que en contraste con el complejo I, la liberación de superóxido se produce al espacio intermembrana<sup>88,97,98,101,102</sup>. Este estudio más profundo ha sido gracias a la resolución de la estructura por rayos X del complejo III<sup>103</sup>.

En este complejo III, la generación de ROS es consecuencia de la transición de dos electrones ( $FADH_2$ ) a la ubiquinona, que se reduce y genera un intermediario reactivo, la semiubiquinona. El escape electrónico al oxígeno molecular en este segmento de la cadena de transporte mitocondrial produce  $O_2^{\cdot-}$  mediante la siguiente reacción:  $UQ^{\cdot-} + O_2 \rightarrow UQ + O_2^{\cdot-}$ . Este  $O_2^{\cdot-}$  se reduce a  $H_2O_2$  por la SOD mitocondrial. Una reacción catalizada por metales conocida como Fenton o la reacción Haber-Weiss

entre el  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  conlleva a la formación de  $OH^{\cdot}$  (reacción 1 y 2 del apartado anterior). Además, el peróxido de oxígeno también puede ser reducido a agua por las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa (figura 14)



**Fig. 14. Localización esquemática de la formación de ROS y RNS en mitocondrias.** Esquema del concepto de estrés oxidativo, con las relaciones entre las principales especies oxidantes y las defensas antioxidantes dentro de la mitocondria. (Fuente: Cottet<sup>104</sup>)

En uno de los estudios citados<sup>97</sup> sobre el lugar de producción de anión superóxido por el complejo III, se observó que el lugar desde donde se cede el electrón al oxígeno es el sitio de oxidación del ubiquinol llamado  $Q_0$  y que está situado en el lado del espacio intermembrana y alejado de la cara de la matriz. Además este trabajo ha demostrado que el complejo III produce anión superóxido a ambos lados de la membrana mitocondrial interna, si bien no queda claro como el anión superóxido se puede generar en la matriz, si el lugar  $Q_0$  está en la cara del espacio intermembrana. Los autores de este artículo plantean diferentes hipótesis para resolver el problema. La primera de ellas postula que una semiquinona sin carga podría

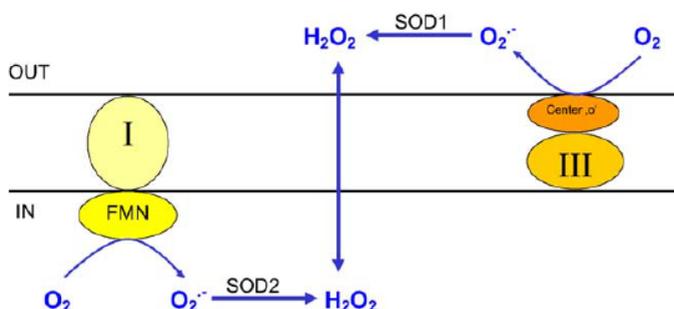
escapar del sitio  $Q_o$  a través de un túnel hidrofóbico que la dejaría en medio de la membrana mitocondrial interna. A partir de aquí, la semiquinona podría difundir a ambos lados de la membrana. En la interfase líquido/acuosa la semiquinona perdería su protón y reaccionaría con el oxígeno formando el anión superóxido. La segunda hipótesis postula que el oxígeno reacciona con la semiquinona sin carga en la parte hidrofóbica del sitio  $Q_o$ , para dar lugar a la forma protonada del anión superóxido ( $HO_2^{\cdot}$ ). Esta especie protonada se puede formar en ambientes no acuosos, mientras que la no protonada no se puede formar y además la especie protonada puede atravesar fácilmente las membranas mientras que la no protonada no puede. Desde el sitio  $Q_o$  el  $HO_2^{\cdot}$  podría difundir a través del túnel hidrofóbico al medio de la membrana mitocondrial interna y a partir de aquí difundir a ambas caras de ella.

Un mecanismo alternativo<sup>90</sup> muestra al complejo III como el lugar clave de producción de ROS no solo en el centro  $Q_o$  orientado hacia el espacio intermembrana sino otro centro, el  $Q_i$  ubicado en la membrana interior y enfrentado a la matriz mitocondrial. Por tanto, el anión superóxido producido en centro  $Q_o$  es liberado al espacio intermembrana, mientras que generado en el centro  $Q_i$  entraría en la matriz mitocondrial. La antimicina A inhibe el complejo III actuando sobre el centro  $Q_i$  e incrementa la generación de anión superóxido desde el centro  $Q_o$ , dirigiendo oxidantes fuera de las defensas antioxidantes de la matriz.

Un estudio anterior también apoya la hipótesis a favor de la noción del espacio intermembrana como una fuente de difusión de  $H_2O_2$  desde la mitocondria<sup>88</sup>, estudiada gracias al efecto de varios inhibidores de la cadena de transporte de electrones como la antimicina o el mixotiazol. Se ha visto que los lugares de producción del  $H_2O_2$  son tanto la matriz mitocondrial como el espacio intermembrana. El primer factor que lo demuestra está basado en experimentos de fraccionamiento e indica que la glutatión

peroxidasa clásica se ha encontrado únicamente en la matriz mitocondrial, mientras que la hidropéroxido glutatión peroxidasa fosfolípida se cree que se encuentra localizada en la membrana interna y en las uniones de contacto entre la membrana interna y externa. El segundo factor indica que debido a la topología de la membrana mitocondrial, el  $H_2O_2$  generado en la matriz tiene una probabilidad más baja de alcanzar el citoplasma que el  $H_2O_2$  producido en el espacio intermembrana. La membrana interna mitocondrial actúa como barrera disminuyendo la difusión del  $H_2O_2$  aumentando así la eficiencia de la glutatión peroxidasa. Debido a que el espacio intermembrana carece de barreras que limiten la difusión de  $H_2O_2$  y contiene una actividad peroxidasa GSH-dependiente baja, el  $H_2O_2$  generado en este espacio, probablemente, se difunde rápidamente en el citoplasma.

La producción de anión superóxido producido a ambos lados de la membrana interna mitocondrial también ha sido estudiado evaluando los efectos de la adición de SOD sobre la generación de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas<sup>88,98</sup> (figura 15).



**Figura. 15. Representación esquemática del flujo de ROS en la membrana interna mitocondrial.** El anión superóxido  $O_2^{\cdot-}$  se genera en el núcleo FMN del complejo respiratorio I de la matriz mitocondrial y en el centro "o" del complejo respiratorio III en contacto con el espacio intermembrana. El anión superóxido de la matriz mitocondrial es dismutado fácilmente a  $H_2O_2$  mediante la SOD2 (que contiene Mn) y el del espacio intermembrana por la SOD1 (que contienen Cu,Zn) OUT: espacio intermembrana, IN: matriz. (Fuente: Kudin<sup>98</sup>)

Ahora bien, nuevos hallazgos también identifican a la flavina (*site II<sub>F</sub>*) del complejo II (succinato deshidrogenasa)<sup>36</sup> como una fuente importante de la producción de superóxido durante la oxidación de la palmito-carnitina, el mayor sustrato de la  $\beta$ -oxidación<sup>92</sup>.

Mediante el uso de mitocondrias aisladas, la contribución de cada sitio de la producción total de  $H_2O_2$  ha sido recientemente cuantificada y comprobada que depende en gran medida del sustrato que se oxida<sup>105</sup>.

Se ha observado en mitocondrias aisladas, que producen  $H_2O_2$  a determinados ratios según el estado metabólico. Por tanto, parece ser que el generador mitocondrial de  $H_2O_2$  es un miembro de la cadena respiratoria o en equilibrio con él, ya que la producción  $H_2O_2$  es máxima en los estados altamente reducidos, tales como en el estado de 4 (en ausencia del aceptor ADP) o en presencia de antimicina A, y mínima en los estados oxidados, como en los Estados 3<sup>12,51,99,106</sup>.

La concentración de las ROS en la matriz mitocondrial debe ser calculada considerando su producción por la mitocondria, su difusión hacia el espacio citosólico y/o matriz mitocondrial y su reducción por enzimas intramitocondriales. Por ejemplo, a pesar de la alta permeabilidad  $H_2O_2$ , se forman gradientes a través de las membranas ya que, su consumo rápido vía las enzimas glutatión peroxidasa y catalasa proporciona la fuerza impulsora para la creación de dicho gradiente.

La hipótesis de que la mitocondria es la fuente primaria de la producción de ROS durante el ejercicio se ratifica por datos indirectos que muestran principalmente daño oxidativo mitocondrial.

### 2.4.2 Xantina oxidasa

La enzima xantina oxidasa (XO) es conocida como una de las mayores fuentes de producción de radicales libres en los procesos de isquemia-reperusión<sup>50,51,107,108</sup>.

El ejercicio intenso está asociado con una hipoxia tisular transitoria en varios órganos (ej. riñones, región esplácnica), ya que la sangre es desviada para cubrir la demanda aumentada de sangre de los músculos esqueléticos activos y la piel. Además de esto, durante el ejercicio realizado a intensidades muy altas, las fibras musculares pueden sufrir hipoxias relativas, ya que el aporte de oxígeno no puede satisfacer los requerimientos de energía. Al término del ejercicio, ocurre la re-oxigenación de estos tejidos, la cual puede estar asociada con la formación de ROS. Una manera en la cual la reperusión podría conducir a un incremento en la producción de ROS es a través de la conversión de la xantina deshidrogenasa (XDH) en xantina oxidasa (XOD). Tanto la XDH como la XOD catalizan la degradación de la hipoxantina (HX) en xantina (X), y subsecuentemente en urato. Sin embargo, sólo XOD produce  $O_2^{\cdot-}$  en el último paso de esta reacción.

### 2.4.3 Neutrófilos y la respuesta inflamatoria

Los polimorfonucleótidos (PMN) son células sanguíneas que juegan un papel importante en la defensa de los tejidos contra una invasión vírica y bacteriana. La activación de estos PMN comienza con un daño muscular o de tejidos blandos. En una fase de respuesta aguda, los PMN migran al lugar afectado atraídos por factores quimiotáctiles producidos por las células dañadas y liberan dos factores primarios durante la fagocitosis, lisozimas y  $O_2^{\cdot-}$ . Los lisozimas facilitan la rotura de proteínas dañadas y restos celulares, mientras que  $O_2^{\cdot-}$  es producido por mieloperoxidasas y la enzima NADPH oxidasa mediante la siguiente ecuación:



La enzima SOD citoplasmática convierte el  $\text{O}_2^{\cdot -}$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  que más tarde es convertido en  $\text{OH}^{\cdot}$  por metales iónicos o en ácido hidrociorhídrico (HOCl). Aunque esta respuesta inflamatoria se considera crítica por eliminar proteínas dañadas e impedir una infección viral o bacteriana, las ROS y otros oxidantes liberados por los neutrófilos pueden también causar problemas secundarios como la peroxidación lipídica<sup>107</sup>.

El ejercicio intenso puede producir un daño muscular acompañado de una respuesta inflamatoria, caracterizada por un incremento en las actividades enzimáticas lisosomales y proteasas en el músculo ejercitado<sup>39</sup>. Además, los biomarcadores de las respuestas inflamatorias a menudo coinciden con aumentos de las actividades enzimáticas antioxidantes como la GPX y la catalasa.

### 2.4.4 Otras rutas de producción de ROS

Los niveles de catecolaminas circulantes aumentan durante el ejercicio prolongado. Las catecolaminas incrementan el metabolismo oxidativo del músculo esquelético y del miocardio mediante la activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, incrementado así potencialmente la producción de ROS en la mitocondria. Además, la autooxidación de la epinefrina a adenocromo (producto de la oxidación de la adrenalina) se asocia con la formación de  $\text{O}_2^{\cdot -}$  que es considerada como una posible fuente de ROS en los procesos de isquemia-reperfusión cardíaca.

Los peroxisomas son orgánulos celulares involucrados en la oxidación de ácidos grasos y D-aminoácidos fuera de la mitocondria. Bajo condiciones fisiológicas, los peroxisomas contribuyen a la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pero no de  $\text{O}_2^{\cdot -}$ <sup>109</sup>. Debido a que los ácidos grasos son los sustratos primarios de energía para el miocardio y el músculo esquelético durante el

ejercicio prolongado, los peroxisomas pueden ser lugares potenciales para la producción de ROS.

En condiciones fisiológicas, los microsomas hepáticos generan radicales libres mediante el sistema citocromo P450<sup>110</sup>. NADPH es oxidado dando lugar a  $O_2^{\cdot-}$ , que puede ser dismutado a  $H_2O_2$ <sup>109</sup>. El ratio de producción de  $H_2O_2$  aumenta a elevados niveles de consumo de oxígeno en los microsomas.

La hemoglobina y la mioglobina tienen la habilidad de generar ROS y aumentar la actividad de las ROS generadas a partir de otras rutas<sup>50</sup>. La autooxidación de la oxihemoglobina y oximioglobina conllevan a la formación de superóxido y consecuentemente a la de peróxidos.

### ***2.5 Acciones biológicas de los radicales libres derivados del oxígeno durante el ejercicio físico***

#### **Peroxidación lipídica y ejercicio físico**

En el ejercicio físico, los estudios disponibles indican que hay un aumento de peroxidación lipídica tanto cuando se realiza ejercicio aeróbico como cuando éste es anaeróbico<sup>73,111</sup>. Cuando los ácidos grasos poliinsaturados de las biomembranas son atacados por radicales libres en presencia de oxígeno molecular, una cadena de reacciones peroxidativas tienen lugar, llevando eventualmente a la formación de gases hidrocarburo (pentano y etano) y de aldehídos (malondialdehído, MDA o sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)). Los bioproductos de esta peroxidación lipídica son los marcadores de daño oxidativo tisular durante el ejercicio más frecuentemente estudiados<sup>31,53,55,64,112</sup>

Además, se ha observado que el contenido de MDA se incrementa durante el ejercicio en diversos tejidos y que la extensión de peroxidación lipídica parece depender de la intensidad del ejercicio <sup>113</sup>.

### **Oxidación proteica y ejercicio físico**

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 <sup>114</sup>. Otros autores han corroborado dicha afirmación <sup>73</sup>. 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 no sólo que el ejercicio aumenta la síntesis proteica y la degradación, sino que la actividad del complejo proteosómico está aumentada tras el ejercicio físico crónico, lo cual es interpretado como efecto beneficioso ya que aumenta la capacidad del músculo de eliminar las proteínas dañadas por agentes oxidantes producidos por el ejercicio físico.

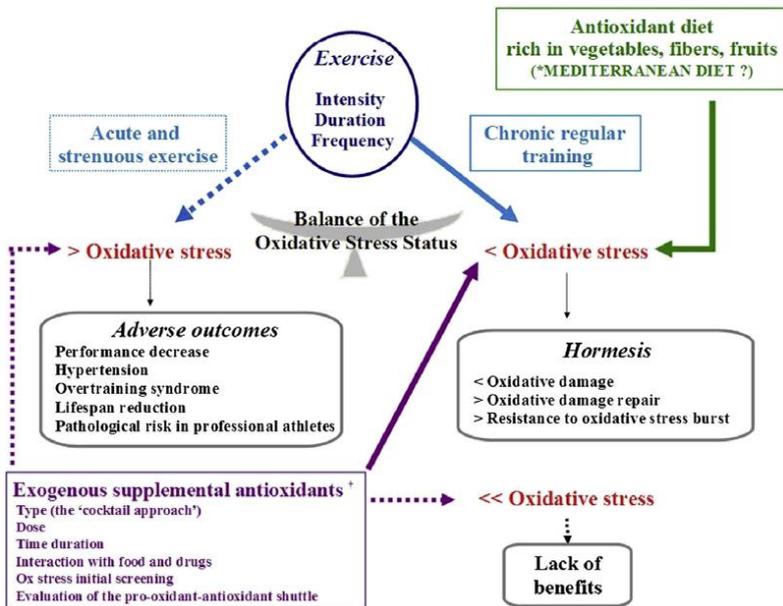
### **Daño al ADN celular inducido por el ejercicio físico.**

Los radicales libres afectan también al ADN, y el ejercicio físico agudo aumenta el daño al ADN <sup>115</sup>, tal como se evidencia por el aumento de la base nitrogenada oxidada, la 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OhdG) <sup>89</sup>. Este producto se utiliza como medida de la oxidación del ADN en respuesta a radicales libres.

## ***2.6 Protección de los antioxidantes contra las ROS durante el ejercicio***

Los organismos superiores han desarrollado sistemas antioxidantes eficaces a lo largo de la evolución. El alcance del daño oxidativo durante el ejercicio físico se determina, no solo por el nivel de producción de radicales

libres, sino también por la capacidad defensiva de los antioxidantes (figura 16). En los últimos años, una consciencia general destaca la importancia de los antioxidantes en los estados enfermos. No obstante, todavía existe un conocimiento insuficiente acerca de la interacción de cada antioxidante y el ejercicio, lo cual es importante para valorar la protección adecuada contra el daño oxidativo y la necesidad de una manipulación o suplemento dietético.



**Fig. 16. Efectos integrados del ejercicio** (agudos y extenuantes, crónicos y regulares), **dieta antioxidante** (la dieta Mediterránea podría ser una posibilidad interesante aunque se necesitan más datos) y **suplementación con antioxidantes exógenos** (todas las variables que se pueden tener en cuenta de la relación entre los beneficios y efectos adversos) sobre el efecto del estrés oxidativo y la salud. Los efectos beneficiosos están representados por una línea continua y los perjudiciales con una discontinua. (Fuente: Pingitore<sup>61</sup>)

### 2.6.1 Sistemas antioxidantes endógenos

Según su composición química podemos clasificarlos en enzimáticos y no enzimáticos.

#### 2.6.1.1 Antioxidantes enzimáticos

##### a) Superóxidodismutasa (SOD)

Es la primera defensa contra el radical superóxido. En el ser humano y otros mamíferos existen tres isoenzimas, la CuZn-SOD, la Mn-SOD y la ecSOD. Se comportan como sistema antioxidante encontrándose en tres formas según su distribución celular y componente metálico; en el citosol del hígado y cerebro y en menor cantidad los hematíes del pulmón, en las mitocondrias y por último en el líquido intersticial y el plasma<sup>110</sup>.

Genera peróxido de hidrógeno (reacción 1 del apartado 3.2) por lo que en presencia de hierro libre puede presentar una acción pro-oxidante, debiendo ser complementada su acción con sistemas que eliminen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el sistema catalasa y el ciclo del glutatión. Los músculos con mayor metabolismo oxidativo (con alto porcentaje de fibras lentas) tienen mayor actividad SOD total que los músculos con baja capacidad oxidativa (con alto porcentaje de fibras rápidas). La ecSOD supone de 1/3 a 1/2 de la actividad SOD en el endotelio.

##### b) Glutatión Peroxidasa (GPx)

Esta enzima reduce el agua oxigenada o el hidroperóxido orgánico a agua y alcohol respectivamente, y para ello utiliza en ambos casos el glutatión reducido (GSH) como donante de electrones<sup>116</sup>. La glutatión peroxidasa (GPx) juega un papel importante en la detoxificación del peróxido de hidrógeno y los lipoperóxidos que se generan en las células.

Es una enzima selenio-dependiente utiliza como agente reductor el glutatión reducido (GSH) oxidándolo a glutatión oxidado (GSSG). Existen 3

formas de GPx: GPx-c o forma celular, tiene mayor afinidad por el peróxido de hidrógeno que por el lipoperóxido; GPx -p o forma extracelular, presenta afinidad semejante para ambos sustratos; GPx-PH, tiene afinidad específica para los lipoperóxidos. Las formas GPx-c y GPx-p no son capaces de utilizar los lipoperóxidos.

### **c) Catalasa (CAT)**

Tiene una amplia distribución en el organismo humano, y se localiza a nivel celular en las mitocondrias, peroxisomas y citosol. Presenta dos funciones fundamentales: catalítica y peroxidativa y forma parte del sistema antioxidante CAT/SOD que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno. La catalasa participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno, dando lugar a agua y a una molécula de oxígeno (reacción 2 del apartado 3.2).

### **2.6.1.2 Antioxidantes no enzimáticos**

#### **a) Glutación (GSH) y tioles**

El GSH ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) es el tiol no proteico más abundante en la célula y ejerce múltiples funciones en la protección de los tejidos al daño oxidativo y en el mantenimiento de un ambiente intracelular en el estado reducido. Puede encontrarse en dos formas según su estado de óxido-reducción: como GSH o glutatión reducido, o como GSSG o glutatión oxidado.

El GSH puede reaccionar directamente con los radicales libres, sin necesidad de intervención enzimática, o bien por medio de la glutatión peroxidasa, enzima clave del ciclo redox del glutatión. Cuando se da una agresión oxidativa, el GSH se oxida a GSSG por medio de la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa. El GSSG formado es inmediatamente reducido a GSH por medio de la enzima glutatión reductasa. La glutatión reductasa requiere NADPH como cofactor, que será suministrado por la glucosa-6- fosfatodeshidrogenasa. Tanto la glutatión peroxidasa como la

glutatión reductasa se hallan predominantemente en el citosol, existiendo también cierta actividad en la mitocondria (figura 17).

La ejercitación del músculo esquelético parece importar GSH desde el plasma durante el ejercicio<sup>117</sup>. El contenido de GSH y el glutatión total (GSH (reducido)+GSSG (oxidado)) en rata del músculo del miembro trasero aumentó significativamente tras una tanda de ejercicio agudo y la magnitud del incremento pareció depender de la intensidad del ejercicio. Como resultado, hubo un pequeño cambio en el ratio GSH/GSSG tras el ejercicio, y solo se observó un modesto descenso del ratio GSH/GSSG tras el agotamiento. Los niveles de GSH en el miocardio también aumentan significativamente en ratas tras un entrenamiento de natación. Debido a síntesis *de novo* de GSH que tiene lugar en el músculo cardíaco y esquelético, parece que los músculos son capaces de adaptarse a un estrés oxidativo crónico al incrementar la captación de GSH extramuscular. Además, es importante reconocer que los tejidos no solo son capaces de importar GSH, sino además de exportar GSSG bajo condiciones de estrés oxidativo. Así, cuando el ratio del consumo de GSH excede al de importación, el tejido puede mostrar un déficit neto de GSH.

Debido a que el ejercicio reduce la reserva de tiol en el cuerpo, un suplemento de tiol durante el ejercicio agudo y crónico debería ser beneficioso.

### **2.6.2 Antioxidantes exógenos**

La vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico) y  $\beta$ -caroteno son antioxidantes importantes que no pueden ser sintetizados por muchos mamíferos y humanos y por tanto son requeridos en la dieta.

#### **a) Vitamina C**

La vitamina C o ácido ascórbico es considerado uno de los más poderosos de los antioxidantes naturales. La vitamina C participa en

numerosos procesos biológicos como hidroxilación hepática del colesterol a nivel microsomal, y además por sus propiedades reductoras mejoran la estabilidad y utilización del ácido fólico y la vitamina E. Se ha demostrado que la vitamina C capta radicales superóxido y oxhidrilo y que actúa como antioxidante interrumpiendo la cadena de la peroxidación lipídica. Actúa también, indirectamente, protegiendo las membranas lipídicas, a través de la regeneración de la forma activa de vitamina E que se une a las membranas aunque no esté completamente demostrado. La vitamina C parecería ser importante en la protección antioxidante del plasma, así como en otros fluidos extracelulares, en membranas e intracelularmente. La vitamina C es hidrofílica, y al contrario que la vitamina E, funciona mejor en medios acuosos. La administración crónica de ácido ascórbico ha demostrado revertir la disfunción vasomotora endotelial en pacientes con enfermedad coronaria. Las mayores fuentes de ascorbato en la dieta son las frutas, especialmente los cítricos, el kiwi, las cerezas y el melón. También forma parte de la composición de algunos vegetales como tomates, coliflor, coles de Bruselas, col o Brócoli.

El efecto de un suplemento de vitamina C en la dieta también ha sido estudiado en humanos que desarrollan ejercicio físico<sup>118</sup>. Aunque se afirmó que grandes dosis de vitamina C reducían la fatiga y el daño muscular en varios estudios, no se midieron marcadores específicos de estrés oxidativo. Además, es difícil determinar si los beneficios observados estaban relacionados con las funciones antioxidantes de la vitamina C<sup>119</sup>. Así también, una sobredosis de vitamina C puede causar defectos metabólicos en el corazón y fatiga temprana durante ejercicio prolongado.

### **b) Vitamina E**

La vitamina E es un compuesto lipofílico localizado en las membranas celulares y es particularmente eficiente en neutralizar radicales libres originados en la membrana mitocondrial interna y otras biomembranas<sup>120</sup>. La

vitamina E es esencial para la función normal de las células durante el ejercicio. El grupo de *Davies*<sup>45</sup> observó que una deficiencia de vitamina E exacerbaba la producción de radicales libres en músculo e hígado y aumentaba la peroxidación lipídica y la disfunción mitocondrial en ratas ejercitadas exhaustivamente.

El músculo esquelético contiene aproximadamente 30–50 nmol de vitamina E por g de peso húmedo, con diferencias considerables entre tipos de fibras musculares; mientras que la concentración de vitamina E en el corazón y el hígado alcanza 60–70 mmol/g. La concentración de vitamina E disminuye en un número de tejidos, como en músculo esquelético, hígado y corazón en ratas tras un entrenamiento de resistencia. El grupo de *Packer*<sup>121</sup> recomienda que los humanos con un estilo de vida activo deberían considerar un incremento diario en la dieta de toma de vitamina E, ya que se ha observado que los entrenamientos de resistencia agotan las reservas de vitamina E en el cuerpo cuando los sujetos consumen una dieta normal.

### **c) Carotenoides**

Son pigmentos que se encuentran en plantas y microorganismos, pero no son sintetizados por animales. Los principales carotenoides hallados en el plasma humano son: luteína, criptoxantina, caroteno, y carotenos. Las mayores fuentes de carotenoides de la dieta son las frutas y vegetales como zanahoria, brócoli, melón, tomates, naranjas entre otros; ingiriéndose en promedio unos 6 mg/d de los principales carotenoides.

### **d) Flavonoides**

Son un gran grupo de antioxidantes polifenólicos que se hallan en muchas frutas, vegetales y bebidas como el té, el vino y la cerveza. Son eficientes antioxidantes capaces de reaccionar con radicales como los radicales peroxilos, el radical hidroxilo y el anión superóxido.

### 2.6.3 Otras sustancias antioxidantes

#### a) **Ácido lipoico.**

Es un tiol endógeno que sirve como cofactor de los complejos  $\alpha$ -deshidrogenasa. Normalmente el ácido lipoico está presente en pequeñas cantidades en los tejidos animales. El ácido lipoico puede ser consumido en la dieta y no tiene efectos secundarios conocidos.

#### b) **Alopurinol**

El alopurinol [1H-pirazolo (3,4-d) pirimidina-4-ol] es un análogo estructural de la base púrica natural hipoxantina y actúa como un inhibidor de la XOD, la enzima responsable de la conversión de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico el producto final de catabolismo de las purinas. Por tanto se puede considerar que actúa sobre el catabolismo de las purinas sin modificar su biosíntesis. La inhibición de la enzima xantina oxidasa por este fármaco es efectiva tanto *in vivo* como *in vitro*.

#### c) **N-acetilcisteína**

La N-acetilcisteína (NAC) no es un antioxidante propiamente dicho. Participa en la síntesis de GSH, asegurando niveles adecuados de este antioxidante.

#### d) **Ácido úrico**

El ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas en el ser humano y otros primates, ya que carecen de la enzima uricasa, la cual hace que continúe la degradación hasta alantoína y urea.

#### e) **Glucosa**

La glucosa se comporta como captador de radicales hidroxilo y del radical superóxido, reteniendo a este último e impidiendo de esta forma su acción tóxica sobre otras moléculas.

### **f) Elementos traza.**

Se conoce que algunos elementos traza como el cobre (Cu), Zinc (Zn), Manganeseo (Mn), Hierro (Fe), Selenio (Se) son necesarios para la función de las enzimas antioxidantes como las SOD, catalasa y glutatión peroxidasa (GPX)<sup>118</sup>. Por lo tanto, la regulación de enzimas antioxidantes en respuesta a un ejercicio físico agudo y crónico no está solo determinada por los niveles de estrés oxidativo sino también por la disponibilidad de los elementos traza. Ji<sup>40</sup> mostró que la deficiencia de Se durante el entrenamiento físico causa un incremento en el contenido de MDA mitocondrial en músculo esquelético de rata. Por lo tanto, se ha sugerido que un nivel adecuado de elementos traza es esencial para un funcionamiento normal de los antioxidantes en las células bajo incrementos de estrés oxidativo durante un ejercicio agudo y crónico.

### **2.7 Adaptaciones del sistema antioxidante al ejercicio físico**

El beneficio del ejercicio como proveedor de buena salud y prevención de varias enfermedades se conoce bien. No obstante, el ejercicio crónico también representa una forma de estrés oxidativo para los organismos y por tanto pueden alterar el balance entre los pro oxidantes y los antioxidantes. Son muchos los estudios previos que han investigado la influencia de entrenamiento físico sobre el estado antioxidante de diferentes tejidos y han probado el efecto de que el entrenamiento de resistencia aumenta la capacidad oxidativa<sup>73,75</sup>.

#### **Antioxidantes no enzimáticos**

La práctica de ejercicio no parece reducir el contenido de vitamina E en varios tejidos. No obstante, la concentración de vitamina E se ha visto que disminuye en músculo esquelético, hígado y corazón tras un entrenamiento de resistencia<sup>107</sup>. Por otro lado, el suplemento de vitamina E aumenta la resistencia a la peroxidación lipídica inducida por el ejercicio

durante el ejercicio crónico<sup>120</sup>. Ya que la vitamina E en la membrana celular se regenera mediante un ciclo redox de la vitamina C-GSH, se espera que los niveles de estos dos antioxidantes tengan un mayor impacto en la respuesta a la vitamina E durante el entrenamiento.

Se ha observado que un entrenamiento de resistencia causa un descenso significativo del contenido de GSH en el músculo sóleo de rata<sup>75,122</sup>, así como un entrenamiento riguroso de natación en ratas causa niveles similares de reducción del contenido de GSH en el miocardio<sup>123</sup>. Sin embargo, estos resultados eran contrarios a aquellos encontrados en músculo esquelético como el vasto lateral (DVL) y gastrocnemio que mostraron un incremento en GSH con el entrenamiento. Como músculos altamente oxidativos, el sóleo y miocardio comparten muchas características metabólicas y bioquímicas como actividades de las enzimas mitocondriales y contenido de GSH. A pesar de una actividad de GPX de 4-5 veces mayor, estos dos tejidos tienen un 60%-70% y un 32% de actividad de GGT y GCS más bajo respectivamente, que vasto lateral. Es concebible que la oxidación de GSH exceda su capacidad de importar GSH de fuentes extracelulares, resultando en un déficit neto tras el entrenamiento. Por el contrario, el músculo DVL, que posee la actividad más alta de GGT entre varios tipos de músculos, no mostró cambios o aumento en el contenido de GSH.

### **Adaptación de enzimas antioxidantes**

Aunque la práctica de ejercicio activa los enzimas antioxidantes sin sintetizar proteínas de nuevo, el margen protector puede ser bastante limitado en función de las enzimas individuales y de los tejidos involucrados. Como una estrategia a largo plazo, las células deben activar la síntesis *de novo* de enzimas antioxidantes para afrontar el estrés oxidativo producido.

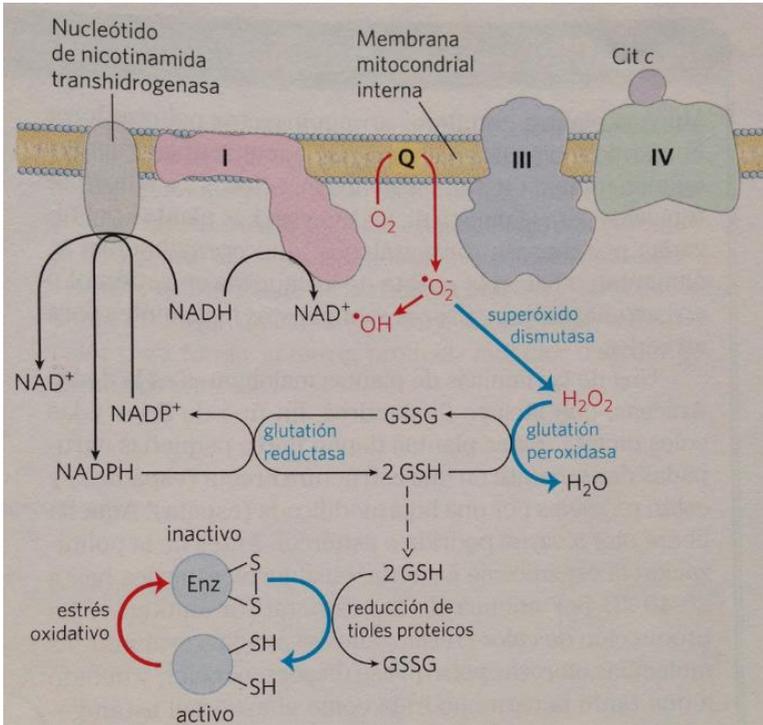
Se ha observado que la actividad SOD en el músculo esquelético aumenta significativamente tras el entrenamiento<sup>117</sup>. Sin embargo, muchos

estudios no han podido detectar una adaptación al entrenamiento de SOD incluso utilizando modelos animales de entrenamiento similares<sup>124</sup>. Las discrepancias deben ser explicadas por los distintos tipos de isoenzimas de la SOD estudiada, los diferentes ensayos usados, las diferentes intensidades y frecuencias de entrenamientos utilizadas que imponían un estrés oxidativo diferente al músculo y diferentes tipos de fibras musculares ensayadas. El grupo de Ji<sup>125</sup> demostró que la MnSOD es responsable del descenso de la actividad SOD durante el entrenamiento, mientras que la actividad CuZnSOD no se vio afectada.

La actividad CAT también se ha observado que aumenta tras el entrenamiento en músculo esquelético por diversos autores. No obstante, muchos estudios no han detectado cambios de CAT muscular con el entrenamiento, y unos pocos incluso han observado una disminución. Por el contrario, una adaptación más consistente al entrenamiento se ha demostrado en GPX<sup>126</sup>. Esta adaptación también demostró un patrón de especificidad de las fibras de músculos tipo 2. *Power et al.*<sup>127</sup> mostraron un incremento del 45% de la actividad GPX en el músculo gastrocnemio rojo (tipo 2) tras un entrenamiento de resistencia en ratas, mientras que en sóleo y músculo gastrocnemio blanco no se observó ningún efecto. *Leeuwenburgh et al.*<sup>124</sup> mostraron un aumento del 62% de la actividad GPX en el músculo vasto lateral en respuesta a un entrenamiento en cinta de correr, mientras que el músculo sóleo y el miocardio no se vieron afectados por el entrenamiento. Aunque la GPX se exprese como una enzima uniforme en varios compartimentos celulares, existen evidencias que las enzimas GPX mitocondriales presentan una adaptación al entrenamiento mayor que las citosólicas en el músculo esquelético de rata.

¿Por qué diferentes enzimas antioxidantes poseen características diferentes para adaptarse al entrenamiento? La respuesta tiene varias facetas y depende del patrón específico de la expresión génica de cada

enzima, el umbral requerido para la activación y sus interacciones. La síntesis *de novo* de una enzima requiere energía y es relativamente lenta, siendo probablemente reservada para hacer frente al estrés oxidativo. Las actividades de las SOD parecen suficientemente altas y relativamente uniformes en los tejidos y tipos musculares, sugiriendo que la eliminación del anión superóxido no debe ser un paso limitante. En comparación, la GPX destruye los productos finales de la ruta de producción de ROS (peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos, incluyendo peróxidos lipídicos y nucleótidos) y su actividad es relativamente baja. Esto permitiría explicar que normalmente la GPX posea una adaptación mayor al entrenamiento que las enzimas SOD y CAT.



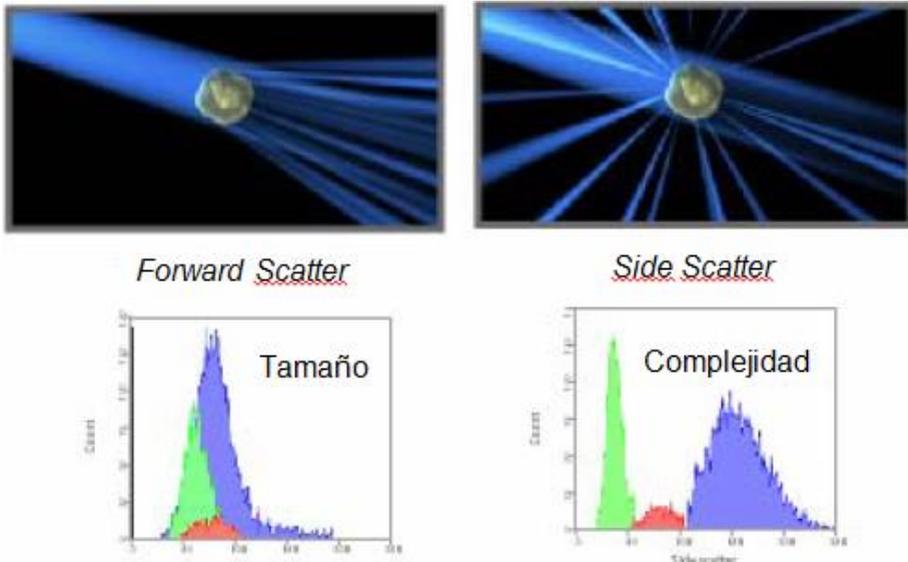
**Fig. 17. Formación de ROS en mitocondrias y defensas mitocondriales.** Cuando la velocidad de entrada de electrones en la cadena respiratoria y la velocidad de transferencia de electrones a través de la cadena no está ajustada aumenta la producción de radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) en los complejos I y III, a medida que el radical ubiquinona parcialmente reducido ( $Q^{\bullet}$ ) cede un electrón al  $O_2$ . El superóxido actúa sobre la aconitasa, una proteína 4Fe-4S, liberando  $Fe^{2+}$ . En presencia de  $Fe^{2+}$ , la reacción de Fenton conduce a la formación de radical hidroxilo libre ( $^{\bullet}OH$ ) muy reactivo. Las reacciones mostradas en azul defienden a la célula frente a los efectos lesivos del superóxido. El glutatión reducido (GSH) cede electrones para la reducción del  $H_2O_2$  y de residuos Cys oxidados (-S-S-) en enzimas y otras proteínas y el GSH se regenera a partir de la forma oxidada (GSSG) por reducción con NADPH. (Fuente: Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas<sup>21</sup>)

### 3. LA CITOMETRIA DE FLUJO COMO MÉTODO DE ESTUDIO

La citometría de flujo (CMF) permite la medida simultánea de emisiones de fluorescencia y dispersión de luz inducidas por la iluminación adecuada de células o partículas microscópicas en suspensión a medida que éstas fluyen de una en una a través de un compartimento de detección<sup>128</sup>.

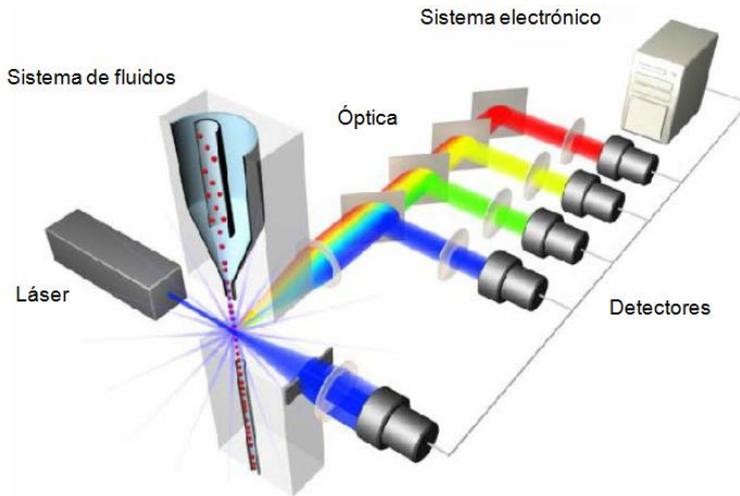
La citometría tiene como finalidad la medida de las características físicas y químicas de las células o partículas biológicas. El principio en el que se basa la citometría de flujo es en hacer pasar células u otras partículas en suspensión, alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso. La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula o la partícula al ser excitados por el rayo luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que se procesan por el ordenador.

La dispersión de luz es un proceso físico en el que una célula interacciona con la luz incidente cambiando la dirección de la luz (figura 18), no la longitud de onda. Las características celulares que contribuyen a la dispersión de la luz son el tamaño, la membrana celular, el núcleo y el material granular del interior de la célula. Pero la luz no se dispersa igual en todas direcciones. La luz dispersada hacia delante (FS, *Forward Scatter*) es una medida del tamaño celular, mientras que la luz dispersada en ángulo recto (SS, *Side Scatter*) depende de la densidad celular y la granularidad (complejidad interna).



**Figura 18. Imágenes de luz dispersada hacia delante (*Forward Scatter, FS*) como medida de tamaño celular y luz dispersada lateralmente (*Side Scatter, SS*) como medida de la complejidad celular.** Representación tipo histograma para los parámetros FS y SS para una población de leucocitos donde los linfocitos se representan en color verde, los monocitos de color rojo y los neutrófilos de color azul. (Fuente: <http://imagestack.co/9064584-flow-cytometry.html>)

Los citómetros de flujo presentan una configuración con tres ejes principales: el del flujo de la muestra, el del rayo de luz y el de los detectores de fluorescencia (figura 19). Las células se transportan a una corriente de flujo hidrodinámico donde existen dos compartimentos: el líquido que contiene la suspensión celular y el fluido hidrodinámico, denominado envolvente (del inglés *Sheath*), que rodea al líquido que contiene la muestra. La fuente luminosa consiste en un rayo láser que genera luz monocromática. El citómetro emplea principalmente luz azul de 488 nm de longitud de onda, aunque se pueden encontrar ya en el mercado nuevos citómetros con gran variedad de fuentes de excitación.



**Figura 19. Ejemplo de configuración de un citómetro de flujo** donde se diferencian los componentes principales del mismo: flujo de la muestra, el del rayo de luz y el de los detectores de fluorescencia. (Fuente: <http://imagestack.co/9064584-flow-cytometry.html>)

Mediante los sistemas de fluorescencia se determinan las células marcadas con compuestos fluorescentes. Los fotones con diferente longitud de onda se seleccionan por medio de un sistema óptico compuesto por filtros y espejos dicróicos y se envían a un detector o fotomultiplicador específico. Cada detector genera una señal electrónica que es proporcional a la cantidad de luz dispersada o la intensidad de fluorescencia. Estas señales se amplifican multiplicándolas por un factor lineal o logarítmico. El pulso amplificado se lleva a un convertidor analógico/digital que puede manejarse por un ordenador.

De esta forma, la CMF es una poderosa metodología citómica que permite cuantificar simultáneamente varios parámetros biológicos en la misma célula a una velocidad de adquisición de datos que alcanza los miles de eventos por segundo. La CMF se ha convertido en una de las tectologías analíticas de fluorescencia más avanzadas que evoluciones más

rápidamente. Con respecto a otras ómicas basadas en la fluorescencia, la CMF es ventajosa porque permite la cuantificación simultánea de múltiples parámetros biológicos sobre la misma célula o partícula, a la vez que miles de ellas son examinadas por segundo cuando desfilan de una en una a través de un sistema adecuado de iluminación. Como consecuencia, una gran diversidad de poblaciones celulares heterogéneas puede ser descrita mediante las propiedades biométricas de sus componentes individuales.

### ***3.1 Análisis del estrés oxidativo por citometría de flujo o por fluorimetría***

La medición del estrés oxidativo en células se realiza mediante ensayos basados en sondas fluorescentes. Se basan principalmente en la adición de un compuesto no fluorescente, el cual es rápidamente oxidado o reducido al reaccionar con especies oxidantes, transformándose en un compuesto fluorescente y cuya emisión es detectada por el citómetro de flujo o por el fluorímetro.

Podemos clasificar las sondas dependiendo de la especie oxidante que reacciona con ella. El ensayo citómico consta de la medición de los siguientes parámetros mediante las sondas que los cuantifican:

#### **a) Análisis de la actividad peroxidativa**

##### ✓ *Dihidrorodamina 123 (DHR-123)*

Es una molécula fluorogénica que difunde pasivamente a través de las membranas por su naturaleza lipofílica y su carga positiva. En el interior de la célula, es oxidada a rodamina 123 que se acaba acumulando en las

mitocondrias. La molécula en su forma fluorescente se excita con una longitud de onda de 480nm y emite a una longitud de onda de 530nm.

✓ *Diclorofluoresceína Diacetato 2,7 (DCF-DA)*

Se trata de un compuesto que pasa libremente a través de la membrana celular y una vez dentro de la célula es diacetilado por esterasas celulares a diclorofluoresceína (DCFH) no fluorescente, la cual a su vez, es atrapada por la célula debido a su naturaleza polar, siendo convertida por oxidantes intracelulares a la molécula fluorescente diclorofluoresceína (DCF). La DCF-DA es excitada a 488nm y tiene un pico de emisión a 520nm.

**b) Medición del anión superóxido**

✓ *Dihidroetidina (HE)*

Es un compuesto fluorogénico altamente selectivo para la detección de superóxido en el citosol de células vivas. Es un indicador fluorogénico derivado por reducción química del hidroetidio que, tras ser oxidado por el ion superóxido, se transforma en bromuro de etidio que se une al DNA y emite a una longitud de onda de 630nm cuando se excita a 488nm.

✓ *MitoSOX Red (MITOSOX)*

El indicador MitoSOX es un novedoso marcador para la detección selectiva de superóxido en la mitocondria. Es permeable a las células vivas siendo selectivamente introducido en la mitocondria. Una vez en ella, el reactivo MitoSOX es oxidado por superóxido y exhibe una débil fluorescencia roja al unirse con ácidos nucleicos. El Mitosox es excitado a 488nm y tiene un pico de emisión a 580 nm.

**c) Medición de RNS**

- ✓ *Diaminofluoresceína diacetato (DAF-FM) (4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato)*

DAF-FM Diacetato es un indicador fluorescente para la detección de óxido nítrico (NO) a bajas concentraciones. Es un compuesto no fluorescente hasta que reacciona con NO formando un compuesto fluorescente, el benzotriazol. En la célula, DAF-FM-DA se transforma en DAF-FM por esterasas celulares. La fluorescencia se mide mediante longitudes de onda de excitación y emisión de 485nm y 515nm respectivamente.

**d) Medición del potencial de membrana mitocondrial**

- ✓ *Tetrametil rodamina metilester (TMRM)*

Es un fluorocromo derivado de la tetrametil rodamina, colorante catiónico que emite una intensa fluorescencia y que se acumula en el interior de la mitocondria activa, a donde es transportado a favor del potencial de la membrana interna mitocondrial, negativo en el interior. El TMRM es por lo tanto, un indicador del potencial de membrana mitocondrial, cuya longitud de onda de emisión máxima es 630nm cuando es excitada a 488nm.

- ✓ *Yoduro de 5,5',6,6'-tetraclorotetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1)*

JC-1 es una sonda fluorescente lipofílica catiónica utilizada como indicador del potencial de membrana mitocondrial y por tanto su integridad. Para ello se mide la captación de dicho fluorocromo dentro de la matriz mitocondrial. El potencial de membrana mitocondrial, a través de la membrana mitocondrial interna, determina la redistribución de este

fluorocromo. La distribución depende del campo eléctrico transmembrana (negativo en el interior) y el gradiente de concentración de este fluorocromo.

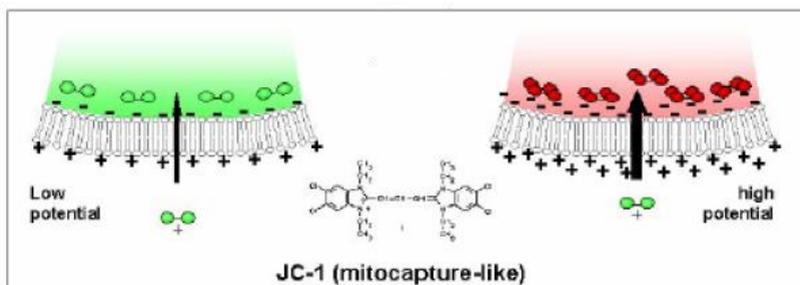
El fluorocromo JC-1 tiene la propiedad de que cuando se excita a 488 nm, el espectro de emisión será dependiente de la concentración de la molécula. En soluciones diluidas de  $\leq 300\text{nM}$  emitirá una fluorescencia verde a 527 nm, pero cuando la concentración sea mayor que 1mM, se emitirá una fuerte fluorescencia rojo-naranja a 590nm. Esto es debido a la formación de agregados del fluorocromo, llamados J-agregados. En células sanas con alto potencial de membrana mitocondrial, JC-1 forma espontáneamente complejos de J-agregados (en el interior de la mitocondria) que exhiben fluorescencia naranja-roja; mientras que en células apoptóticas o dañadas el potencial de membrana se colapsa (despolarización), JC-1 permanece en su forma monomérica (en el citoplasma) exhibiendo fluorescencia verde (figura 20).

Este procedimiento es un ensayo a punto final de la medida de captación de JC-1 con la formación de J-agregados, pero es posible seguir la captación con el tiempo utilizando un programa cinético. Compuestos que causan un bloqueo de la cadena de transporte de electrones, seguido de una pérdida de energía de la mitocondria y una bajada significativa del potencial de membrana como la antimicina A a  $2\mu\text{M}$  o Pirrolnitrina a  $3\text{-}12\mu\text{M}$ , mostrarán una bajada drástica de la fluorescencia de JC-1 debido a una igualación de la concentración de JC-1 entre el interior y exterior de la matriz mitocondrial.

### ✓ *Rodamina 123* (**Rh123**)

La rodamina es un fluorocromo catiónico y lipofílico que es secuestrado por mitocondrias funcionales, por tanto es eliminado de las células una vez han perdido el potencial de membrana mitocondrial. La fluorescencia se

mide mediante longitudes de onda de excitación y emisión de 485nm y 515nm respectivamente.



**Figura 20. Gráfico de captación de la sonda catiónica JC-1 por la mitocondria.** Aquellas sanas con alto potencial de membrana se forman complejos J-agregados que exhiben fluorescencia naranja-roja, mientras que las mitocondrias dañadas con potencial de membrana bajo exhiben fluorescencia verde. (Fuente: <http://www.enzolifesciences.com>)

**Tabla 3. Fluorocromos de medida de Estrés Oxidativo por citometría de flujo.**

Fluorocromo	Medida	Bibliografía
HE	Radical superóxido	98,129,130,131,74,132
DHRH123	Peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y anión peroxinitrito	42,129,74,133,134,135
MitoSOX Red	Radical superóxido	136
DCFH-DA	Peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo	31,42,73,79,129,131,74,134,137
TMRM	Potencial membrana mitocondrial	132,138,104
JC-1	Potencial membrana mitocondrial	139,140,141
Rh123	Potencial membrana mitocondrial	142,143,144,145,146
DAF	Niveles NO	147,148

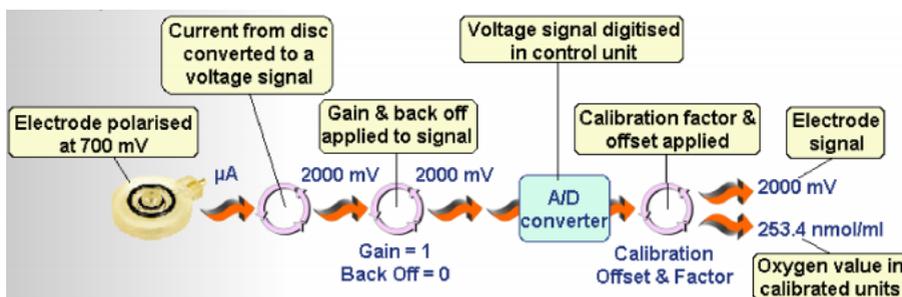
## 4. ENSAYOS DE CONSUMO DE OXÍGENO, EL ELECTRODO DE OXÍGENO

Una forma de valorar la funcionalidad de las mitocondrias aisladas es la determinación de la tasa de consumo de oxígeno en preparados de células o mitocondrias. Para ello se emplea un electrodo de oxígeno tipo Clark<sup>7,16,149,150,151,152,141</sup>. El electrodo de oxígeno realiza lecturas polarigráficas de forma continua del consumo de oxígeno en el interior de una cámara de incubación sellada. Éstas de transmiten a un sistema informático que transforma la señal eléctrica recibida en valores relativos de la concentración de oxígeno presente en el medio. El electrodo de oxígeno comprende un cátodo de platino central unido a una resina y un ánodo de plata concéntrico unido por un puente electrolítico y conectados al módulo control.

La cámara del electrodo se prepara por aplicación de un espaciador de papel muy fino y una fina membrana de poli-tetra-fluor-etileno (P.T.F.E.) que es cuidadosamente fijada a la placa base donde se encuentran los electrodos por un anillo-O.

En presencia de oxígeno una pequeña corriente fluye a través de los electrodos que es proporcional a la concentración de oxígeno en la muestra. Esta señal es digitalizada por la unidad de control y presentada directamente en el PC (figura 21). Las señales de las medidas en fase líquido se representan con las unidades nmol/ml.

Todos los componentes del electrodo deben mantenerse a temperatura constante durante las determinaciones. Este efecto se consigue por circulación de agua a la temperatura deseada alrededor de la cámara y controlando la temperatura de los componentes de la muestra.



**Figura. 21. Diagrama que muestra los procesos llevados a cabo para presentar las señales en unidades calibradas.** (Fuente: Silva<sup>152</sup>)

- La corriente producida por las reacciones electroquímicas en presencia de oxígeno es convertida en primer lugar a una señal de voltaje. En condiciones de aire saturado y agua desionizada, la unidad control está diseñada para leer aproximadamente 2000 mV (aproximadamente el rango medio del instrumento).
- *Gain & Back off* se aplican a la señal en este momento. Estos valores se establecen automáticamente durante la calibración. Sin embargo, los valores suelen permanecer con una *Gain* aproximadamente a 1 y un *Back Off* de 0. En aquellos casos donde las medidas de pequeños cambios de oxígeno son necesarios, estos valores se deben de ajustar manualmente.
- La señal de voltaje se pasa a través de un convertidor A/D de 12 bits de resolución donde la señal se digitaliza
- Una vez está digitalizada, el factor de corrección de la calibración se aplica a la señal permitiendo que esta aparezca en unidades calibradas

Durante la medida, el electrodo consume una pequeña proporción del oxígeno disponible. Para evitar registrar un declive en la señal debido a este artefacto, las muestras deben estar continuamente en agitación de

forma que la capa de líquido, situada encima del disco del electrodo, sea constantemente repuesta en oxígeno.

Es necesaria la calibración del electrodo para relacionar la lectura en mV de la caja de control con la concentración de  $O_2$ . Para ello se mide el nivel máximo de oxígeno mediante la adición de agua destilada mantenida en constante agitación para que ajuste el 100% del registro (253 nmoles de  $O_2$  /ml) y el nivel mínimo de oxígeno mediante la adición de ditionito ( $Na_2S_2O_4$ , una punta de espátula) para reducir el  $O_2$ . Se enrosca el émbolo hasta enrasarlo con el líquido dentro de la célula, cuidando que quede sin burbujas y mantener la agitación (ajustar el 0% del registro). Después se debe lavar muy bien la cámara con  $H_2O$  destilada antes de su uso con muestras.



## **OBJETIVOS**



## OBETIVOS

---

- 1- Determinar la posible existencia de estrés oxidativo mitocondrial en el miocardio de animales en diferentes fases del proceso de entrenamiento
  - a. Análisis de suspensiones de mitocondrias aisladas de miocardio utilizando marcadores fluorescentes específicos y cuantificando diferentes parámetros indicadores de estrés mitocondrial por citometría de flujo.
- 2- Correlacionar los indicadores de estrés oxidativo mitocondrial con otros indicadores del estado funcional de las mitocondrias aisladas del miocardio de animales en diferentes fases del proceso de entrenamiento
  - a. Análisis del consumo respiratorio de oxígeno, utilizando un electrodo de oxígeno
  - b. Análisis citométrico del potencial de membrana mitocondrial, utilizando marcadores fluorescentes específicos para determinar parámetros indicadores de la función mitocondrial, como el potencial de membrana, la cantidad de membrana mitocondrial y los niveles y estado de fluidez de fosfolípidos de membrana mitocondrial
- 3- Determinar la especificidad de los posibles efectos detectados en el miocardio mediante la comparación de los indicadores de estrés oxidativo mitocondrial y de estado funcional de las mitocondrias cardíacas con los de otros órganos y tejidos.
  - a. Análisis de suspensiones de mitocondrias aisladas de miocardio, de otros tipos musculares (músculo estriado, músculo esquelético), otros órganos no contráctiles (hígado) y en células sanguíneas (leucocitos), utilizando marcadores fluorescentes específicos y cuantificando diferentes parámetros indicadores de estrés mitocondrial por citometría de flujo.



## **METODOLOGÍA**



## 1. ANIMALES DE ESTUDIO Y ENTRENAMIENTO

### 1.1. Animales y grupos experimentales

Para el presente trabajo se utilizaron conejos obtenidos en colaboración con el departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. Los conejos eran machos de raza White New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*), con una edad de 9 semanas y un peso medio de  $2,02 \pm 0,1$  Kg al inicio del periodo de entrenamiento o estabulación. Tras este periodo, los animales con los que se realizó la preparación experimental y el estudio electrofisiológico tenían una edad de 16 semanas y un peso medio de  $3,7 \pm 0,3$  kg. Fueron alimentados *ad libitum*.

Las condiciones de estabulación y los procedimientos experimentales fueron de conformidad con la normativa de la Unión Europea sobre el uso de animales para fines científicos (2003/65/CE) y como promulga la legislación Española (RD1201/2005). El servicio de animalario de la Universidad de Valencia y el Comité Científico aprobaron todos los procedimientos utilizados para este estudio.

Los animales se dividieron en tres grupos experimentales:

1. Conejos no entrenados: **Grupo Control (C)**:
  - Operados y sometidos a estudio electrofisiológico
  - Recibieron tratamiento con atropina previo a la obtención de muestras de tejido cardíaco
  
2. Conejos no entrenados: **Grupo Falso Operado (FO)**
  - Operados y no sometidos a estudio electrofisiológico

- No recibieron tratamiento con atropina previo a la obtención de muestras de tejido cardíaco
3. Conejos entrenados: **Grupo Entrenados (E)**:
- Operados y sometidos a estudio electrofisiológico
  - Recibieron tratamiento con atropina previo a la obtención de muestras de tejido cardíaco

La administración de atropina ( $1\mu\text{M}$ ) (un fármaco anticolinérgico que inhibe la acción vagal y permite un predominio simpático que aumenta la frecuencia cardiaca) a los grupos control y entrenado, se infundió a mitad del protocolo electrofisiológico con el fin de bloquear los receptores muscarínicos miocárdicos y llevar a cabo los experimentos por parte de los compañeros del departamento de Fisiología relacionado con otro proyecto<sup>153</sup>. Asimismo, al grupo de animales sin atropina, es decir, al grupo falso operado, se les infundió Tyrode filtrado como medio fisiológico con el fin de determinar los posibles efectos que la aplicación del propio protocolo electrofisiológico pudiese ejercer.

De cada uno de los conejos a estudio, se extrajeron los siguientes órganos:

- **Corazón**, como músculo cardíaco y órgano principal de estudio
- **Diafragma**, como músculo esquelético liso y principal responsable de la respiración
- **Hígado**, como tejido parenquimático no muscular y tejido “control”, no sujeto a agotamiento muscular por la práctica de ejercicio físico.

Todos los tejidos de todos los grupos fueron usados para obtener homogenados de **mitocondrias aisladas** para medidas polarigráficas y ensayos por citometría de flujo de la producción de especies oxidantes.

También se obtuvo **sangre periférica** del pabellón auditivo de cada conejo en un tubo heparinizado para posteriores medidas de la producción de especies oxidantes por citometría de flujo.

Esto ha permitido realizar las siguientes comparativas:

- a) Efecto del entrenamiento: grupo control vs entrenado
- b) Efecto de la atropina: grupo control vs falso operado
- c) Efectos combinados entrenamiento y atropina: grupo entrenado vs falso operado
- d) Efecto del miocardio: corazón vs diafragma vs hígado
- e) Efectos *in situ* células enteras: células mononucleares sanguíneas

## ***1.2. Protocolo de entrenamiento físico***

Previamente a la iniciación de las sesiones de entrenamiento, los conejos fueron sometidos a una semana de familiarización con la cinta rodante en la que se habituaron a la dinámica de la carrera durante 6 minutos diarios (3 series de 2 minutos de duración con un minuto de descanso entre ellas). Tras esta semana de familiarización, los animales fueron asignados al grupo control, al grupo entrenado o al grupo falso operado.

Los conejos pertenecientes al grupo de animales entrenados fueron sometidos a un protocolo de entrenamiento físico en cinta rodante durante 6 semanas, a razón de 5 sesiones semanales en días consecutivos (de lunes a viernes). Cada sesión se compuso, a su vez, de 6 series de carrera continua sobre tapiz rodante, en cada una de las cuales el animal corrió a una velocidad de  $0,33 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ , ( $20 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ ) durante 4 minutos. El intervalo de

descanso entre cada una de las 6 series fue de 1 minuto. Así pues, el tiempo de entrenamiento total diario fue de 29 minutos.

La correcta realización del ejercicio sobre la cinta rodante fue continuamente supervisada. Los conejos, que una vez iniciado el período de entrenamiento, no corrieron adecuadamente durante cinco sesiones consecutivas, fueron excluidos del estudio. Finalizado el protocolo de entrenamiento se procedió a sacrificar a los animales para la realización del estudio electrofisiológico.

Los conejos no entrenados (grupo control y falso operado) permanecieron en las respectivas jaulas durante un tiempo igual al total del tiempo necesario para el entrenamiento de los conejos del grupo entrenado, esto es, seis semanas, más la semana que entraña la familiarización de los conejos con la cinta para su posterior entrenamiento.

Se trata de un entrenamiento tipo crónico. En el ámbito de las ciencias del ejercicio físico los efectos “crónicos” son los cambios o modificaciones morfológicas y funcionales *duraderas y estables* (porque permanecen más allá del estímulo) resultado de la repetición sistemática o acumulación de estímulos o esfuerzos, y que capacitan al organismo para responder con mayor eficacia (p.e.: reducción de la frecuencia cardiaca de reposo, hipertrofia muscular, incremento de la masa ósea, proliferación de capilares, etc.).

Las adaptaciones a largo plazo se caracterizan no sólo por las modificaciones estructurales de los órganos afectados sino también por el aumento de la eficacia de los sistemas funcionales y por su coordinación<sup>154</sup>.

## 2. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS

Tras la extracción de sangre del pabellón auricular de cada animal, se administró un anestésico intravenoso (1 mL Ketolar®) a través de la vena marginal de la oreja y se sacrificó al animal mediante una dislocación cervical. Después de una toracotomía mediosternal y una pericardotomía, los órganos se extrajeron rápidamente y se sumergieron en la solución de homogenización inmediatamente (las soluciones se mantuvieron en hielo durante todo el proceso).

La homogeneización a partir de las muestras de tejido se llevó a cabo siguiendo un kit comercial de aislamiento mitocondrial, *Mitochondria Isolation Kit MITOISO1 (Sigma-Aldrich)* con algunas modificaciones. Se diferencia un protocolo para la homogenización de tejidos blandos (hígado) y otro para tejidos duros (músculo esquelético y músculo cardíaco).

Las mitocondrias pueden ser preparadas fácilmente de tejidos animales por el simple método de homogenización seguido de una centrifugación a baja velocidad (600 x g) y otra a alta velocidad (11,000 x g). El precipitado final representa una fracción mitocondrial cruda que puede ser utilizada como base de experimentos posteriores. Para obtener una fracción mitocondrial más pura, enriquecida en mitocondrias sin contaminación con peroxisomas y lisosomas, las velocidades de centrifugación pueden aumentarse.

El kit permite aislar tejidos blandos como hígado o cerebro y tejidos duros como músculo esquelético y músculo cardíaco. Los tejidos blandos se extraen en presencia de BSA delipidada que elimina los ácidos grasos libres presentes en el tejido que causan desacoplamiento de la respiración en la mitocondria. EGTA también está presente en el medio de aislamiento para quelar iones de  $\text{Ca}^{2+}$  que causan el hinchamiento mitocondrial.

Los tejidos duros no se pueden homogenizar fácilmente sin un pre-tratamiento con proteasas como la tripsina para favorecer la rotura de la estructura celular. Las miofibrillas en el músculo esquelético tienden a dar una consistencia gelatinosa al homogenado en un medio no-iónico (sacarosa isotónico) por lo que debe ser homogenizarse en un medio iónico como el medio de extracción B al 1X.

El precipitado final de mitocondrias puede resuspenderse tanto en el medio de almacenamiento (solución de conservación al 1X) para experimentos que necesiten ensayos de respiración mitocondrial o en el medio de extracción A al 1X.

Todos los pasos de aislamiento mitocondrial se llevaron a cabo a 4°C con las soluciones en hielo.

### ***2.1 Preparación de las soluciones de trabajo***

Las soluciones de extracción y conservación al 1X se prepararon a partir del kit mencionado, sin embargo, los medios de respiración se prepararon siguiendo lo indicado en la bibliografía, diferenciando uno para hígado<sup>155</sup> y otro para corazón y diafragma<sup>156</sup>:

Tabla 4. Soluciones de trabajo

<b>Solución de extracción A al 1X</b>	Tampón HEPES 10mM, pH 7.5, suplementado con manitol 200mM, sacarosa 70mM, EGTA 1mM
<b>Solución de extracción B 1X</b>	Solución iónica de MOPS 20mM, pH 7.5, suplementados con KCl 110mM y EGTA 1mM
<b>Solución de conservación 1X</b>	HEPES 10mM, pH 7.4, suplementado con sacarosa 250mM, ATP 1mM, ADP 0.08mM, Sodio succinato 5mM, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2mM y DTT 1mM.
<b>Medio de respiración para hígado</b>	Sacarosa 250mM, KCl 15mM, EGTA 1mM, MgCl <sub>2</sub> 5mM, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 30mM, pH 7.4
<b>Medio de respiración para músculo esquelético o cardíaco</b>	Tris/HCl 1M, EGTA/ Tris 0.1mM, MgCl <sub>2</sub> 5mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2mM, Sacarosa 250mM, pH 7.4

**Nota:** Para ajustar el pH de los medios de respiración, se utilizó HCl o KOH, no NaOH. Éstos deben prepararse con agua pura y almacenarse en recipientes estériles. Todos los sustratos *stock* pueden prepararse con antelación y almacenarlos en alícuotas a -80°C durante varias semanas. Sin embargo, las soluciones deben prepararse cada semana de nuevo. BSA debe añadirse en el mismo día del experimento. El resto de soluciones de trabajo se prepararon con antelación como indica el kit, se filtraron (filtro de 30µm) y se congelaron en tubos de 50 ml.

## **2.2 Aislamiento de mitocondrias de hígado**

1. Utilizar tejido fresco (obtenido antes de una hora desde el sacrificio) mantenido en hielo para evitar la activación de fosfolipasas y proteasas.
2. Lavar la muestra dos veces con 2 volúmenes de la solución de extracción A al 1X. Secar con un papel y pesar la muestra.
3. Cortar el tejido en porciones muy pequeñas y homogenizarlo con 10 volúmenes de la solución de extracción A 1X suplementado con 2mg/mL de BSA delipidada utilizando un *Homogeneizador Potter-Elvehjem* provisto de émbolo de teflón.
4. Asegurarse de que la muestra queda homogenada totalmente deslizando el émbolo arriba y abajo entre 5 y 10 veces. Mantener el homogenado en hielo
5. Transferir el homogenado a tubos de centrifuga y centrifugar a 600 x g durante 10 minutos a 4°C. (Centrífuga Sorvall Legend RT)
6. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de centrifuga filtrándolo con una gasa para eliminar las partículas grasas. Centrifugar a 11,000 x g durante 15 minutos a 4°C.
7. Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 10 volúmenes de la solución de extracción A 1X.
8. Repetir los pasos 5 y 6 del lavado del precipitado.
9. Resuspender el precipitado final en la solución de conservación 1X (alrededor de 40µL cada 100mg de tejido). Si se quieren concentrar las mitocondrias para una mejor conservación añadir menor volumen.
10. Calcular la concentración de proteína siguiendo el método de Lowry (apartado 3.1)

### **2.3 Aislamiento de mitocondrias de corazón y de diafragma**

Para la extracción de mitocondrias de músculo cardíaco se utilizó solución de extracción A 1X y para músculo esquelético la solución de extracción B 1X.

1. Utilizar tejido fresco (obtenido antes de una hora desde el sacrificio) mantenido en hielo.
2. Lavar la muestra dos veces con 2 volúmenes de la solución de extracción al 1X correspondiente para cada tejido. Secar con un papel y pesar la muestra.
3. Cortar el tejido en porciones muy pequeñas.
4. Suspender la muestra con 10 volúmenes del medio de extracción apropiado suplementado con 0.25mg/mL de tripsina.
5. Incubar en hielo durante 3 minutos y hacer un centrifugado rápido (*Spin Down*) durante unos pocos segundos.
6. Eliminar el sobrenadante por aspiración y añadir 8 volúmenes del medio de extracción apropiado, suplementado con 0.25mg/mL de tripsina.
7. Incubar en hielo durante 20 minutos.
8. Añadir una solución de BSA a una concentración final de 10mg/mL para detener la reacción proteolítica, mezclar y hacer un centrifugado rápido del tejido durante unos segundos.
9. Eliminar el sobrenadante por aspiración y añadir 8 volúmenes del medio de extracción apropiado, hacer un centrifugado rápido del tejido durante unos segundos.
10. Eliminar el sobrenadante por aspiración y añadir 8 volúmenes del medio de extracción apropiado.
11. Homogenizar la muestra utilizando un *Homogeneizador Potter-Elvehjem* provisto de émbolo de teflón.

12. Asegurarse de que la muestra queda homogenizada totalmente deslizando el émbolo hacia arriba y hacia abajo entre 20 y 30 veces. Mantener el homogenado hielo.
13. Transferir el homogenado a tubos de centrifuga y centrifugar la muestra a  $700 \times g$  durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .
14. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de centrifuga filtrándolo con un filtro de  $30\mu\text{m}$
15. Centrifugarlo a  $14,000 \times g$  durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .
16. Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en el medio de extracción apropiado.
17. Centrifugar el precipitado a  $11,000 \times g$  durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .
18. Resuspender el precipitado final en el medio de conservación 1X (sobre  $40\mu\text{L}$  cada  $100\text{mg}$  de tejido). Si se quieren concentrar las mitocondrias para una mejor conservación añadir menor volumen.
19. Calcular la concentración de proteína siguiendo el método de Lowry (apartado 3.1).

### 3. MÉTODOS ANALÍTICOS

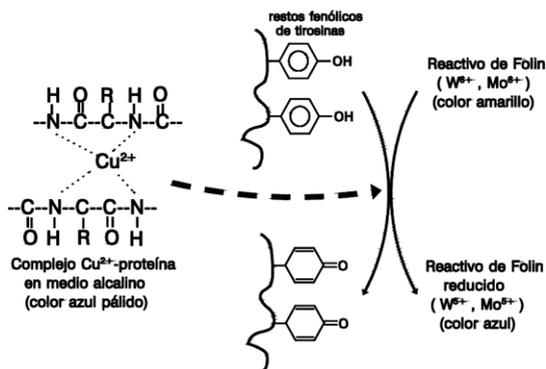
#### ***3.1 Determinación de la concentración de proteínas en los homogenados de mitocondrias: método de Lowry***

Una alícuota de los homogenados anteriores se utilizó para determinar el contenido total de proteínas por el método de Lowry<sup>157</sup> adaptado a placas de 96 pocillos mediante un fluorímetro (modelo Synergy HT, Bio Tek).

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 de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer.

Este método consta de dos etapas (figura 22):

- 1) Los iones  $\text{Cu}^{2+}$ , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El  $\text{Cu}^{2+}$  se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.
- 2) La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.



**Figura 22.** Reacción entre la proteína y los reactivos (ley de Lambert-Beer) (Fuente: yunelijo-k.blogspot.com)

### **Reactivos**

- Reactivo A:  $Na_2CO_3$  al 2%, NaOH 0,1 M
- Reactivo B<sub>1</sub>:  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  al 1%
- Reactivo B<sub>2</sub>: tartrato sódico-potásico al 2%
- Reactivo C: Se prepara en el momento de iniciar el ensayo, mezclando A, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> en proporciones 50:0,5:0,5 (en volumen)
- Reactivo Folin-Ciocalteu: reactivo comercial diluido a  $\frac{1}{4}$
- Solución patrón de albúmina de suero bovino (del inglés, BSA) de concentración 1 mg/ml
- Muestra problema (diluir para evitar la saturación de la prueba)

### **Procedimiento experimental**

El ensayo realizado en microplacas es esencialmente un micro ensayo de Lowry que ha sido adaptado a microplacas.

Para realizar la curva patrón, se disuelve y diluye BSA a una concentración final de  $1\mu g/\mu l$  (1mg/ml). Se realizan una serie de diluciones (0, 1, 2.5, 5, 10 y 20  $\mu g/pocillo$ ) en réplicas de 3 con un volumen final de  $100\mu l$ . Las muestras se diluyen con el fin de que estén dentro del rango de

la curva patrón (0-25 µg/100µl). Después de que los estándares y las muestras se transfieran a las placas, se añade 200 µl del reactivo C a cada pocillo y se mezcla bien con un repetido pipeteo. La mezcla se incuba a temperatura ambiente y en oscuridad entre 10-15 minutos. A continuación, añadir a todos los pocillos 20 µl del reactivo Folin-Ciocalteau, mezclando bien. Dejar 30 minutos en oscuridad para que se desarrolle completamente la reacción coloreada. Leer la absorbancia utilizando un lector de placas (Fluorímetro, modelo Synergy HT, marca BioTek) a 650nm. Ajustar el aparato previamente a A=0 con el blanco (pocillo 0); de esa forma se mide el color producido por las proteínas, puesto que se resta el color debido a los reactivos.

### ***3.2 Medidas polarigráficas del consumo de oxígeno o respiración mitocondrial***

Los ensayos de consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas se realizaron con un sistema *Oxytherm* (Hansatech Instruments) equipado con un electrodo tipo Clark y temperatura controlada en la cámara de reacción a 25°C, utilizando 1mL del medio de respiración del tejido específico (mirar tabla del apartado 2.1) y con una agitación continua para asegurar la distribución uniforme del oxígeno disuelto a lo largo del experimento siguiendo el protocolo descrito con alguna modificación<sup>7,156</sup>. La determinación del control respiratorio mediante el electrodo de oxígeno se realizó con la adición de Glutamato/Malato como sustrato del complejo I de la cadena de respiración mitocondrial.

Brevemente, el protocolo que seguido es:

1. Añadir 1 ml del medio de respiración adecuado para cada tejido en la cámara de reacción del oxímetro. Cerrar la cámara ajustando el émbolo hasta que cubra todo el volumen.

2. Comenzar a grabar el consumo de oxígeno. Comprobar que la lectura es estable y que no hay saltos.
3. Esperar unos minutos a que se obtenga una lectura estable.
4. Utilizando una jeringa Hamilton adecuada añadir una suspensión mitocondrial para obtener una concentración final de 1 mg/ml. Se observará una bajada transitoria en la concentración de oxígeno debido al consumo de sustratos endógenos (estado 1).
5. Grabar el consumo de oxígeno hasta que se estabilice la lectura.
6. Con la ayuda de una jeringa Hamilton añadir una suspensión de Glutamato/Malato (sustrato complejo I) a 5 mM de concentración final. La suspensión mitocondrial comenzará entonces a consumir oxígeno (estado 2).
7. Grabar el consumo de oxígeno durante unos minutos.
8. Añadir ADP para obtener una concentración final de 500  $\mu$ M. Una bajada de la concentración de oxígeno se observará (estado 3). El ratio de consumo de oxígeno debe ser mayor que el ratio observado con los sustratos solos, indicando que se han obtenido mitocondrias acopladas.
9. Esperar unos minutos que se estabilice la respiración y vuelva a un ratio comparable con el anterior a la adición de ADP o añadir Oligomicina a 10 $\mu$ g/ml (inhibidor de la ATP-sintasa) para medir el escape basal de protones y como “inductor” del estado 4 en el que todo el ADP consumido es convertido a ATP
10. Por último, añadir un desacoplador mitocondrial FCCP (en etanol absoluto) a una concentración final de 250nM para determinar la capacidad máxima respiratoria al final de cada experimento y verificar así el buen estado de la preparación. La respiración debe alcanzar ratios mayores que los observados durante el estado 3.
11. Seguir grabando durante unos minutos más.

Las muestras de suspensión mitocondrial, las soluciones stock de sustratos e inhibidores se mantuvieron en hielo en todo momento durante el análisis de respiración mitocondrial.

### ***3.3 Ensayo del potencial de membrana mitocondrial mediante la captación de JC-1***

La integridad de la membrana mitocondrial interna se estudió midiendo su potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ). Para ello se midió la captación del fluorocromo catiónico JC-1<sup>139,140</sup> dentro de la matriz mitocondrial mediante el kit comercial *Mitochondria Isolation Kit MITOISO1* (Sigma-Aldrich) con algunas modificaciones.

Las preparaciones se realizan como indica el protocolo siguiente en una placa de 24 pocillos. Brevemente:

1. Preparar la tinción de JC-1 y la solución de ensayo de JC-1 como se describe a continuación: Solución stock JC-1 a 1mg/mL en DMSO - 20°C. Para el ensayo, diluir la solución 5 veces en DMSO: solución JC-1 a 0.2mg/mL. Concentración final de JC-1 a 0.2µg/mL
2. Diluir la suspensión mitocondrial obtenida del aislamiento mitocondrial en la solución de conservación 1X a 1mg/mL de proteína y tomar muestras de 25µg de proteína para el ensayo de JC-1 en cada uno de los pocillos excepto en el blanco.
3. Preparar las muestras como indica la tabla 5.
4. En otro pocillo, añadir antimicina A (2 µM) y en otro, FCCP (250nM).
5. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad
6. Añadir la solución de JC-1 mezclando bien.

7. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
8. Medir la fluorescencia utilizando un lector de placas (Fluorímetro, modelo Synergy HT, marca BioTek) ( $\lambda$  excitación: 490nm;  $\lambda$  emisión: 525 y 590nm).

**Tabla 5. Preparación de los reactivos para la realización del ensayo de JC-1.**

Muestra	Medio de ensayo 1X	Medio de conservación	Muestra	Solución JC-1
Blanco	950 $\mu$ L	50 $\mu$ L	-	1 $\mu$ L
Fracción mitocondrial	950 $\mu$ L	50-X $\mu$ L	X $\mu$ L	1 $\mu$ L

El ratio de fluorescencia 590/530nm (naranja-rojo/verde) se consideró como indicador del potencial de membrana mitocondrial.

### ***3.4 Análisis por citometría de flujo de la producción de especies oxidativas***

El análisis de citometría de flujo se llevó a cabo utilizando un citómetro equipado con un láser de argón de 488 nm, Cytomics FC500 MCL (Beckman Coulter). Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa informático de análisis Kaluza v1.3 (Beckman Coulter). Los eventos adquiridos por muestra fueron de 10,000 como condición de parada, con una velocidad de flujo lenta para evitar la aparición de dobletes.

Tanto las muestras de mitocondrias aisladas como las de células mononucleares sanguíneas fueron estudiadas bajo condiciones basales y tras la exposición *in vitro* de desacoplantes o inhibidores de la cadena de transporte mitocondrial (CTM), así como a sustancias pro oxidantes exógenas.

Las muestras de **células mononucleares sanguíneas (CMN)** fueron sometidas a condiciones de estrés oxidativo mediante la adición de inductores como: tert-butilhidroperóxido (t-BHP), ampliamente usado en muchos estudios como un compuesto modelo de hidroperoxidación<sup>65,138</sup> y plumbagina (PB), que ha sido utilizada como agente para generar anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). También se adicionó carbonilcianuro-p-trifluorometoxihidrazona (FCCP), un ionóforo que desacopla la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria, disipando el potencial de membrana mitocondrial (tabla 6).

Del mismo modo, las muestras de **mitocondrias aisladas** fueron sometidas a condiciones de estrés oxidativo mediante inductores como la citada anteriormente plumbagina (PB), antimicina A (Ant A), un inhibidor del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial y generador de especies reactivas de oxígeno, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), un producto químico poderosamente oxidante y NOR-1 ((±)-(E)-Metil-2-[(E)-hidroximino]-5-nitro-6-metoxi-3-hexanamida), un donante de NO (tabla 6).

**Tabla 6. Inductores de Estrés Oxidativo utilizados en los ensayos de citometría de flujo.**

	<b>Acción</b>	<b>Muestra</b>	<b>Bibliografía</b>
<b>t-BHP</b>	Agente químico oxidante	CMN	62,117,129,149
<b>PB</b>	Agente químico oxidante	CMN / Mitocondrias	159
<b>FCCP</b>	Desacoplador CTM	CMN / Mitocondrias	139,140
<b>Antimicina A</b>	Inhibidor del complejo III de CTM	Mitocondrias	97,130,136
<b>NOR-1</b>	Donante de NO	Mitocondrias	147,148
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Agente químico oxidante	Mitocondrias	138

Los **fluorocromos** empleados (tabla 7) para el estudio de las especies oxidantes fueron:

- HE (5µg/mL, ex. 488nm, em. 625nm, detector FL3 Log) para detectar niveles del radical superóxido en células mononucleares sanguíneas.
- DHRH123 (1µg/mL, ex. 488nm, em. 525nm; detector FL1 Log) para detectar niveles de peróxido de hidrogeno, del radical hidroxilo y el anión peroxinitrito en leucocitos y mitocondrias aisladas.
- MitoSOX Red (1,25µM, ex. 488nm, em. 625nm; detector FL3 Log) para detectar niveles del radical superóxido en mitocondrias aisladas.

## METODOLOGÍA

- DCFH-DA (5µg/mL, ex. 488nm, em. 522nm; detector FL1Log) para detectar niveles de peróxido de hidrogeno y del radical hidroxilo en mitocondrias aisladas.
- TMRM (150nM; ex. 488nm, em. 625nm; detector FL3 Log) para medir el potencial de membrana mitocondrial en células mononucleares sanguíneas.
- Rh123 (75ng/mL; ex. 488nm, em. 525nm; detector FL1 Log) para medir el potencial de membrana mitocondrial en células mononucleares sanguíneas.
- DAF (10µM; ex. 488nm, em. 515nm; detector FL1 Log) para detectar niveles de NO en mitocondrias aisladas.

**Tabla 7. Resumen fluorocromos utilizados en los ensayos de citometría de flujo.**

<b>Fluorocromo</b>	<b>Concentración</b>	<b><math>\lambda_{ex.}/</math> <math>\lambda_{em.}</math> (nm)</b>	<b>Detector citómetro</b>	<b>Tiempo incubación</b>
<b>HE</b>	5µg/mL	488/625	FL3 Log	15 minutos
<b>DHRH123</b>	1µg/mL	488/525	FL1 Log	30 minutos
<b>MitoSOX Red</b>	1,25µM	488/625	FL3 Log	30 minutos
<b>DCFH-DA</b>	5µg/mL	488/522	FL1 Log	30 minutos
<b>TMRM</b>	150nM	488/625	FL3 Log	15 minutos
<b>Rh123</b>	75ng/m	488/525	FL1 Log	15 minutos
<b>DAF</b>	10µM	488/515	FL1 Log	15 minutos

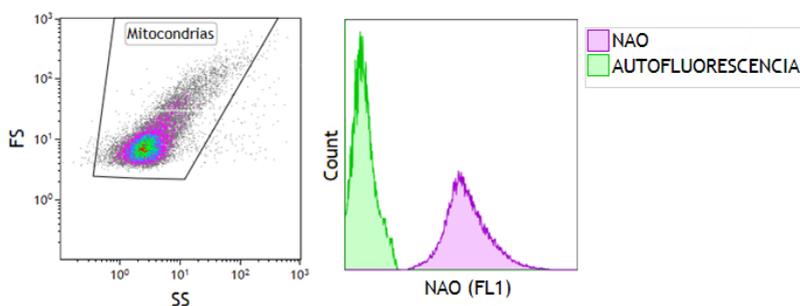
### 3.4.1 En mitocondrias aisladas

Los homogenados mitocondriales (0,125mg proteína/mL en medio de respiración específico para cada tejido) fueron incubados en presencia de antimicina A (5µM, 15 minutos) y plumbagina (25µg/mL, 30 minutos) a 37°C por separado y teñidos con DHRH123, MitoSOX Red y DCFH-DA durante 15 minutos a 37°C. Además, los homogenados fueron tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100µM, 30 minutos) a 37°C y teñidos con DHRH123 y DCFH-DA durante 15 minutos a 37°C. En los homogenados teñidos previamente con DAF durante 15 minutos a 37°C se realizó una cinética añadiendo 25µM de NOR (tabla 8).

**Tabla 8. Resumen agentes inductores pro-oxidantes utilizados en los ensayos de citometría de flujo con mitocondrias aisladas**

Agente	Concentración	Condiciones incubación	Fluorocromos
<b>PB</b>	25µg/mL	30 minutos Temperatura ambiente	DHR, Mitosox, DCF
<b>FCCP</b>	10 µM	15 minutos Temperatura ambiente	Rh123
<b>Antimicina A</b>	5µM	15 minutos Temperatura ambiente	DHR, Mitosox, DCF
<b>NOR-1</b>	25µM	Cinética	DAF
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	100µM	30 minutos Temperatura ambiente	DHR, DCF

Las mitocondrias se seleccionaron en el citómetro de flujo mediante sus características morfológicas de tamaño (Forward Scatter, FS) y granularidad (Side Scatter, SS) (figura 23) en escala logarítmica procedente de la dispersión de luz <sup>129,132</sup> y con el discriminador por tamaño (FS), con un valor de 2. La población morfológica se verificó mediante un marcador fluorescente selectivo de mitocondrias, NAO (100nM, excitación 488 nm y emisión 525 nm) que se une a la cardiolipina en la membrana interna mitocondrial.



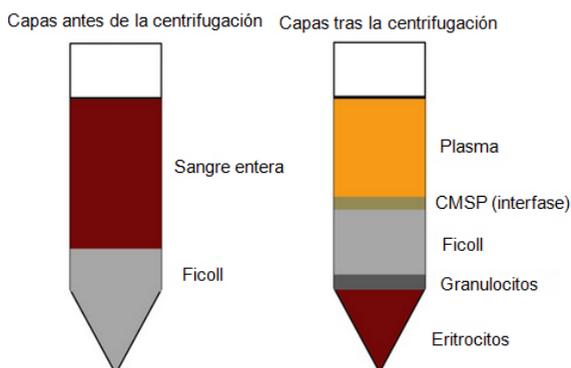
**Figura 23. Selección de mitocondrias aisladas según el perfil morfológico de dispersión de luz y según su marcaje con NAO.** En dicho gráfico de FS/SS (Log, Area) de mitocondrias aisladas, se asume que la ventana de selección corresponde con la fracción mitocondrial después del protocolo de aislamiento por su marcaje positivo para el fluorocromo NAO

El estudio de la generación de ROS y RNS se basó en los cambios en FL1 de DHR123, DCF y DAF y en FL3 de Mitosox.

### 3.4.2 En células mononucleares de sangre periférica

Para obtener células mononucleares de sangre periférica (CMN) se empleó el método de separación por gradiente de Ficoll como sigue:

1. Dispensar 1000  $\mu\text{L}$  de Ficoll Histopaque 1.077 en un tubo eppendorf de 1.5 mL colocado verticalmente sobre una gradilla estable, mantenido a temperatura ambiente.
2. Dispensar cuidadosamente 500  $\mu\text{L}$  de sangre entera anticoagulada, evitando que se mezcle con el Ficoll.
3. Dejar reposar durante 20 minutos el tubo abierto para que los eritrocitos se agreguen en presencia del Ficoll y precipiten a gravedad normal.
4. Centrifugar los tubos eppendorf a 3000 r.p.m. durante 10 minutos.
5. Cuando hayan precipitado los eritrocitos, aspirar cuidadosamente la parte superficial de la capa superior al Ficoll o interfase (halo de células mononucleares) tal y como muestra la siguiente imagen:

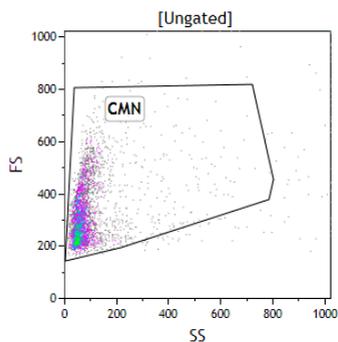


6. Dispensar alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  de las células mononucleares en un tubo de citometría de 12x75 mm.
7. Incubar los tubos por separado en presencia de t-BHP (100 $\mu\text{M}$ , 1h, 37°C) y PB (50 $\mu\text{g/ml}$ , 30 min, 37°C) como inductores de estrés oxidativo; y FCCP (20 $\mu\text{M}$ , 30 min, 37°C) como desacoplador del potencial de membrana mitocondrial. (tabla 9)
8. Añadir HE (5 $\mu\text{g/ml}$ , 15 min, 37°C) a los tubos inducidos con PB y DHRH123 (1 $\mu\text{g/ml}$ , 15 min, 37°C) a los tubos inducidos con t-BHP para el estudio del efecto inductor en el estrés oxidativo. Para el

estudio de la despolarización del potencial de membrana mitocondrial añadir TMRM (150nM, 15 min, 37°C) a los tubos con FCCP.

9. Diluir 1/10 (900 µL) con PBS a 37°C.
10. Analizar por citometría de flujo.

Las células mononucleares se seleccionaron en el citómetro de flujo mediante sus características morfológicas de tamaño (*Forward Scatter*, FS) y granularidad (*Side Scatter*, SS) (figura 24) en escala lineal procedente de la dispersión de luz y con el discriminador por tamaño (FS), con un valor alrededor de 80.



**Figura 24.** Selección de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) según el perfil morfológico de dispersión de luz (FS, Forward Scatter y SS, Side Scatter) obtenidas a partir de un gradiente de Ficoll.

El estudio de la generación de ROS se basó en los cambios en FL1 de DHR123 y en FL3 de HE, mientras que el estudio del potencial de membrana mitocondrial se basó en los cambios en FL3 de TMRM.

**Tabla 9. Resumen agentes inductores pro-oxidantes utilizados en los ensayos de citometría de flujo con células mononucleares de sangre periférica**

Agente	Concentración	Condiciones incubación	Fluorocromos
<b>t-BHP</b>	100µM	1 hora Temperatura ambiente	DHR
<b>PB</b>	50µg/mL	30 minutos Temperatura ambiente	DHR, Mitosox, DCF
<b>FCCP</b>	20 µM	15 minutos Temperatura ambiente	Rh123

#### 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

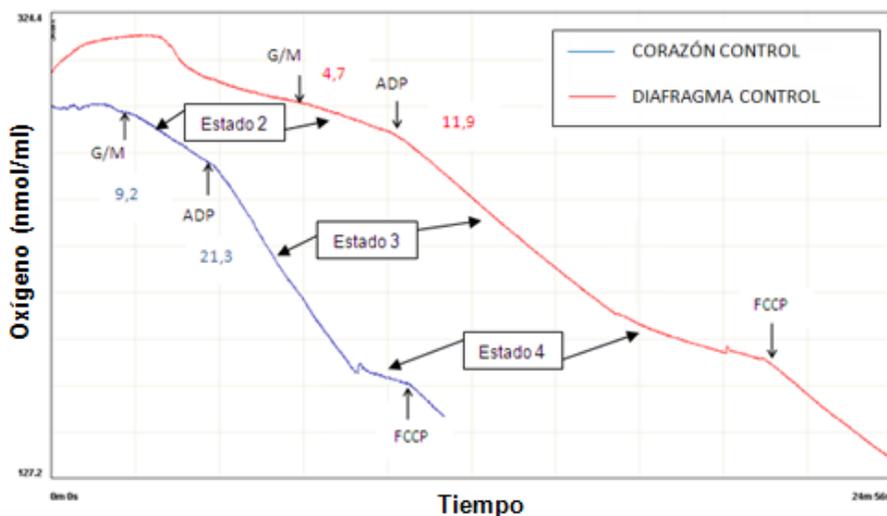
Los datos son expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de dos a seis experimentos por duplicado. Para realizar las comparativas citadas en el apartado *Metodología* se ha usado un análisis de la t-Student apareado (comparativa basal vs inducido) o desapareado (comparativa cada dos de los grupos experimentales) y un análisis de la varianza ANOVA (comparativa entre tejidos), considerando un valor de *p* menor de 0,05 como estadísticamente significativo, mediante el programa GraphPad PRISM.

## **RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL**



## 1. MEDIDAS POLARIGRÁFICAS DEL CONSUMO DE OXÍGENO

La figura 25 muestra el típico trazo polarigráfico del consumo de oxígeno mitocondrial mediante el uso de un electrodo de oxígeno. La respiración se inicia con la adición de homogenados mitocondriales como se indica en el apartado *Material y Métodos* y continúa con la adición del sustrato del complejo I, Glutamato/Malato, midiendo así el consumo endógeno de oxígeno (Estado 2). A continuación, se añade una cantidad determinada de ADP y se graba la respiración máxima (Estado 3). Una vez se ha consumido el ADP volviendo a la respiración basal (Estado 4) se añade el desacoplador FCCP que activa de nuevo el consumo de oxígeno.



**Figura 25. Consumo de oxígeno en músculo cardíaco y músculo de diafragma en conejos del grupo control.** Los homogenados mitocondriales se resuspendieron a 1mg/mL, en el medio de respiración correspondiente para cada tejido a 25°C. Las concentraciones finales de las adiciones indicadas fueron: Glutamato/Malato 5mM, ADP 500µM, FCCP 250nM. Parámetros: nmolO<sub>2</sub>/mL (eje de ordenadas) frente a tiempo (eje de abscisas).

La tabla 10 compara los resultados de los ensayos de respiración mitocondrial en homogenados de hígado, miocardio y diafragma, obtenidos de conejos de los grupos control, entrenado y falso operado.

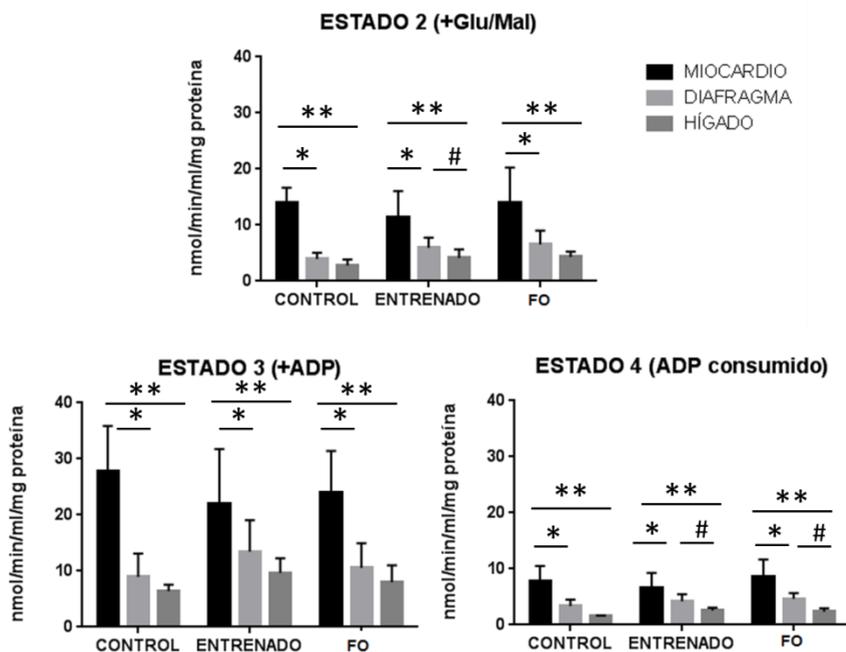
**Tabla 10. Ratios de respiración medidos tras la adición de ADP 500  $\mu$ M y expresados como  $\text{nmolO}_2/\text{min}/\text{ml}/\text{mg}$  de proteína.**

Tejido	Tipo animal	n	Estado 2 (+Glu/Mal)	Estado 3 (+ADP)	Estado 4 (ADP consumido)	Ratio estado 3/2	Ratio estado 3/4
Hígado	C	3	4,31 $\pm$ 0,25	10,27 $\pm$ 2,23	3,23 $\pm$ 0,10	2.38	3,58
	E	6	4,74 $\pm$ 0,87	9,63 $\pm$ 2,34	2,61 $\pm$ 0,54	2.03	3,73
	FO	4	4,31 $\pm$ 0,94	9,01 $\pm$ 2,38	2,38 $\pm$ 0,59	2.10	3,79
Miocardio	C	4	14,88 $\pm$ 1,67	27,87 $\pm$ 7,98	9,02 $\pm$ 1,56	1.87	3,1
	E	6	14,92 $\pm$ 2,09	28,56 $\pm$ 3,82	8,94 $\pm$ 1,83	1.91	3,2
	FO	4	20,06 $\pm$ 1,31	29,62 $\pm$ 3,49	11,61 $\pm$ 0,78	1.48	2,55
Diafragma	C	2	3,98 $\pm$ 1,11	8,97 $\pm$ 4,15	3,34 $\pm$ 1,19	2.25	2,69
	E	6	9,75 $\pm$ 1,46	18,79 $\pm$ 2,96	5,56 $\pm$ 0,74	1.96	3,38
	FO	3	10,53 $\pm$ 0,54	16,84 $\pm$ 2,48	7,38 $\pm$ 1,64	1.60	2,28

Los experimentos se realizaron con el sustrato Glutamato/Malato (Glu/Mal) 5 mM en mitocondrias aisladas de distintos tipos grupos de animales como se indica en el apartado Material y Métodos. Media  $\pm$  DE.  
Tipos de animal: C, conejos control; E, conejos entrenados; FO, conejos falsos operados. n, número de animales ensayados.

El ratio de control de la respiración (RCR: estado 3 dividido por estado 4) refleja el control de consumo de oxígeno por fosforilación o grado de “acoplamiento”, como se ha descrito en la bibliografía.

Las mitocondrias aisladas de los tres tejidos respondieron correctamente a los distintos estímulos (figura 26) en los tres grupos de experimentación.



**Figura 26. Diagramas para cada uno de los grupos de animales en cada estado (descritos anteriormente) según los distintos tejidos (leyenda).** Parámetros:  $\text{nmolO}_2/\text{mL}/\text{mg}$  proteína (eje de ordenadas) frente a los grupos de experimentación, FO: Falso operado (eje de abscisas). \* indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) Miocardio vs. Diafragma; # indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) Diafragma vs. Hígado; \*\* indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) Miocardio vs. Hígado.

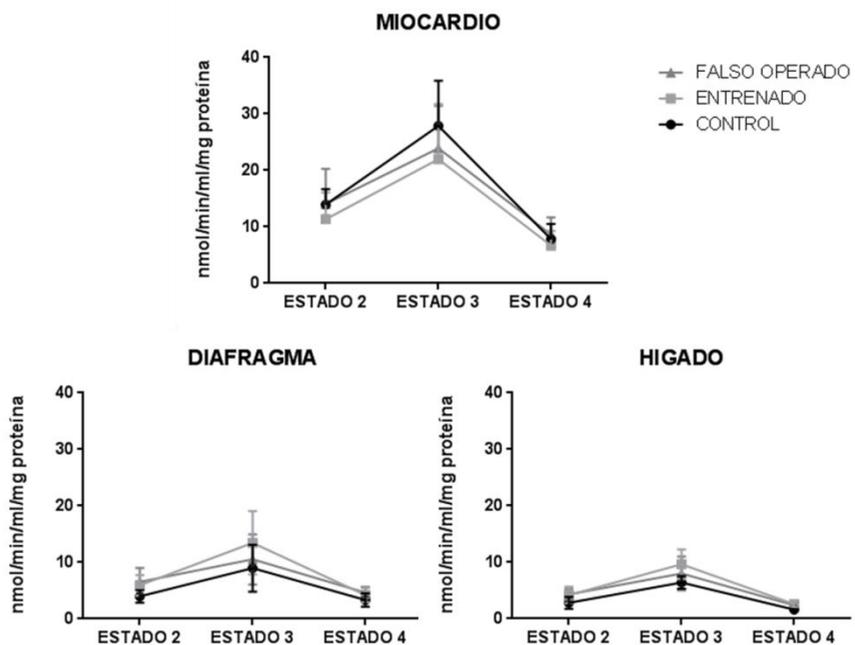
Cuando se compararon dentro de cada grupo de experimentación los valores de respiración **según cada tejido**, se encontraron diferencias significativas entre los tejidos miocardio vs diafragma y miocardio vs hígado en todos los estados respiratorios, e incluso entre el hígado y diafragma en el estado 4 (respiración basal por el ADP consumido) en los grupos entrenado y falso operado. Estas diferencias son debidas a los valores superiores de los ratios de respiración en las mitocondrias de miocardio en comparación con los del diafragma y más notablemente con el hígado, que

presenta valores muy inferiores. Aun así, se observa que los tres estados se comportan más o menos de manera proporcional a nivel de los tejidos.

Que el miocardio sea el tejido donde mayor respiración se produce no es de extrañar, ya que las mitocondrias son muy abundantes en el corazón, por ser un tejido de gran demanda energética, donde constituyen un 20-40% del volumen celular y donde trabajan continuamente, por lo que deben tener valores relativamente altos de ADP incluso en reposo<sup>39</sup>.

Cuando la comparación se realizó según **los grupos de experimentación** para cada tejido (figura 27), no se observó ninguna diferencia entre dichos grupos, por lo que no se ha encontrado efecto ni del entrenamiento ni de la administración de atropina sobre el consumo de oxígeno.

Si se observan los valores de control respiratorio obtenidos cuando los sustratos glutamato y malato fueron oxidados, se encuentran entre 2,5 y casi 4 (tabla 10). Dichos ratios tampoco no revelan diferencias significativas entre los distintos grupos de animales, Ahora bien, los datos muestran que el tejido con mayor RCR es el hígado, a pesar de que el miocardio presenta mayores valores de consumo de oxígeno.



**Figura 27. Curvas comparativas entre los diferentes tejidos según grupo de experimentación.** Parámetros:  $\text{nmolO}_2/\text{mL}/\text{mg}$  proteína (eje de ordenadas) frente los estados de respiración (eje de abscisas). No se encuentran diferencias significativas entre los grupos experimentales (leyenda).

Dichos valores de RCR, se encuentran, algunos de ellos, próximos a 4, que es el valor indicativo de un buen grado de acoplamiento descrito en la bibliografía <sup>13,14,156,160</sup>. En dichos estudios se detalla cómo proceder a la obtención de homogenados mitocondriales de diferentes tejidos de la manera más adecuada. En el caso de este estudio, el protocolo seguido ha sido el del kit comercial MITOISO1 de Sigma, pero teniendo en cuenta los puntos críticos que aparecen en los artículos citados. Aun así, los tejidos de miocardio y diafragma presentan valores bajos de RCR. Y es a esto a lo que podría deberse la diferencia de dicho valor del hígado respecto a los otros dos tejidos, y es que el hígado como tejido blando ha seguido un proceso más suave a la hora de aislar las mitocondrias, por lo que puede ser que el

método de disgregación muscular haya afectado a las preparaciones finales. Además, puntualizar que en la obtención de mitocondrias aisladas entran muchos factores en juego, desde los componentes de las soluciones de trabajo, el pH de las mismas, la variación en la temperatura, hasta la contaminación del producto final con ácidos grasos, lisosomas, peroxisomas, microsomas<sup>161</sup> y ATPasas y restos musculares<sup>15</sup>.

Respecto al posible efecto del entrenamiento sobre los valores de RCR, que en nuestro caso no se ha visto que estén relacionados, son varios los estudios realizados, incluso con conclusiones contradictorias<sup>51</sup>. En algunos casos, se ha encontrado una disminución del índice RCR en el hígado y homogenados musculares de ratas o humanos exhaustos debido al incremento del ratio de respiración basal (estado 3) respecto a una disminución del ratio máximo de respiración (estado 4)<sup>45,84,162</sup>. Sin embargo, otras muestras musculares tomadas 30 o 60 minutos después de terminar el ejercicio mostraron una reducción progresiva en RCR, relacionada de manera significativa con un mayor valor del estado 4. Estos resultados por tanto, indican la influencia de los tiempos de recogida de muestra tras el ejercicio en los valores RCR.

Por otro lado, muchos otros investigadores no han encontrado diferencias significativas de los valores de RCR en diferentes tejidos como hígado, músculo cardíaco o músculo esquelético entre animales controles y ejercitados<sup>47,57</sup>, debido a un incremento paralelo entre la respiración basal y máxima. Estos resultados podrían indicar que tanto la integridad de la membrana mitocondrial como la función respiratoria se encuentran preservadas durante la práctica de ejercicio severo.

Es difícil encontrar una explicación para los resultados discrepantes mencionados. Aparte de las diferencias en el tejido y el protocolo o tipo de ejercicio, la variabilidad en los resultados puede depender de los procedimientos utilizados para determinar la función mitocondrial. Las

mediciones llevadas a cabo en homogenados de tejido o preparaciones mitocondriales ofrecen ventajas, pero también muestra algunas limitaciones y está sujeto a una serie de artefactos potenciales. La medición de la respiración mitocondrial en los homogenados mitocondriales debe evaluarse lo más rápidamente posible después del ejercicio. Pero esta medición puede llevarse a cabo más o menos una hora después del sacrificio cuando los efectos dañinos del ejercicio podrían haber desaparecido. Además, aunque en la preparación de los homogenados de mitocondrias se intenta evitar la interferencia de otros componentes celulares, la difusión de oxígeno y otros metabolitos no está restringida. Existe un peligro potencial de daño mitocondrial durante la desintegración mecánica de los tejidos, y la estructura y la función de las mitocondrias puede verse afectada durante el aislamiento por homogeneización y centrifugación diferencial. Por otra parte, los procedimientos anteriores pueden resultar en una pérdida de una gran fracción de las mitocondrias de modo que las mitocondrias obtenidas a partir del homogeneizado de tejido podrían no ser representativas de toda la población mitocondrial. Por otro lado, existen estudios donde se estudia las fibras musculares gracias a la permeabilidad con saponina, donde las mitocondrias mantienen la estructura y función intacta. Es posible que este tipo de técnicas arroje luz sobre los efectos del ejercicio sobre la función mitocondrial. Sin embargo, su aplicación hasta ahora queda limitada a la musculatura humana.

El hecho de no haber encontrado diferencias entre los grupos sugiere que la función mitocondrial se ha conservado en los tres tejidos a pesar del requisito metabólico intenso por parte del ejercicio.

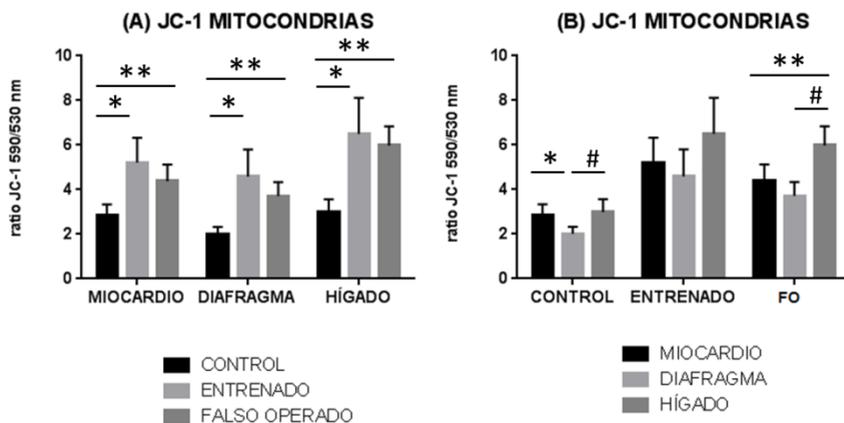
## **2. ENSAYO DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL MEDIANTE LA SONDA JC-1**

El ratio de fluorescencia de longitudes de onda 590/530 nm (naranja-rojo/verde), mediante el uso del marcador fluorescente JC-1, se consideró como indicador del potencial de membrana mitocondrial.

En los ensayos realizados, se adicionaron compuestos que causaron un bloqueo de la cadena de transporte de electrones, seguido de una bajada significativa del potencial de membrana (ya que se despolariza), como la antimicina A (inhibidor Complejo III) o FCCP (desacoplador mitocondrial) demostrando una bajada drástica de la fluorescencia de JC-1 debido a una igualación de la concentración de JC-1 entre el interior y exterior de la matriz mitocondrial (figura 29). De ese modo, el ratio 590/530nm disminuye, pasando de una fluorescencia naranja-roja propia de los J-agregados en el interior de las mitocondrias intactas, a fluorescencia verde, donde JC-1 permanece en su forma monomérica, fuera de ella.

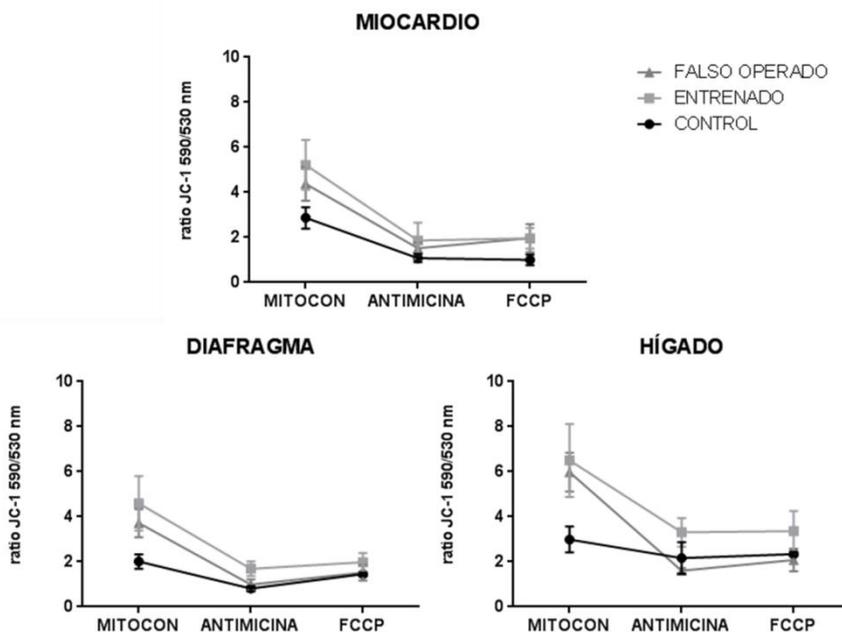
Si se tiene en cuenta este potencial de membrana de los homogenados de mitocondrias, sin la adición de ningún compuesto mencionado (figura 28), se observan diferencias significativas dentro de los grupos de experimentación entre el grupo control y entrenado y entre grupo control y falso operado y es, que los homogenados mitocondriales de los grupos entrenados y falsos operados presentan ratios de fluorescencia mucho mayores que los del grupo control (figura 28A) en todos los tejidos. Si se compara según tejidos (figura 28B), no se observan diferencias dentro del grupo de entrenados, pero sí en el grupo control, donde los ratios del miocardio e hígado son mayores que el del diafragma. Dentro del grupo falso operado, sólo se observan diferencias entre el corazón y el hígado y

entre el diafragma y el hígado, donde este último presenta valores de ratio superiores.



**Figura 28. Diagramas del potencial de membrana mediante el ensayo por captación de JC-1 en homogenados mitocondriales.** En (A) \* indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Control vs. Entrenado; # indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Entrenado vs. Falso operado (FO); \*\* indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Control vs. Falso operado. En (B) según el grupo animal estudiado, \* indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Miocardio vs. Diafragma; # indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Diafragma vs. Hígado; \*\* indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Miocardio vs. Hígado.

Cuando se adicionan los compuestos mencionados inicialmente, se observa efectivamente un descenso del ratio de fluorescencia al despolarizarse la mitocondria (figura 29). En los gráficos, además puede observarse, que aunque los tres tejidos estudiados tienen similar comportamiento, aparece un ratio mayor y captación del marcador JC-1, con lo cual un mayor potencial de membrana, en las mitocondrias de hígado. Si comparamos estos resultados con los obtenidos con los estudios poligráficos, esto podría explicar por qué las mitocondrias de hígado presentan valores superiores de RCR en comparación con los otros tejidos y es que podrían encontrarse en un estado fisiológico más “sano”.



**Figura 29. Diagramas del potencial de membrana mediante JC-1 para cada uno de los tejidos según el grupo de experimentación.** Concentraciones siguiendo el kit comercial MITOISO1, Sigma. JC-1 a 0.2µg/ml; antimicina A 2µM; FCCP 250nM. \* indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Control vs. Entrenado; # indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Entrenado vs. Falso operado; \*\* indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Control vs. Falso operado; Mitocon: homogenados mitocondriales

A la vista de las imágenes de la figura 29, no sólo se observa que los grupos entrenado y falso operado presentan mayores ratios de fluorescencia, sino que además son más sensibles a la inhibición de la cadena de transporte mitocondrial mediante antimicina A y al efecto desacoplante del agente FCCP, al presentar mayores pendientes en el gráfico respecto al grupo control y de forma similar, aunque un poco más pronunciada en el hígado cuando se añade el inhibidor.

Por tanto, a la vista de los resultados, la administración de atropina parece que produce el mismo efecto en los tres tejidos, afectando al

potencial de membrana (menor), pero que es revertido con la práctica de ejercicio, aumentando en el grupo entrenado y provocando además, una menor sensibilidad ante compuestos que producen la despolarización de la membrana mitocondrial.

### **3. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES OXIDANTES**

#### **3.1 *En mitocondrias aisladas***

##### **3.1.1 Comparación Basal vs Inducido**

Este primer análisis se llevó a cabo mediante la comparación de la intensidad media de fluorescencia (unidades arbitrarias de fluorescencia) inducida con los diferentes sustratos oxidantes y la intensidad media de fluorescencia basal, para cada sonda fluorescente y que se expresa como un ratio entre ambos, en cada tejido y dentro de cada grupo experimental. Del ratio de cada sujeto de estudio se calculó la media y la desviación estándar.

Estos ratios se muestran en las siguientes tablas para cada tejido estudiado (tabla 11, Miocardio; tabla 12, Diafragma; tabla 13, Hígado).

**RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL**

**Tabla 11.** Estudio de los cambios en los niveles de anión superóxido, peróxidos, radical NO y potencial de membrana en las mitocondrias de **miocardio** del grupo control, entrenado y falso operado tratados con antimicina A (ANT, 5µM), plumbagina (PB, 25 µg/mL), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100µM), NOR-1 (25µM) y FCCP (10 µM).

MIOCARDIO		CONTROL	ENTRENADO	FALSO OPERADO
<b>MITOSOX</b>	Basal	1	1	1
	ANT	2.45±1.76	2.28±1.43	1.83±0.19*
	Basal	1	1	1
	PB	1.10±0.25	1.13±0.19	1.00±0.27
<b>DHR</b>	Basal	1	1	1
	ANT	1.56±1.05	1.33±0.42	2.11±0.73
	Basal	1	1	1
	PB	3.10±1.16*	3.37±1.14*	2.71±0.50*
	Basal	1	1	1
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5.23±2.24*	5.17±4.35	4.88±4.81
<b>DCF</b>	Basal	1	1	1
	ANT	1.08±0.12	1.23±0.74	1.9±0.83
	Basal	1	1	1
	PB	1.48±0.46	1.42±0.59	0.96±0.36
	Basal	1	1	1
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4.55±1.42*	5.63±3.02*	8.15±3.19*
<b>DAF</b>	Basal	1	1	1
	NOR-1	23.71±7.70*	16.52±12.88*	19.74±0.48*
<b>RH-123</b>	Basal	1	1	1
	FCCP	1.07±0.11	0.9±0.16	0.91±0.16
n		6	6	4

n: número de animales estudiados. Ratio inducido vs basal expresados como intensidad media de fluorescencia ± desviación estándar (IMF±DE), \* indica que hay diferencias significativas (p≤0.05) entre el basal y el inducido.

**RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL**

**Tabla 12.** Estudio de los cambios en los niveles de anión superóxido, peróxidos, radical NO y potencial de membrana en las mitocondrias de **diafragma** del grupo control, entrenado y falso operado tratados con antimicina A (ANT, 5µM), plumbagina (PB, 25 µg/mL), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100µM), NOR-1 (25µM) y FCCP (10 µM).

DIAFRAGMA		CONTROL	ENTRENADO	FALSO OPERADO
<b>MITOSOX</b>	Basal	1	1	1
	ANT	2.21±0.72*	1.59±0.28*	1.77±0.47*
	Basal	1	1	1
	PB	1.14±0.22	1.04±0.14	0.79±0.20
<b>DHR</b>	Basal	1	1	1
	ANT	1.65±0.65	1.33±0.54	1.48±0.39
	Basal	1	1	1
	PB	5.11±2.66*	2.51±0.64*	2.03±0.57*
	Basal	1	1	1
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3.35±1.60*	2.44±1.37	3.89±1.39
<b>DCF</b>	Basal	1	1	1
	ANT	0.93±0.25	1.21±0.74	1.21±0.17
	Basal	1	1	1
	PB	1.91±0.64*	1.15±0.37	0.86±0.31
	Basal	1	1	1
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3.41±1.35*	2.36±0.87*	2.93±0.91*
<b>DAF</b>	Basal	1	1	1
	NOR-1	48.81±6.44*	85.76±7.51*	10.09±1.87*
<b>RH-123</b>	Basal	1	1	1
	FCCP	1.03±0.17	0.81±0.37	1.06±0.01
n		6	6	4

n: número de animales estudiados. Ratio inducido vs basal expresados como intensidad media de fluorescencia ± desviación estándar (IMF±DE), \* indica que hay diferencias significativas (p≤0.05) entre el basal y el inducido.

**RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL**

**Tabla 13.** Estudio de los cambios en los niveles de anión superóxido, peróxidos, radical NO y potencial de membrana en las mitocondrias de **hígado** del grupo control, entrenado y falso operado tratados con antimicina A (ANT, 5µM), plumbagina (PB, 25 µg/mL), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100µM), NOR-1 (25µM) y FCCP (10 µM).

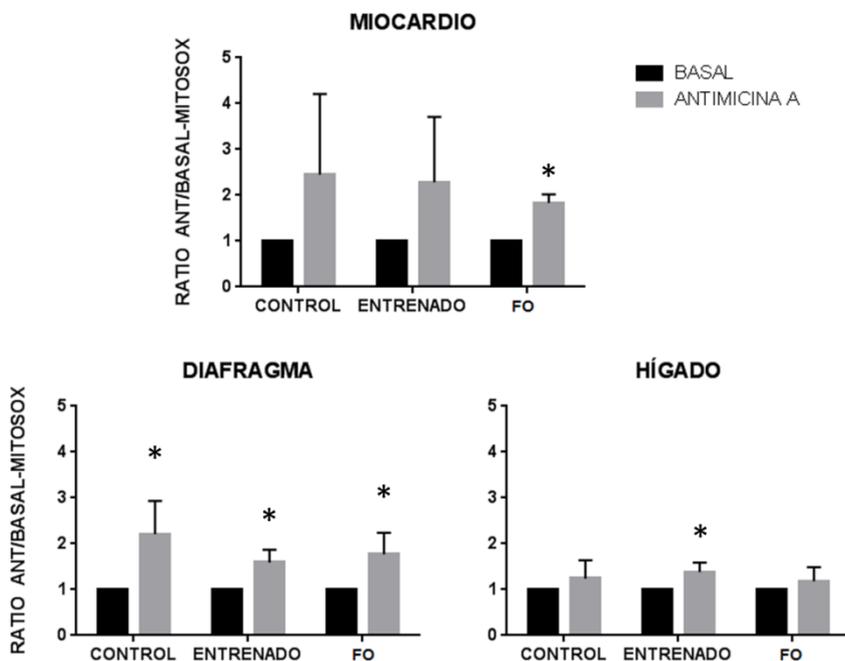
<b>HÍGADO</b>		<b>CONTROL</b>	<b>ENTRENADO</b>	<b>FALSO OPERADO</b>
<b>MITOSOX</b>	<b>Basal</b>	1	1	1
	<b>ANT</b>	1.24±0.40	1.38±0.21*	1.18±0.31
	<b>Basal</b>	1	1	1
	<b>PB</b>	1.32±0.33	1.50±0.46	1.27±0.50
<b>DHR</b>	<b>Basal</b>	1	1	1
	<b>ANT</b>	0.81±0.18	0.81±0.25	1.06±0.22
	<b>Basal</b>	1	1	1
	<b>PB</b>	3.68±2.7*	3.21±1.22*	4.04±1.53*
	<b>Basal</b>	1	1	1
	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	1.04±0.11	1.00±0.20	1.02±0.05
<b>DCF</b>	<b>Basal</b>	1	1	1
	<b>ANT</b>	0.77±0.23	0.75±0.25	0.77±0.41
	<b>Basal</b>	1	1	1
	<b>PB</b>	4.75±2.55*	4.50±2.46*	3.36±0.26*
	<b>Basal</b>	1	1	1
<b>DAF</b>	<b>Basal</b>	1	1	1
	<b>NOR-1</b>	40.10±5.37*	48.68±27.38*	32.72±2.69*
	<b>Basal</b>	1	1	1
<b>RH-123</b>	<b>Basal</b>	1	1	1
	<b>FCCP</b>	0.84±0.23	0.85±0.14	0.83±0.13
<b>n</b>		6	5	4

n: número de animales estudiados. Ratio inducido vs basal expresados como intensidad media de fluorescencia ± desviación estándar (IMF±DE), \* indica que hay diferencias significativas (p≤0.05) entre el basal y el inducido.

✓ **Inducción con antimicina A**

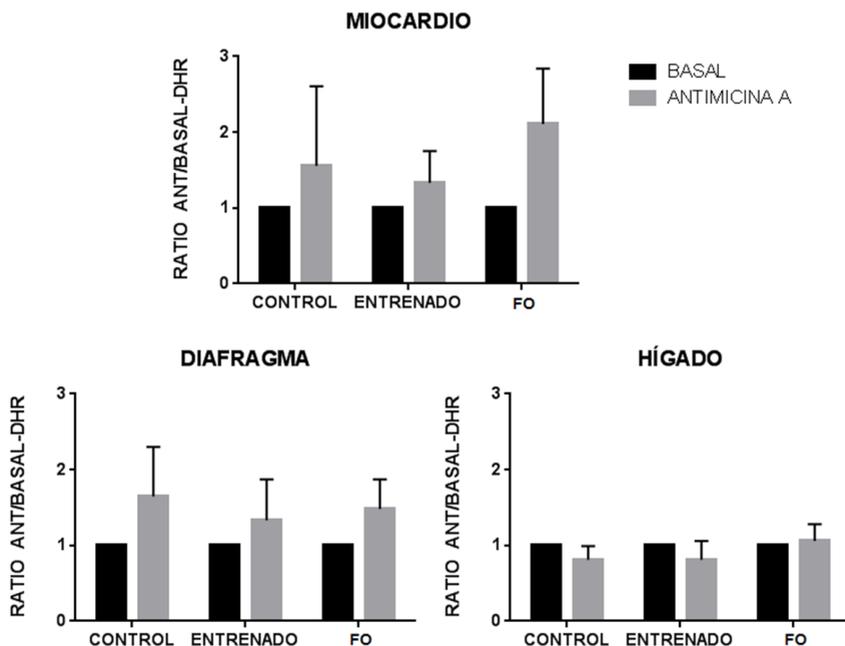
Para inducir la generación de anión superóxido se añadió a los homogenados mitocondriales, el inhibidor del complejo III de la membrana mitocondrial, la antimicina A, tal y como indica en la literatura mencionada.

En los casos en que se utilizó Mitosox para detectar dicha producción, se observó que a pesar de que los valores están elevados al añadir antimicina A, respecto al basal (figura 30), esta diferencia solamente fue significativa en el diafragma de todos los grupos y solo en el grupo entrenado del hígado.



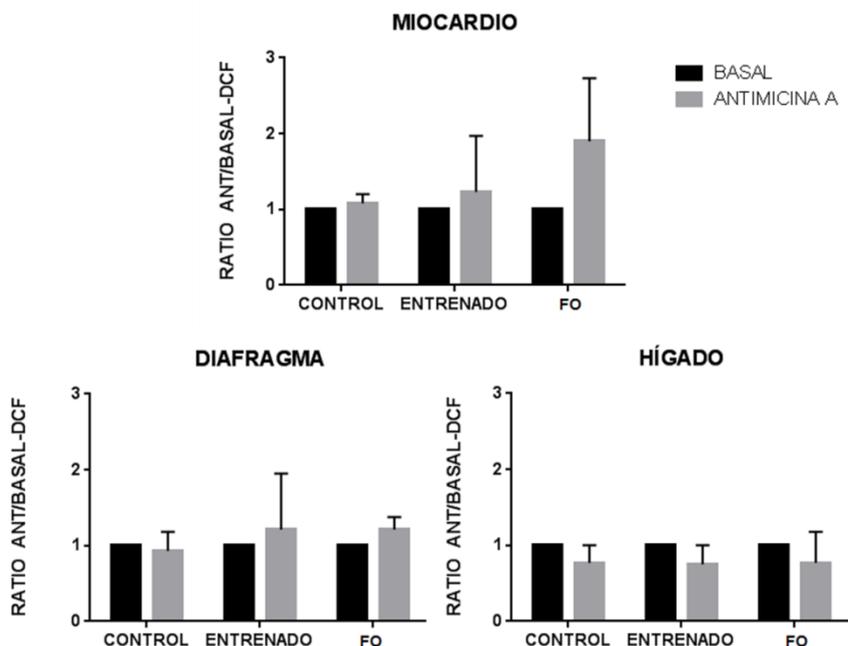
**Figura 30. Diagramas de la producción de superóxido mediante la adición del inhibidor antimicina A (ANT) y medido mediante el marcador fluorescente Mitosox.** No se encuentra relación significativa entre la inducción y el valor basal. Parámetros: ratio fluorescencias inducción vs basal (eje de ordenadas) frente a los grupos de experimentación (eje de abscisas); FO: Falso Operado

Cuando se añadieron los marcadores fluorescentes DHR (figura 31) y DCF (figura 32) no se detectaron diferencias significativas en la producción de superóxido, tal y como sucede con el Mitosox, aunque sí que se observa un incremento con la adición de Antimicina A sobre todo en el miocardio y en el diafragma.



**Figura 31. Diagramas de la producción de superóxido mediante la adición del inhibidor antimicina A (ANT) y medido mediante el marcador fluorescente DHR.** No se encuentra relación significativa entre la inducción y el valor basal. Parámetros: ratio fluorescencias inducción vs basal (eje de ordenadas) frente a los grupos de experimentación (eje de abscisas); FO: Falso Operado

Y es que el Mitosox es más adecuado para la detección de superóxido, mientras que DHR y DCF lo son más de peróxidos.



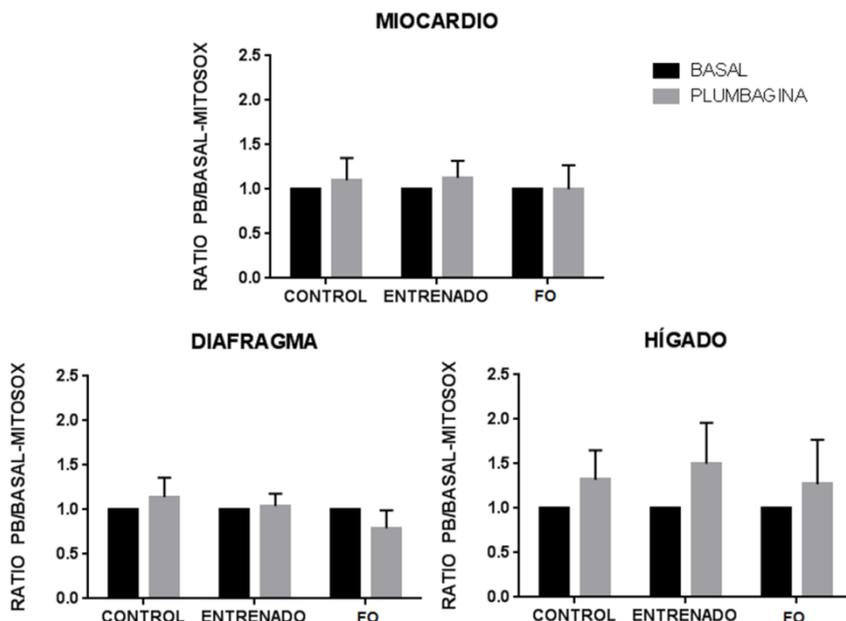
**Figura 32. Diagramas de la producción de superóxido mediante la adición del inhibidor antimicina A (ANT) y medido mediante el marcador fluorescente DHR.** No se encuentra relación significativa entre la inducción y el valor basal. Parámetros: ratio fluorescencias inducción vs basal (eje de ordenadas) frente a los grupos de experimentación (eje de abscisas); FO: Falso Operado

✓ **Inducción con plumbagina**

A los homogenados mitocondriales también se añadió un dador exógeno de superóxido, la plumbagina y se midieron los valores del mismo mediante diferentes marcadores.

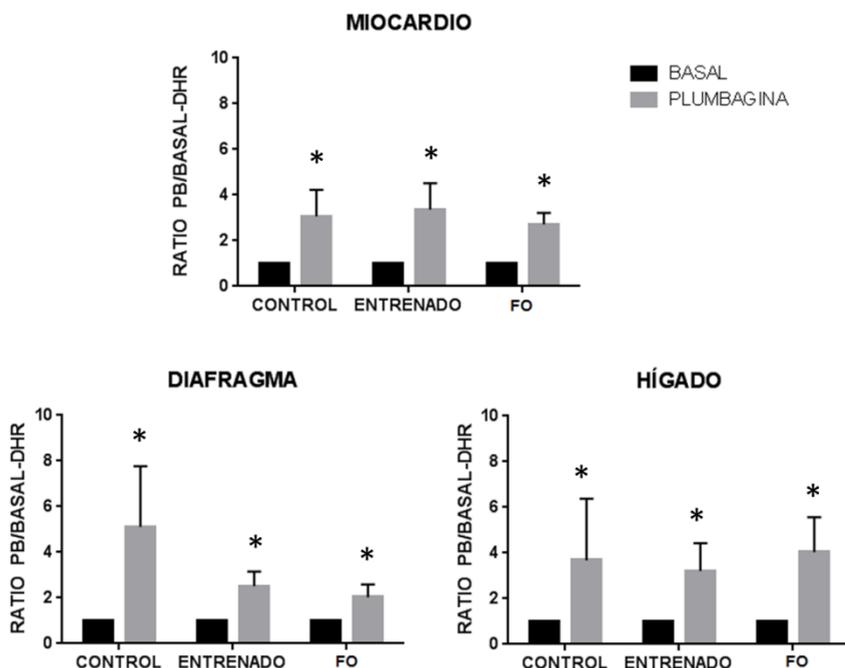
En primer caso, se utilizó el marcador de superóxido Mitosox (figura 33). Mediante éste, no se observó un incremento en la producción de manera significativo en ningún tejido excepto un leve incremento en el hígado. El hecho de que no se detecte anión superóxido al añadir un dador directo de éste, puede deberse a la acción de la enzima SOD en el interior

de la mitocondria que dismutaría éste superóxido a peróxidos, no siendo detectable por el marcador Mitosox.



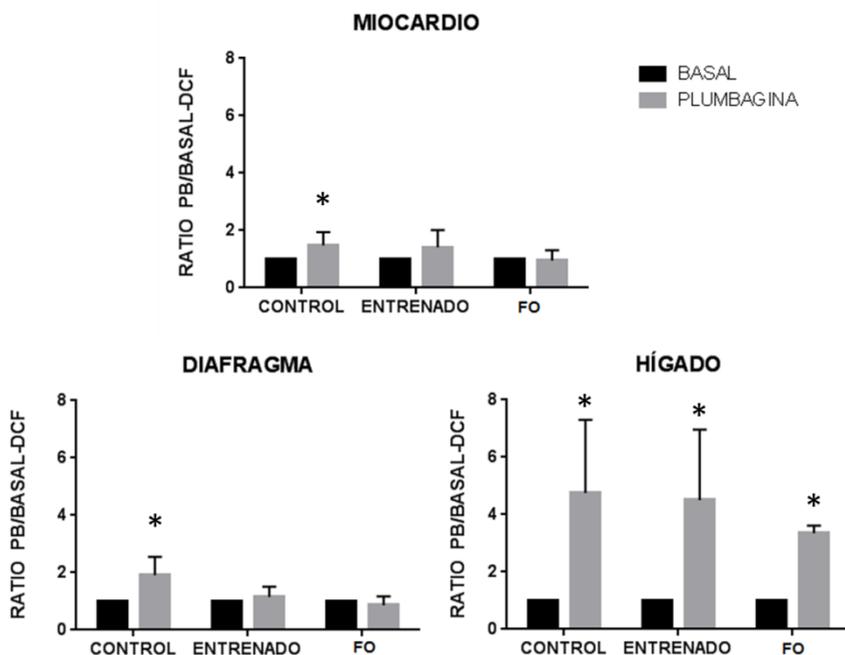
**Figura 33. Diagramas de la producción de superóxido mediante la adición de plumbagina (PB) como dador exógeno de superóxido y medido mediante el marcador fluorescente Mitosox.** No se encuentra relación significativa entre la inducción y el valor basal. Parámetros: ratio fluorescencias inducción vs basal (eje de ordenadas) frente a los grupos de experimentación (eje de abscisas); FO: Falso Operado

En cambio, cuando se utilizan los marcadores DHR (figura 34) y DCF (figura 35) junto con la plumbagina, sí que se observan valores elevados en todos los tejidos a pesar de ser marcadores de peróxidos. Y es que esto corroboraría lo dicho anteriormente, de que el superóxido producido por la plumbagina se dismutaría a peróxido de hidrógeno por acción de la enzima SOD mitocondrial, siendo este subproducto cuantificado por ambos marcadores.



**Figura 34. Diagramas de la producción de peróxidos mediante la adición de plumbagina (PB) como dador exógeno de superóxido y medido mediante el marcador fluorescente DHR. \* indica que hay diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre el basal y el inducido. Parámetros: ratio fluorescencias inducción vs basal (eje de ordenadas) frente a los grupos de experimentación (eje de abscisas); FO: Falso Operado**

Ahora bien, mediante el marcador DHR (figura 34), las diferencias son significativas para todos los grupos en todos los tejidos, mientras que mediante el marcador DCF (figura 35), las diferencias solo son significativas en todos los grupos del tejido hígado y en el grupo control de los tejidos miocardio y diafragma. Esto es debido a el marcador DHR entra en la células por su naturaleza lipofílica y su carga positiva donde se oxida a Rh123 que acaba acumulándose en la mitocondria, mientras que el marcador DCF entra en menor proporción en la mitocondria permaneciendo a nivel citosólico principalmente.



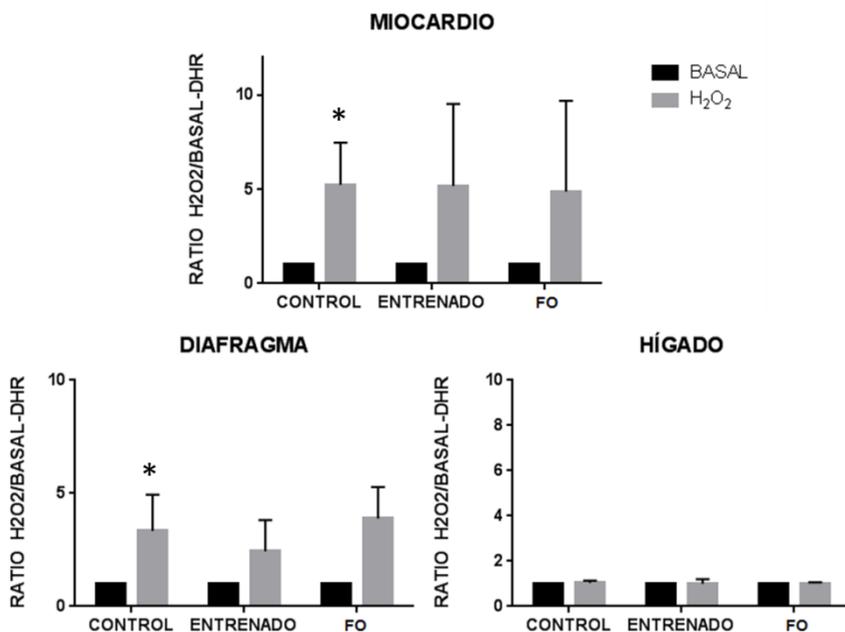
**Figura 35. Diagramas de la producción de peróxidos mediante la adición de plumbagina como dador exógeno de superóxido y medido mediante el marcador fluorescente DCF. \* indica que hay diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre el basal y el inducido. Parámetros: ratio fluorescencias inducción vs basal (eje de ordenadas) frente a los grupos de experimentación (eje de abscisas). FO: Falso Operado**

✓ **Inducción con Peróxido de Hidrógeno**

A los homogenados mitocondriales también se añadió directamente peróxido de hidrógeno para medir los valores del mismo mediante diferentes marcadores.

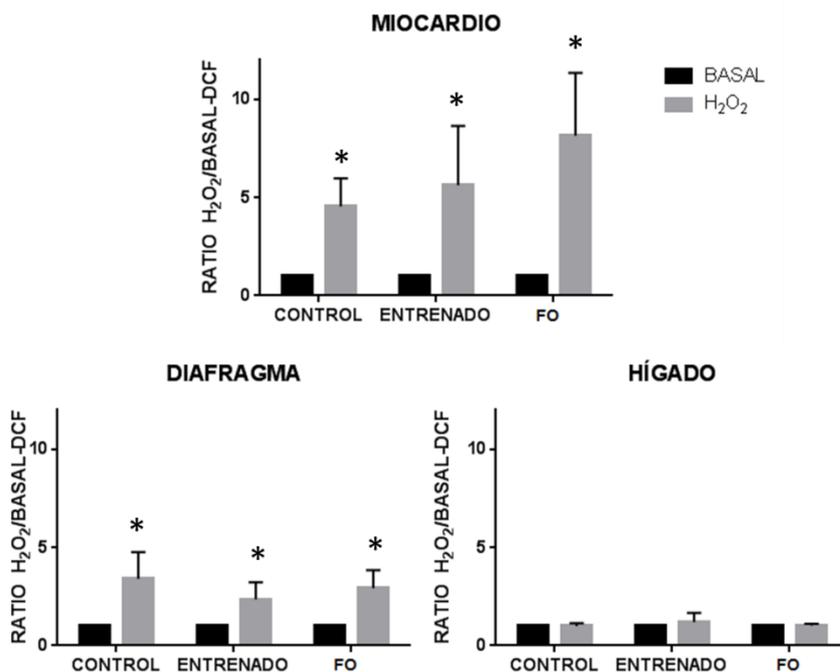
En el caso en que se utilizó el marcador DHR (figura 36), solo se observaron diferencias significativas entre el basal y el inducido en los grupos control de los tejidos miocardio y diafragma. Esta producción en el resto de grupos para estos dos tejidos también se observa aunque que no

es significativo estadísticamente debido al alto valor de desviación en los datos. Por el contrario, llama la atención en el hígado, que la propia adición de peróxido de hidrógeno no detectara valores de peróxidos y es que esto puede explicarse a la gran cantidad de enzima antioxidante catalasa y glutatión peroxidasa que actuaría a nivel del peróxido de hidrógeno convirtiéndolo en agua respecto a los otros tejidos.



**Figura 36. Diagramas de la producción de peróxidos mediante la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o peróxido de hidrógeno como generador de peróxidos y medido mediante el marcador fluorescente DCF. \* indica que hay diferencias significativas (p<0.05) entre el basal y el inducido. Parámetros: ratio fluorescencias inducción vs basal (eje de ordenadas) frente a los grupos de experimentación (eje de abscisas). FO: Falso Operado**

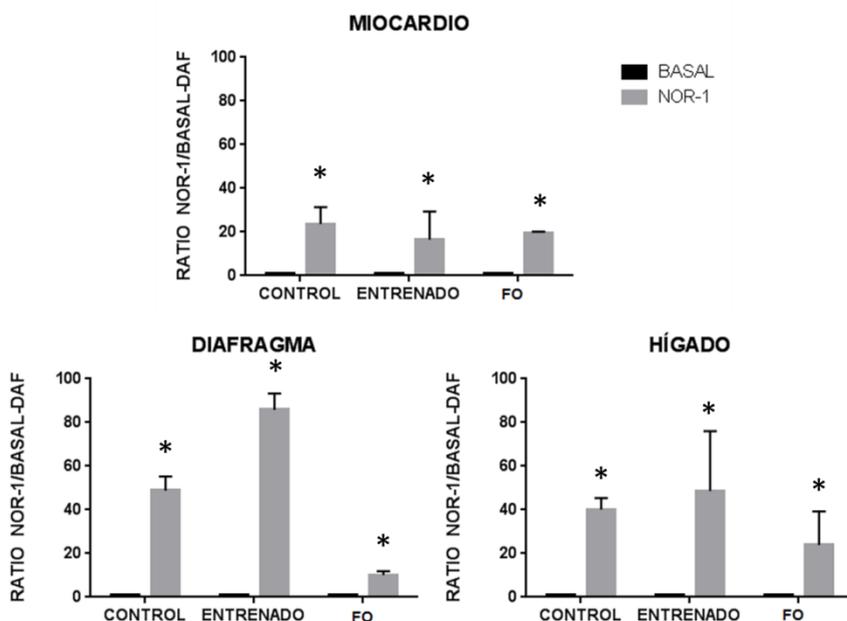
Dicho efecto también puede observarse mediante el uso del marcador DCF (figura 37) donde al contrario del anterior, las diferencias significativas aparecen en todos los grupos de los tejidos miocardio y diafragma, pero el hígado se comporta de la misma manera, teniendo valores de peróxidos muy bajos seguramente por efecto de las enzimas detoxificantes.



**Figura 37. Diagramas de la producción de peróxidos mediante la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o peróxido de hidrógeno como generador de peróxidos y medido mediante el marcador fluorescente DCF. \* indica que hay diferencias significativas (p<0.05) entre el basal y el inducido. Parámetros: ratio fluorescencias inducción vs basal (eje de ordenadas) frente a los grupos de experimentación (eje de abscisas). FO: Falso Operado**

✓ **Inducción con NOR-1**

También se han encontrado diferencias significativas entre los valores basales y los inducidos por efecto de la adición de NOR-1 cuando se cuantifican los niveles del radical óxido nítrico mediante el marcador fluorescente DAF en todos los tejidos de todos los grupos estudiados (figura 38). Pero es en el tejido diafragma del grupo entrenado, donde aparecen niveles mayores.

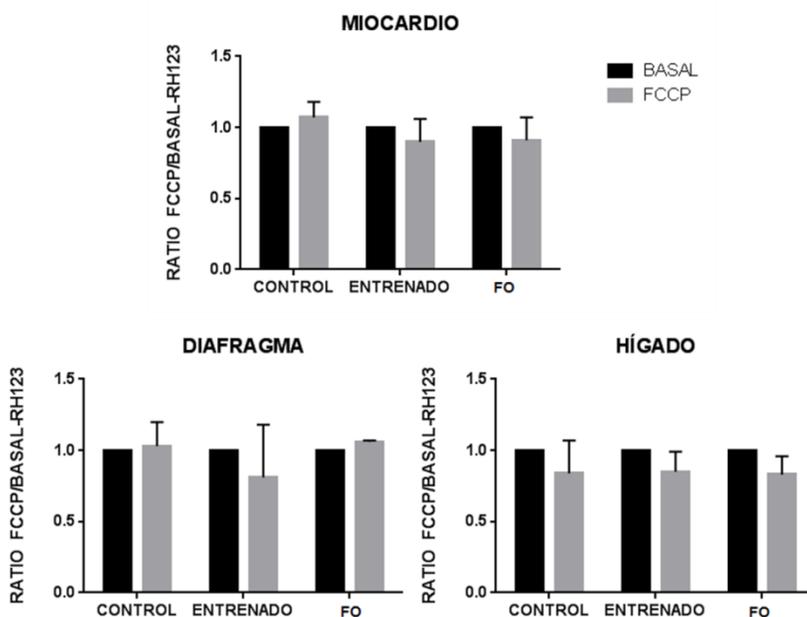


**Figura 38. Diagramas de la producción de peróxidos mediante la adición de NOR-1 como generador de óxido nítrico y medido mediante el marcador fluorescente DAF. \* indica que hay diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre el basal y el inducido. Parámetros: ratio fluorescencias inducción vs basal (eje de ordenadas) frente a los grupos de experimentación (eje de abscisas). FO: Falso Operado**

✓ **Inducción con FCCP**

Respecto a una posible diferencia de potencial de membrana entre los valores basales y los inducidos por efecto de la adición del agente desacoplante FCCP, cuando se cuantifica mediante el marcador fluorescente RH-123, no se han encontrado diferencias significativas en todos los tejidos de todos los grupos estudiados (figura 39), aunque sí que se observa una leve tendencia a disminuir por efecto de la despolarización del agente FCCP.

Si estos datos se comparan con los anteriores en que se midió el efecto en el potencial de membrana con FCCP y el marcador JC-1, en ese caso sí que se encontró el efecto esperado de despolarización de la membrana.



**Figura 39. Diagramas del potencial de membrana mediante la adición del agente desacoplante FCCP y medido mediante el marcador fluorescente RH-123. \* indica que hay diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre el basal y el inducido. Parámetros: ratio fluorescencias inducción vs basal (eje de ordenadas) frente a los grupos de experimentación (eje de abscisas). FO: Falso Operado**

Es de resaltar que a la vista de los datos y las imágenes, sí que se observan aumentos de los niveles de ROS/RNS por efecto de la adición de compuestos generadores de los mismos, pero los datos presentan una gran variabilidad con unos valores de desviación estándar elevado en algunos casos, que provocan que no se encuentren diferencias significativas.

### **3.1.2 Comparación C vs FO (efecto atropina); C vs. E (efecto del entrenamiento) y E vs. FO (efecto combinando entrenamiento y atropina)**

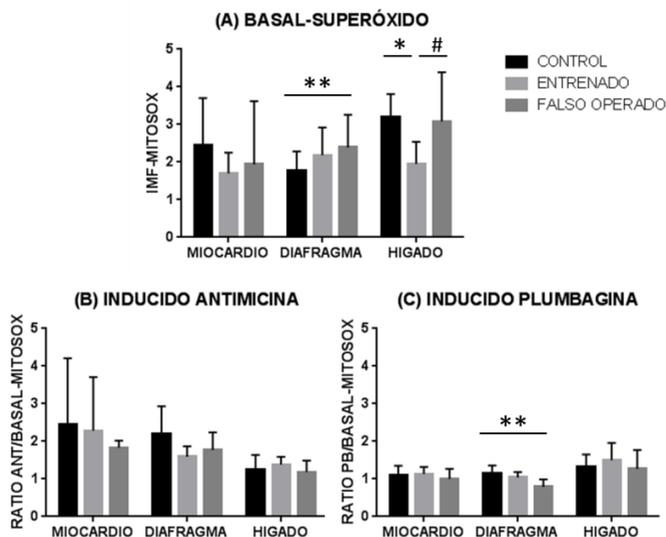
Este segundo análisis se llevó a cabo mediante la comparación de la intensidad media de fluorescencia (IFM, unidades arbitrarias de fluorescencia) basal entre cada pareja de grupos indicada y por otro lado, mediante la comparación del ratio de la intensidad media de fluorescencia basal partido por la inducida, para cada marcador fluorescente en cada tejido. Del ratio de cada sujeto de estudio se calculó la media y la desviación estándar.

#### **✓ Estimación de superóxido**

La estimación de superóxido se ha realizado mediante el marcador fluorescente MitoSox a nivel basal de homogenados mitocondriales y mediante su inducción con un inhibidor de la cadena de transporte mitocondrial, la antimicina A y con un dador exógeno, la plumbagina. Los resultados obtenidos (figura 40) muestran una diferencia en el tejido diafragma a nivel basal (figura 40 A) entre el grupo control y el grupo falso operado, por lo que podría decirse que la administración de atropina en el diafragma produce una menor generación de anión superóxido cuando no se practica ejercicio. Este efecto no se ha observado ni en el miocardio ni en el hígado, pero en éste último los datos muestran diferencias significativas entre el grupo control y el entrenado y entre el grupo entrenado y falso

operado. Esto podría indicar un efecto en la práctica de ejercicio por un lado y en la práctica de ejercicio combinado con la administración de atropina, que supondría una menor producción de superóxido en animales entrenados en el tejido hígado a nivel basal.

Sin embargo, la adición de antimicina A (figura 40 B), no provoca dichos efectos sobre ningún grupo experimental y solo la adición de plumbagina (figura 40 C) genera diferencias significativas en el tejido diafragma entre el grupo control y el falso operado, por lo que en este caso podría decirse, al contrario de lo que ocurre a nivel basal, que la administración de atropina junto con plumbagina en el diafragma produce una mayor generación de anión superóxido (en el otro caso era inferior).



**Figura 40. Diagramas de la estimación de superóxido estudiado mediante el marcador fluorescente MitoSox para cada uno de los tejidos según el grupo de experimentación.\* indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Control vs. Entrenado; # indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Entrenado vs. Falso operado; \*\* indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Control vs. Falso operado. Parámetros: (A) intensidad media de fluorescencia basal, (B y C) ratio fluorescencias inducción vs basal (eje de ordenadas) frente a los grupos de experimentación (eje de abscisas). Inductores: ANT, antimicina A y PB, plumbagina**

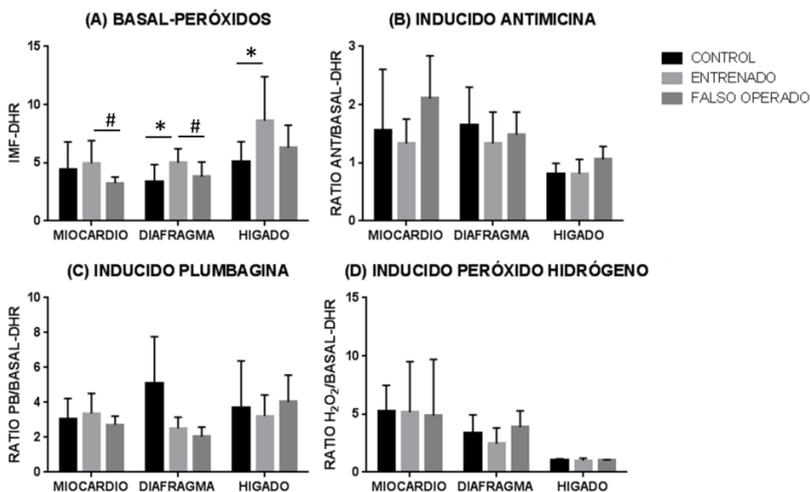
✓ **Estimación de peróxidos**

La estimación de peróxidos se ha realizado mediante los marcadores fluorescentes DHR y DCF a nivel basal de homogenados mitocondriales y mediante su inducción con un inhibidor de la cadena de transporte mitocondrial, la antimicina A, con un dador exógeno, la plumbagina y con la adición directamente de peróxido de hidrógeno.

Los resultados obtenidos (figura 41) muestran a nivel basal (figura 41 A) diferencias distintas dentro de cada tejido en cuanto a los grupos experimentales. Por un lado, en miocardio, encontramos dichas diferencias entre el grupo entrenado y el grupo falso operado, habiendo menor cantidad de peróxidos en el grupo falso operado, por lo que podría pensarse, que existe un efecto en la mayor producción de peróxidos en la combinación del ejercicio junto con la administración de la atropina. Por otro lado, en el diafragma, las diferencias aparecen entre el grupo control y el entrenado y entre el grupo entrenado y el falso operado, por lo que podría decirse que el ejercicio tiene un efecto en la mayor producción de peróxidos, se administre atropina o no ya que los valores control y falso operado son similares. Por último, a nivel basal en el hígado, las diferencias se observan solo por efecto del ejercicio, habiendo mayores niveles de peróxidos en los grupos entrenados respecto a los que no fueron sometidos a ejercicio físico.

Sin embargo, la adición de los productos inductores inicialmente mencionados, no revelan diferencias estadísticamente significativas en entre los grupos experimentales, aunque a la vista de las figuras (41 B y 41 C), sí que se observan diferencias en los niveles de peróxidos. Esto seguramente se deba, como ya se ha mencionado, a los niveles elevados de la desviación estándar de la media de los datos y es que algunos valores son muy discrepantes entre ellos, además de tener un bajo número de animales de experimentación.

Destacar, que en el tejido diafragma inducido con plumbagina se observa una bajada drástica en los grupos entrenado y falso operado respecto al control, lo que podría entenderse como un efecto más sensible en la reducción de peróxidos (provocados por la administración de la atropina) de la práctica de ejercicio, gracias a la acción de las enzimas SOD y catalasa sobre el compuesto plumbagina. Pero por otro lado, cuando se añade peróxido de hidrógeno (figura 41 D), los niveles de peróxidos dentro de cada tejido son más o menos iguales para los tres grupos, llamando la atención los niveles tan bajos en el tejido hígado como anteriormente se ha puntualizado y que seguramente sea debido a la acción de las enzimas detoxificantes presentes en ese tejido como la catalasa o glutatión peroxidasa.

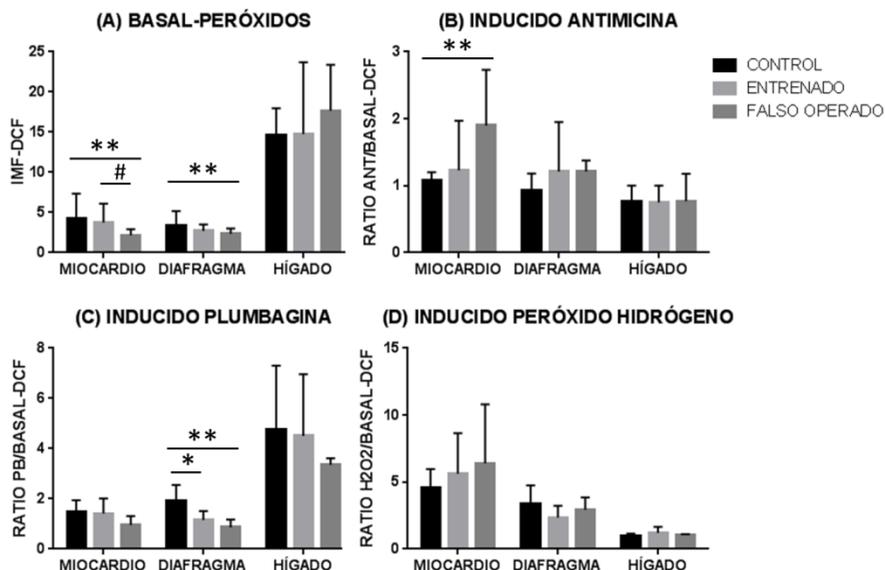


**Figura 41. Diagramas de la estimación de peróxidos estudiado mediante el marcador fluorescente DHR para cada uno de los tejidos según el grupo de experimentación.\*** indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Control vs. Entrenado; # indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Entrenado vs. Falso operado; \*\* indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Control vs. Falso operado. Parámetros: (A) intensidad media de fluorescencia, (B, C y D) ratio fluorescencias inducción vs basal (eje de ordenadas) frente a los grupos de experimentación (eje de abscisas). Inductores: ANT, antimicina A, PB, plumbagina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrógeno.

Adicionalmente al marcador fluorescente DHR, también se han estudiado los niveles de peróxidos mediante el marcador DCF. Los resultados obtenidos (figura 42) muestran a nivel basal (figura 42 A) diferencias distintas en los tejidos en cuanto a los grupos experimentales. Por un lado, en miocardio, encontramos dichas diferencias entre el grupo control y falso operado, con niveles mayores de peróxidos en el aquellos a los cuales se les administró atropina y también, entre el grupo entrenado y el grupo falso operado, habiendo menos cantidad de peróxidos en el grupo falso operado, por lo que podría pensarse, que la adición de atropina provoca niveles superiores de peróxidos se practique o no el ejercicio. Por otro lado, en el diafragma, las diferencias aparecen entre el grupo control y el falso operado, produciendo la administración de atropina, niveles relativamente mayores de peróxidos respecto a los que no se le administró (grupo falso operado). Por último, a nivel basal en el hígado, no se encontraron diferencias entre los grupos, en contraposición lo hallado con el marcador anterior.

Sin embargo, la adición de los productos inductores inicialmente mencionados, provoca efectos diferentes al basal. Cuando el producto utilizado es un inhibidor de la cadena de transporte, la antimicina A (figura 42 B), aparecen diferencias entre los grupos control y falso operado, siendo mayor el nivel de peróxidos en el grupo que no se les administró atropina. En el resto de tejidos no aparecen diferencias significativas entre los grupos. Con la adición de plumbagina como dador exógeno de superóxido (figura 42 C), encontramos diferencias significativas solo en el tejido diafragma entre los grupos control y entrenados y entre los control y falsos operados. En este caso, el comportamiento es similar al del marcador DHR y es que parece ser que el efecto del ejercicio es reducir los niveles de peróxidos, provocados por la administración de atropina. Por último, indicar que cuando se añade peróxido de hidrógeno (figura 42 D), al igual que con el marcador de peróxidos anterior, llama la atención los niveles tan bajos en el tejido

hígado y que como anteriormente se ha puntualizado, seguramente sea debido a la acción de las enzimas detoxificantes tan frecuentes en ese tejido como la catalasa o glutatión peroxidasa.



**Figura 42. Diagramas de la estimación de peróxidos estudiado mediante el marcador fluorescente DCF para cada uno de los tejidos según el grupo de experimentación.\*** indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Control vs. Entrenado; # indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Entrenado vs. Falso operado; \*\* indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Control vs. Falso operado. Parámetros: (A) intensidad media de fluorescencia, (B, C y D) ratio fluorescencias inducción vs basal (eje de ordenadas) frente a los grupos de experimentación (eje de abscisas). Inductores: ANT, antimicina A, PB, plumbagina y  $H_2O_2$ , peróxido de hidrógeno

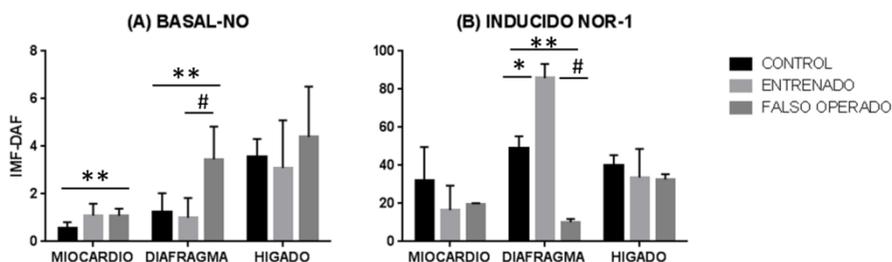
### ✓ Estimación de óxido nítrico (NO)

La estimación de óxido nítrico se ha realizado mediante el marcador fluorescente DAF a nivel basal de homogenados mitocondriales y mediante su inducción con un donante de NO, NOR-1.

Los resultados obtenidos (figura 43) muestran a nivel basal (figura 43 A) diferencias en dos de los tejidos estudiados. Por un lado, en el miocardio, se observan diferencias entre el grupo control y el grupo falso operado, donde parece ser que la administración de atropina cuando no se entrena, genera menores niveles de NO. En el diafragma se observa el mismo efecto, además de entre el grupo entrenado y falso operado, por lo que la administración de atropina disminuye los niveles de NO se practique o no ejercicio físico.

Respecto a los niveles observados por la inducción con el agente NOR-1 (figura 43 B), solo se han encontrado diferencias significativas en el diafragma entre todos los grupos experimentales, revirtiendo los valores de NO respecto al estado basal. Se observan niveles mucho mayores con la práctica de ejercicio, y es que, además de que el óxido nítrico modula la función contráctil de la respiración<sup>148,163</sup>, durante el ejercicio la contracción del diafragma es más repetitiva, liberándose tasas mayores de derivados de NO en comparación con tasas más lentas en condiciones de reposo. Del mismo modo, aunque el marcador fluorescente DAF-FM reacciona con el NO derivado de varios donantes, no es sensible a otras RNS o ROS, no obstante la presencia de  $\text{ONNO}^-$ , aumenta en gran medida la sensibilidad del marcador. Esto también podría explicarse por el hecho de que otros estudios mantienen la hipótesis de la contractilidad extenuante del diafragma aumenta la formación de peroxinitrito bajo condiciones de hipoxia<sup>164,165</sup>.

El hecho de que el grupo falso operado en el diafragma tenga niveles tan bajos de NO, hace pensar que los sistemas antioxidantes de depleción de ese NO añadido exógenamente funcionen mejor si no se administra atropina.



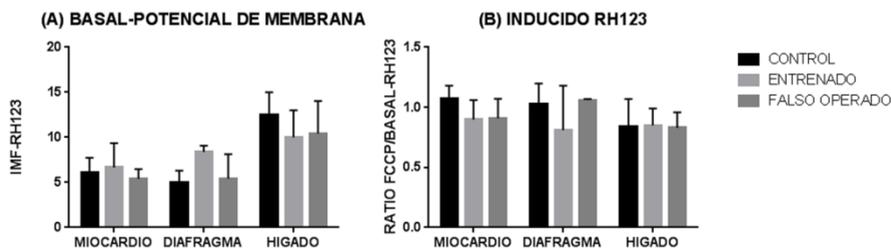
**Figura 43. Diagramas de la estimación de óxido nítrico estudiado mediante el marcador fluorescente NOR para cada uno de los tejidos según el grupo de experimentación.\*** indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Control vs. Entrenado; # indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Entrenado vs. Falso operado; \*\* indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Control vs. Falso operado. Parámetros: (A) intensidad media de fluorescencia basal, (B) ratio fluorescencias inducción vs basal (eje de ordenadas) frente a los grupos de experimentación (eje de abscisas). Inductores: NOR-1

#### ✓ Estimación del potencial de membrana

Los cambios en el potencial de membrana se han medido mediante el marcador fluorescente RH123 a nivel basal de homogenados mitocondriales y mediante la adición de un desacoplador del gradiente electroquímico FCCP.

Los resultados obtenidos (figura 44) no muestran ninguna diferencia significativa en ningún tejido a nivel basal (figura 44 A) ni mediante el desacoplador (figura 44 B) entre ninguno de los grupos experimentales, por lo que no se ha podido concluir que el ejercicio y la administración de atropina provoquen algún efecto a nivel del potencial de membrana.

Estos resultados, en comparación con el estudio del potencial de membrana con la sonda fluorescente JC-1, revelan discrepancias, ya que en el anterior encontramos diferencias significativas en todos los tejidos entre los grupos control y entrenado y entre los grupos control y falso operado, indicando efecto del entrenamiento y de la administración de atropina.



**Figura 44. Diagramas del potencial de membrana estudiado mediante el marcador fluorescente RH-123 para cada uno de los tejidos según el grupo de experimentación** no se encuentra relación significativa entre grupos. Parámetros: (A) intensidad media de fluorescencia, (B) ratio fluorescencias inducción vs basal (eje de ordenadas) frente a los grupos de experimentación (eje de abscisas). Desacoplador: FCCP

### 3.1.3 Especificidad del Miocardio: Comparación tejidos Miocardio vs Diafragma vs Hígado

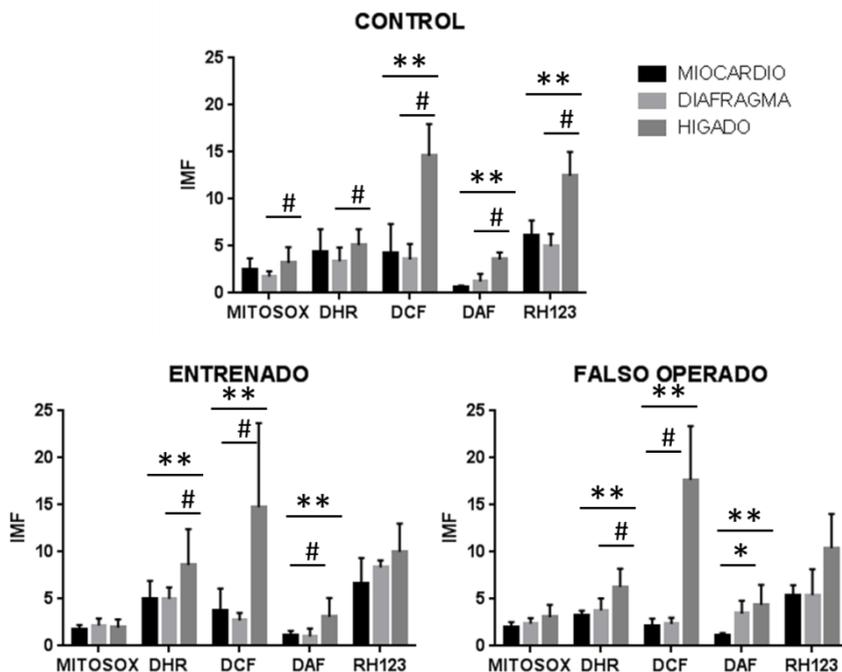
El último análisis se llevó a cabo mediante la comparación de la intensidad media de fluorescencia (IFM, unidades arbitrarias de fluorescencia) **basal** entre cada pareja de tejidos indicados (figura 45) en cada grupo experimental.

Si se compara a nivel basal los niveles de superóxido medidos mediante el marcador MitoSox dentro del **grupo control**, solo se encuentran diferencias significativas entre el diafragma y el hígado, mostrando éste último niveles superiores. En cuanto a niveles basales de peróxidos, medidos con ambos marcadores fluorescentes utilizados, se encuentra este

mismo efecto en los tejidos, pero adicionalmente, con el DCF, aparecen también diferencias entre el miocardio y el hígado, teniendo este último un valor elevadísimo de peróxidos. Respecto a valores de óxido nítrico medidos mediante el marcador DAF, se observan las mismas diferencias en los grupos, con valores muy elevados en el hígado en comparación tanto con el miocardio como con el diafragma. Y por último, también se encuentra mayor potencial de membrana medido mediante RH-123, en el hígado respecto los otros dos tejidos.

Si se realiza el mismo análisis dentro del **grupo entrenado**, se observa que los niveles de superóxido cuantificados mediante MitoSox son aproximadamente los mismos en todos los grupos. Respecto al nivel de peróxidos, los niveles son diferentes, apareciendo tanto se utilice la sonda DHR como la DCF diferencias entre los tres grupos, siendo los valores mayores de superóxido en el hígado. Como en el caso anterior del grupo control, el valor de DCF en el hígado es elevadísimo. Respecto a valores de óxido nítrico, se observan lo mismo que en el grupo control donde aparecen valores muy elevados en el hígado en comparación tanto con el miocardio como con el diafragma. Y por último, también se encuentra mayor potencial de membrana en el hígado respecto los otros dos tejidos pero no es una diferencia significativa.

Para terminar, si comparamos dichos valores dentro del **grupo falso operado** aparecen las mismas diferencias que en el grupo entrenado, es decir, aproximadamente igual valor de superóxido en los tres tejidos, y mayores niveles de peróxidos y óxido nítrico en el hígado.



**Figura 45. Comparativa entre los tejidos miocardio, diafragma e hígado para cada marcador fluorescente a nivel basal.** Parámetros: Intensidad media de fluorescencia, IMF (eje de ordenadas) frente a sondas fluorescentes (eje de abscisas). \* indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Miocardio vs. Diafragma; # indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Diafragma vs. Hígado; \*\* indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Miocardio vs. Hígado.

A la vista de los resultados, podría decirse que el hígado en todos los grupos experimentales es el tejido que presenta mayores niveles de todas las ROS y RNS cuantificadas en este estudio y es que tal vez se deba a que las mitocondrias en este tejido presenten una mayor actividad respiratoria, bien por una mayor capacidad intrínseca o por resistir mejor las condiciones experimentales del aislamiento.

### 3.2 En células mononucleares de sangre periférica

#### 3.2.1 Comparación Basal vs Inducido

Este primer análisis se llevó a cabo mediante la comparación de células mononucleares sanguíneas dentro de cada grupo experimental, entre la intensidad media de fluorescencia (unidades arbitrarias de fluorescencia) inducida con los diferentes sustratos oxidantes y la intensidad media de fluorescencia basal, para cada sonda fluorescente y que se expresa como un ratio entre ambos. Del ratio de cada sujeto de estudio se calculó la media y la desviación estándar. Estos ratios se muestran en la tabla 14.

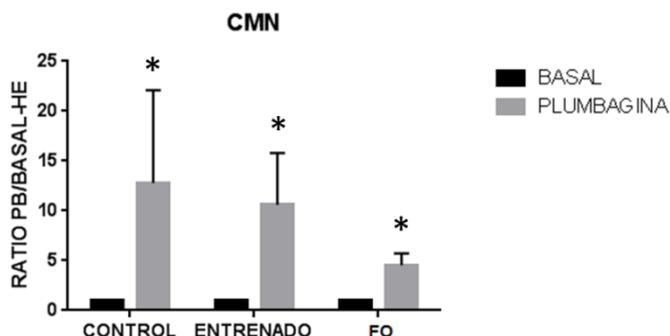
**Tabla 14.** Estudio de los cambios en los niveles de anión superóxido, peróxidos, y potencial de membrana en células mononucleares (CMN) del grupo control, entrenado y falso operado tratados con plumbagina (PB, 50 µg/mL), t-Butyl (100µM) y FCCP (20 µM).

CMN		CONTROL	ENTRENADO	FALSO OPERADO
HE	Basal	1	1	1
	PB	12.78±9.34*	10.59±5.21*	4.54±1.18*
DHR	Basal	1	1	1
	t-BHP	43.70±9.56*	41.02±22.15*	1.53±0.80
TMRM	Basal	1	1	1
	FCCP	0.80±0.20	0.75±0.33	0.75±0.20
	N	5	8	6

n: número de animales estudiados. Ratio: inducido vs basal expresados como intensidad media de fluorescencia ± desviación estándar (IMF±DE), \* indica que hay diferencias significativas (p≤0.05) entre el basal y el inducido.

✓ **Inducción con plumbagina**

A las células mononucleares sanguíneas se añadió un dador exógeno de superóxido, la plumbagina y se midió los valores del mismo mediante el marcador de superóxido HE (figura 46). Se encontraron diferencias significativas entre el basal y el inducido, siendo muy superiores los valores en el grupo control y el entrenado respecto al falso operado. Esto hace pensar que la administración de atropina potencia la producción de superóxido y/o altera la actividad de la enzima SOD que dismuta ese superóxido a peróxidos.

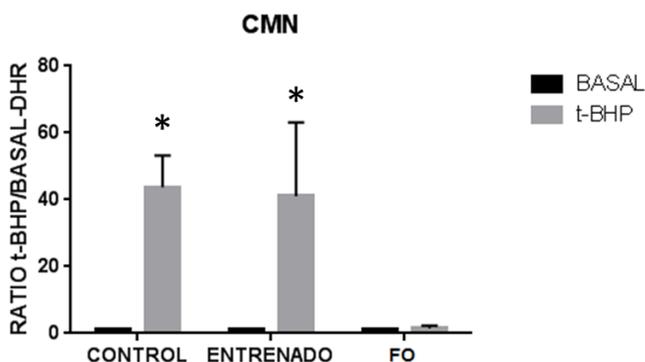


**Figura 46. Diagramas de la producción de superóxido mediante la adición de plumbagina (PB) como dador exógeno de superóxido y medido mediante el marcador fluorescente HE. \* indica que hay diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre el basal y el inducido. Parámetros: ratio fluorescencias inducción vs basal (eje de ordenadas) frente a los grupos de experimentación (eje de abscisas); FO: Falso Operado**

✓ **Inducción con hidroperóxido**

A las células mononucleares sanguíneas se añadió un dador de peróxidos, el hidroperóxido (t-BHP) y se midió los valores de peróxidos mediante el marcador DHR como ya empleó anteriormente en mitocondrias aisladas (figura 47). Se encontraron diferencias significativas entre el basal y

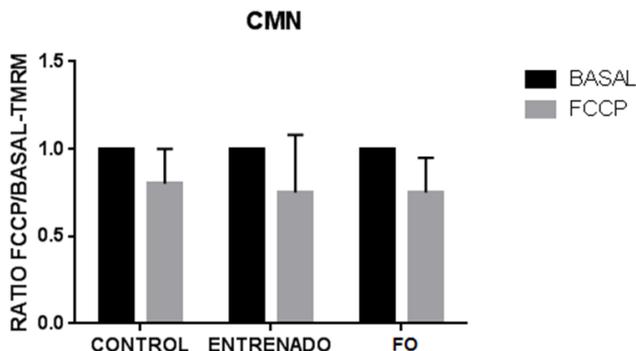
el inducido, solo en los grupos control y entrenados, donde los valores de peróxidos aumentaron de manera notable respecto al basal más o menos al mismo nivel. Sin embargo, en el grupo falso operado no se encontró dicho aumento, por lo que esto hace pensar que la administración de atropina potencia la producción de peróxidos y/o altera la actividad de la enzima catalasa y/o glutatión peroxidasa que convertiría el  $H_2O_2$  en agua.



**Figura 47. Diagramas de la producción de peróxidos mediante la adición de tert-Butyl (t-BHP) como dador exógeno de peróxidos y medido mediante el marcador fluorescente DHR. \* indica que hay diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre el basal y el inducido. Parámetros: ratio fluorescencias inducción vs basal (eje de ordenadas) frente a los grupos de experimentación (eje de abscisas); FO: Falso Operado**

#### ✓ Inducción con FCCP

Respecto a una posible diferencia de potencial de membrana entre los valores basales y los inducidos por efecto de la adición del agente desacoplante FCCP, cuando se cuantifica mediante el marcador TMRM (figura 48) se observa en todos los grupos valores inferiores al basal como cabría esperar por el efecto del FCCP al despolarizar la membrana mitocondrial, pero estas diferencias no son estadísticamente significativas.

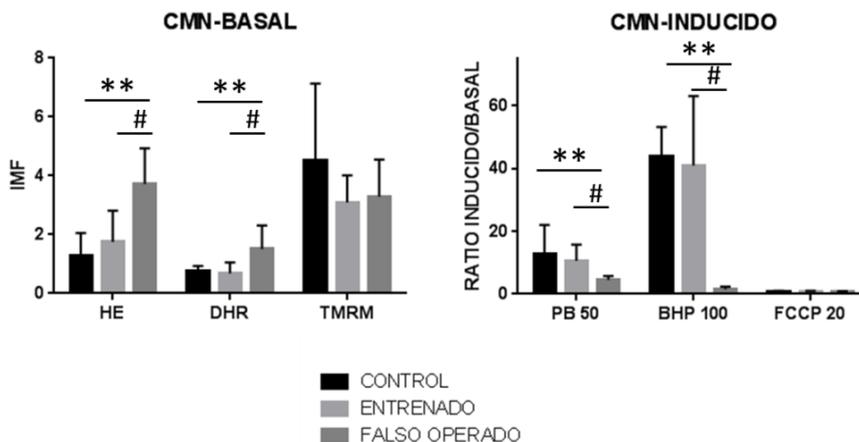


**Figura 48. Diagramas del potencial de membrana mitocondrial estudiado mediante el marcador fluorescente TMRM el grupo de experimentación. \* indica que hay diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre el basal y el inducido. Parámetros: ratio fluorescencias inducción vs basal (eje de ordenadas) frente a los grupos de experimentación (eje de abscisas); FO: Falso Operado Desacoplador; FCCP**

### **3.2.2 Comparación C vs FO (efecto atropina); C vs. E (efecto del entrenamiento) y E vs. FO (efecto combinando entrenamiento y atropina)**

Este segundo análisis se llevó a cabo mediante la comparación en cada tejido de la intensidad media de fluorescencia, IFM (unidades arbitrarias de fluorescencia) basal entre cada pareja de grupos indicada y por otro lado, mediante la comparación del ratio de la intensidad media de fluorescencia basal partido por la inducida, para cada marcador fluorescente. Del ratio de cada sujeto de estudio se calculó la media y la desviación estándar.

En la figura 49 se observa la combinación de todos los marcadores utilizados a nivel basal y los productos adicionados a modo de inductores.



**Figura 49. Diagramas de la estimación de producción de ROS y cambios en la función mitocondrial a nivel basal (A) e inducida mediante diferentes productos (B) según el grupo de experimentación.** \* indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Control vs. Entrenado; # indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Entrenado vs. Falso operado; \*\* indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre Control vs. Falso operado. Parámetros: (A) intensidad media de fluorescencia basal, (B) ratio fluorescencias inducción vs basal (eje de ordenadas) frente a los grupos de experimentación (eje de abscisas).

A nivel de los valores basales se distingue un comportamiento similar cuando se estima el nivel de superóxido (mediante el marcador HE) y el de peróxidos (mediante el marcador DHR). En ambos dos, se observan valores superiores en el grupo falso operado que no recibió atropina, mientras que los grupos control y entrenado (ambos dos con atropina) tienen niveles inferiores y hasta parecidos. Esto hace pensar, que la administración de atropina reduce los niveles de superóxido y peróxidos basales, independientemente de la práctica de ejercicio. Sin embargo, cuando se administran sustratos inductores sucede todo lo contrario y aparecen niveles menores en el grupo falso operado que recibió atropina.

Los valores de potencial de membrana a nivel basal medidos con el marcador TMRM muestran que en el grupo control que recibió atropina son mayores que en los otros dos grupos que además de inferiores son

similares, entre sí. Por tanto, en este caso, el efecto de esas diferencias se debería a la administración de atropina, no teniendo efecto el ejercicio. Cuando se añade el desacoplador del potencial de membrana FCCP, sí que se observa el mismo comportamiento en los tres grupos con una bajada del mismo. Esas diferencias no son estadísticamente significativas.

A modo de conclusión y entendiendo la situación dentro del contexto de células mononucleares (no sangre entera donde pudieran actuar otras vías como el burst oxidativo o células fagocíticas) y sometidas a un aislamiento mediante Ficoll, se ha observado por un lado que la administración de atropina a nivel basal mejora la función mitocondrial al, aumentar el potencial de membrana mitocondrial, por lo que mejora la respiración mitocondrial y al disminuir los valores basales de superóxido y peróxidos. Esto confiere a la célula una mayor protección como se ha observado en la poca literatura encontrada al respecto<sup>166</sup>. Pero por otro lado, se ha visto, que la atropina potencia el estrés oxidativo por inducción con determinados agentes mientras que no tiene efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial, perdiendo esa protección, bien por aumento en la generación de ROS, por el metabolismo propio de los agentes, o por inhibición de las enzimas antioxidantes.



## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

---

1. Se ha puesto a punto una plataforma que integra medidas polarográficas de respiración mitocondrial, junto con la espectrofluorimetría y la citometría de flujo en mitocondrias aisladas, siendo el primer estudio de este tipo en fisiología del ejercicio.
2. En los estudios de consumo de oxígeno no se han encontrado diferencias significativas dentro de los grupos experimentales por lo que no se ha podido demostrar efecto del entrenamiento, pero se han encontrado diferencias en mitocondrias de miocardio con niveles de respiración mayores en comparación con el diafragma e hígado.
3. Las comparaciones entre los grupos experimentales en los ensayos de potencial de membrana, muestran un efecto en la disminución del potencial de membrana tras la administración de atropina, pero una reversión de dicho efecto por la práctica de ejercicio.
4. Los efectos producidos dentro de los grupos experimentales la por adición de inhibidores de cadena de transporte mitocondrial o mediante el uso de ROS exógenas son consistentes con los conocimientos sobre la bioquímica de las mitocondrias animales.
5. Este estudio ha permitido evaluar la contribución de los enzimas implicados en el sistema antioxidante mitocondrial de forma indirecta.
6. Las comparaciones entre los grupos experimentales en los ensayos de estimación de ROS muestran, salvo excepciones, más diferencias significativas entre los grupos control y falso operado que entre el control y entrenado, lo que sugiere que los principales efectos son debidos a la administración de atropina.
7. Estos resultados relacionados con la atropina invitan a la realización de estudios posteriores por sus posibles implicaciones clínicas, incluyendo un mayor número de animales.



## **BIBLIOGRAFIA**



1. Kennedy, E. P. Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **957** (1949).
2. Margulis, L. This Week's Citation Classic®. *Curr. Contents* **9**, 19–20 (1993).
3. Dimmer, K. S. & Scorrano, L. ( De ) constructing Mitochondria : What For ? *Physiology* **21**, 233–241 (2006).
4. Palade, G. E. The fine Structure of Mitochondria. 427–451 (1952).
5. Marín-García, J. & Goldenthal, M. J. The mitochondrial organelle and the heart. *Rev. Esp. Cardiol.* **55**, 1293–1310 (2002).
6. Olszewska, A. & Szewczyk, A. Mitochondria as a pharmacological target: Magnum overview. *IUBMB Life* **65**, 273–281 (2013).
7. Barrientos, A. In vivo and in organello assessment of OXPHOS activities. *Methods* **26**, 307–316 (2002).
8. Wallace, D. C., Brown, M. D., Melov, S., Graham, B. & Lott, M. Mitochondrial biology, degenerative diseases and aging. *Biofactors* **7**, 187–190 (1998).
9. Saraste, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* **283**, 1488–1493 (1999).
10. McKee, T. & McKee, J. *Bioquímica, Las bases moleculares de la vida.* (2009).
11. Mitchell, P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **41**, 445–502 (1966).
12. Barja, G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: Sites of production in States 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**, 347–366 (1999).
13. Chance, B. & Williams, G. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **217**, 395–408 (1955).
14. Fernández-Vizarra, E., López-Pérez, M. J. & Enriquez, J. A. Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. *Methods* **26**, 292–7 (2002).

15. Brand, M. D. & Nicholls, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem.J.* **435**, 297–312 (2011).
16. Xiong, Y., Peterson, P. L. & Lee, C. P. Polarographic Assays of Mitochondrial Functions. *Cell Biol. Four-Volume Set 2*, 259–264 (2006).
17. Tagerg, J. M. Control of mitochondrial respiration. *FEBS Lett.* **151**, (1983).
18. Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Principios de bioquímica*. (Lehlibger, 2013).
19. Brand, M. D., Hafner, R. P. & Brown, G. C. Control of respiration in non-phosphorylating mitochondria is shared between the proton leak and the respiratory chain. *Biochem.J.* **255**, 535–539 (1988).
20. Groen, A. K., Westerhoff, H. V, Meers, R. Van Der & Tagerg, J. M. Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondria respiration. *J. Biol. Chem.* **257**, 2754–2757 (1982).
21. Devlin, T. *Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas*. (1999).
22. Crompton, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* **341 ( Pt 2)**, 233–249 (1999).
23. Petit, P. X. *et al.* Disruption of the outer mitochondrial membrane as a result of large amplitude swelling: The impact of irreversible permeability transition. *FEBS Lett.* **426**, 111–116 (1998).
24. Green, D. R. & Evan, G. I. A matter of life and death. *Cancer Cell* **1**, 19–30 (2002).
25. Osellame, L. D., Blacker, T. S. & Duchen, M. R. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **26**, 711–723 (2012).
26. Duchen, M. R. Roles of Mitochondria in Health and Disease. *Diabetes* **53**, (2004).
27. Duchen, M. R. Mitochondria : The Hub of Cellular Ca<sup>2+</sup> + Signaling. *Physiol. Rev.* **21**, 84–94 (2008).

28. Shoffner, J. M. & Wallace, D. C. Oxidative phosphorylation diseases. Disorders of two genomes. *Adv. Hum. Genet.* **19**, 267–330 (1990).
29. Wallace, D. C. A mitochondrial bioenergetic etiology of disease. *J. Clin. Invest.* **123**, 1405–1412 (2013).
30. Wallace, D. C. A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging and Cancer: A Drawn for Evolutionary Medicine. *Annu Rev Genet* **39**, (2005).
31. Bejma, J. & Ji, L. L. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **87**, 465–470 (1999).
32. Wallace, D. C. Mitochondria and cancer. *nat Rev Cancer* **12**, 685–698 (2012).
33. Scatena, R. Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **942**, 287–308 (2012).
34. Pruchniak, M., Arazna, M. & Demkow, U. Biochemistry of Oxidative Stress. *Adv Exp. Med. Biol. Respir.* 2–7 (2015).
35. Powers, Scott K, Ji Li Li, K. N. A. Reactive Oxygen Species: Impact on Skeletal Muscle. *Compr Physiol* **1**, 941–969 (2014).
36. Ježek, P. & Hlavatá, L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 2478–2503 (2005).
37. Halliwell, B. Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source , Biochemistry , and Role in Human Disease. *Am. J. Med.* **91**, (1991).
38. Halliwell, B. Reactive Species and Antioxidants . Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol.* **141**, 312–322 (2006).
39. Leeuwenburgh, C. & Heinecke, J. W. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr. Med. Chem.* **8**, 829–838 (2001).
40. Ji, L. I. L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med.* **222**, 283–92 (1999).

41. Sies, H. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin. Wochenschr.* **69**, 965–968 (1991).
42. Halliwell, B. & Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* **142**, 231–255 (2004).
43. Boveris, A., Alvarez, S., Bustamante, J. & Valdez, L. Measurement of superoxide radical and hydrogen peroxide production in isolated cells and subcellular organelles. *Methods Enzymol.* **349**, 280–287 (2002).
44. Aruoma, O. I., Kaur, H. & Halliwell, B. Oxygen Free Radicals and Human Diseases. *J. R. Soc. Promot. Health* **111**, 172–177 (1991).
45. Davies, K. J., Quintanilha, a T., Brooks, G. a & Packer, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**, 1198–205 (1982).
46. Sen, C. & Hanninen, O. Physiological antioxidants. *Elsevier, Amsterdam*, 89–126 (1994).
47. Caillaud, C. *et al.* Antioxidants and Mitochondrial Respiration in Lung , diaphragm and locomotor muscles: effect of exercise. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1292–1299 (1999).
48. Jammes, Y., Steinberg, J. G., Mambrini, O., Brégeon, F. & Delliaux, S. Chronic fatigue syndrome: Assessment of increased oxidative stress and altered muscle excitability in response to incremental exercise. *J. Intern. Med.* **257**, 299–310 (2005).
49. Dillard, C., Litov, R., Savin, W., Dumelin, E. & Tappel, A. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J. Appl. Physiol.* **45**, 927–32 (1978).
50. Cooper, C. E., Vollaard, N. B. J., Choueiri, T. & Wilson, M. T. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 280–285 (2002).
51. Di Meo, S. & Venditti, P. Mitochondria in Exercise-Induced Oxidative Stress. *Biol Signals Recept* 125–140 (2001).

52. Jackson, M. J., Edwards, R. H. T. & Symons, M. C. R. Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **847**, 185–190 (1985).
53. Lovlin, R., Cottle, W., Pyke, I., Kavanagh, M. & Belcastro, a. N. Are indices of free radical damage related to exercise intensity. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **56**, 313–316 (1987).
54. Kanter, M. M., Nolte, L. a & Holloszy, J. O. Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *J. Appl. Physiol.* **74**, 965–969 (1993).
55. Ashton, T. *et al.* Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **77**, 498–502 (1998).
56. Radak, Z., Taylor, a. W., Ohno, H. & Goto, S. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: From muscle to brain. *Exerc. Immunol. Rev.* **7**, 90–107 (2001).
57. Venditti, P., Masullo, P. & Di Meo, S. Effect of training on H(2)O(2) release by mitochondria from rat skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* **372**, 315–320 (1999).
58. Sun, L. *et al.* Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: Effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. *Life Sci.* **86**, 39–44 (2010).
59. Sachdev, S. & Davies, K. J. a. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 215–223 (2008).
60. Powers, S. K. & Shanely, R. A. Exercise-induced changes in diaphragmatic bioenergetic and antioxidant capacity. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **30**, 69–74 (2002).
61. D, A. P. M. *et al.* Exercise and oxidative stress: Potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition* **31**, 916–922 (2015).
62. Steinbacher, P. & Eckl, P. Impact of Oxidative Stress on Exercising Skeletal Muscle. *Biomolec* 356–377 (2015).

63. Alessio, H. M. *et al.* Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **32**, 1576–1581 (2000).
64. Niess, A., Hartmann, A., Grunert-Fuchs, M., Poch, B. & Speit, G. DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int.J.Sport Med.* **17**, 397–403 (1996).
65. Kennedy, C. H., Church, D. F., Winston, G. W. & Pryor, W. a. Tert-butyl hydroperoxide-induced radical production in rat liver mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **12**, 381–387 (1992).
66. Ashton, T. *et al.* Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. *J. Appl. Physiol.* **87**, 2032–2036 (1999).
67. Bailey, D. M. *et al.* Electron paramagnetic spectroscopic evidence of exercise-induced free radical accumulation in human skeletal muscle. *Free Radic. Res.* **41**, 182–190 (2007).
68. Cadenas, E., Varsavsky, a I., Boveris, a & Chance, B. Oxygen- or organic hydroperoxide-induced chemiluminescence of brain and liver homogenates. *Biochem. J.* **198**, 645–654 (1981).
69. Jenkins, R. R., Krause, K. & Schofield, L. Influence of exercise on clearance of oxidant stress products and loosely bound iron. *Med. Sci. Sports Exerc.* **25**, 213–217 (1999).
70. Kalyanaraman, B. *et al.* Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 1–6 (2012).
71. Reid, M. B. Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Med. Sci. Sports Exerc.* 371–376 (2001).
72. Reid, M. B. *et al.* Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J. Appl. Physiol.* **73**, 1797–1804 (1992).
73. Bejma, Ramires & Ji. Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: Differential effects in the myocardium and liver. *Acta Physiol. Scand.* **169**, 343–351 (2000).

74. Degli Esposti, M. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. *Methods* **26**, 335–340 (2002).
75. Atalay, M., Seene, T., Hänninen, O. & Sen, C. K. Skeletal muscle and heart antioxidant defences in response to sprint training. *Acta Physiol. Scand.* **158**, 129–134 (1996).
76. Patwell, D. M., McArdle, A., Morgan, J. E., Patridge, T. a. & Jackson, M. J. Release of reactive oxygen and nitrogen species from contracting skeletal muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 1064–1072 (2004).
77. Herrero, a. & Barja, G. Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **32**, 609–615 (2000).
78. Ji, L. L. in *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise* 689–712 (2000).
79. Best, T. M., Fiebig, R., Corr, D. T., Brickson, S. & Ji, L. Free radical activity, antioxidant enzyme, and glutathione changes with muscle stretch injury in rabbits. *J. Appl. Physiol.* **87**, 74–82 (1999).
80. Zuo, L., Pasniciuc, S., Wright, V. P., Merola, a J. & Clanton, T. L. Sources for superoxide release: lessons from blockade of electron transport, NADPH oxidase, and anion channels in diaphragm. *Antioxid. Redox Signal.* **5**, 667–675 (2003).
81. Kumar, C., Reddy, V., Bejma, J. & Ji, L. L. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **87**, 465–470 (1999).
82. O’Neill, C. a, Stebbins, C. L., Bonigut, S., Halliwell, B. & Longhurst, J. C. Production of hydroxyl radicals in contracting skeletal muscle of cats. *J. Appl. Physiol.* **81**, 1197–1206 (1996).
83. Ji, L. L. *et al.* Oxidative stress and aging: role of exercise and its influences on antioxidant systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **854**, 102–117 (1998).
84. Chandwaney, R., Leichtweis, S., Leeuwenburgh, C. & Ji, L. L. Oxidative stress and mitochondrial function in skeletal muscle: Effects of aging and exercise training. *Age (Omaha).* **21**, 109–117 (1998).

85. Gomez-Cabrera, M.-C., Viña, J. & Ji, L. L. Interplay of oxidants and antioxidants during exercise: implications for muscle health. *Phys. Sportsmed.* **37**, 116–123 (2009).
86. Steinbacher, P. & Eckl, P. Impact of Oxidative Stress on Exercising Skeletal Muscle. *Biomolecules* 356–377 (2015).
87. Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* **12**, 913–922 (2007).
88. Boveris, a & Cadenas, E. Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubisemiquinone. *IUBMB Life* **50**, 245–250 (2000).
89. Cadenas, E. & Davies, K. J. a. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 222–230 (2000).
90. Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L. & Lesnefsky, E. J. Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III. *J. Biol. Chem.* **278**, 36027–36031 (2003).
91. Kowaltowski, A. J., de Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F. & Vercesi, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 333–343 (2009).
92. Perevoshchikova, I. V., Quinlan, C. L., Orr, A. L., Gerencser, A. a. & Brand, M. D. Sites of superoxide and hydrogen peroxide production during fatty acid oxidation in rat skeletal muscle mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **61**, 298–309 (2013).
93. Turrens, J. F. & Boveris, a. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* **191**, 421–427 (1980).
94. Turrens, J. F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Rep.* **17**, 3–8 (1997).
95. Kudin, A. P., Bimpong-Buta, N. Y. B., Vielhaber, S., Elger, C. E. & Kunz, W. S. Characterization of Superoxide-producing Sites in Isolated Brain Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **279**, 4127–4135 (2004).

96. Kudin, A. P., Malinska, D. & Kunz, W. S. Sites of generation of reactive oxygen species in homogenates of brain tissue determined with the use of respiratory substrates and inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1777**, 689–695 (2008).
97. Muller, F. L., Liu, Y. & Van Remmen, H. Complex III Releases Superoxide to Both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane. *J. Biol. Chem.* **279**, 49064–49073 (2004).
98. Kudin, A. P., Debska-Vielhaber, G. & Kunz, W. S. Characterization of superoxide production sites in isolated rat brain and skeletal muscle mitochondria. *Biomed. Pharmacother.* **59**, 163–168 (2005).
99. Boveris, a, Cadenas, E. & Stoppani, a O. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **156**, 435–444 (1976).
100. Cadenas, E., Boveris, a, Ragan, C. I. & Stoppani, a O. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **180**, 248–257 (1977).
101. Turrens, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* **552**, 335–344 (2003).
102. St-Pierre, J. Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *J. Biol. Chem.* **277**, 44784–44790 (2002).
103. Crofts, A. The cytochrome bc<sub>1</sub> complex: function in the context of structure. *Annu Rev Physiol* **66**, 680–733 (2004).
104. Cottet-Rouselle, Ronot, X., Lerverve, X. & Mayol, J. Cytometric Assessment of Mitochondria Using Fluorescent Probes. *Cytometry* **79A**, 405–425 (2011).
105. Goncalves, R. L. S., Quinlan, C. L., Perevoshchikova, I. V., Hey-Mogensen, M. & Brand, M. D. Sites of Superoxide and Hydrogen Peroxide Production by Muscle Mitochondria Assessed *ex Vivo* under Conditions Mimicking Rest and Exercise. *J. Biol. Chem.* **290**, 209–227 (2015).
106. Boveris, A. Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Tissue Hypoxia and Ischemia* 67–82 (1977).

107. Kuppusamy, P. & Zweier, J. L. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J. Biol. Chem.* **264**, 9880–9884 (1989).
108. Koyama, K. *et al.* Role of xanthine oxidase in delayed lipid peroxidation in rat liver induced by acute exhausting exercise. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **80**, 28–33 (1999).
109. Chance, B., Sies, H. & Boveris, a. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527–605 (1979).
110. Yu, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* **74**, 139–162 (1994).
111. Alessio, H. M., Goldfarb, a H. & Cutler, R. G. MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. *Am. J. Physiol.* **255**, C874–C877 (1988).
112. Vollaard, N. B. J., Cooper, C. E. & Shearman, J. P. Exercise-induced oxidative stress in overload training and tapering. *Med. Sci. Sports Exerc.* **38**, 1335–1341 (2006).
113. Alessio, H. M. Exercise induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* 218–224 (1992).
114. Radak, Z. & Goto, S. The effects of exercise, ageing and energy restriction on protein oxidation and DNA damage in skeletal muscle. *Oxidative Stress Skelet. Muscle* 87–102 (1998).
115. Asami, S. *et al.* Effects of forced and spontaneous exercise on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 678–682 (1998).
116. Powers, S. K., Ji, L. L. & Leeuwenburgh, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med. Sci. Sports Exerc.* **31**, 987–997 (1999).
117. Li Li Ji. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidants nutrition. *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 1079–1086 (1995).

118. Yavari, A., Javadi, M., Mirmiran, P. & Bahadoran, Z. Exercise-induced oxidative stress and dietary antioxidants. *Asian J. Sports Med.* **6**, e24898 (2015).
119. Kanter, M. M. Free radicals and exercise: effects of nutritional antioxidant supplementation. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 375–398 (1995).
120. Gohil, K., Packer, L., de Lumen, B., Brooks, G. a & Terblanche, S. E. Vitamin E deficiency and vitamin C supplements: exercise and mitochondrial oxidation. *J. Appl. Physiol.* **60**, 1986–1991 (1986).
121. Packer, L. Protective role of vitamin E in biological systems. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**, 1050S–1055S (1991).
122. Leeuwenburgh, C. *et al.* Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am. J. Physiol.* **272**, R363–R369 (1997).
123. Leichtweis, S. B., Leeuwenburgh, C., Parmelee, D. J., Fiebig, R. & Ji, L. L. Rigorous swim training impairs mitochondrial function in post-ischaemic rat heart. *Acta Physiol. Scand.* **160**, 139–148 (1997).
124. Leeuwenburgh, C. *et al.* Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue- and muscle fiber- specific. *Am J Physiol* **272**, 363–369 (1997).
125. Ji, L. L. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 142–152 (2008).
126. Ji, L. L. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med. Sci. Sports Exerc.* 225–231 (1992).
127. Powers, S. K. *et al.* Training-induced oxidative and antioxidant enzyme activity in the diaphragm: Influence of exercise intensity and duration. *Respir. Physiol.* **95**, 226–237 (1994).
128. O'Connor, J. E. *et al.* The relevance of flow cytometry for biochemical analysis. *IUBMB Life* **51**, 231–9 (2001).
129. Mattiasson, G. Analysis of Mitochondrial Generation and Release of Reactive Oxygen Species. *Cytom. Part A* **96**, 89–96 (2004).

130. Robinson, K. M. *et al.* Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 15038–15043 (2006).
131. Rothe, G. & Valet, G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J. Leukoc. Biol.* **47**, 440–448 (1990).
132. Umegaki, T. *et al.* Flow cytometric analysis of ca-induced membrane permeability transition of isolated rat liver mitochondria. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **42**, 35–44 (2008).
133. Rothe, G., Oser, a & Valet, G. Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften* **75**, 354–355 (1988).
134. Campos P., Opazo N., C. J. L. Estallido Respiratorio En Granulocitos. *Rev. Latinoam. Actual. Biomédicas ISSN* **1**, 17–21 (2007).
135. Kooy, N. W., Royall, J. a., Ischiropoulos, H. & Beckma, J. S. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Biol. Med.* **16**, 149–156 (1994).
136. Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Yoshihiro, K., Haskó, G. & Pacher, P. Simple quantitative detection of mitochondria superoxide production in kive cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 203–208 (2008).
137. LeBel, C. P., Ischiropoulos, H. & Bondy, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 227–231 (1992).
138. Labiós, M. *et al.* Effects of eprosartan on mitochondrial membrane potential and H2O2 levels in leucocytes in hypertension. *J. Hum. Hyerptension* **22**, 493–500 (2008).
139. Cossarizza, A. & Salvioli, S. Flow Cytometric Analysis of Mitochondrial Membrane Potential Using JC-1. *Curr. Protoc. Cytom.* supplement 13 (2000).
140. Lugli, E., Troiano, L. & Cossarizza, A. Polychromatic Analysis of Mitochondrial Membrane Potential Using JC-1. *Curr. Protoc. Cytom.* 1–15 (2007).

141. Lecoeur, H. *et al.* Real-time flow cytometry analysis of permeability transition in isolated mitochondria. *Exp. Cell Res.* **294**, 106–117 (2004).
142. Petit, P. X. Flow Cytometric Analysis of Rhodamine 123 Fluorescence during Modulation of the Membrane Potential in Plant Mitochondria. *Plant Physiol.* **98**, 279–286 (1992).
143. Juan, G., Cavazzoni, M., Sáez, G. T. & O'Connor, J. E. A fast kinetic method for assessing mitochondrial membrane potential in isolated hepatocytes with rhodamine 123 and flow cytometry. *Cytometry* **15**, 335–42 (1994).
144. Medina, J. M., López-Mediavilla, C. & Orfao, A. Flow cytometry of isolated mitochondria during development and under some pathological conditions. *FEBS Lett.* **510**, 127–132 (2002).
145. O'Connor, J. E., Vargas, J., Kilmer, B., Hernández-Yago, J. & Grisolia, S. Use of rhodamine 123 to investigate alterations in mitochondrial activity in isolated mouse liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151**, 568–573 (1988).
146. Lopez-Mediavilla, C., Orfao, A., Gonzalez, M. & Medina, J. M. Identification by flow cytometry of two distinct rhodamine- 123-stained mitochondrial populations in rat liver. *FEBS Lett.* **254**, 115–120 (1989).
147. Lampiao, F., Strijdom, H. & du Plessis, S. S. Direct nitric oxide measurement in human spermatozoa: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. *Int. J. Androl.* **29**, 564–567 (2006).
148. Lacza, Z. *et al.* Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 1217–1228 (2003).
149. Walker, B. D. *The Use of the Oxygen Electrode & Fluorescence Probes in Simple Measurements of.* (1987).
150. Gonz, L. & Bola, C. USE OF OXYGEN ELECTRODE IN MEASUREMENTS OF PHOTOSYNTHESIS. (1993).
151. Gnaiger, E. *et al.* High-resolution respirometry – optimum permeabilization of the cell membrane by digitonin SB. *Bio ThermoKinetics* **95**, 89–94 (1998).

152. Silva, A. M. & Oliveira, P. J. Evaluation of respiratory with Clark Type Electrode in Isolated Mitochondria and Permeabilized Animals cells. *Mitochondrial Bioenerg.* **810**, 7–8 (2012).
153. Zarzoso, M. *et al.* The training-induced changes on automatism, conduction and myocardial refractoriness are not mediated by parasympathetic postganglionic neurons activity. *Eur. J. Appl. Physiol.* **112**, 2185–2193 (2012).
154. Vargas, R. *Diccionario de Teoría del Entrenamiento Deportivo.* (2007).
155. Will, Y., Hynes, J., Ogurtsov, V. I. & Papkovsky, D. B. Analysis of mitochondrial function using phosphorescent oxygen-sensitive probes. *Nat. Protoc.* **1**, 2563–72 (2006).
156. Frezza, C., Cipolat, S. & Scorrano, L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat. Protoc.* **2**, 287–295 (2007).
157. Lorry, O., Rosebrough, N., Randall, R. J. & Lewis, A. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Readings* **193**, 265–275 (1951).
158. Jenkins, R. R. Relationship to Exercise. **170**, 156–170 (1988).
159. Hassan, H. M. & Fridovich, I. Intracellular production of superoxide peroxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds. *Biochem. Biophys.* **196**, 385–395 (1979).
160. Kuznetsov, A. V *et al.* Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat. Protoc.* **3**, 965–976 (2008).
161. Fernández-Vizarra, E., Fernández-Silva, P. & Enríquez, J. a. Isolation of mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. *Cell Biol. Four-Volume Set* **2**, 69–77 (2006).
162. Madsen, K., Ertbjerg, P., Djurhuus, M. & Pedersen, P. Calcium content and respiratory control index of skeletal muscle mitochondria during exercise and recovery. *American J. Physiol. Metab.* **271**, E1044–E1050 (1996).

## BIBLIOGRAFÍA

---

163. Nethery, D., Stofan, D., Callahan, L., DiMarco, a & Supinski, G. Formation of reactive oxygen species by the contracting diaphragm is PLA(2) dependent. *J. Appl. Physiol.* **87**, 792–800 (1999).
164. Zhu, X. *et al.* Nitric oxide modulates neuromuscular transmission during hypoxia in rat diaphragm. *Muscle Nerve* **33**, 104–112 (2006).
165. Zhu, X. *et al.* Hypoxia-induced dysfunction of rat diaphragm: role of peroxynitrite. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **288**, L16–26 (2005).
166. Masoud, A., Kiran, R. & Sandhir, R. Impaired mitochondrial functions in organophosphate induced delay neuropathy in rats. *Cell Mol Neurobiol* **29**, 1245–1255 (2009).

