



# UNIVERSIDAD DE LEÓN

Departamento de Ciencias Biomédicas

Área de Fisiología

---

**Efecto de un programa de entrenamiento  
excéntrico sobre la regulación génica de la  
óxido nítrico sintasa en ratas sometidas a  
un protocolo de ejercicio excéntrico agudo**

---



**Memoria presentada por la Licenciada María Elena Lima Cabello para la  
obtención del grado de Doctor por la Universidad de León**

**León, 2010**





**UNIVERSIDAD DE LEÓN**

**INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS  
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)**

Las Dras. Dña. Mar Almar Galiana y Dña. María José Cuevas González, como directoras de la Tesis Doctoral titulada: “Efecto de un programa de entrenamiento excéntrico sobre la regulación génica de la óxido nítrico sintasa en ratas sometidas a un protocolo de ejercicio excéntrico agudo” realizada por Dña. María Elena Lima Cabello, en el Departamento de Ciencias Biomédicas, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa

Lo que firman, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 19 de mayo de 2010.

Las directoras de la Tesis Doctoral

**Fdo: Mar Almar Galiana**

**Fdo: María José Cuevas González**





**UNIVERSIDAD DE LEÓN**

**ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO  
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y  
norma 7ª de las Complementarias de la ULE)**

El Departamento de Ciencias Biomédicas en su reunión celebrada el día 3 de Junio de 2010 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada: "Efecto de un programa de entrenamiento excéntrico sobre la regulación génica de la óxido nítrico sintasa en ratas sometidas a un protocolo de ejercicio excéntrico agudo", dirigida por las Dras. Dña. Mar Almar Galiana y Dña. María José Cuevas González, y elaborada por Dña. María Elena Lima Cabello, cuyo título en inglés es: "Effect of an eccentric training program on gene regulation of nitric oxide synthase in acute eccentric exercised rats".

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 3 de Junio de 2010.

VºBº

La Directora del Departamento,

La secretaria,

**Fdo.: Dra. Mª Jesús Tuñón González**

**Fdo.: Dra. Nélida Fernández Martínez**



*A mi familia y amigos*



*“He aquí mi secreto, que no puede ser más simple:*

*sólo con el corazón se puede ver bien;*

*lo esencial es invisible para los ojos”*

*Antoine de Saint-Exupéry*



## **AGRADECIMIENTOS:**

Hay que ver cómo son las cosas, la parte de la Tesis que debería ser más sencilla de escribir es precisamente la que más cuesta. Se hace difícil reflejar seis años de tu vida en unas pocas páginas. Será porque esta aventura es a la vez la de mucha gente. Será porque nos damos cuenta de cómo cambian las cosas. Será porque el recuerdo nos ablanda y se materializa. Será...

Un día de febrero, después de las incertidumbres propias de entrar en un sitio nuevo y tan distinto llegué al Departamento de Fisiología de la mano de María José, una de mis directoras de Tesis, ella me dio ese pequeñito empujón que me llevó inconscientemente a introducirme y desenvolverme en este complicado mundo de la investigación, orientándome en mis primeras experiencias en el laboratorio. Ha sido un largo camino el que hemos recorrido y en el que he aprendido mucho. Más tarde conocí a Mar, mi otra directora de Tesis, ella me recibió encantada desde el primer momento, gracias por tu tiempo, por tu rigurosidad científica y gracias a las dos por vuestra proximidad, por la libertad y la confianza brindada día a día. Gracias a Javier por ofrecerme la oportunidad de desarrollar este trabajo, por su constante consejo y orientación.

Poco a poco fui alejándome de mi timidez, gracias a todos aquellos con los que he compartido el día a día en el laboratorio, en un principio a María y a Virginia por vuestras ganas de compartirlo todo y a mi compañera de "mini" despacho, Rebeca, por su alegría al llegar cada mañana. No puedo olvidarme de todos los miembros de Fisiología que me han rodeado y me recibieron desde un primer momento como una más, especialmente Paquita, Pilar, Ana y sus reflexiones, María Jesús con

su calidez y el no entender que hacía una chica como yo aquí, en León, con tantísimo frío..., las historias de Ariel. Y cómo no, gracias a Ludy y a Héctor, todo a vuestro lado se hace más divertido.

Una mención muy especial e importante para mí va para Victoria, Sonia y José Luis. Sois un referente en lo científico y en lo personal, vuestra amistad sin duda es el mejor regalo de todos estos años, gracias. Por supuesto, tengo que agradecer a Nuria y a Marta Baldini (desde que te conocí me encanta Rafaella Carrà, sobre todo el tema “Explota”) por ese duro entrenamiento de las ratas y todas esas horas en el animalario... parte de este trabajo os lo debo a vosotras.

Muchas gracias al grupo de Valencia, no se me ocurre pensar en otro grupo mejor al que pudiéramos podido ir a parar. Gracias por esos “ChIPs”, y eso hay que agradeceréselo a Luis Torres.

Gracias a mis niñas: Gracia, Irene, Miriam y Bea, ya son muchos los años que nos conocemos. Diferentes, pero todas grandes mujeres. Gracias por vuestra alegría, por vuestro saber escuchar, por emocionaros con lo pequeño y con lo grande, por compartirlo todo, por abrir vuestros corazones. Javi, mil gracias por ser tan paciente conmigo, por emocionarte con los resultados, por querer aprender, aguantaremos nuestros ataques de “esto vamos a ordenarlo y a cambiarlo de sitio”.

Al resto de compañeros de laboratorio: Guilherme, Cristiano, Rodrigo, y más recientemente a Sara y Raquel por su espontaneidad y los buenos ratos.

Gracias a mis padres y a mis hermanos. Os quiero mucho. Gracias por estar siempre ahí, por sentirnos orgullosos, por enseñarme lo que es luchar y salir adelante. Os debo el haber podido llegar hasta aquí y os necesito para llegar más lejos. Gracias al resto de la familia y amigos que con tanto cariño me han animado durante todo este tiempo.

Y por último, gracias a una persona muy especial y a su entorno, por ayudarme a progresar, por su optimismo ante la vida y por estar siempre.

¡Un beso a todos!



**Parte de los resultados expuestos en la presente Memoria han sido objeto de las siguientes publicaciones y comunicaciones:**

“Eccentric exercise induces nitric oxide synthase expression through nuclear factor kappa B modulation in rat skeletal muscle” Lima, E.; Cuevas, M.J.; Garatachea, N.; Baldini, M.; Almar, M. and González-Gallego J. *Journal of Applied Physiology* 108: 575-583, 2010

“Efecto de la pirrolidina ditiocarbamato sobre las alteraciones inflamatorias en ratas sometidas a ejercicio físico excéntrico agudo: Estudio de los mecanismos moleculares implicados” Lima, E.; Almar, M.; Baldini, M.; Garatachea, N.; Cuevas, M.J. and González-Gallego, J. *I Simposio Internacional sobre Avances en Ciencias del Deporte. Rendimiento Deportivo*. Sevilla, 28-30 de marzo de 2008

“Acute exercise induces expression of NOS isoforms in skeletal muscle through NF- $\kappa$ B modulation”. Lima, E.; Almar, M.; Baldini, M.; Garatachea, N.; Cuevas, M.J. y González-Gallego, J. XXX FIMS World Congress of Sports Medicine. Barcelona, 18-23 de noviembre de 2008 *Archivos de Medicina del Deporte XXV*, (6) 537.

“Eccentric exercise induces HIF-1 activation and iNOS expression in rat skeletal muscle” Lima, E.; Almar, M.; Baldini, M.; Garatachea, N.; Cuevas, M.J. and González-Gallego, J. XXXV Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas en colaboración con la Physiological Society (UK and Eire). Valencia, 17-20 de febrero de 2009 *Acta Physiologica* 195, S667, P18.



## ABREVIATURAS UTILIZADAS

---

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ANOVA	Test de análisis de varianza
ATP	Adenosín trifosfato
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
BSA	Albúmina sérica bovina
CK	Creatinquinasa
cols	Colaboradores
COX-2	Ciclooxigenasa-2
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitól
DVL	Vastolateral profundo
EEM	Error estandar de la media
EDTA	Ácido etilén diamino tetraacético
EMSA	Ensayo de movilidad electroforética
eNOS	Enzima óxido nítrico sintasa endotelial
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FAD	Flavín adenina dinucleótido
FMN	Flavín mononucleótido

g	Gramo
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogeno
HO <sub>2</sub> <sup>·</sup>	Radical hidroperóxido
HIF	Factor inducible por hipoxia
HPRT	Hipoxantina fosforibosil transferasa
HRP	Peroxidasa de rábano picante
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal
IκB-α	Proteína inhibidora-κBα
IKK	Quinasa del inhibidor KB
IL	Interleucina
INF-γ	Interferón γ
iNOS	Enzima óxido nítrico sintasa inducible
kDa	Kilo Dalton
LDH	Lactato deshidrogenasa
LPS	Lipopolisacárido
NAC	N-acetil cisteína
NO <sub>2</sub>	Dióxido de nitrógeno
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Óxido nitroso
N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Tetraóxido de dinitrógeno
NaCl	Cloruro sódico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaOH	Hidróxido sódico
NF-κB	Factor de transcripción nuclear kappa-B
nNOS	Enzima óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico

$\text{NO}_2^-$	Nitrito
$\text{NO}_3^-$	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintasa
$\text{O}_2$	Oxígeno molecular
$\text{O}_2^{\cdot -}$	Anión superóxido
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxilo
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDTC	Pirrolidina ditiocarbamato
Pi	Fosfato inorgánico
PMSF	Fenilmetil-sulfonil fluoruro
Poli-dI-dC	Ácido polidesoxilinosínico-desoxocitidínico
P-I $\kappa$ B $\alpha$	Proteína inhibidora- $\kappa$ B- $\alpha$ fosforilada
P-IKK $\alpha$	I $\kappa$ B kinasa- $\alpha$ fosforilada
RT	Transcripción inversa
RT-PCR	Transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa
s	Segundos
SDS	Duodecil sulfato sódico
TBE	Tampón bórico Tris/EDTA
TEMED	Tetrametiletildiamida

TNF- $\alpha$       Factor de necrosis tumoral alfa

U              Unidad

UV            Ultravioleta

V              Voltios

xg             Unidades de gravedad

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS.....</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>VII</b>
1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1.- Características del ejercicio excéntrico.....	9
2.1.1.- Generalidades.....	9
2.1.2.- Ejercicio excéntrico.....	9
2.1.3.- Entrenamiento excéntrico.....	11
2.2.- Inflamación.....	13
2.2.1.- Generalidades.....	13
2.2.1.1.- La respuesta inflamatoria.....	14
2.2.1.2.- Citoquinas.....	17
2.3.- Estrés oxidativo y nitrosativo.....	22
2.3.1.- Generación de radicales libres durante la contracción muscular, papel en la señalización celular.....	23
2.3.2.- Óxido nítrico (NO).....	25
2.3.2.1.- Síntesis del óxido nítrico.....	27
2.3.2.2.- Óxido nítrico sintasa (NOS).....	27
2.3.3.- Acciones fisiológicas del óxido nítrico.....	28
2.3.4.- Efecto de las ERNs en la contracción muscular.....	29
2.3.5.- Regulación de las isoformas de la NOS.....	33
2.4.- Factores de transcripción.....	35
2.4.1.- Factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB).....	36
2.4.2.- Componentes de NF-κB.....	37
2.4.3.- Proteínas IκB.....	39
2.4.4.- Rutas de activación de NF-κB.....	40
2.4.5.- Agentes inductores de la activación de NF-κB.....	42
2.4.6.- Genes regulados por NF-κB.....	43
2.4.7.- NF-κB y modulación en el ejercicio.....	44
2.4.8.- Factor inducible por hipoxia (HIF-1).....	45
2.4.9.- Vías de estimulación de HIF-1.....	47

2.4.10.- HIF-1 y ejercicio.....	49
2.4.11.- Inhibición de NF- $\kappa$ B/HIF por agentes antioxidantes y pirrolidona ditiocarbamato (PDTC).....	51
<b>3.- MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>53</b>
3.1.-Ámbito de trabajo.....	55
3.2.-Animales.....	55
3.3.- Diseño experimental.....	55
3.3.1.- Grupos experimentales.....	56
3.4.- Procedimiento quirúrgico. Recogida de muestras.....	57
3.5.- Soluciones utilizadas.....	58
3.6.- Aparatos utilizados.....	58
3.7.- Métodos analíticos.....	60
3.7.1.- Determinaciones en el músculo esquelético vastolateral profundo (DVL).....	60
3.7.1.1.- Obtención de homogeneizado fresco.....	60
3.7.1.2.- Obtención de la fracción citosólica.....	60
3.7.1.3.- Obtención de extractos nucleares.....	61
3.7.1.4.- Concentración de proteínas.....	62
3.7.1.5.- Cuantificación de la proteína nNOS, iNOS, eNOS, I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ -fosforilado, IKK $\alpha$ , IKK $\alpha$ -fosforilado e IL-1 $\beta$ .....	63
3.7.1.6.- Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).....	66
3.7.1.7.- Análisis de la expresión génica por retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-qPCR).....	68
3.7.1.8.- Ensayo de Inmunoprecipitación de fragmentos de cromatina (ChIP assay).....	75
3.8 Análisis estadístico.....	82
<b>4.- RESULTADOS.....</b>	<b>83</b>
4.1.- Efecto de una sesión de ejercicio excéntrico agudo y de un programa de entrenamiento excéntrico o de la administración de PDTC, previos al ejercicio agudo, sobre la formación de peroxinitritos.....	85
4.2.- Efecto de una sesión de ejercicio excéntrico agudo y de un programa de entrenamiento excéntrico o de la administración de PDTC, previos al ejercicio agudo, sobre la activación del NF- $\kappa$ B y la expresión de las proteínas más relevantes de su ruta de activación: I $\kappa$ B $\alpha$ , IKK y formas fosforiladas.....	86
4.2.1.- I $\kappa$ B $\alpha$ .....	87
4.2.2.- I $\kappa$ B $\alpha$ -fosforilado.....	88
4.2.3.- IKK $\alpha$ .....	89
4.2.4.- IKK $\alpha$ -fosforilado.....	89

4.2.5.- Activación del NF- $\kappa$ B.....	90
4.3.- Efecto de una sesión de ejercicio excéntrico agudo y de un programa de entrenamiento excéntrico o de la administración de PDTC, previos al ejercicio agudo, sobre la expresión de los genes de las isoformas de la enzima óxido nítrico sintetasa en el músculo DVL.....	92
4.3.1.- Contenidos de ARNm de las isoformas de óxido nítrico sintasa.....	92
4.3.2.- Contenido proteico de las isoformas de óxido nítrico sintasa.....	93
4.4.- Efecto de una sesión de ejercicio excéntrico agudo y de un programa de entrenamiento excéntrico o de la administración de PDTC, previos al ejercicio agudo, sobre la inmunoprecipitación de los complejos NF- $\kappa$ B-ADN	95
4.5.- Efecto de una sesión de ejercicio excéntrico agudo y de un programa de entrenamiento excéntrico o de la administración de PDTC, previos al ejercicio agudo, sobre la inmunoprecipitación de los complejos ARN polimerasa II-ADN.....	97
4.6.- Efecto de una sesión de ejercicio excéntrico agudo y de un programa de entrenamiento excéntrico o de la administración de PDTC, previos al ejercicio agudo, sobre la activación del HIF-1 $\alpha$ .....	99
4.7.- Efecto de una sesión de ejercicio excéntrico agudo y de un programa de entrenamiento excéntrico o de la administración de PDTC, previos al ejercicio agudo, sobre la inmunoprecipitación de los complejos HIF1 $\alpha$ -ADN	101
4.8.- Efecto de una sesión de ejercicio excéntrico agudo y de un programa de entrenamiento excéntrico o de la administración de PDTC, previos al ejercicio agudo, sobre la inmunoprecipitación de los complejos ARN polimerasa II-ADN.....	103
4.9.- Efecto de una sesión de ejercicio excéntrico agudo y de un programa de entrenamiento excéntrico o de la administración de PDTC, previos al ejercicio agudo, sobre la expresión génica de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ .....	105
5.- DISCUSIÓN.....	107
5.1.- Efectos de una sesión de ejercicio excéntrico agudo.....	109
5.2.- Efecto de un programa de entrenamiento excéntrico previo a una sesión de ejercicio excéntrico agudo.....	125
6.- CONCLUSIONES.....	131
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	137



# ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1.-	<i>Esquema de las principales dianas del óxido nítrico en el músculo .....</i>	32
Figura 2.-	<i>Mecanismo de acción del factor de transcripción NF-<math>\kappa</math>B.....</i>	38
Figura 3.-	<i>Ciclo de activación-degradación de HIF-1<math>\alpha</math>.....</i>	47
Figura 4.-	<i>Esquema de la técnica de inmunoprecipitación de factores de transcripción.....</i>	79
Figura 5.-	<i>Formación de peroxinitritos en los diferentes grupos experimentales.....</i>	85
Figura 6.-	<i>Expresión de proteína I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math> en la fracción citosólica de músculo esquelético vastolateral profundo (DVL) en los diferentes grupos experimentales.....</i>	87
Figura 7.-	<i>Expresión de proteína I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math> fosforilada en la fracción citosólica de músculo esquelético vastolateral profundo (DVL) en los diferentes grupos experimentales.....</i>	88
Figura 8.-	<i>Expresión de proteína IKK en la fracción citosólica de músculo esquelético vastolateral profundo (DVL) en los diferentes grupos experimentales.....</i>	89
Figura 9.-	<i>Expresión de proteína IKK<math>\alpha</math>-fosforilada en la fracción citosólica de músculo esquelético vastolateral profundo (DVL) en los diferentes grupos experimentales.....</i>	90
Figura 10.-	<i>Activación del factor de transcripción nuclear <math>\kappa</math>B en el extracto nuclear del músculo esquelético vastolateral profundo (DVL) en los distintos grupos experimentales.....</i>	91
Figura 11.-	<i>Expresión de proteínas nNOS, iNOS, y eNOS en la fracción citosólica de músculo esquelético vastolateral profundo (DVL) en los diferentes grupos experimentales.....</i>	94
Figura 12.-	<i>Inmunoprecipitación de los complejos NF-<math>\kappa</math>B-ADN.....</i>	96
Figura 13.-	<i>Inmunoprecipitación de los complejos ARN polimerasa II-ADN.....</i>	98
Figura 14.-	<i>Activación del factor de transcripción HIF-1<math>\alpha</math> en el extracto nuclear del músculo esquelético vastolateral profundo (DVL) en los distintos grupos experimentales.....</i>	100
Figura 15.-	<i>Inmunoprecipitación de los complejos HIF1<math>\alpha</math>-ADN.....</i>	102

Figura 16.- <i>Inmunoprecipitación de los complejos ARN polimerasa II-ADN.....</i>	104
Figura 17.- <i>Contenido de ARNm de IL-1<math>\beta</math> en los diferentes grupos experimentales.....</i>	105
Figura 18.- <i>Expresión de la proteína IL-1<math>\beta</math> en la fracción citosólica de músculo esquelético vastolateral profundo (DVL) en los diferentes grupos experimentales.....</i>	106

# ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 1.- <i>Oligonucleótidos utilizados en la RT-PCR como iniciadores en la amplificación de fragmentos correspondientes a cada gen.....</i>	74
Tabla 2.- <i>Oligonucleótidos empleados para el análisis por PCR del ADN inmunoprecipitado.....</i>	81
Tabla 3.- <i>Contenido de ARNm de los genes de la nNOS, iNOS y eNOS en los distintos grupos experimentales.....</i>	92



# **1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**



La práctica regular de ejercicio físico aporta un beneficio indiscutible para la salud de los seres humanos, incluyendo el efecto preventivo sobre diferentes patologías crónicas como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes.

Paradójicamente, durante la última década, en que el ejercicio físico ha sido ampliamente estudiado, se ha asociado la práctica de éste con un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en el tejido muscular, que a su vez se incrementan con el ritmo metabólico y el consumo de oxígeno. Dichas especies incluyen el óxido nítrico (NO), cuya participación es relevante en la regulación de multitud de procesos fisiológicos en los que se ha visto que ejerce funciones de vasodilatador, neurotransmisor, antimicrobiano e inmunomodulador. La síntesis de NO está catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Existen tres isoformas descritas para esta enzima, la neuronal (nNOS), la inducible (iNOS) y la endotelial (eNOS), codificadas por distintos genes y que presentan diferencias tanto en sus propiedades catalíticas como en su regulación. La producción de elevadas concentraciones de NO por parte de dichas isoformas, puede estimular el proceso inflamatorio y una elevación de las concentraciones de citoquinas como la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Durante la inflamación, el NO y otras especies reactivas de nitrógeno derivadas del mismo, tales como el peroxinitrito, son potencialmente tóxicas, contribuyendo al daño oxidativo muscular y a la nitración proteica. La destrucción indiscriminada de células y tejidos por parte del NO y otras especies reactivas de nitrógeno pueden jugar un papel significativo en la patología de muchos cuadros inflamatorios. Por ello la regulación de la expresión muscular de las isoformas de NOS es un proceso delicado que requiere ser investigado en detalle.

La expresión génica de la enzima iNOS implica diferentes rutas de transducción de señales, a través del factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB). La regulación transcripcional de nNOS y eNOS es particularmente compleja. En la última década, se pensaba que ambas isoformas se expresaban de forma constitutiva, sin embargo, recientemente los estudios se han centrado en su modulación por distintos factores químicos y físicos, incluso bajo determinadas condiciones fisiológicas. Los factores de transcripción implicados en la activación de los genes de nNOS y eNOS no se han identificado, pero determinados factores de transcripción sensibles a estos cambios, como el NF-κB y el factor inducible por hipoxia (HIF), podrían ser dos candidatos bastante atractivos para la posible regulación de dichas isoformas.

Numerosos autores han manifestado un gran interés por la administración de antioxidantes como intervención terapéutica para contrarrestar el daño causado por el estrés oxidativo/nitrosativo producido durante el ejercicio. De hecho, el entrenamiento se plantea como una herramienta beneficiosa para atenuar significativamente el daño muscular, traducido en distintas respuestas fisiológicas, y la respuesta inflamatoria. Con el fin de minimizar los efectos causados por el ejercicio con un alto componente excéntrico, caracterizado por un conjunto de síntomas aparentemente bien definidos, se han propuesto entrenamientos que proporcionen un incremento en la capacidad contráctil del músculo, un mínimo coste metabólico y una percepción menor de esfuerzo.

Contemplando todo lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo los objetivos específicos planteados, son los siguientes:

1. Valorar el posible daño nitrosativo causado por una sesión de ejercicio excéntrico agudo en aspectos tales como la nitración de proteínas celulares, marcador utilizado como medida indirecta de la formación de peroxinitritos, analizándose simultáneamente el efecto del compuesto antioxidante pirrolidina ditiocarbamato (PDTC) o del entrenamiento excéntrico.
2. Evaluar si una sesión de ejercicio excéntrico agudo induce cambios en la ruta de señalización del NF- $\kappa$ B y determinar si los posibles efectos sobre dicho factor de transcripción podrían prevenirse mediante la administración del compuesto PDTC, así como por un entrenamiento excéntrico de 8 semanas de duración.
3. Profundizar en el efecto de un ejercicio excéntrico agudo sobre la expresión génica de las distintas isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa, así como evaluar la posible atenuación de las mismas tras la realización del programa de entrenamiento o tras la administración de PDTC.
4. Analizar la relación entre la expresión de las diferentes isoformas de NOS y la vía de señalización del factor nuclear- $\kappa$ B en los diferentes grupos experimentales.
5. Analizar los efectos que el ejercicio físico excéntrico agudo produce en la activación del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF), su posible participación en la regulación de los genes de las distintas isoformas de la NOS y la influencia de un entrenamiento excéntrico o el tratamiento con PDTC sobre dicho factor.

6. Evaluar el papel que el ejercicio físico agudo con alto componente excéntrico produce en la expresión génica de algunos de los mediadores de la inflamación tales como la IL-1 $\beta$ , así como el efecto del entrenamiento y el tratamiento con PDTC, sobre la expresión de dicha citoquina.

## **2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



## **2.1. CARACTERÍSTICAS DEL EJERCICIO EXCÉNTRICO**

### **2.1.1 Generalidades**

El modelo de funcionamiento muscular presenta una serie de características especiales que se complementan entre sí. En todas las especies animales, cuando el músculo esquelético se activa mediante la generación de potenciales de acción, pueden producirse tres tipos de contracción:

*Contracción concéntrica*, en la que el músculo se activa y se acorta (sus dos inserciones se acercan durante la contracción).

*Contracción isométrica*, en la que el músculo se activa y no puede vencer la resistencia que tiene, con lo que su longitud no cambia.

*Contracción excéntrica*, en la que el músculo se activa pero la resistencia le vence, y se estira (sus dos inserciones se alejan durante la contracción).

Este criterio es importante, ya que los ejercicios se clasificarán según el tipo de contracción que predomine, y se ha observado, además, que producen diferentes efectos fisiológicos a nivel del organismo; p.e. el ejercicio excéntrico produce más daño oxidativo que el concéntrico (Amstrong, 1990).

### **2.1.2 Ejercicio excéntrico**

Como acabamos de ver, podemos definir la contracción muscular excéntrica como aquella en que la tensión que genera el músculo es

menor que la resistencia externa que se le aplica, por lo que el músculo se alarga o distiende (Tous, 1999). Cuando la fuerza aplicada a un músculo excede la fuerza producida por el mismo, éste se estira, absorbiendo energía mecánica (Lindstedt y cols., 2001). Así, podríamos decir que el papel primario de las contracciones excéntricas en actividades habituales de la vida diaria como correr, andar, saltar, etc, es la desaceleración y absorción de energía (Stauber, 1989). Por lo tanto, la aparición de este tipo de contracción muscular en determinados movimientos va a permitir a los músculos antagonistas la desaceleración y detención del gesto al final del movimiento. Esta contracción no se va a manifestar de forma aislada puesto que normalmente aparece integrada en una secuencia denominada “ciclo estiramiento-acortamiento”. Este funcionamiento muscular presenta una serie de características especiales que lo hacen diferente al resto de tipos de contracción.

Está ampliamente demostrado que un ejercicio con alto componente excéntrico, sobre todo cuando el organismo no está acostumbrado a ello, induce daño muscular. Dicho daño es provocado presumiblemente por la excesiva tensión a la que un número determinado de fibras es sometido durante esta contracción (Armstrong, y cols., 1983). De esta manera, la lesión cursa inicialmente con alteraciones de tipo mecánico (Armstrong y cols., 1991) que posteriormente se traducen en procesos y alteraciones de tipo metabólico (Pizza y cols., 1995). Además del daño muscular, el ejercicio excéntrico también puede provocar cambios en determinados componentes del sistema inmune (Akimoto y cols., 2002), incluyendo la elevación de los niveles de interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Ostrowski y cols., 1999; Vassilakopoulos y cols.,

2003). Se sabe que estas citoquinas están involucradas en la regulación de la respuesta inmune y de la inflamación. Y aunque la producción de estas citoquinas proinflamatorias son beneficiosas para la defensa del sistema, su sobreproducción en el proceso inflamatorio puede causar daño muscular, debilidad y un incremento del riesgo de infección (Meksawan y cols., 2004).

### **2.1.3 Entrenamiento excéntrico**

Las particularidades que acompañan la contracción excéntrica hacen que cada vez sean más los estudios interesados en las respuestas y adaptaciones que puede provocar un entrenamiento con un alto componente de este tipo. El entrenamiento excéntrico puede ser una alternativa a los clásicos entrenamientos de fuerza muscular, ya que se ha demostrado, en numerosos estudios, que existen incrementos significativos de la fuerza a través del entrenamiento excéntrico. Además dada la baja fatigabilidad, el bajo requerimiento cardiopulmonar (Vallejo y cols., 2006) y un incremento en la eficiencia metabólica asociado a este tipo de contracción, teóricamente éste sería un tipo de entrenamiento prolongado ideal para conseguir mejoras de fuerza con un gasto metabólico muy pequeño.

Se ha demostrado incluso como un entrenamiento excéntrico puede prevenir el daño muscular y la disminución de la pérdida de fuerza tras un ejercicio agudo (Vallejo y cols., 2006).

No son muchos los estudios científicos que recogen resultados sobre el efecto que tiene la realización de un entrenamiento excéntrico previo sobre la inducción del daño muscular. Si está claro que el ejercicio

excéntrico induce una cierta protección contra sucesivos daños provocados por contracciones excéntricas (García-López y cols., 2006). Por ello, es razonable pensar que al planificar un entrenamiento es importante introducir una parte de entrenamiento excéntrico específico (Allen, 2001).

Debido a la disparidad de resultados y a la falta de estudios que ahonden en marcadores de inflamación y estrés oxidativo, así como en las vías de activación génicas responsables de algunas de las respuestas inflamatorias, se hace necesario tener una idea más precisa de los mecanismos que subyacen a la hipotética adaptación producida por un entrenamiento específico excéntrico.

El daño muscular inducido especialmente por la contracción muscular excéntrica, induce daño muscular, el cual conlleva una serie de síntomas característicos como el aumento de la concentración sérica de determinadas proteínas musculares, p.e. la creatínquinasa (CK) (Toft y cols., 2002; Lee y Clarkson, 2003). En los últimos años se están utilizando otros métodos a través de los cuales se intenta cuantificar el daño muscular tras la realización de un ejercicio excéntrico. Uno de éstos métodos es el análisis de la activación de las células satélite, las cuales son responsables del desarrollo de las miofibrillas y su regeneración (Asakura y cols., 2001, Asakura y cols., 2002; Grounds y cols., 2002). Algunos de los estudios sobre la activación de las células satélite tras la realización de una sesión aguda de ejercicio se han realizado en humanos (Malm y cols., 2004), demostrándose un incremento en el número de células satélite tras una sesión de ejercicio muy intenso. En algunos casos, esta activación de células satélite ha derivado en una expresión de miosina fetal como señal de regeneración, produciéndose “nuevo

sarcoplasma” dónde se encontraban expresadas las isoformas de la miosina embriónica.

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

## **2.2 INFLAMACIÓN**

### **2.2.1 Generalidades**

La inflamación representa un estado fisiopatológico que altera sustancialmente el equilibrio redox celular. Está demostrado que, la realización de un ejercicio con alto componente excéntrico, cuando el organismo no está acostumbrado a ello, induce daño en el músculo esquelético, el cual induce una respuesta inflamatoria aguda. El valor adaptativo más importante reside en eliminar el tejido necrótico o los restos celulares lo que posteriormente promueve la reparación del daño en miofibrillas, fibras y matriz extracelular. Esto se logra a través de la rápida estimulación de varios tipos de células inflamatorias después del daño (Cannon y St Pierre, 1998).

Las fibras musculares se dañan debido a la fuerza física y el ejercicio intenso, el cual desencadena la liberación de citoquinas inflamatorias desde las células inmunes y/o desde el propio músculo dañado. Estas citoquinas están implicadas en la respuesta inmune y la inflamación. A pesar de que la producción de citoquinas pro-inflamatorias son beneficiosas para la defensa del sistema inmune, como se mencionó previamente, la sobreproducción de éstas puede provocar un daño en el músculo, lo que conlleva un aumento de riesgo de infección (Meksawan y cols., 2004). Durante la fase temprana del daño en el músculo las citoquinas inflamatorias promueven la expresión de diversos genes tales como la óxido nítrico sintasa.

La secuencia de eventos que se desencadenan tras la realización de un ejercicio inductor de daño culmina en la respuesta inflamatoria. Durante la inflamación el óxido nítrico y sus metabolitos, como el peroxinitrito, son potencialmente citotóxicos y son capaces de lesionar los patógenos y eliminar las células lesionadas.

#### 2.2.1.1 La respuesta inflamatoria

La lesión provocada mecánicamente en distintas estructuras de la célula muscular desencadena una respuesta inflamatoria mediada por la síntesis de leucotrienos y prostaglandinas (prostaglandina E2, PGE2). Además de las células del sistema inmune, que juegan un papel importante en el proceso de degeneración y regeneración del músculo, se produce una acumulación de líquido en el tejido lesionado, la cual es utilizada por muchos autores como marcador de daño. Las primeras células que se infiltran en el tejido dañado son los neutrófilos (Tidball,

1995) cuyos incrementos tras ejercicios de alta intensidad se han detectado tanto en el torrente sanguíneo (Pizza y cols., 1995) como en el propio tejido muscular (MacIntyre y cols., 2000). Los neutrófilos tienen un papel primordial en la defensa de determinados tejidos contra invasiones víricas y bacterianas. Durante su actividad fagocítica los neutrófilos liberan dos factores primarios: lisozimas (facilitan la degradación de las proteínas dañadas) y radicales superóxido ( $O_2^-$ ) (Petrone y cols., 1980). Su activación parece íntimamente relacionada con las microlesiones provocadas por el ejercicio. De hecho varios autores han encontrado correlaciones positivas entre los neutrófilos circulantes y ciertos marcadores de daño, tanto directos como indirectos (concentración plasmática de creatínquinasa (CK) y mioglobina), tras protocolos de ejercicio con alto componente excéntrico (Peake y cols., 2005). Al parecer, tanto los neutrófilos como los macrófagos contribuyen a la degradación del tejido dañado mediante la liberación de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Nguyen y Tidball, 2003) y pueden producir enzimas proinflamatorias (Cannon y St Pierre, 1998)

Toda esta respuesta inflamatoria es importante para la regulación de la respuesta en la fase aguda y la regeneración del músculo dañado después de este tipo de ejercicio.

Son muchos los estudios que demuestran la presencia de éste tipo de células inflamatorias en el músculo y en la sangre tras la realización de ejercicio con alto componente excéntrico. No obstante, los tipos de células y tejidos estudiados, los protocolos excéntricos utilizados y los puntos de muestreo varían mucho entre unos estudios y otros, lo que puede explicar la gran variabilidad encontrada respecto al patrón temporal del proceso de inflamación.

En general, se ha demostrado un incremento en la concentración de determinados mediadores químicos, tanto a nivel muscular como plasmático, tras ejercicios con alto componente excéntrico.

Estos mediadores químicos pueden clasificarse según su acción en:

-Moléculas efectoras: radicales libres de oxígeno y enzimas.

-Moléculas facilitadoras: que favorecen la vasodilatación, la permeabilidad y la expresión de moléculas de adhesión, entre otras acciones. Entre éstas podemos citar la IL-1 $\beta$ , las prostaglandinas y moléculas de adhesión celular como inmunoglobulinas, integrinas, selectinas y caderinas. Estas últimas promueven la marginación y el reclutamiento de los leucocitos circulantes y su adherencia al endotelio.

-Moléculas inhibitoras: que controlan el excesivo desarrollo del proceso inflamatorio.

Estos mediadores químicos también se pueden clasificar según su localización como:

- *Factores tisulares:*

-Mediadores almacenados en las células: los más importantes son la histamina (contribuye a la vasodilatación) y enzimas como la mieloperoxidasa.

-Mediadores sintetizados *de novo*: como radicales libres, óxido nítrico, derivados de fosfolípidos (prostaglandinas, tromboxanos...) o citoquinas.

- *Factores plasmáticos*, como los sistemas de complemento que intervienen en la permeabilidad, vasodilatación, acumulación de leucocitos, etc.

A pesar de que esta respuesta inflamatoria es de suma importancia en lo que a eliminación de células dañadas se refiere, y por lo tanto en la prevención de infección, los radicales libres y otros agentes oxidantes liberados por los neutrófilos tienen un efecto negativo, dado que son los responsables del denominado “daño oxidativo/ nitrosativo”, que afecta a las células en varios puntos. De hecho, el estrés oxidativo/nitrosativo aumenta la inflamación a través de la activación de factores de transcripción sensibles al equilibrio redox, tales como el NF- $\kappa$ B que se unen a sus respectivos sitios en regiones concretas de los genes implicados en esta respuesta.

#### 2.2.1.2 Citoquinas

Existen diversos estímulos relacionados con el daño muscular, incluyendo daños mecánicos o por el efecto cizalla (“shear stress”), ejercicio físico, las especies reactivas del oxígeno/nitrógeno, que pueden producir un incremento en la concentración de determinadas citoquinas, tales como interleucinas, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferón gamma (INF- $\gamma$ ). Está ampliamente demostrado que el ejercicio induce cambios en muchos de los componentes del sistema inmune, incluyendo elevados niveles de interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) y de TNF- $\alpha$  y que explicaremos a continuación detenidamente.

Las citoquinas son péptidos señalizadores que se producen en respuesta a la agresión de un tejido e intervienen en la respuesta inflamatoria (Miller y Krangel, 1992). En general, éstas actúan a través de receptores de alta afinidad, que se expresan en la superficie celular. La mayoría de ellas son moléculas multifuncionales que ejercen diferentes

acciones en las distintas células sobre las que actúan. Las funciones de las citoquinas se solapan entre ellas, y son pocas las que tienen un único cometido. Las citoquinas suelen actuar de forma local, ya sea de forma autocrina o paracrina, pero alguna de ellas, como la IL-6, tiene funciones endocrinas. Existen dos tipos de citoquinas:

- *Citoquinas anti-inflamatorias*, son generadas en el proceso inflamatorio, inducen su propia producción y son responsables de la correcta conclusión de la respuesta inflamatoria.

- *Citoquinas pro-inflamatorias*, responsables del comienzo de la respuesta inflamatoria. Estas moléculas suelen actuar conjuntamente con otras citoquinas.

### ***Citoquinas anti-inflamatorias***

Entre ellas se incluyen el factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ), la IL-10 y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra).

**TGF- $\beta$** . Existen 3 tipos de receptores del TGF- $\beta$  en la superficie celular que activan una vía de segundos mensajeros que actúan inhibiendo, de manera competitiva, la activación del factor de transcripción nuclear inducido por los mediadores inflamatorios (Tedgui y Mallat, 2001).

**IL-1 (IL-1Ra)**. Compite con la IL-1 en la unión a los receptores de superficie celular sin presentar ninguna actividad biológica ni desencadenar las respuestas celulares típicas de la IL-1 tras unirse al receptor. El IL-1Ra y la IL-1 $\beta$  son a menudo co-expresados en los monocitos activados, y parece ser que la gravedad de la respuesta

inflamatoria desencadenada por la IL-1, depende más de la relación entre las concentraciones locales de IL-1 e IL-1Ra, que de la concentración del agonista exclusivamente (Tedgui y Mallat, 2001).

**Interleucina 4 (IL-4).** Se expresa en basófilos y eosinófilos. Inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ , así como la producción de óxido nítrico (mediante la inhibición de la transcripción del gen de la enzima óxido nítrico sintasa inducible) (Kamijo y cols., 1994).

**Interleucina 10 (IL-10).** Actúa sobre diferentes tipos celulares, incluyendo timocitos, células T citotóxicas, mastocitos, células B y monocitos-macrófagos. La IL-10 es producida por los linfocitos y una de sus principales funciones es la capacidad para inhibir la síntesis de otras citoquinas (Tracey y cols., 1989; De Waal Malefyt y cols., 1991; Baeuerle y Henkel, 1994; Wang y cols., 1995; Bourcier y cols., 1997).

### ***Citoquinas pro-inflamatorias***

Entre las más importantes se incluyen la IL-1, la IL-6, el TNF- $\alpha$  y el INF- $\gamma$ .

**Interleucina 1 (IL-1).** Es una molécula producida principalmente por los macrófagos (Mizel y cols., 2003). Sus dos formas, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , están codificadas por genes distintos y se unen a varios receptores que se encuentran en diferentes tipos celulares.

La IL-1 desempeña un papel central en el inicio de las reacciones inflamatorias, ya que desencadena respuestas inmunes específicas al estimular las células inmunitarias. La aplicación local de IL-1 activa la formación de mediadores de la inflamación, induciendo la síntesis de

prostaglandinas (French y cols., 1991), de leucotrienos, del factor activador de plaquetas y de la enzima NOS, por las células endoteliales (Sica y cols., 1990). La IL-1 está estrechamente relacionada con la IL-6 (Bochner y cols., 1991) y, de hecho, es uno de los principales estímulos para su producción. La IL-1 también aumenta la expresión de moléculas de adhesión por las células endoteliales y los leucocitos (Saklatvala y cols., 1984) así como la secreción de enzimas proteolíticas (Biasucci y cols., 1999).

La IL-1 induce la expresión de genes que codifican para factores de la coagulación e inhibidores de la fibrinólisis, para la adhesión y posterior migración de leucocitos a través del endotelio (Filonzi y cols., 1993) y para la síntesis del factor estimulador de colonias de macrófagos (Kurt-Jones y cols., 1995). La IL-1 $\alpha$  se expresa en la superficie de los macrófagos activados y se libera desde los gránulos de las plaquetas activadas (Hawrylowicz y cols., 1989). También juega un papel importante en el proceso de la aterogénesis, potenciando la respuesta inflamatoria local y sistémica y parece contribuir al desencadenamiento de procesos coronarios agudos.

**Interleucina 6 (IL-6).** Es una citoquina pleiotrópica que regula la respuesta inmune humoral y celular (Baumann y Gauldie, 1990) y la expresión de moléculas de adhesión y de otras citoquinas, como la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , contribuyendo a incrementar la respuesta inflamatoria (Schieffer y cols., 2000). La síntesis de la IL-6 puede verse incrementada en respuesta a diversos estímulos, incluyendo la presencia de IL-1 (Ng y cols., 1994), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (Franchimont y Canalis, 1995), distintos virus (Tanner y cols., 1996), las endotoxinas bacterianas (Neilly y cols., 1995), el INF- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$

(Sanceau y cols., 1995). Los principales productores de IL-6 son los monocitos, los fibroblastos y las células endoteliales (Sironi y cols., 1989).

**Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).** Se sintetiza en células de la estirpe monocitaria/macrofágica, en linfocitos, en células endoteliales y en las células del músculo liso. Su producción se induce mediante endotoxinas bacterianas, antígenos de hongos o virus (Tracey y cols., 1989) y por otras citoquinas como la IL-1. El TNF- $\alpha$  es un potente inductor de los efectos sistémicos de la inflamación como fiebre, hipotensión y taquicardia (Tracey y cols., 1987).

**Interferón gamma (INF- $\gamma$ ).** Es un potente activador de macrófagos, neutrófilos y linfocitos B (García-Moll y Kaski, 1999). El INF- $\gamma$  induce la expresión de muchas moléculas clave, entre las que se encuentran la enzima NOS y citoquinas como la IL-1 (Farrar y Schreiber, 1993). El INF- $\gamma$  también regula la producción de varios componentes del complemento y algunas proteínas de la fase aguda, ya sea mediante efectos directos o mediante la inducción de otras moléculas, modulando asimismo la síntesis y actividad de otras citoquinas como la IL-1, IL-2 y el TNF- $\alpha$ .

Por lo tanto es importante considerar estos indicadores específicos cuando se interpreten datos en las respuestas inflamatorias en respuesta al ejercicio excéntrico. Son varios los estudios (Toft y cols., 2002; Hirose y cols., 2004; Paulsen y cols., 2005) y revisiones (Suzuki y cols., 2002) que analizan los cambios en la concentración sistémica de citoquinas tras un ejercicio excéntrico. En este caso también existen diferentes respuestas dependiendo del ejercicio a realizado. Por ejemplo correr cuesta abajo a elevadas intensidades estimula un mayor incremento en la concentración plasmática de IL-6, IL-1 e IL-1ra (Petersen y cols., 2001; Toft y cols., 2002).

Sin embargo, son poco conocidos los mecanismos genéticos de la inflamación causadas por el ejercicio. Si bien, sabemos que uno de los factores de transcripción más importantes que están expuestos a su activación durante el ejercicio excéntrico es el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (García-López y cols., 2007). Este factor es responsable de la transcripción de proteínas relacionadas con el proceso inflamatorio como TNF- $\alpha$ , e interleucinas como IL-1, IL-2 e IL-6; moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM, e-selectina y actividades enzimáticas como iNOS y COX-2 (Chung y cols., 2005). Otro factor de transcripción importante inducido en la respuesta inflamatoria provocada por la contracción muscular excéntrica es el factor inducible por hipoxia, HIF-1 $\beta$ , cuya expresión se ha puesto de manifiesto en el músculo esquelético en los días posteriores a la realización de un ejercicio excéntrico de carrera cuesta abajo (Malm y cols., 2004).

### **2.3 ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO**

El estrés oxidativo es un estado de la célula en la cual se encuentra alterada la homeostasis de la óxido-reducción intracelular, es decir el equilibrio entre prooxidantes y antioxidantes. Este desequilibrio se produce a causa de una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y de nitrógeno (ERNs) y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, lo que finalmente conduce al daño celular.

De hecho, del 2 al 5% del oxígeno consumido en la mitocondria se convierte en estas dañinas moléculas (Urso y Clarkson, 2003), que son responsables de muchos procesos degenerativos que acontecen en el organismo. Dentro de las EROs podemos encontrar el anión superóxido

( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), o el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), mientras que entre las ERNs están el óxido nítrico (NO) y el dióxido de nitrógeno ( $NO_2^{\cdot}$ ).

### **2.3.1 Generación de radicales libres durante la contracción muscular, papel en la señalización celular**

En la última década cada vez son más los trabajos en los que se apunta hacia la función fisiológica que las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno desempeñan en el músculo esquelético. La producción de las mismas está vinculada a la actividad muscular y pueden influir sobre la expresión de ciertos genes (Marshall y cols., 2000). Los datos indican que las EROs y ERNs son generadas continuamente en el músculo de individuos sanos y que estas moléculas modulan procesos que van desde el desarrollo al metabolismo, pasando por el control del flujo sanguíneo y la contracción muscular.

Los genes expresados en el músculo son sensibles al estado redox, de hecho, éstos se adaptan al ejercicio sobreexpresando genes de enzimas antioxidantes (Jackson, 2008). La producción de radical superóxido en el músculo esquelético en reposo es pequeña, sin embargo ésta se acelera durante la actividad contráctil. Se propone al radical superóxido y al peróxido de hidrógeno como las especies reactivas con función en la señalización. El radical hidroxilo, sin embargo, dada su elevada reactividad y su baja vida media, es prácticamente indetectable en el músculo en condiciones basales. Éste aumenta cuando el ejercicio se realiza hasta el agotamiento y está más relacionado con la fatiga muscular (Reid, 2001).

Durante el ejercicio existen diferentes fuentes generadoras de radicales libres:

- Las catecolaminas, cuya liberación se incrementa durante el ejercicio, pueden sufrir autooxidación, produciendo radicales libres.
- El ejercicio físico incrementa las demandas energéticas, incrementándose el consumo de oxígeno ( $\text{VO}_2$ ). Esto, lógicamente, induce una mayor producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  por parte de la mitocondria.
- El ejercicio intenso puede provocar un estado transitorio de hipoxia en los tejidos de determinados órganos (riñones, órganos de la región esplácnica, etc) debido a que el flujo sanguíneo se centra en abastecer principalmente a los músculos activos. La reoxigenación de estos tejidos, además de los tejidos musculares que también han sufrido hipoxia (si el esfuerzo se ha desarrollado en algún momento a intensidades superiores al  $\text{VO}_{2\text{max}}$ ), se lleva a cabo una vez que la actividad ha finalizado, y este proceso (conocido como isquemia-reperfusión) puede originar EROs/ERNs (Packer, 1997).
- El daño muscular inducido por algunas modalidades de ejercicio (principalmente el que conlleva contracciones excéntricas) puede inducir un proceso de inflamación. La actividad de las células que se infiltran y actúan durante este proceso de inflamación (macrófagos y neutrófilos) es una importante fuente productora de EROs/ERNs.

### 2.3.2 Óxido nítrico (NO)

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

El NO es un radical diatómico considerado funcionalmente como un potente radical libre, aunque su estructura electrónica no se corresponda con la de estos elementos. Este hecho es debido a sus propiedades y, sobre todo, a los derivados que surgen en su metabolismo, todos ellos con estructura y función de radical libre. Como radical libre reacciona con otros radicales, con el oxígeno molecular y con metales pesados. Es una molécula gaseosa altamente reactiva que participa en una gran variedad de funciones celulares en el organismo como neurotransmisor y agente microbiano (Moncada y cols., 1991), efectos mediados por sus metabolitos.

La mayor parte de las células del organismo son capaces de producir NO en un determinado momento, ya sea de forma constitutiva o a consecuencia de una agresión. Esta multiplicidad de orígenes hace que sus funciones fisiológicas sean a su vez muy variadas, actuando de forma específica a través de un amplio rango de reacciones químicas, controlando diversas actividades enzimáticas, modificando la apertura o el cierre de canales iónicos, la transcripción de genes, la respiración mitocondrial e incluso la formación de radicales libres (Yun y cols., 2003).

En términos generales se considera que el NO a bajas concentraciones es pro-inflamatorio, favoreciendo la respuesta inmune inespecífica mediante la vasodilatación y el reclutamiento de neutrófilos,

mientras que a concentraciones elevadas disminuye la capacidad de adhesión celular e induce la apoptosis de las células inflamatorias (Ross y Reske-Kunz, 2001), estando asociado a citotoxicidad y carcinogénesis (Nguyen y cols., 1992; Lyons, 1995). El óxido nítrico también puede ser oxidado dando lugar a otras especies reactivas de nitrógeno que tienen un comportamiento similar a las EROs.

En su forma reducida (NO, propiamente dicho) posee una enorme capacidad lesiva, ya que se combina con el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) formando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que no es un radical, pero si un intermediario oxidante que puede protonarse y descomponerse con facilidad de modo que es altamente reactivo (Murphy y cols., 1998). Es capaz de inducir la peroxidación lipídica en lipoproteínas, interferir con la señalización celular por nitración de residuos tirosina, oxidar grupos tioles y guanosinas, degradar carbohidratos así como de fragmentar ADN (Beckman, 1996; Beckman y cols., 1990).

Otras formas derivadas del NO con acciones típicas de radical libre son: dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ), trióxido de dinitrógeno ( $N_2O_3$ ) y tetraóxido de dinitrógeno ( $N_2O_4$ ). Por otra parte, cuando se encuentra en forma oxidada ( $NO^+$ , ión nitrosonium) su acción es protectora (Tamargo y cols., 1996).

### **2.3.2.1 Síntesis del óxido nítrico**

El NO se sintetiza a partir del nitrógeno terminal del aminoácido L-arginina en una reacción catalizada por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas.

La síntesis de NO se lleva a cabo en dos pasos. En el primer paso se forma N<sup>o</sup>-hidroxiarginina, que es una especie intermedia, a través de una reacción que requiere una molécula de O<sub>2</sub> y otra de NADPH, además de la presencia de tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (Kwon y cols., 2004). El segundo paso es la oxidación de la N<sup>o</sup>-hidroxiarginina para formar L-citrulina y NO. Básicamente, se transfieren los electrones desde el NADPH a través de los flavín cofactores: FAD y FMN, produciéndose la reducción de la molécula de oxígeno (Mayer y cols., 1991).

### **2.3.2.2 Óxido nítrico sintasa (NOS)**

Las primeras descripciones de la enzima óxido nítrico sintasa demostraron que en la síntesis de NO se requería además de L-arginina y NADPH, otros coenzimas y cofactores tales como FAD, FMN, BH<sub>4</sub> y calmodulina (Moncada y cols., 1991).

Dicha enzima presenta tres isoformas (Bredt y cols., 1991; Lamas y cols., 1992):

- nNOS (Tipo I), de origen neuronal
- iNOS (Tipo II), inducible
- eNOS (Tipo III), de origen endotelial

Cada una de las isoformas es el producto de diferentes genes, con diferentes localizaciones, regulación, propiedades catalíticas y sensibilidad a los inhibidores (Alderton y cols., 2001).

### **2.3.3 Acciones fisiológicas del óxido nítrico**

El óxido nítrico juega un papel fundamental en numerosos procesos fisiológicos. Entre ellos, actúa como mediador biológico, desempeñando tres funciones fisiológicas relevantes: la comunicación intercelular, la regulación tisular del flujo sanguíneo y la eliminación de cuerpos extraños (McCall y Vallance, 1992). El papel que adopte dependerá de las diferentes ubicaciones de su síntesis.

El NO actúa como regulador del flujo sanguíneo, en el control de la presión arterial y en la inhibición de la agregación plaquetaria y de la adhesión de los neutrófilos. El NO interviene en diversas funciones del sistema nervioso tales como la transmisión sináptica, la regulación del flujo sanguíneo cerebral, la inducción y regulación del ritmo circadiano y la hiperalgesia (Bachneff, 1996). En el sistema nervioso periférico es un neurotransmisor sináptico no adrenérgico ni colinérgico. En las neuronas incrementa la vascularización interviniendo por lo tanto en el mantenimiento de la integridad de las mismas. En el pulmón su acción es variada y en algunos casos perjudicial; así, el NO de origen endotelial regula la circulación pulmonar, mientras que el NO neuronal tiene acciones broncodilatadoras y el producido por la enzima iNOS puede provocar asma, bronquiectasia y fibrosis alveolar (Kubes, 2000; Calatayud y cols., 2001). En el sistema inmunológico el NO participa de diferentes formas con acciones tan diversas como ser agente tóxico frente a microorganismos infecciosos (Hibbs, 2002; Hibbs y cols., 1988), o inmunorregulador (Wei y cols., 1995). Debido a las características del sistema inmune, cuya capacidad de reacción se prolonga de días a semanas, la producción de NO debe realizarse de forma intensa y

continuada, siendo la isoforma iNOS la que entra en actividad en dicha situación (Coleman, 2001). El NO es capaz de interactuar con proteínas de la cadena respiratoria inhibiendo los mecanismos oxidativos mitocondriales (Stuehr y Nathan, 1989). Estos mecanismos permiten al sistema inmune defender al organismo frente a posibles agentes infecciosos, aunque también puede producir daño tisular como ocurre en varios procesos patológicos (Greenwald, 1991).

Diferentes autores atribuyen al NO un papel protector como agente antioxidante debido a que puede reaccionar con el radical  $O_2^{\cdot-}$  y otros radicales libres produciendo especies menos tóxicas (Kanner y cols., 1991; Gorbunov y cols., 1995; Wink y cols., 1998; Sarti y cols., 2002). Por el contrario, otros investigadores afirman que puede interactuar con el radical  $O_2^{\cdot-}$ , produciendo peroxinitritos y dando lugar a especies con mayor toxicidad (Beckman y cols., 1990).

#### **2.3.4 Efecto de las ERNs en la contracción muscular**

Como las ERO, el NO es generado continuamente por el músculo esquelético, y su producción aumenta en los períodos de contracción muscular. Esta molécula de bajo peso molecular cataliza una variedad de señales que regulan procesos intracelulares e interacciones entre células. A niveles bajos, el NO puede tener propiedades antioxidantes oponiéndose a los efectos de las EROs. Pero el NO también interactúa con el radical superóxido para generar peroxinitrito, una especie muy tóxica y cuya reactividad sólo se ve superada por el radical hidroxilo.

Como se comentó anteriormente, el NO es sintetizado por las óxido nítrico sintasas (NOS), una familia de enzimas que se expresan en

músculo esquelético. Las formas constitutivas de NOS son dependientes de las concentraciones del  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático.

Las células musculares expresan de forma constitutiva nNOS, eNOS, o ambas. Se ha demostrado que tanto las fibras tipo I como las fibras tipo II expresan ambas isoformas de forma constitutiva. Sin embargo los músculos de fibras rápidas expresan una mayor cantidad de nNOS mientras que los músculos de fibras oxidativas están asociados a la expresión de la isoforma eNOS (Kobzik y cols., 1994).

La isoforma neuronal, se localiza en el sarcolema de las fibras musculares rápidas y está asociada al complejo distrofina. La distrofina es una proteína del citoesqueleto que forma, al unirse con una glicoproteína de membrana, un puente de unión entre el citoesqueleto y la matriz extracelular. El complejo distrofina-glicoproteína, previene el daño al sarcolema durante los ciclos repetitivos de contracción muscular transmitiendo las fuerzas generados por los sarcómeros en el interior de la fibra muscular, al tejido conectivo extracelular (Miyagoe-Suzuki y Takeda, 2001).

La isoforma neuronal de la NOS está estratégicamente situada cerca del complejo distrofina-glicoproteína para la transmisión de información del exterior de la célula al interior y viceversa. El  $\text{Ca}^{+2}$  liberado por el retículo sarcoplásmico en respuesta a los potenciales de acción que alcanzan los túbulos transversales, se considera que puede desempeñar un papel en la activación de la nNOS en la cara citoplasmática del sarcolema. Curiosamente se han encontrado contenidos más elevados de ARNm y de actividad enzimática nNOS en músculo que en cerebro de humano (Peters y cols., 1997).

La NOS endotelial está asociada a la mitocondria. Los contenidos de eNOS no se correlacionan con el contenido de miosina del músculo. La isoforma eNOS está relacionada con el desarrollo muscular, el tono vascular y especialmente la función mitocondrial. Esta isoforma se encuentra tanto en la matriz como en la membrana mitocondrial (Bates y cols., 1996). La liberación de NO por eNOS mejora el flujo sanguíneo y han sido varios los trabajos en los que se han encontrado evidencias de que el NO regula la respiración mitocondrial mediante interacciones con la citocromo oxidasa y el complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Clementi y cols., 1999).

Las enfermedades inflamatorias pueden estimular la expresión de un tercer tipo de isoforma, la inducible (iNOS). En condiciones normales el músculo esquelético presenta bajos niveles de iNOS, en las fibras de tipo I (Chaubourt y cols., 2002). La producción de NO por iNOS no está regulada por  $Ca^{2+}$  y depende del sustrato. Como la L-arginina es muy abundante en músculo, sus ratios de producción son mucho más elevados que los de las otras dos isoformas. Este hecho exagera la acción del NO en las células a las que afecta y puede desembocar en un estrés oxidativo o nitrosativo.

Las tres isoformas están reguladas por citoquinas y por los procesos de hipoxia (Gaston, 1999). La expresión de la nNOS aumenta por daño por compresión, la actividad muscular y el envejecimiento, mientras que disminuye tras denervación (Tews y cols., 1997). Las isoformas eNOS, tanto vascular como muscular, y nNOS aumentan con el ejercicio físico crónico (Tidball y cols., 1998). La isoforma iNOS es inducida también durante el ejercicio, como respuesta a la liberación de citoquinas y otros factores (Husain y Hazelrigg, 2002)



La producción de NO por las células endoteliales y neuronas tiene lugar cuando se incrementa el calcio intracelular. Éste se une a la proteína calmodulina formando un complejo que se une a su vez a la enzima eNOS o nNOS.

En las células neuronales el calcio entra en la célula para unirse a la calmodulina mediante la apertura de canales de calcio localizados en el neurilema, como consecuencia de la llegada de un potencial de acción a una neurona. En las células endoteliales la síntesis constitutiva genera pequeñas cantidades de NO, el cual participa en diversos procesos fisiológicos celulares (Moncada y cols., 1991).

Existen evidencias de que estas dos isoformas también pueden regularse por una vía independiente del calcio. Así, se ha descrito que mecanismos de estrés y la acción de estrógenos pueden regular la acción de la eNOS (Dimmeler y cols., 1999), mientras que situaciones de lesión nerviosa pueden modular la actividad de la nNOS (Steel y cols., 1994).

Las tres isoformas pueden estar inducidas por distintos estímulos, estímulos apropiados a través de mecanismos transcripcionales y postrcripcionales y pueden ser expresados constitutivamente en algunos tejidos o células (Stamler y Meisser, 2001).

La complejidad de la regulación transcripcional de los genes de nNOS y eNOS se refleja en las numerosas funciones biológicas y fisiopatológicas celulares y tisulares del NO (Vassilakopoulos y cols., 2002). Los factores de transcripción implicados en la activación de los genes que codifican a ambos, no han sido identificados. Un buen candidato sería el NF- $\kappa$ B, ya que los genes que codifican para estas dos

isoformas contienen sitios de unión para el NF- $\kappa$ B en su región promotora (Guo y cols., 2003; Davis y cols., 2004; Tai y cols., 2004).

La regulación de la iNOS es regulada tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. En situaciones fisiológicas la actividad de la iNOS es muy baja o ausente; sin embargo, en procesos patológicos como la infección o la inflamación, la enzima se induce generando grandes cantidades de NO (Moncada y cols., 1991). La actividad iNOS se induce por varios factores incluyendo citoquinas tales como la IL-1, los factores de necrosis tumoral TNF- $\alpha$  o TNF- $\gamma$  y endotoxinas como liposacáridos (LPS) (Pfeilschifter y cols., 1993), incrementando considerablemente la producción de NO durante periodos prolongados de tiempo y provocando una marcada vasodilatación que desempeña un papel importante en la regulación de los procesos inflamatorios. Por el contrario, citoquinas como el TGF- $\beta$  (Ding y cols., 1990), la IL-4 (Liew y cols., 1991) y la IL-10 (Cunha y cols., 1992) inhiben la iNOS de forma que su expresión puede estar controlada por el equilibrio entre las citoquinas que inducen y que reprimen su síntesis (Terenzi y cols., 1995).

En la mayoría de las células, un proceso esencial que participa en la inducción de la enzima iNOS consiste en la activación de los factores de transcripción tales como el NF- $\kappa$ B, el cual induce la activación del promotor de la iNOS. La iNOS está regulada transcripcionalmente por las citoquinas, como también lo están la nNOS y la eNOS en el músculo esquelético (El-Dwairi y cols., 1998).

Otros estudios realizados han sugerido un incremento en estas isoformas en situaciones de hipoxia, esta regulación puede deberse a dos mecanismos distintos: estrés celular general o una activación directa de

la transcripción de los genes de las tres isoformas a través de los sitios de unión del factor de hipoxia a los elementos *cis* de las mismas (Förstermann y cols., 1998).

## 2.4 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Los factores de transcripción son proteínas de bajo peso molecular que estimulan la transcripción de genes que intervienen en el desarrollo, crecimiento y envejecimiento celular, mediante la unión específica a regiones promotoras presentes en los mismos (Kamata y cols., 1999; Israel, 2000).

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

#### **2.4.1 Factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B)**

Existen muchas rutas de señalización intracelular, bien caracterizadas, que conducen a la activación de la transcripción de genes, es decir, que median la activación de factores de transcripción. De estas, la correspondiente al factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) es única en cuanto a la rapidez de su activación, su inusual mecanismo de regulación y el actual conocimiento de la misma, ya que este abarca desde el entendimiento de la estructura molecular, hasta las funciones fisiológicas de cada uno de sus componentes (Schreck y cols., 1991; Schreck y cols., 1992a; Nakshatri y cols., 1997; Van den Berg y cols., 2001).

En este contexto las características de NF- $\kappa$ B lo hacen un elemento clave. Este factor transcripcional es más conocido por su importante papel en los mecanismos inflamatorios (y con ellos en las patologías con base inflamatoria, entre otras) por ser un elemento fundamental en el inicio y perpetuación de éstos; su respuesta a toda una serie de señalizadores iniciales en estos fenómenos y su capacidad para inducir la síntesis de mediadores de todo tipo, han hecho de este heterodímero, y la ruta que lo incluye, un foco de atención en la investigación relacionada con todo tipo de enfermedades.

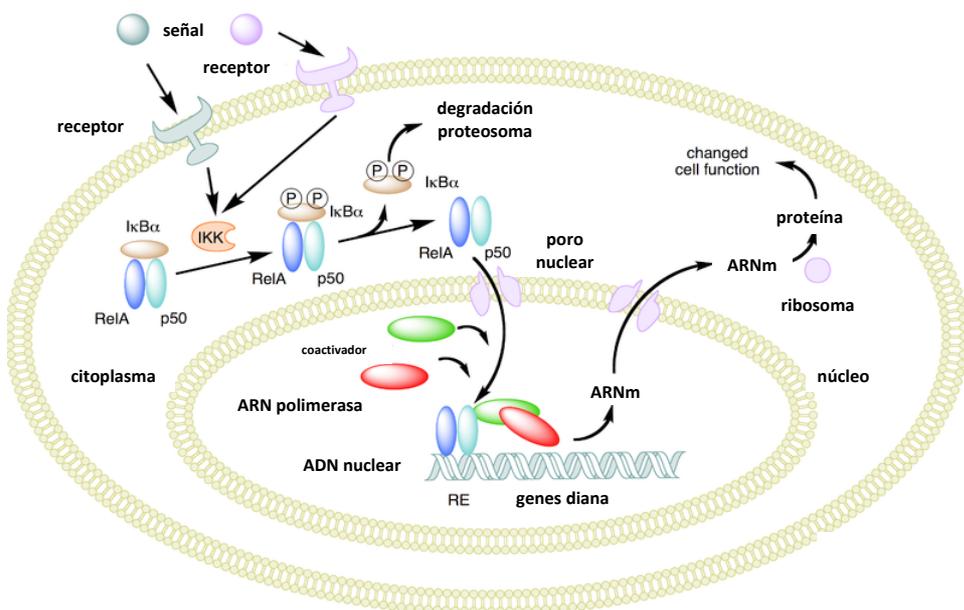
#### **2.4.2 Componentes de NF- $\kappa$ B**

En su forma activa de unión al ADN, el NF- $\kappa$ B abarca un conjunto heterogéneo de dímeros constituidos por miembros de la familia NF- $\kappa$ B /Rel. En mamíferos se han identificado hasta el momento cinco proteínas que integrarían esta familia (Chen y cols., 1999): NF- $\kappa$ B 1 o p50 (y su

precursor el p105), NF- $\kappa$ B 2 o p52 (y su precursor p100), c-Rel, RelA o p65 y Rel B (Saccani y cols., 2003). Todas estas proteínas comparten una zona homóloga de unos 300 aminoácidos llamada dominio Rel, el cual es responsable de la dimerización, de la unión al ADN, de la interacción con las proteínas inhibidoras y que además contiene las secuencias de localización nuclear (Baldwin y cols., 1996). La secuencia consenso de ADN que reconocen responde a la siguiente estructura: GGGRNNYYCC, donde R es una purina, Y una pirimidina y N es cualquier base. No todos los miembros de esta familia se unen a esta secuencia con la misma afinidad, de modo que se ha constatado que las subunidades p65 (RelA) y c-Rel son las que se unen con más afinidad y activan la transcripción con mayor eficiencia (Zhong y cols., 2002; Saccani y cols., 2003). Se ha postulado que los dímeros constituidos por miembros de la familia Rel sin capacidad de activar la transcripción, como el dímero p50-p50 por ejemplo, mediarían respuestas represoras de la transcripción génica (Israel, 2000).

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

produzca su activación, región denominada NLS ("nuclear location sequence") (Siebenlist y cols., 1994).



**Figura 2.- Mecanismo de acción del factor de transcripción NF-κB, a través de la fosforilación de su inhibidor (IκB) vía IκB kinasa (IKK), el cual es degradado posteriormente vía proteosoma. El complejo p50/p65 se traslada al núcleo donde el complejo se une al sitio específico del gen objetivo.**

Para llegar a un mejor entendimiento de las funciones fisiológicas que cada uno de los miembros de esta familia de proteínas desempeña, se han desarrollado estudios con ratones *knockout*, los cuales presentan mutaciones en determinados *locus* para genes de miembros específicos de la familia Rel. Los investigadores han llegado a la conclusión de que tan sólo la subunidad p65/RelA sería imprescindible para la supervivencia del animal (Beg y cols., 1995). Los heterodímeros p50/p65 (los primeros

en ser descubiertos), son los más abundantes en la mayor parte de las células, es por ello que en muchas ocasiones bajo el término NF- $\kappa$ B se designe a este dímero en particular. En la actualidad se cree que todos los complejos NF- $\kappa$ B se encuentran sometidos a mecanismos de regulación muy similares, en los que jugaría un papel imprescindible la interacción con las diferentes proteínas inhibidoras de la familia I $\kappa$ B aunque distintas I $\kappa$ Bs pueden presentar diferente afinidad por distintos complejos NF- $\kappa$ B.

### 2.4.3 Proteínas I $\kappa$ B

La familia de proteínas I $\kappa$ B incluye las isoformas: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , bcl-3 y los precursores de NF- $\kappa$ B 1 (p105) y NF- $\kappa$ B 2 (p100). En mamíferos, los miembros más relevantes son el I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e I $\kappa$ B $\epsilon$ . Todos ellos tienen en común siete dominios helicoidales de anquirina en su estructura que permiten la unión al dominio Rel del NF- $\kappa$ B (Whiteside e Israel, 1997) y enmascaran la zona de localización nuclear del mismo. Sólo las isoformas I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e I $\kappa$ B $\epsilon$  poseen la secuencia N-terminal necesaria para su ubiquitinación y posterior proteólisis en respuesta a ciertos estímulos, que como hemos citado anteriormente es un requisito básico para la posterior activación del NF- $\kappa$ B. El I $\kappa$ B $\alpha$  recién sintetizado entra en el núcleo y promueve la disociación del NF- $\kappa$ B de la zona del ADN a la que se encuentra unida, ya que la afinidad de este último por el I $\kappa$ B $\alpha$  es mayor que por las secuencias  $\kappa$ B del ADN. Así, el NF- $\kappa$ B es exportado de nuevo al citoplasma unido al I $\kappa$ B $\alpha$  gracias a una secuencia nuclear de exportación presente en ésta, denominada NES (Li y Reid, 2000; Sacconi y cols., 2003). Existen datos que confirman este transporte NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B entre el núcleo y el citoplasma (Tam y cols., 2000).

## 2.4.4 Rutas de activación de NF- $\kappa$ B

### a) *Translocación al núcleo*

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

### b) *Fosforilación específica de I $\kappa$ Bs*

La fosforilación de las proteínas I $\kappa$ Bs es un paso clave en la regulación de los complejos Rel/NF- $\kappa$ B. Dicha fosforilación está mediada por las denominadas I $\kappa$ B kinasas (IKKs), cuya actividad se ve fuertemente inducida por los agentes activadores de esta ruta de señalización. Esta actividad enzimática se refiere a un complejo proteico de elevado peso molecular, constituido por tres subunidades, dos de ellas catalíticas (pueden llevar a cabo la fosforilación): IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  y una tercera

reguladora: IKK $\gamma$  o NEMO (Israel, 2000). Las tres subunidades presentan una homología del 52% en cuanto a su composición en aminoácidos y una organización estructural muy similar que incluye, un dominio quinasa, una cremallera de leucina y dominios hélice-bucle-hélice. Pueden formar heterodímeros y homodímeros.

Los estudios genéticos y bioquímicos realizados en ratones revelan que el IKK $\beta$  sería la kinasa principal involucrada en el proceso de activación del NF- $\kappa$ B, desempeñando el IKK $\alpha$  un papel redundante y accesorio. En cualquiera de los casos, los genes para ambas subunidades son imprescindibles para la supervivencia del animal (Li y Reid, 2000).

El complejo IKK activo fosforilará a la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  en dos residuos de serina cercanos a su extremo N-terminal, de modo que la proteína queda marcada para su posterior reconocimiento por el complejo ubiquitín-ligasa E3, que ubiquitina dos residuos de lisina cercanos al extremo N-terminal (Palombella y cols., 1994; Verma y cols., 1995). Esto a su vez sirve de señal para el proteosoma 26S que procede a la degradación del I $\kappa$ B $\alpha$  (Karin y cols., 2000). Una vez liberado de sus inhibidores, el NF- $\kappa$ B se transloca al núcleo donde se une a secuencias promotoras específicas de genes activando su expresión génica. Se observan pues dos hechos claves para la activación de éste factor, que son la inducción de las IKKs y la fosforilación y posterior degradación proteosómica de las I $\kappa$ Bs.

Dada la gran diversidad de procesos involucrados en la activación del NF- $\kappa$ B, no resulta sorprendente el hecho de que existan a su vez múltiples inhibidores que prevengan dicha activación.

#### 2.4.5 Agentes inductores de la activación de NF- $\kappa$ B

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B puede ser activado por una gran variedad de estímulos, lo cual explica su ubicua localización y su función central no sólo en las respuestas inmune e inflamatoria sino también en muchos otros procesos biológicos.

De esta manera, encontramos estímulos físicos, como las radiaciones ionizantes (X y  $\gamma$ ), la luz UV y la hipoxia, estímulos bioquímicos, como la calmodulina A, el pervanadato, la ceramida, el ácido okadaico, inhibidores de la síntesis de proteínas (cicloheximida, anisomicina, emetina), señales inmunológicas como citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IFN  $\gamma$ , M-CSF, GM-CSF) o mitógenos (antígenos, estimulación alogénica, lectinas, ésteres de forbol, diacilglicerol, suero, PDGF, etc), bacterias y/o productos bacterianos, toxinas, virus y/o productos virales (Li y cols., 2000; Sacconi y cols., 2003).

El estatus *redox* de la célula constituye un desencadenante en la activación de este factor de modo que, las situaciones de estrés oxidativo/nitrosativo que promueven un aumento en la concentración de EROs/ERNs son un estímulo importante (Saenko y cols., 2002).

No obstante la mayor parte de estos estímulos también activan otras rutas de señalización distintas a la del NF- $\kappa$ B, que pueden interactuar entre sí lo cual constituye una dificultad añadida a la hora de esclarecer cómo se desarrollan los acontecimientos espacial y temporalmente.

#### 2.4.6 Genes regulados por NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B es descrito a menudo como un mediador central en la respuesta inmune y en ciertas respuestas al estrés en humanos. Esta denominación se empieza a entender si nos atenemos al número de agentes inductores y al número de genes diana de este factor transcripcional: hasta el momento se han descrito aproximadamente 150 agentes inductores de NF- $\kappa$ B entre moléculas y agentes físicos.

Se conoce más de 800 genes regulados por NF- $\kappa$ B, bien de manera putativa, porque al ser secuenciados se ha encontrado en sus promotores motivos de unión de este factor transcripcional, o bien porque se ha demostrado directamente su activación al observar su transcripción o traducción en combinación con ensayos de la presencia de NF- $\kappa$ B en el núcleo. La mayoría de las proteínas codificadas por estas secuencias participan de una manera u otra en la defensa inmune, el crecimiento, la regulación del metabolismo y/o los sistemas de protección contra diferentes condiciones de estrés.

Las citoquinas estimuladas por NF- $\kappa$ B, como son la IL-1 y el TNF- $\alpha$  pueden a su vez activar por sí mismas la ruta del NF- $\kappa$ B por lo que se establece un bucle positivo que amplifica la respuesta e intensifica el proceso inflamatorio. La IL-2 también se ve inducida por acción del NF- $\kappa$ B, por lo cual se ve incrementada la proliferación y diferenciación de los linfocitos T.

También por acción del NF- $\kappa$ B se ven activados los genes para enzimas cuyos productos participan en la patogénesis del proceso inflamatorio, incluyendo la forma inducible de la óxido nítrico sintetasa

(iNOS) que sintetiza óxido nítrico y la ciclooxigenasa inducible (COX-2) que está implicada en la síntesis de prostanoïdes (Pahl, 1999).

Otros procesos en los que el NF- $\kappa$ B tiene un papel relevante son aquellos relacionados con la proliferación celular (Barkett y Gilmore, 1999) y la apoptosis (Kucharczak y cols., 2004).

#### **2.4.7 NF- $\kappa$ B y modulación en el ejercicio**

Los estudios realizados en cultivos de células de músculo esquelético revelan que la adición al medio de citoquinas como el TNF- $\alpha$ , induce la activación del NF- $\kappa$ B. En el músculo esquelético *in vivo* se sabe que la acción de esta citoquina promueve la pérdida de proteína muscular. Entre las dianas potenciales del NF- $\kappa$ B en el músculo esquelético se encuentran diversos genes antiapoptóticos, como el TRAF2 durante la miogénesis o genes de supervivencia en procesos de distrofia muscular (Baghdiguián y cols., 2001). Durante el ejercicio, el aumento de consumo de oxígeno conduce a una mayor producción de EROs, hecho que puede propiciar la activación del NF- $\kappa$ B que regula la expresión de numerosos genes relacionados con la actividad de enzimas antioxidantes, y con la regulación de los mediadores de la inflamación. La activación del NF- $\kappa$ B es sensible en muchos casos al estado *redox* o a la sobreexpresión de enzimas antioxidantes, por lo tanto puede ser regulado por el estado de oxidoreducción general de la célula (Li y Karin, 1999). Además, nuestro equipo de investigación ha demostrado que en células polimorfonucleares sanguíneas también puede ser activado debido a la realización de un test anaeróbico (Cuevas y cols., 2005), o en respuesta a un ejercicio excéntrico (García-López y cols., 2007).

#### 2.4.8 Factor inducible por hipoxia (HIF-1)

El factor inducible por hipoxia (HIF-1) es un heterodímero compuesto por dos subunidades (HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$ ) con pesos moleculares aparentes de 120-130 kD y 91-94 kD respectivamente (Wang y Semenza, 1995). Ambas subunidades comparten cierta homología en sus extremos N-terminales, conteniendo un dominio bHLH (*hélice-bucle-hélice*) y un dominio PAS (Per-Arnt-Sim), que están involucrados en la dimerización y en la unión al ADN (Wang y cols., 1995). El extremo COOH-terminal de la subunidad alfa contiene dos dominios de transactivación (TADs) y un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD), siendo éstos los responsables de las funciones transactivadora y reguladora de dicho factor en diferentes condiciones de disponibilidad de oxígeno (Jiang y cols., 1997).

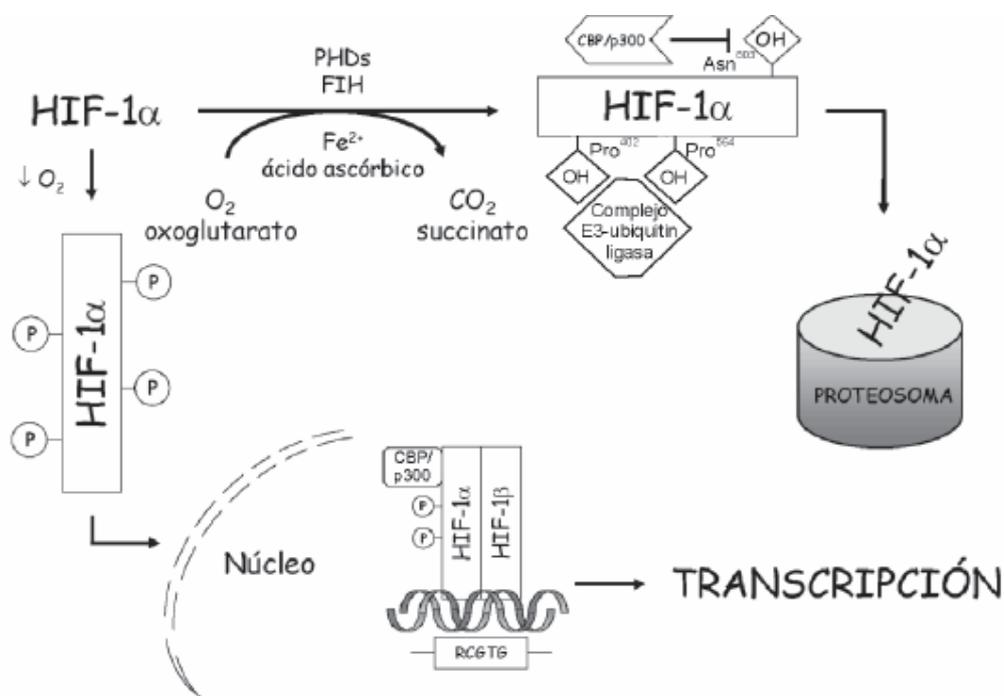
HIF-1 $\beta$  es idéntico al ARNT, translocador nuclear del receptor Ah (aril hidrocarburo). Esta proteína ARNT dimeriza con receptores Ah activados cuyos ligandos constituyen diferentes contaminantes ambientales, como aminas heterocíclicas, hidrocarburos aromáticos y compuestos aromáticos (dioxinas, dibenzofuranos y bifenilos). La identificación de ARNT como subunidad de HIF-1 demostró por vez primera que ARNT (HIF-1 $\alpha$ ) constituye una subunidad común de varios heterodímeros que contienen dominios bHLH. La translocación al núcleo de HIF-1 $\alpha$  y heterodimerización con HIF-1 $\beta$  son necesarias para la unión de HIF-1 a los HBSs y su consiguiente transactivación (Hoffman y cols., 1991).

El descubrimiento de HIF-1 como factor regulador de la homeostasis del O<sub>2</sub> surgió como consecuencia del estudio de los

mecanismos moleculares que modulaban la transcripción de la eritropoyetina en respuesta a la hipoxia (Semenza y cols., 1991). La caracterización de los niveles de expresión de HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$ , se evaluó inicialmente en células Hep3B y HeLa bajo diferentes condiciones de disponibilidad de O<sub>2</sub>, hipoxia, normoxia y re-oxigenación (Wang y Semenza, 1993). De manera general el ARNm de ambas subunidades se expresaba constitutivamente bajo cualquier condición.

Sin embargo, la proteína de HIF-1 $\alpha$  sólo era detectable en hipoxia. En presencia de oxígeno, HIF-1 $\alpha$  sufre modificaciones post-traduccionales por parte de hidroxilasas (PHD1-3, FIH-1), las cuales hidroxilan residuos de Pro<sup>402/564</sup> y de Asn<sup>803</sup> que se localizan en los dominios ODD y TADs, respectivamente (Jaakkola y cols., 2001; Lando y cols., 2002). Estas modificaciones permiten la unión de la proteína VHL (von Hippel Lindau) a los sitios hidroxilados de HIF-1 $\alpha$  formando parte del complejo E3 ubiquitin-ligasa, provocando así su ubiquitinación y posterior degradación (Huang y cols., 1998). La hidroxilación del residuo Asn<sup>803</sup> se ha descrito recientemente y constituye un impedimento estérico en la unión del co-activador CBP/p300 a HIF-1 $\alpha$ , necesario para la transactivación de HIF-1 (Lando y cols., 2002).

En ausencia de oxígeno, HIF-1 $\alpha$  es fosforilado y translocado al núcleo, donde dimeriza con HIF-1 $\beta$  y se acopla a su co-activador CBP/p300, permitiendo la transactivación e inducción de genes (Figura 3).



**Figura 3.- Ciclo de activación-degradación de HIF-1α.** A la izquierda se muestra el funcionamiento en hipoxia y a la derecha en normoxia. Abreviaturas: **Asn**, asparagina; **CBP/p300**, complejo coactivador transcripcional CREB-binding protein/p300; **FIH**, factor inhibidor de HIF; **HIF-1α**, subunidad α del factor inducible por hipoxia; **OH**, sitios de hidroxilación; **P**, sitios de fosforilación; **PHDs**, prolil hidroxilasas; **Pro**, prolina.

Es importante también, aunque está menos caracterizada, la unión de HIF-1 a proteínas de estrés térmico (Heat Shock Proteins) (Katschinski y cols., 2002).

#### 2.4.9 Vías de estimulación de HIF-1

La hipoxia no es el único estímulo que incrementa los contenidos de HIF-1α. En condiciones de normoxia muchas citoquinas y factores de crecimiento activadores de receptores del tipo tirosina quinasa (RTKs) son también capaces de inducir HIF-1α, repercutiendo sobre un

incremento en los contenidos de este factor transcripcional. Entre éstos se incluyen: insulina (Zelzer y cols., 1998), factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF-2) (Feldser y cols., 1999), IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , (Hellwig-Burgel y cols., 1999; Albina y cols., 2000; Jung y cols., 2003a), factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Zhong y cols., 2000), trombina (Gorlach y cols., 2001), endotelina 1 (ET-1) (Spinella y cols., 2002) y heregulina (HER2) (Laughner y cols., 2001).

El HIF-1 también juega un papel importante en los procesos de inflamación regulando la inmunidad (Lukashev y cols., 2001; Kojima y cols., 2002; Mecklenburgh y cols., 2002; Cramer y cols., 2003). Asimismo el HIF-1 puede estar regulado por el NO (Callapina y cols., 2005).

De manera general, el mecanismo por el cual todos ellos inducen HIF-1 $\alpha$  incluye un incremento en la síntesis de la proteína, a diferencia de lo que ocurre en hipoxia, en la que la estabilidad del factor está asociada a una disminución en su tasa de degradación.

Existen trabajos enfocados a estudiar el efecto de las EROs sobre las células endoteliales, los resultados sugieren la existencia de una vía de retroalimentación del VEGF sobre su propio factor de transcripción principal, el HIF-1 (Deudero y cols., 2008). Un aspecto novedoso adicional de esta vía es el papel del anión superóxido como mediador principal de transmisión de la señal activadora. En cuanto al posible significado funcional de esta vía, pueden postularse la sensibilización a la respuesta hipóxica a través de uno de sus productos intermedios y la amplificación de los efectos de factores de crecimiento a través del reclutamiento de genes dependientes de HIF-1. En este último sentido, puede considerarse, por ejemplo, que el efecto inductor de HIF-1 sobre las vías

glucolíticas puede ser crítico a la hora de la oferta de energía y metabolitos intermediarios necesarios para la proliferación.

Diferentes estudios han demostrado que en situaciones donde se incrementa los niveles de HIF-1 $\alpha$  se produce una activación de un promotor novel, de la nNOS, como respuesta al HIF-1 $\alpha$ , sintetizando ARNm con una alta eficiencia transduccional (McLaren y cols., 2007).

Existen datos que indican que la hipoxia induce la transcripción y la expresión de la iNOS y regula también la expresión de la nNOS. Esto ha sido demostrado en neuronas y en músculo esquelético (McLaren y cols., 2007). La regulación de la eNOS en condiciones de hipoxia induce la vasodilatación y el aumento del flujo sanguíneo (Bolanos y Almeida, 1999). En definitiva el HIF-1 es un activador transcripcional de una serie de genes que aumentan el transporte de oxígeno, como por ejemplo las isoformas de la NOS (Grange y cols., 2001).

#### **2.4.10 HIF-1 y ejercicio**

Durante la actividad física hay un gran aumento del consumo de oxígeno, independientemente del tipo y de la intensidad del ejercicio, (Stainsby y cols., 1991; Astrand, 1992). Este incremento es debido a la gran tensión generada por los músculos durante las contracciones máximas o submáximas.

Durante la actividad física moderada o intensa el músculo y el organismo en general se ven sometidos a un gran estrés oxidativo y nitrosativo (Sen, 1995). No obstante, no está claro si en el músculo esquelético el fenómeno que se asocia al aumento de los radicales libres es la hipoxia o la hiperoxia (Wenger, 2000; White, 2006). El aumento de

las EROs y ERNs como consecuencia de ciclos hipoxia-hiperoxia se ha relacionado en el músculo con la fatiga y el daño (Zerba y cols., 1990; Reid y cols., 1992). Además, se ha propuesto a los radicales libres como posibles mediadores de la respuesta celular a la hipoxia (Acker, 2005).

El papel desempeñado por el HIF-1 en el aumento de la demanda de oxígeno durante las adaptaciones fisiológicas en situaciones no patológicas, no ha sido todavía muy clarificado. El músculo esquelético posee una gran capacidad para cambiar su estructura y sus características metabólicas cuando se altera la demanda de oxígeno (Blomqvist y Saltin, 1983). Durante el ejercicio, y debido al incremento de oxígeno en el músculo esquelético, tanto el organismo como el músculo sufren cambios profundos orientados a incrementar el envío de oxígeno al músculo para mejorar sus capacidades metabólicas. Otro cambio adicional en el músculo es el que afecta a la ruta glucolítica, este proceso parece estar mediado por HIF-1 $\alpha$ .

Son varios los estudios en los cuales se ha visto una relación directa entre la regulación del HIF-1 $\alpha$  y ratas sometidas a un determinado ejercicio. De hecho, en animales no entrenados se puso de manifiesto una sobreexpresión del ARNm de HIF-1 $\alpha$  después de un ejercicio agudo. Además, diversos estudios han confirmado que la hipoxia *per se* es un importante estímulo para la adaptación al músculo esquelético durante el entrenamiento. Otro ejemplo de cambios en la respuesta muscular mediados por este factor de transcripción sería el aumento de la capilarización, fenómeno conocido como angiogénesis y que está considerado como una adaptación importante después de un periodo de entrenamiento (Gustafsson y Kraus, 2001; Hudlicka y cols., 1992). Todos estos datos evidencian el importante papel que el factor de transcripción

HIF-1 $\alpha$  puede jugar en las adaptaciones del músculo esquelético (Ameln y cols., 2005).

Jackson y cols., en 2007, propusieron a las EROs y ERNs como mediadoras de las adaptaciones musculares, y cabe recordar en este punto, que también se han sugerido como mediadoras de la respuesta a la hipoxia (y a la hiperoxia). Por tanto, se justifica la necesidad de profundizar en la relación HIF-EROs/ERNs en diferentes tipos de ejercicio, bien sesiones de ejercicio agudo a diferentes intensidades, o bien después de un programa de entrenamiento, evaluando prospectiva y paralelamente la respuesta del HIF y la producción de EROs/ERNs. El óxido nítrico puede aumentar la expresión del HIF-1, de modo que ésta podría ser una vía de conexión, en el músculo esquelético, entre los radicales libres y el HIF.

#### **2.4.11 Inhibición de NF- $\kappa$ B/HIF por agentes antioxidantes y pirrolidina ditiocarbamato (PDTC)**

Una de las principales evidencias a favor de la modulación redox de NF- $\kappa$ B ha sido la inhibición de su activación por compuestos de reconocida actividad antioxidante *per se*, especialmente: N-acetil cisteína (NAC) y pirrolidina ditiocarbamato.

La NAC es un antioxidante que actúa incrementando los niveles intracelulares de GSH al funcionar como dador de cisteína, pero que además, funciona como neutralizador directo de especies oxidantes de oxígeno como los ya mencionados H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o HClO (Schreck y cols., 1992b).

El PDTC pareció en un principio ser un inhibidor general de NF- $\kappa$ B. Como ditiocarbamato, el PDTC presenta propiedades tanto antioxidantes

como quelante de metales. Este carbamato es capaz de penetrar en las células, por lo que ha sido ampliamente utilizado en modelos celulares en cultivo. De nuevo el grupo de Scherck (Schreck y cols., 1992b) demostró una actividad inhibitoria de la activación de NF- $\kappa$ B frente a todo un abanico de diferentes agentes (IL-1, TNF- $\alpha$ , LPS o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). De esta forma se mostraban más evidencias del papel central de los oxidantes en la modulación de la actividad de NF- $\kappa$ B.

Como en el caso de la NAC, se han ido mostrando evidencias de la dependencia del tipo celular y del agente activador en la inhibición por PDTC. Existen otros compuestos de actividad antioxidante implicados de manera putativa en la modulación de las rutas de activación de NF- $\kappa$ B.

El PDTC se ha visto que además de suprimir la activación del NF- $\kappa$ B, también inhibe al factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ , esto sugiere que estos efectos inhibitorios pueden ser mediados por la oxidación directa de este factor de transcripción (Brennan y O'Neill, 1996).

## **3.- MATERIAL Y MÉTODOS**



### **3.1 ÁMBITO DE TRABAJO**

Este trabajo de experimentación se inicia en el mes de Marzo de 2006 y se desarrolla en el Instituto de Biomedicina (IBIOMED) de la Universidad de León.

### **3.2 ANIMALES**

Para la realización de este trabajo se han utilizado ratas macho de la raza Wistar (Charles River, Barcelona), con un peso aproximado comprendido entre  $200 \pm 20$  g, mantenidas en jaulas con libre acceso al agua y a una dieta estándar.

Los animales se mantienen en condiciones controladas de temperatura ( $22-24^{\circ}\text{C}$ ) y humedad (50-60%), con un fotoperiodo (luz/oscuridad) de 12 horas, desde las 8:00 a las 20:00 horas.

Todos los experimentos realizados con los animales de laboratorio se ejecutan siguiendo las pautas recogidas en la normativa internacional GLP (Good Laboratory Practices), en la Directiva Europea 86/609/CEE y en la Legislación Española R.D. 223/86, referentes a la investigación y protección animal.

### **3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL**

Durante 8 semanas un grupo de ratas realizó un entrenamiento aeróbico de tipo excéntrico (AT). Las ratas se ejercitaron 5 días a la semana corriendo sobre una cinta rodante con pendiente negativa de  $-16^{\circ}$ . La duración de las sesiones y la velocidad del tapiz se incrementaron

gradualmente. Pasadas estas 8 semanas, y tras dos días de descanso, se les sometió a una sesión de ejercicio agudo según indica el protocolo propuesto por Armstrong y cols., 1983. Este es un protocolo intermitente, cuesta abajo con una inclinación negativa de 16°, a una velocidad de 16 m.min<sup>-1</sup> durante 90 minutos. El resto de los animales del grupo ejercitado de forma aguda (A y AP), solamente llevaron a cabo el protocolo de Armstrong, el cual se realizó el mismo día del sacrificio. Para la realización de ambos protocolos se empleó un tipo de tapiz rodante sencillo (Letica, L18706).

### **3.3.1 Grupos experimentales**

Los 40 animales que participaron en el presente estudio se dividieron en dos grandes grupos: animales control y animales sometidos a una sesión de ejercicio excéntrico agudo.

El grupo de animales control (16 ratas no sometidas a ejercicio físico) se distribuyó a su vez en:

- Grupo C: animales control no tratados ni ejercitados (n=8).
- Grupo CP: ratas a las que se inyectaron dos dosis del antioxidante pirrolidina ditiocarbamato (PDTC) 24 horas y una hora antes del sacrificio (n=8).

El grupo de 24 ratas sometidas a una sesión de ejercicio excéntrico agudo se dividió en:

- Grupo A: ratas sin tratamiento sacrificadas 2 horas después de la sesión de ejercicio excéntrico agudo (n=8).

- Grupo AP: ratas a las que se inyectaron dos dosis del antioxidante pirrolidina ditiocarbamato (PDTC) 24 horas y una hora antes de realizar el ejercicio agudo excéntrico y que se sacrificaron 2 horas después de dicha sesión (n=8).
- Grupo AT: ratas sin tratamiento, entrenadas durante 8 semanas y sacrificadas dos horas después de la sesión de ejercicio excéntrico agudo (n=8).

### **3.4 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO. RECOGIDA DE MUESTRAS**

Para la obtención de las diferentes muestras objeto de estudio se procedió a la disección quirúrgica de los animales, previamente anestesiados, vía intraperitoneal, con una solución de pentobarbital sódico en solución salina al 0,9% a una dosis de 50 mg/g de peso corporal.

La intervención quirúrgica comenzó con la disección de la arteria carótida del lado izquierdo, introduciendo en ella un catéter (0,5 x 0,9 mm Braun, Melsungen AG, Alemania) provisto de solución anticoagulante (heparina 0,05% en solución salina al 0,9%) y se procedió a la exanguinación del animal a través de dicho catéter. Posteriormente se recogieron las muestras de músculo esquelético vastolateral profundo (DVL) que fueron inmediatamente sumergidas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C para su posterior análisis.

### 3.5 SOLUCIONES UTILIZADAS

#### *Solución salina fisiológica*

Se preparó disolviendo cloruro sódico (Panreac, Madrid) en agua destilada hasta una concentración final de 0,9%.

#### *Pirrolidina ditiocarbamato (PDTC)*

EL PDTC (Sigma Chemical Co, San Luis, USA) se disolvió en 1 ml de solución salina al 0,9%. Se calculó la cantidad de PDTC para cada animal de modo que la dosis administrada fuera de 100 mg/kg peso corporal.

#### *Pentobarbital sódico*

El pentobarbital sódico (Sigma Chemical Co, San Luis, USA) se disolvió en solución salina fisiológica a una concentración de 5 mg/ml.

#### *Heparina sódica*

Se preparó disolviendo heparina sódica (Rovi, Madrid) en solución salina fisiológica (0,9%) a una concentración final de 0,05%.

#### *Solución salina fisiológica*

Se preparó disolviendo cloruro sódico (Panreac, Madrid) en agua destilada hasta una concentración final de 154 mM.

### 3.6 APARATOS UTILIZADOS

- ❖ *Autoclave*: Raypa, modelo Sterilmatic.
- ❖ *Baños termostáticos*: Selecta, modelo 135925 Selecta, modelo CE95, Selecta, modelo Unitronic 320 OR.
- ❖ *Baño ultrasónico*: Sonovex, modelo TK-52.

- ❖ *Centrifugas:* Eppendorf, modelo Centrifuge 5415C, S-4 Du pont, modelo Sorvall RC-5B Superspeed Centrifuge, Beckman, modelo XL-100 K Ultracentrifuge.
- ❖ *Espectrofotómetros:* Milton Roy, modelo Spectronic 1201 Hitachi, modelo U-2000.
- ❖ *Cubetas de electroforesis vertical:* Bio-Rad Mini-PROTEAN®3 Cell, Bio-Rad, Miniprotean II cell Bio-Rad, Protean II xi cells.
- ❖ *Cubetas de electroforesis horizontal:*
- ❖ *Desecador de geles:* BioRad, modelo 583.
- ❖ *Aparato de transferencia:* Bio-Rad, Trans-blot SD.
- ❖ *Fuentes de alimentación:* Bio-Rad, modelo 200/2 Savant instruments, modelo HV 1000.
- ❖ *Granatario:* Sartorius, modelo 1216 MP.
- ❖ *Balanzas de precisión:* Sartorius, modelo R200D, Sartorius, modelo 2842.
- ❖ *pH metros:* Crison, modelo 2001 Meteor, modelo 991 A.
- ❖ *Homogenizador:* Homogenizador electrónico, potters y vástagos.
- ❖ *Tapiz rodante:* Letica modelo LI8706.
- ❖ *Sonicador:* Branson Sonifier 150.
- ❖ *Termociclador:* Gene Amp PCR Biosystems 2400 (Applied Biosystems).
- ❖ *Termociclador:* Step One Plus (Applied Biosystems).
- ❖ *Material de cirugía:* Agujas, bisturís, cánulas, catéteres, pinzas,

suturas, tijeras, etc.

- ❖ *Material de laboratorio de carácter general:* agitadores de tubos, arcones congeladores, dispensadores automáticos, frigoríficos, micropipetas automáticas, ordenadores, etc.

### **3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS**

#### **3.7.1 Determinaciones en músculo esquelético vastolateral profundo (DVL)**

##### **3.7.1.1 Obtención de homogeneizado fresco**

Se homogeneizaron 100 mg de músculo esquelético vastolateral profundo en 1 ml de *tampón de homogeneización* (Tris 10 mM, Sacarosa 0,25 M, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM, fosfato sódico 30 mM, NaF 50 mM, ortovanadato sódico 30 mM a pH 7,4. El músculo se troceó previamente para facilitar su completa homogeneización, que se llevó a cabo en un homogeneizador manual.

##### **3.7.1.2 Obtención de la fracción citosólica**

Para la obtención de la fracción citosólica las muestras se homogeneizaron tal y como se describe en el apartado anterior, con una posterior centrifugación a 14000 xg durante media hora y a 4°C. El sobrenadante que resulta de dicha centrifugación se recolectó y almacenó a -80°C hasta la realización de las determinaciones analíticas.

### 3.7.1.3 Obtención de extractos nucleares

#### *Fundamento*

La extracción nuclear se llevó a cabo mediante lisis celular y posteriores centrifugaciones.

#### *Reactivos*

- ❖ *Tampón A*: 10 mM Hepes NaOH (pH 7,9), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF
- ❖ *Tampón B*: 20 mM Hepes-NaOH (pH 7,9), 25% glicerol, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM EDTA (pH 8), 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF
- ❖ *Nonidet*

#### *Procedimiento*

Para la obtención de los extractos nucleares de músculo esquelético vastolateral profundo se homogeneizaron 50 mg de tejido en 2 ml de *tampón A* con un 0,1% de *Nonidet*, utilizando homogeneizadores y vástagos autoclavados. Tras 15-60 minutos de incubación en hielo se centrifugaron las muestras 10 minutos a 1000 xg a 4°C y se descartó el sobrenadante resultante. El precipitado se resuspendió nuevamente en 2 ml de *tampón A* sin detergente, se agitó vigorosamente y se centrifugó 10 minutos a 1000 xg a 4°C. Al precipitado resultante se le añadieron 50 µl de *tampón B*. Posteriormente se incubó en hielo durante 30 minutos y se centrifugó a 4°C durante 15-30 minutos a 14000 xg para recoger el sobrenadante que se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis.

### 3.7.1.4 Concentración de proteínas

#### *Fundamento*

Se utilizó una modificación del método de Lowry y cols. (1951) realizada por Markwell y cols. (1978) basada en la reducción de la proteína con el cobre en medio alcalino y la posterior reducción del ácido fosfomolibdico fosfotúngstico con la proteína tratada.

#### *Reactivos*

- ❖ *Reactivo A*: carbonato sódico 2%, NaOH 0,4%, tartrato sódico 0,16% y SDS 1%.
- ❖ *Reactivo B*: sulfato de cobre 4%.
- ❖ *Reactivo C*: Folin Ciocalteu 50%.
- ❖ *Reactivo D* : 100 ml de *reactivo A* + 1 ml de *reactivo B*

#### *Procedimiento*

Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz, la siguiente mezcla: 5  $\mu$ l de muestra, 495  $\mu$ l de agua destilada, 1,5 ml de *reactivo D*. Posteriormente se añadieron 150  $\mu$ l de *reactivo C* y se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos en oscuridad. La lectura de la absorbancia se realizó a una longitud de onda de 650 nm. Para el cálculo de las concentraciones se elaboró una recta patrón utilizando albúmina bovina (fracción V, Sigma).

### 3.7.1.5 Cuantificación de la proteína nNOS, iNOS, eNOS, I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ -fosforilado, IKK $\alpha$ , IKK $\alpha$ -fosforilado e IL-1 $\beta$

#### *Fundamento*

La determinación de las proteínas nNOS, iNOS, eNOS, I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ -fosforilado, IKK $\alpha$ , IKK $\alpha$ -fosforilado e IL-1 $\beta$  se llevó a cabo mediante la técnica de *Western blot* utilizando el sistema de Laemmli (1970).

#### *Reactivos*

- ❖ *Tampón de lisis*: NaCl 140 mM, EDTA 15 mM, glicerol 10%, Tris 20 mM a pH 8.
- ❖ *Mezcla de inhibidores de proteasas*: Fenilmetil-sulfonil fluoruro (PMSF), aprotinina e inhibidor de tripsina.
- ❖ *Solución de ebullición*: H<sub>2</sub>O, Tris/HCl 2 M, glicerol 60%, SDS 10%, pirrolina 0,5%.
- ❖ *Tampón de electroforesis*: Tris 25 mM, glicina 0,2 M, SDS 3,5 mM pH 8,8.
- ❖ *Tampón de transferencia*: Tris 25 mM, glicina 0,2 M y metanol 20%.
- ❖ *PBS*: NaCl 0,14 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM, NaHPO<sub>4</sub> 8 mM, KCl 2,7 mM.
- ❖ *PBS-Tween 0,05%*.
- ❖ *Solución de bloqueo e incubación de anticuerpos*: 4% y 3% de leche en polvo desnatada en PBS-Tween 0,05%, respectivamente.

#### *Procedimiento*

En primer lugar se realizó la homogeneización de 100 mg de

músculo esquelético vastolateral en 1 ml de *tampón de homogeneización* (ver apartado 3.7.2.1). El homogeneizado se incubó durante 30 minutos a 4°C y se centrifugó durante 30 minutos a 13000 xg y 4°C, recogándose a continuación el sobrenadante.

a) Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se tomó una cantidad de muestra equivalente a 50-100 µg de proteína a la que se le añade *tampón de lisis* y se incubó durante 2 minutos a 100°C. A continuación se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en *tampón de electroforesis*. Para la realización del gel se preparó la siguiente mezcla:

- ❖ 3 ml de mezcla acrilamida/bis acrilamida.
- ❖ 4,75 ml de tampón Tris/HCl 0,75 M pH 8,8.
- ❖ 0,5 ml de SDS al 2%.
- ❖ 0,43 ml de persulfato amónico al 1%.
- ❖ 0,3 ml de TEMED al 1%.
- ❖ 1 ml de H<sub>2</sub>O milliQ.

b) Transferencia

Una vez separadas las proteínas, éstas fueron transferidas a una membrana de PVDF para permitir su exposición a los anticuerpos. Para dicha transferencia, una vez extraído el gel, éste se equilibró en un *tampón de transferencia*. La transferencia se realizó a 13 V durante 20-25 minutos. Para comprobar que la transferencia fue correcta se introdujo la membrana de nitrocelulosa en una solución de rojo Ponceau para visualizar las proteínas totales. La membrana se lavó en agitación con PBS y después se incubó durante media hora en solución de bloqueo (2-

4% leche en polvo desnatada en PBS-Tween frío) a 37°C, durante 30 minutos.

c) Incubación con anticuerpo

A continuación la membrana se incubó durante una noche con anticuerpos específicos para la nNOS (155kDa), iNOS (130 kDa), eNOS (133 kDa), I $\kappa$ B $\alpha$  (36 kDa), I $\kappa$ B $\alpha$ -fosforilado (40 kDa), IKK $\alpha$  (85 kDa), IKK $\alpha$ -fosforilado (85 kDa) e IL-1 $\beta$  (17 kDa) de rata obtenidos en conejo y en ratón (adquiridos a Santa Cruz Biothecnology, Santa Cruz, USA, a Cell Signaling Technology, Beverly, USA, o a Calbiochem, San Diego, USA). Transcurrido ese tiempo se lavó 5 veces con PBS-Tween. Posteriormente se incubó durante 90 minutos con un anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo o de ratón unido a peroxidada de rábano picante (HRP), (DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca). Transcurrido el tiempo se volvió a lavar 5 veces en PBS-Tween.

d) Revelado

La detección de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Gran Bretaña) exponiendo la membrana durante 1 minuto a la mezcla reactiva comercial. Posteriormente se introdujo en una cassette hermética junto con una película (Amersham Hyperfilm ECL, Gran Bretaña), durante aproximadamente 5 minutos.

Tras el revelado y secado de la película se llevó a cabo la cuantificación de las bandas por densitometría utilizando para ello el programa Scion Image 4.02 para Windows (Scion Corporation, Frederick, USA).

Con objeto de verificar que se había cargado la misma cantidad de

proteína en cada pocillo del gel, las manchas de las membranas se lavaron en tampón de deshibridación durante 15 minutos y se expusieron posteriormente a anticuerpos  $\beta$ -actina (42kDa) (Sigma, Saint Louis, EEUU).

### 3.7.1.6 Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)

#### *Fundamento*

La determinación de los factores de transcripción nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B) y el factor inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ), se realizó mediante la técnica EMSA (del inglés: “electrophoretic mobility shift assay”), que consiste en la separación electroforética del complejo formado por el NF- $\kappa$ B y/o el HIF-1 $\alpha$  con una sonda específica de ADN marcada radiactivamente.

Los extractos nucleares fueron obtenidos según el método descrito anteriormente. Se examinaron la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B e HIF-1 $\alpha$  usando los oligonucleótidos específicos:

- NF- $\kappa$ B: 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'
- HIF-1 $\alpha$ : 5'-TCT GTA CGT GAC CAC ACT CAC CTC-3'

#### *Procedimiento*

1) Marcaje de la sonda específica:

Se utilizó un oligonucleótido con la secuencia consenso para cada uno de los factores de transcripción marcado con  $^{32}$ P, para lo cual se dispuso en un tubo eppendorf, a 4°C, de la siguiente mezcla reactiva:

- 2,5 µl de EDTA sódico 0,1 M.
- 5,7 µl de oligonucleótido para NF-κB.
- 2,5 µl de tampón 10x T4 PNK (T4 polinucleótido kinasa).
- 5,3 µl (10 pmol)  $\gamma$ -<sup>32</sup>P (ATP).
- 2 µl de la enzima T4 PNK.

Tras agitar esta mezcla, se incubó a 37°C durante 30 minutos, posteriormente y con el fin de detener la reacción y purificar el oligonucleótido, se añadieron:

- 2,5 µl de EDTA sódico 0,1 M.
- 50 µl de TE (Tris/HCL 10 mM y EDTA 1 mM pH= 7.4).

La mezcla anterior se centrifugó 2 minutos a 3500 xg. Al volumen resultante de la centrifugación se le añadió 125 µl de TE. La sonda, en estas condiciones, fue almacenada a -20°C durante un período inferior a 15 días.

## 2) Reacción de unión con el ADN:

Se preparó la siguiente mezcla reactiva:

- 5 µl de tampón de incubación (10 mM Tris/HCl, 40 mM NaCl, 1mM EDTA y glicerol 4% a pH 7,5).
- 1 µl de Poli (dl-dC).
- 25 µg proteína correspondientes a los extractos nucleares de cada muestra.
- H<sub>2</sub>O estéril hasta completar un volumen final de 25 µl.

Después de 15 minutos en hielo se añadieron 2 µl del

oligonucleótido marcado y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos.

### 3) Separación electroforética:

Para la realización del gel se preparó la siguiente mezcla:

- 10 ml de acrilamida/bis acrilamida.
- 2.5 ml TBE 5x (Tris 0.25M, ácido bórico 0.25M y EDTA 5mM).
- 15 ml de H<sub>2</sub>O.
- 200 µl de persulfato amónico al 10%.
- 10 µl de TEMED.

Posteriormente la mezcla fue sometida a electroforesis a través de un gel de poliacrilamida al 6% a 4°C durante dos horas a 150V.

Con el fin de facilitar la manipulación posterior del gel, este se desecó al vacío y con calor seco (80°C) en un desecador de geles. El gel desecado se introdujo en el interior de una cassette hermética con el objeto de exponerlo con una película de alta sensibilidad (Amersham Pharmacia, Piscataway, USA) y se incubó a -80°C durante 7 días. Tras el revelado de la película se realizó la cuantificación de las bandas por densitometría utilizando el programa Scion Image.

#### **3.7.1.7 Análisis de la expresión génica por retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-qPCR)**

##### 1) Aislamiento de ARN a partir de tejido muscular

*Fundamento:*

El aislamiento de ARN a partir de músculo esquelético vastolateral se llevó a cabo utilizando el kit Promega, “SV Total RNA Isolation System”. Éste se basa en un método que combina las propiedades disruptivas y a la vez protectoras del tiocianato de guanidina (GTC) y  $\beta$ -mercaptoetanol para inactivar las ribonucleasas presentes en los extractos celulares. El tiocianato en combinación con el duodecil sulfato sódico (SDS), rompe los complejos de nucleoproteínas, dejando libre el ARN en la solución y aislado de proteína. Tras la centrifugación para limpiar el lisado de las proteínas centrifugadas y escombros celulares, el ARN es precipitado selectivamente con etanol y unido a la silica de las fibras del cristal encontradas en el filtro de la columna. Los lisados, ya limpios, se unirán a los filtros por centrifugación. La unión ocurre rápidamente, favoreciendo la adsorción de los ácidos nucleicos al filtro. La DNasa I es aplicada directamente en el filtro para digerir la contaminación con ADN genómico. El ARN unido se purifica. Finalmente el ARN se eluye añadiendo agua libre de nucleasas.

*Reactivos*

Los proporcionados por el kit.

*Procedimiento*

Según las instrucciones del kit, se siguieron los siguientes pasos, para cada una de las muestras. Se pesaron 30 mg de tejido y se añadieron al homogeneizador con 175  $\mu$ L de tampón de lisis, se homogeneizó el tejido y posteriormente se añadieron 350  $\mu$ L del tampón de dilución. Se bloqueó la mezcla, en un baño seco a 70°C durante 3 minutos y se centrifugó durante 15 minutos a 14000 xg. El sobrenadante se recogió en

un eppendorf limpio. Se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de etanol al 95% y todo ello se transfirió a una columna la cual se centrifugó a 14000  $\times g$  1 minuto. El eluido fue desechado y se añadieron 600  $\mu\text{L}$  de tampón de lavado, volviéndose a centrifugar a 14000  $\times g$  1 minuto. A continuación se procedió a la incubación con 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla de DNasa I, 15 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente, se añadieron 900  $\mu\text{L}$  del tampón de lavado. Finalmente, el ARN se eluyó añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleadas. El ARN se almacenó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización.

## 2) Cuantificación de la concentración de ARN

Para la cuantificación del ARN total se procedió a la medida de la densidad óptica (DO) a 260 nm (1 unidad de DO equivale a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) usando un Espectrofotómetro UV-Vis que cubre todo el rango espectral de 220 a 750 nm (modelo NANODROP 1000). La pureza del ARN se comprobó a través de la relación DO A260/A280, debiendo encontrarse dicho valor dentro del intervalo 1,7-2,0. Un valor menor indica contaminación con proteínas.

## 3) Retrotranscripción-Amplificación

La RT-PCR consistió en dos pasos:

### 3.1) Síntesis de ADNc: Retrotranscripción (RT)

#### *Procedimiento*

Consiste en la obtención de un ADN complementario (ADNc) a partir de un ARN total, el proceso inverso de la transcripción. Para ello son necesarias unas ADN polimerasas particulares, llamadas

transcriptasas inversas o retrotranscriptasas. Las enzimas utilizadas proceden de algunos retrovirus, que son virus que presentan ARN como genoma, en vez de ADN. Para poder expresar sus proteínas, han de pasar la información a ADN. Para la síntesis de ADNc se utilizó el sistema “*High-Capacity cDNA Archive Kit*” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para ello, se utilizaron cantidades idénticas de ARN total de cada uno de los animales de los diferentes grupos experimentales, realizándose en paralelo un control negativo, con H<sub>2</sub>O.

#### *Reactivos*

- Tampón RT-PCR 10X: Tris HCl 100mM; KCl 500mM; MgCl<sub>2</sub> 15mM; pH 8,3
- Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) 25X
- Iniciadores (secuencia de nucleótidos) 10X
- Transcriptasa inversa Multiscribe (50U/μL)
- Inhibidor de ARNasas (1U/μL)
- Agua tratada con DEPC

Con el fin de desnaturalizar las posibles estructuras secundarias del ARN y facilitar el anillamiento de los cebadores, se incubaron 10 μg de ARN a 25°C durante 10 minutos seguido de una incubación posterior a 37°C durante 2 horas. A continuación, se añadieron los siguientes reactivos:

- 10 μl de tampón de retrotranscripción
- 4 μl de mezcla de dNTP
- 10 μl de iniciadores (mezcla de nucleósidos)

- 5  $\mu$ l de la enzima transcriptasa reversa MultiScribe
- 1  $\mu$ l de inhibidor de ARNasas

La mezcla de reacción se completó con agua tratada con DEPC hasta un volumen final de 50  $\mu$ l, manteniéndose a temperatura ambiente durante 10 minutos e incubándose posteriormente a 37°C durante 2 horas.

El ADNc obtenido se congeló a -20°C hasta el momento de su utilización en el proceso de amplificación.

### 3.2) Amplificación del ADNc: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez sintetizado el ADNc, se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método que permite amplificar de forma selectiva secuencias específicas de ADN. El método de PCR está basado en la síntesis de una hebra complementaria de ADN, utilizando una cadena simple como molde. La PCR utiliza dos fragmentos cortos de ADN (oligonucleótidos) como iniciadores de la síntesis. Estos iniciadores se unen específicamente a secuencias que flanquean la región a amplificar, uno en cada una de las cadenas del ADN.

El proceso básico se desarrolla en tres pasos que se repiten sucesivas veces, según el gen a amplificar:

- *Desnaturalización*: Las cadenas de ADN diana se separan mediante la incubación a una temperatura superior a 70°C. Las hebras disociadas permanecerán en esta forma en la solución hasta que la temperatura baje lo suficiente para permitir el anillamiento de los iniciadores.

- *Anillamiento de los iniciadores*: Los iniciadores utilizados consisten en un par de oligonucleótidos sintéticos (sentido y antisentido) capaces de unirse a secuencias específicas del ADN de la región que se pretende amplificar. La temperatura óptima para el anillamiento debe ser estimada de forma empírica y viene determinada por la composición de nucleótidos de los dos iniciadores.

- *Elongación a partir de los iniciadores*: El resultado del proceso es la formación de copias de las cadenas de ADN diana.

En el presente estudio, se utilizó la metodología de la PCR cuantitativa a tiempo real (PCR *real time*) para la estimación de la concentración de ARNm. Al contrario de lo que ocurre en una PCR convencional, en la PCR a tiempo real se puede cuantificar la cantidad de producto amplificado en cada ciclo de PCR. La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial de la cantidad de la región diana del ADN, que viene dado por la expresión  $2^n$  (siendo  $n$  el nº de ciclos) hasta que se llega a un punto en que disminuye la eficiencia de la enzima, y la reacción deja de ser exponencial (“fase Plateau”).

*Reactivos:*

- SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemania)
- Iniciadores (Tib Molbiol, Berlin, Alemania)
- Agua libre de nucleasas (Ambion)

En una placa de 96 pocillos se preparó la siguiente mezcla de reacción con un volumen final de 25µl:

- 1 µl de iniciadores ( sentido y antisentido)
- 1 µl de ADNc
- 12,5 µl de Sybergreen PCR Master Mix
- 10,5 µl de agua libre de nucleasas

<b>Nombre del Gen</b>	<b>Iniciadores</b>	<b>Tamaño fragmento (pb)</b>
<b>nNOS</b>	Sentido: 5`-CGATCGGCCCTTGGTAGAC- 3` Antisentido: 5`-AGGCAATGCCCTGAGAAC- 3`	100
<b>iNOS</b>	Sentido: 5`-CCAGGTGCACACAGGCTACTC- 3` Antisentido: 5`-GCTCTTTCTGCAGGATGTCTTGA- 3`	139
<b>eNOS</b>	Sentido: 5` -TGAGCAGCACAAGAGTTACAAAATC- 3` Antisentido: 5`-GCCGCCAAGAGGATACCA -3`	129
<b>IL-1β</b>	Sentido: 5` -ATTCGAAATGTCCCTTCTCCGTT- 3` Antisentido: 5`-ATTAGTTATCGATAGTC -3`	125
<b>HPRT</b>	Sentido: 5`-CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC- 3` Antisentido: 5`-GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC- 3`	123

**Tabla 1.-** Oligonucleótidos utilizados en la RT-PCR como iniciadores en la amplificación de fragmentos correspondientes a cada gen.

Las condiciones del termociclador fueron las siguientes:

1. Etapa inicial de desnaturalización de 10 minutos a 95°C
2. Etapa de desnaturalización de 15 segundos a 95°C
3. Etapa de anillamiento/elongación de 1 minuto a 60°C

Las etapas 2 y 3 se repitieron a lo largo de 50 ciclos. Como patrón interno para normalizar la señal entre las diferentes muestras se amplificó un fragmento específico del gen hipoxantina fosforibosil transferasa (HPRT) en cada una de ellas.

Cada experimento además incluyó un control negativo de cada una de las muestras de ARN que no fueron sometidas a la transcripción reversa. Dicha muestra no dio lugar a producto de PCR alguno, confirmándose la ausencia de ADN genómico extraño o producto de PCR que pudiera haber contaminado la muestra previamente. Los cambios relativos en la expresión génica se determinaron mediante el cálculo del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001).

### **3.7.1.8 Ensayo de Inmunoprecipitación de fragmentos de cromatina (ChIP assay)**

#### *Fundamento*

Esta técnica permite identificar la presencia de proteínas (histonas modificadas, factores de transcripción y proteínas cromosómicas no-histonas) unidas directa o indirectamente al ADN. Es una técnica que ofrece una mejor representación fisiológica de los procesos nucleares involucrados en el procesamiento del ADN (Spencer y cols., 2003). Se basa en el entrecruzamiento con formaldehído y la inmunoprecipitación de los complejos cromatínicos resultantes. Se utiliza formaldehído para

establecer enlaces covalentes entre las proteínas y las secuencias de ADN adyacentes. La cromatina entrecruzada es sonicada para conseguir los tamaños deseados (500-1000 pb). Los fragmentos de ADN y los complejos de proteínas de interés unidos a éstos son inmunoprecipitados con anticuerpos frente a las proteínas presuntamente entrecruzadas.

Los fragmentos de cromatina inmunoprecipitados pueden ser entonces examinados por PCR con oligonucleótidos específicos (Weinmann y Farnham, 2002) (ver Figura 4). De este modo, medimos la relación existente entre la unión de un factor de transcripción y la regulación específica de un gen concreto. Si se estudia además la presencia de la ARN polimerasa II en un exón se puede relacionar la unión del factor de transcripción con la transcripción del gen.

#### *Reactivos*

- ❖ PBS 1X pH 7,4
- ❖ PBS 1X pH 7,4 1 % formaldehído
- ❖ PBS 1X pH 7,4 glicina 0,125 M
- ❖ *Tampón de lisis celular* (HEPES 5 mM; KCl 85 mM; NP-40 0.5%, pH 8)
- ❖ Inhibidores de proteasas (Sigma P8340) y fosfatasa (Sigma P2850)
- ❖ *Tampón de lisis nuclear* (Tris-HCl 50 mM; EDTA 10 mM; SDS 1%, pH 8.1)
- ❖ Proteína A/G sefarosa (Amersham Pharmacia, Piscataway, USA)
- ❖ ADN lammbda (ADN $\lambda$ ) Amersham (250 mg/mL)

- ❖ Albúmina sérica bovina (BSA) Sigma
- ❖ ARN de transferencia (ARNt) Sigma
- ❖ *Tampón de baja salinidad* (Tris-HCl pH 8, 50 mM; NaCl 150 mM; Deoxicolato sódico 0,5%; SDS 0,1%; NP-40 1%; EDTA 1mM)
- ❖ *Tampón de alta salinidad* ( Tris-HCl pH 8, 50 mM; NaCl 500 mM; Deoxicolato sódico 0,5%; SDS 0,1%; NP-40 1%; EDTA 1mM)
- ❖ *Tampón de LiCl* (Tris-HCl pH 8, 50 mM; EDTA 1 mM; LiCl 250 mM; Deoxicolato sódico 0,5%; NP-40 1%)
- ❖ *Tampón TE* (Tris 10 mM; EDTA 0,25 mM, pH 8)
- ❖ *Tampón de elución* (NaHSO<sub>3</sub> 100 mM; SDS 1%)
- ❖ PCR purification Kit (Quiagen ®)

### *Procedimiento*

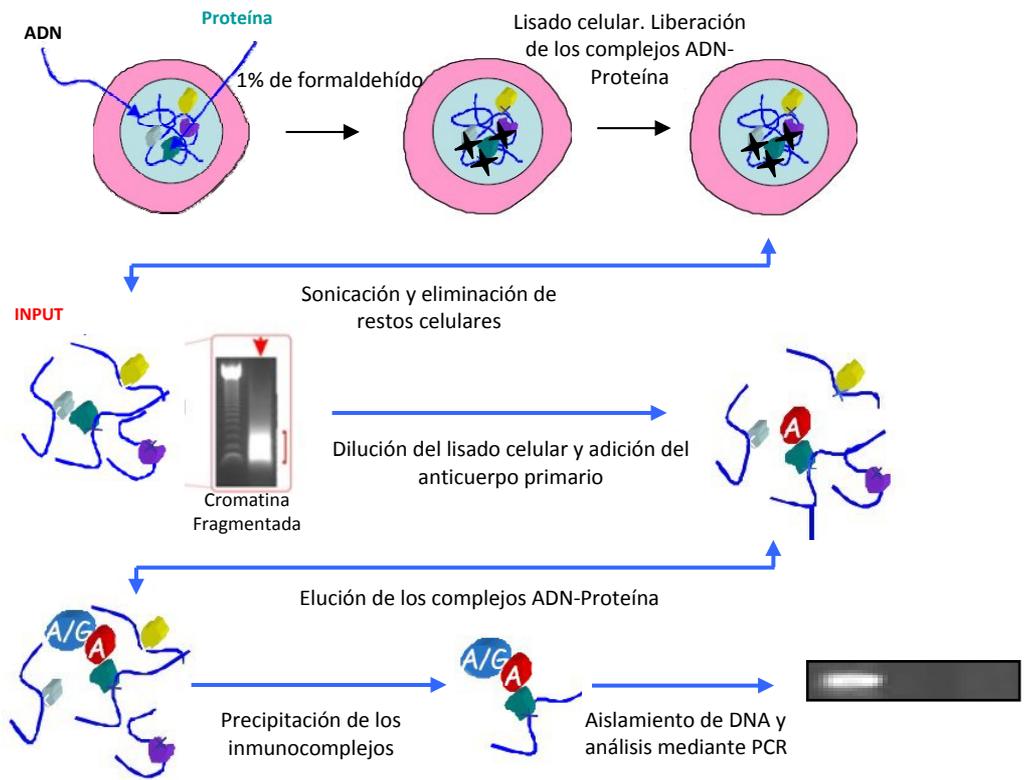
Los ensayos se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Borrás y cols. 2003, con modificaciones. Las muestras de músculo fueron extraídas, pesadas y sumergidas en 30 ml de PBS con formaldehído al 1%, durante 12 minutos, en rotación, a temperatura ambiente. El entrecruzamiento une, mediante enlaces carbamida, el ADN con los factores nucleares, proteínas reguladoras y remodeladores de la cromatina. La reacción se detuvo por adición de glicina a una concentración final de 0.125 M. Las muestras se centrifugaron a 190 xg, 5 minutos, se lavaron dos veces con 10 ml de PBS pH 7,4 y se resuspendieron en 10 ml de PBS. El tejido se disgregó en un homogeneizador y se centrifugó a 1000 xg durante 5 minutos. Los sedimentos celulares se resuspendieron en *tampón de lisis celular* suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa, se incubaron en

hielo durante 15 minutos y se centrifugaron a 5000 xg durante 5 minutos para recoger los núcleos. Los sedimentos nucleares se resuspendieron en 3 ml de *tampón de lisis nuclear* y se almacenaron a -20°C en alícuotas hasta su uso.

Para obtener los fragmentos de cromatina para la inmunoprecipitación, los núcleos lisados se sometieron a sonicación. Cada muestra se sonicó 10 ciclos de 10 segundos, siendo mantenidas en hielo entre ciclos durante 1 minuto. A continuación fueron centrifugadas a 15000 xg durante 10 minutos para eliminar los residuos celulares.

Los sobrenadantes, conteniendo los fragmentos de cromatina solubles, se transfirieron a nuevos tubos, y se determinó su concentración de ADN. Cantidades equivalentes de muestra se diluyeron 10 veces y se prelavaron con 20 ml/ml proteína A/G sefarosa 1:1 (v:v) [bloqueada previamente con ADN $\lambda$  (250 mg/mL); BSA (10 mg/mL) y ARNt (250 mg/ml)]. Las muestras se incubaron a 4°C durante 4 horas en una plataforma rotatoria y se centrifugaron a 12000 xg durante 1 minuto para eliminar la proteína A/G Sefarosa. Las muestras se fraccionaron en alícuotas equivalentes a 50  $\mu$ g de ADN.

Los complejos de inmunoprecipitación fueron seleccionados mediante la adición de 2 mg del anticuerpo correspondiente frente a la proteína (factor de transcripción) de interés; en este caso, se utilizaron anticuerpos frente a NF- $\kappa$ B (p65), ARN polimerasa II (Santa Cruz Biothecnology, Santa Cruz, USA,), HIF-1 $\alpha$  (Abcam, Cambrige, Gran Bretaña) incubándose toda la noche a 4°C en un sistema rotatorio. Como control de la inmunoprecipitación se procesó una alícuota en paralelo en ausencia de anticuerpo (ver Figura 4).



**Figura 4.- Esquema de la técnica de inmunoprecipitación de factores de transcripción.**

Las muestras se incubaron con 50 ml de proteína A/G sefarosa bloqueada durante 3 horas a 4°C, bajo agitación suave. Tras la incubación, se centrifugaron las muestras a 12000 xg, 1 minuto y se recogió el sedimento con los inmunocomplejos formados por fragmentos de cromatina/anticuerpo/ proteínas A/G sefarosa. En el caso del tubo que llevaba la muestra sin anticuerpo, se tomó el sobrenadante, que corresponde al ADN total (el unido más el no unido) que se denomina "Input".

El precipitado de esta muestra (que corresponde a la fracción de ADN que se une inespecíficamente a la proteína A/G sefarosa, y que teóricamente, debía ser nula) se trató en paralelo con el resto de muestras, y se utilizó como control negativo, al que se denomina “Sin anticuerpo”.

A continuación las muestras se lavaron 2 veces con *tampón de baja salinidad*, dos veces con *tampón de alta salinidad*, posteriormente dos veces con *tampón de LiCl*, y finalmente dos veces con *tampón TE*. La fracción de cromatina inmunoseleccionada se eluyó de la proteína A/G sefarosa mediante dos extracciones consecutivas con *tampón de elución*. Los fragmentos de cromatina aislados con el anticuerpo se incubaron a continuación a 65°C durante toda la noche para romper el entrecruzamiento entre los complejos proteicos y el ADN. El ADN de las fracciones (Input, Sin anticuerpo y el Unido) se purificó con “PCR purification Kit” (Quiagen®).

### **Análisis del ADN inmunoprecipitado**

Para determinar si la fracción de cromatina inmunoprecipitada con los diferentes anticuerpos contiene los ADNs de los promotores de los genes estudiados, las muestras de ADN (Input, Unido y Sin anticuerpo) se analizaron por PCR utilizando los oligonucleótidos descritos en la tabla 2A. En el caso del análisis de la posible unión de la ARN polimerasa II a la zona transcribible de los genes estudiados, se utilizaron oligonucleótidos con secuencias contenidas en esta región Tabla 2.

<b>Nombre del Gen</b>	<b>Secuencia seleccionada del promotor</b>	<b>Tamaño fragmento(pb)</b>
<b>nNOS</b>	Sentido 5`-TTGTGGGACTCTCGTGGACA-3` Antisentido 5`-ATCCATGTGACCCCGAAAG-3`	300
<b>iNOS</b>	Sentido 5`-CCTCCCTCCCTAGTGAGTCC-3` Antisentido 5`-CCCAGTAGGGTGTGCAAGTT-3`	315
<b>eNOS</b>	Sentido 5`-AAGACGCTGCTTGGGATCC -3` Antisentido 5`-GGCCGGCTCTGTA ACTTCT -3`	342
<b>HPRT</b>	Sentido 5`-CAGCACGGCCAGTACCATTT -3` Antisentido 5`-AAGTTGGCCTGGGAATTTT -3`	280
<b>Nombre del Gen</b>	<b>Secuencia seleccionada de la zona transcribible</b>	<b>Tamaño fragmento(pb)</b>
<b>nNOS</b>	Sentido 5`-GCACCTGAAGAGCACACTGG-3` Antisentido 5`-CCCATGCAAATGTGCTCTGT-3`	333
<b>iNOS</b>	Sentido 5`-AGCGGCTCCATGACTCTCA-3` Antisentido 5`-TGCACCCAAACACCAAGGT-3`	328
<b>eNOS</b>	Sentido 5`-CTCCAGAGCATACCCGCACT-3` Antisentido 5`-CTTGTGTCCACCGCTCGAG-3`	346
<b>HPRT</b>	Sentido 5`-GCTCGAGATGTCATGAAGGAGAT -3` Antisentido 5`-AGCAGGTCAGCAAAGA ACTTATAG -3`	387

**Tabla 2.-** Oligonucleótidos empleados para el análisis por PCR del ADN inmunoprecipitado

### **3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para la expresión de los resultados se calculó el valor de la media y el error estándar de la media (E.E.M.).

Para el análisis estadístico de los resultados se realizó el test de análisis de varianza (ANOVA). Además, en aquellos grupos donde aparecían diferencias significativas, se realizaba posteriormente el test de Newman-Keuls. Se consideró que existían diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ .

Para el tratamiento de los datos y su análisis estadístico se utilizó el software comercial SPSS+ vrs. 14.0 (Chicago, IL).

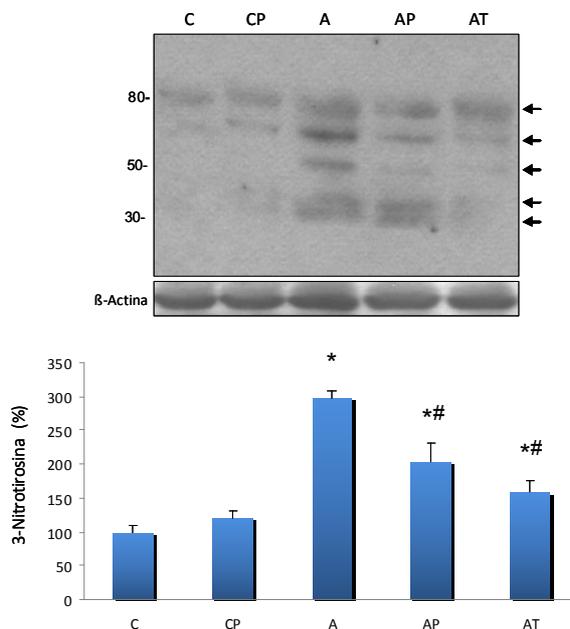
## **4.- RESULTADOS**



#### 4.1 Efecto de una sesión de ejercicio excéntrico agudo, de un programa de entrenamiento excéntrico o de la administración de PDTC, previos al ejercicio agudo, sobre la formación de peroxinitritos

El NO puede reaccionar con el anión superóxido dando lugar a la formación de otra especie reactiva de nitrógeno, el peroxinitrito, el cual puede provocar la nitración de los residuos de tirosina de las proteínas celulares formando 3-nitrotirosina. La detección de 3-nitrotirosina unida a las proteínas se utiliza con frecuencia como marcador estable y específico de la generación de peroxinitritos (Ishiropoulos y cols., 1992).

En la Figura 5 se muestra el Western blot y la gráfica representativa de la oxidación de proteínas celulares.



**Figura 5.- Formación de peroxinitritos en los diferentes grupos experimentales.** Valores medios  $\pm$  E.E.M = 8 ratas. \* Diferencias significativas respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ). # Diferencias significativas respecto al grupo con ejercicio excéntrico agudo ( $p < 0,05$ ).

Los resultados muestran un marcado aumento de la nitración de los residuos de tirosina de las proteínas en el grupo de ejercicio excéntrico agudo. Este incremento fue menor tanto en el grupo de animales tratados con PDTC como en los entrenados. Ambos grupos fueron estadísticamente significativos frente al grupo con ejercicio agudo, aunque se detectó una menor proporción de proteínas nitradas en el grupo de animales previamente entrenados (Figura 5).

#### **4.2 Efecto de una sesión de ejercicio excéntrico agudo, de un programa de entrenamiento excéntrico o de la administración de PDTC, previos al ejercicio agudo, sobre la activación NF- $\kappa$ B y la expresión de las proteínas más relevantes de su ruta de activación: I $\kappa$ B $\alpha$ , IKK y formas fosforiladas**

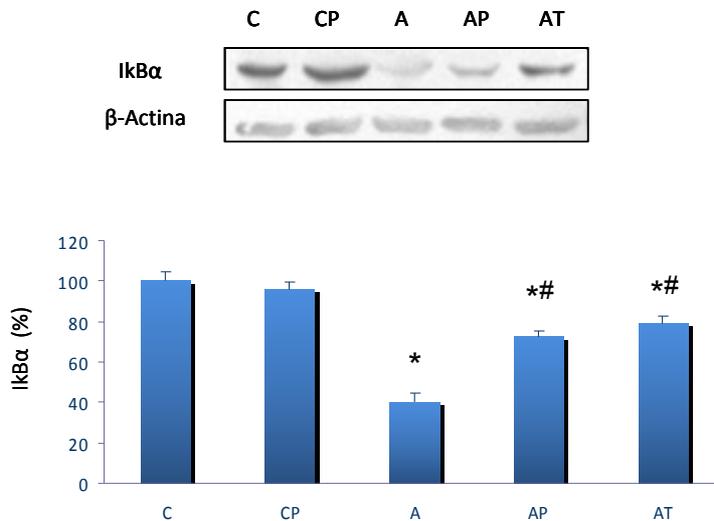
La activación del factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) requiere de la estimulación de una serie de proteínas citoplasmáticas, fundamentalmente mediante fenómenos de fosforilación que se suceden unos a otros en cadena y que concluyen con la fosforilación de las proteínas inhibidoras I $\kappa$ Bs, las cuales posteriormente serán degradadas. Esta fosforilación es llevada a cabo por un conjunto de proteínas, las IKKs, que, a su vez, también se activan mediante fenómenos de fosforilación.

En el presente apartado se analiza la expresión para las distintas proteínas y sus formas fosforiladas, con el fin de dilucidar si la ruta ordinaria de activación del NF- $\kappa$ B se ve estimulada a consecuencia del ejercicio excéntrico agudo y si los efectos de la sesión aguda se ven influenciados por la administración previa de PDTC o por un programa de entrenamiento excéntrico.

El análisis del contenido en proteína se lleva a cabo mediante la técnica de Western blot, utilizando para ello anticuerpos específicos para cada caso.

#### 4.2.1 I $\kappa$ B $\alpha$

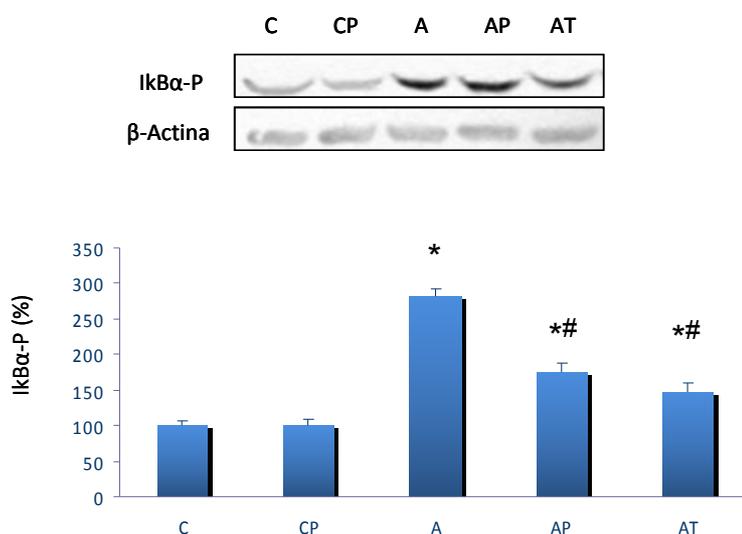
En la Figura 6 se pone de manifiesto como, dos horas después de la finalización de la sesión de ejercicio agudo, el grupo de animales sometidos únicamente a un ejercicio excéntrico agudo presenta valores significativamente más bajos que los controles, mientras que el grupo entrenado presenta valores cercanos a los controles, y significativamente más altos respecto al grupo de ejercicio excéntrico agudo. El efecto del ejercicio excéntrico agudo fue también parcialmente atenuado con el tratamiento de PDTC.



**Figura 6.- Expresión de proteína I $\kappa$ B $\alpha$  en la fracción citosólica de músculo esquelético vastolateral profundo (DVL) en los diferentes grupos experimentales.** Bandas (1) I $\kappa$ B $\alpha$  41 kDa (2)  $\beta$ -Actina 40kDa. El panel superior muestra Western blots representativos. El panel inferior muestra las variaciones de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  en los distintos grupos de estudio expresadas como % respecto a su control. Valores medios  $\pm$  E.E.M = 8 ratas. \* Diferencias significativas respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ). # Diferencias significativas respecto al grupo con ejercicio excéntrico agudo ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2 I $\kappa$ B $\alpha$ -fosforilado

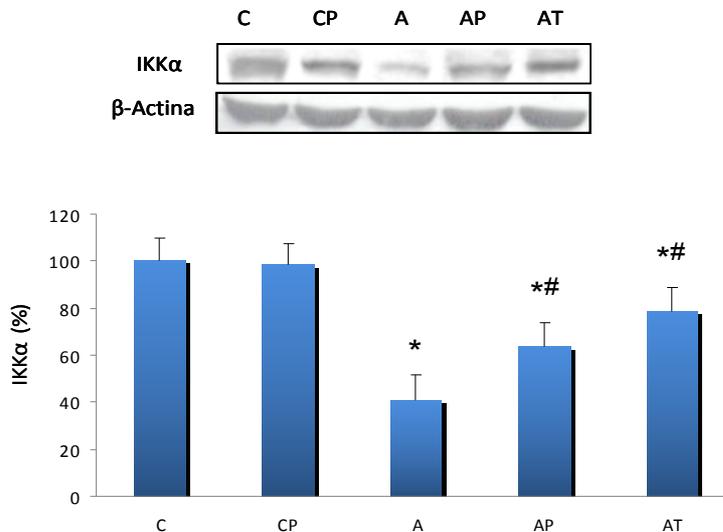
La fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$  constituye el paso previo para la degradación de la proteína, por lo que se analizó el contenido citosólico de esta forma. Los datos reflejan que la expresión de esta proteína sufre modificaciones inversamente proporcionales a las observadas para la forma no fosforilada, es decir, con incrementos significativos en los tres grupos sometidos a ejercicio excéntrico agudo. No obstante, este aumento fue parcialmente revertido en los animales entrenados y en los tratados con el antioxidante PDTTC (Figura 7).



**Figura 7.- Expresión de proteína I $\kappa$ B $\alpha$ -fosforilada en la fracción citosólica de músculo esquelético vastolateral profundo (DVL) en los diferentes grupos experimentales.** Bandas (1) I $\kappa$ B $\alpha$ -P 41 kDa (2)  $\beta$ -Actina 40kDa. El panel superior muestra Western blots representativos. El panel inferior muestra las variaciones de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$ -P en los distintos grupos de estudio expresadas como % respecto a su control. Valores medios  $\pm$  E.E.M = 8 ratas. \* Diferencias significativas respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ). # Diferencias significativas respecto al grupo con ejercicio excéntrico agudo ( $p < 0,05$ ).

### 4.2.3 IKK $\alpha$

Una de las subunidades que forman parte del complejo IKK y que interviene en la fosforilación de la proteína inhibidora I $\kappa$ B $\alpha$ , es el IKK $\alpha$ . En la figura 8 se observa una disminución significativa de dicha subunidad tras la realización del ejercicio excéntrico agudo. La ejecución durante 8 semanas de un programa de entrenamiento, así como la administración de pirrolidina ditiocarbamato, atenúa el efecto anterior aunque no llegan a restablecerse los valores control.

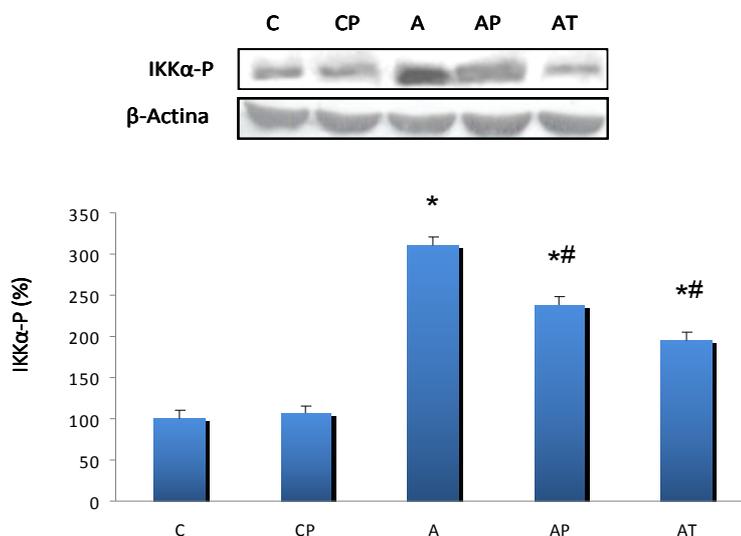


**Figura 8.- Expresión de proteína IKK en la fracción citosólica de músculo esquelético vastolateral profundo (DVL) en los diferentes grupos experimentales.** Bandas (1) IKK $\alpha$  85kDa (2)  $\beta$ -Actina 40kDa. El panel superior muestra Western blots representativos. El panel inferior muestra las variaciones de la proteína IKK en los distintos grupos de estudio expresadas como % respecto a su control. Valores medios  $\pm$  E.E.M = 8 ratas. \* Diferencias significativas respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ). # Diferencias significativas respecto al grupo con ejercicio excéntrico agudo ( $p < 0,05$ ).

### 4.2.4 IKK $\alpha$ -fosforilado

La fosforilación de IKK $\alpha$  constituye otro paso importante previo a la activación del factor nuclear kappaB. Transcurridas dos horas de la

finalización del ejercicio excéntrico agudo pudo observarse un aumento significativo de la forma fosforilada del IKK $\alpha$ . Este incremento fue de menor magnitud en el grupo de animales entrenados y en el grupo de animales tratados con PDTC y sometidos a ejercicio excéntrico agudo. Ambos grupos continuaban siendo estadísticamente significativos respecto a los grupo control (Figura 9).



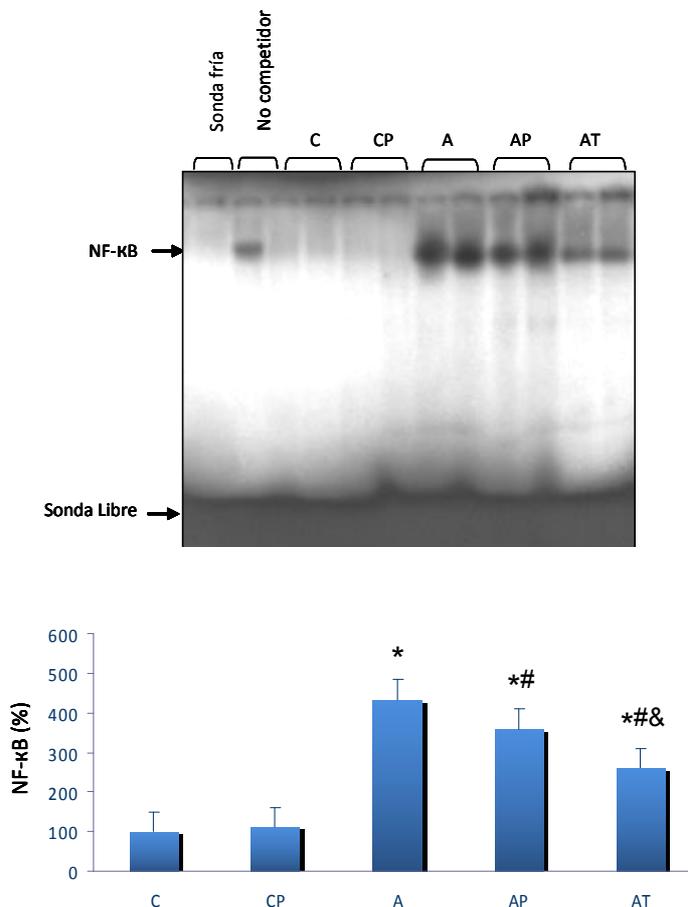
**Figura 9.- Expresión de proteína IKK $\alpha$ -fosforilada en la fracción citosólica de músculo esquelético vastolateral profundo (DVL) en los diferentes grupos experimentales.** Bandas (1) IKK $\alpha$ -P 85kDa (2)  $\beta$ -Actina 40kDa. El panel superior muestra Western blots representativos. El panel inferior muestra las variaciones de la proteína IKK $\alpha$ -P en los distintos grupos de estudio expresadas como % respecto a su control. Valores medios  $\pm$  E.E.M = 8 ratas. \* Diferencias significativas respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ). # Diferencias significativas respecto al grupo con ejercicio excéntrico agudo ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.5 Activación del NF- $\kappa$ B

La activación del NF- $\kappa$ B, es el resultado final de la cascada de activaciones/inactivaciones (mediante procesos de fosforilación), descrita en los apartados anteriores. La activación de dicho factor finaliza con su

traslocación al núcleo celular, donde promueve la transcripción de una gran variedad de genes.

En la siguiente figura se representa el grado de activación de este factor en la fracción nuclear del músculo esquelético DVL, mediante la técnica de EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*).



**Figura 10.- Activación del factor de transcripción nuclear  $\kappa B$  en el extracto nuclear del músculo esquelético vastolateral profundo (DVL) en los distintos grupos experimentales.** Valores medios  $\pm$  E.E.M = 8 ratas. \* Diferencias significativas respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ). # Diferencias significativas respecto al grupo con ejercicio excéntrico agudo ( $p < 0,05$ ). & Diferencias significativas respecto al grupo con ejercicio excéntrico agudo tratado con PDTC ( $p < 0,05$ ).

Como puede apreciarse se puso de manifiesto un efecto inductor tras el protocolo de ejercicio excéntrico agudo sobre este factor de transcripción. El grupo con ejercicio excéntrico agudo y con tratamiento previo de PDTC presentó un descenso significativo, con respecto a los animales no tratados. Esta activación fue significativamente menor en aquellos animales que fueron entrenados durante las 8 semanas previas a la sesión aguda de ejercicio (Figura 10).

#### **4.3 Efecto de una sesión de ejercicio excéntrico agudo, de un programa de entrenamiento excéntrico o de la administración de PDTC, previos al ejercicio agudo, sobre la expresión de los genes de las isoformas de la enzima óxido nítrico sintetasa en el músculo DVL**

El estudio de la expresión génica de las isoformas de la enzima óxido nítrico sintetasa en el músculo vastolateral se realizó analizando los contenidos de ARN mensajero y la proteína específica de cada isoforma.

##### **4.3.1 Contenidos de ARNm de las isoformas de óxido nítrico sintasa**

En la Tabla 3 se muestra la expresión del ARNm de las tres isoformas de óxido nítrico sintetasa en los diferentes grupos experimentales.

	C	CP	A	AP	AT
nNOS,%	100 ± 12	98 ± 13	242 ± 15*	188 ± 18*#	196 ± 15*#
iNOS,%	100 ± 8	93 ± 19	305 ± 16*	228 ± 12*#	218 ± 14*#
eNOS,%	100 ± 11	99 ± 13	208 ± 19*	155 ± 8*#	131 ± 8*#

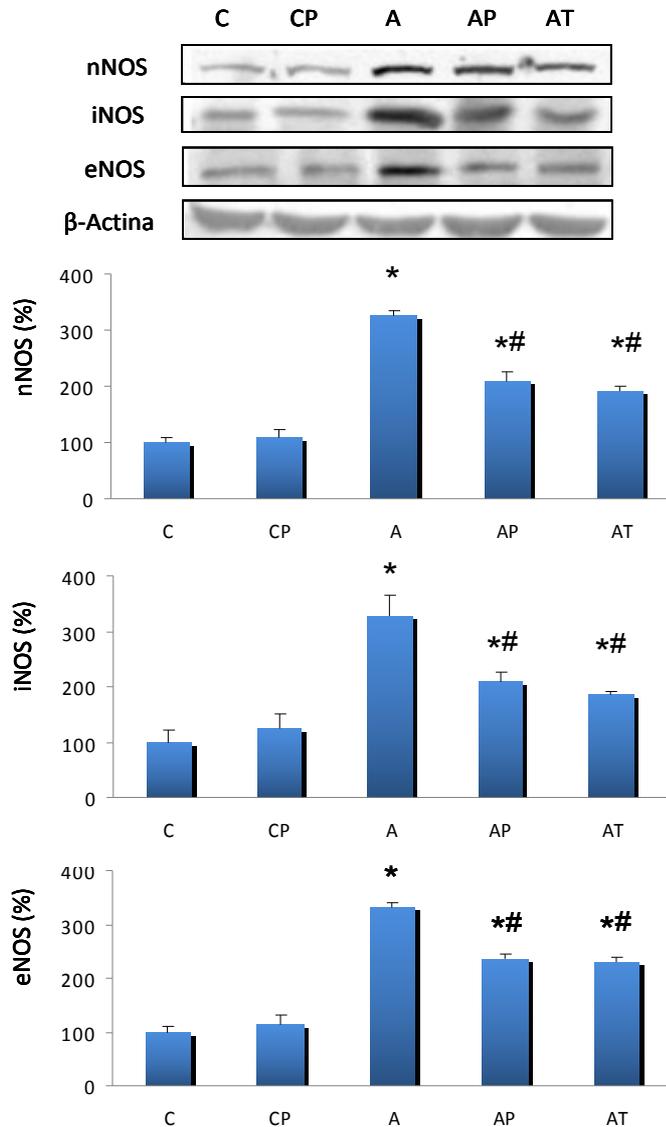
**Tabla 3.- Contenido de ARNm de los genes de la nNOS, iNOS y eNOS en los distintos grupos experimentales.\* Diferencias significativas respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ). # Diferencias significativas respecto al grupo con ejercicio excéntrico agudo ( $p < 0,05$ ).**

Los animales con entrenamiento excéntrico previo presentaron un aumento en los contenidos de ARNm de los tres genes estudiados frente a sus respectivos controles. Este incremento se vuelve más acusado en ratas con ejercicio agudo excéntrico. La misma tendencia se puso de manifiesto en el grupo de animales a los que se les administró PDTC 24 y 2 h antes de la realización del protocolo de ejercicio excéntrico agudo.

#### **4.3.2 Contenido proteico de las isoformas de óxido nítrico sintasa**

Como se puede apreciar en la siguiente figura, el protocolo de ejercicio excéntrico agudo utilizado en el presente trabajo incrementó significativamente los contenidos de proteína de las tres isoformas de NOS en todos los grupos experimentales que realizaron este tipo de ejercicio.

En la Figura 11 también se puede observar como el incremento en el contenido proteico de nNOS, iNOS y eNOS, detectado en los grupos A, AP y AT, disminuyó parcialmente tras la administración de las dos dosis de PDTC y con la realización de un programa de entrenamiento de 8 semanas de duración. Sin embargo, aunque la disminución fue significativa desde el punto de vista estadístico, no se consiguió alcanzar los valores observados en los animales no ejercitados (Figura 11).



**Figura 11.- Expresión de proteínas nNOS, iNOS, y eNOS en la fracción citosólica de músculo esquelético vastolateral profundo (DVL) en los diferentes grupos experimentales.** Bandas (1) nNOS 155kDa (2) iNOS 130kDa (3) eNOS 133kDa (4) β-Actina 40kDa. El panel superior muestra Western blots representativos. El panel inferior muestra las variaciones de las proteínas nNOS, iNOS, y eNOS en los distintos grupos de estudio expresadas como % respecto a su control. Valores medios ± E.E.M = 8 ratas. \* Diferencias significativas respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ). # Diferencias significativas respecto al grupo con ejercicio excéntrico agudo ( $p < 0,05$ ).

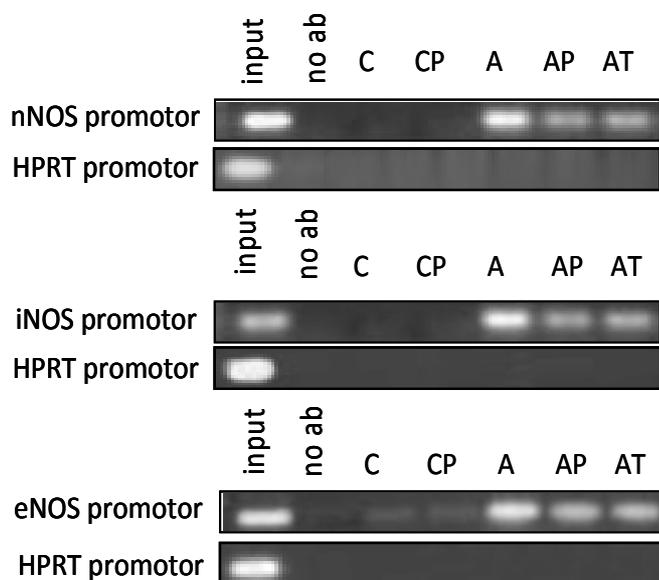
#### **4.4 Efecto de una sesión de ejercicio excéntrico agudo, de un programa de entrenamiento excéntrico o de la administración de PDTC, previos al ejercicio agudo, sobre la inmunoprecipitación de los complejos NF- $\kappa$ B-ADN**

Para intentar determinar el mecanismo responsable del incremento de la expresión de los genes de las isoformas de la NOS se procedió al estudio de la posible unión de NF- $\kappa$ B al promotor de estos genes. Para ello empleamos la inmunoprecipitación del complejo NF- $\kappa$ B-ADN, utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce específicamente a NF- $\kappa$ B (p65).

Se extrajo el ADN de las fracciones Input, Unido y Sin anticuerpo; analizándose cantidades iguales de cada fracción, usando para ello oligonucleótidos que amplificasen la región promotora del gen de interés [ver Sección Material y Métodos: Inmunoprecipitación de fragmentos de cromatina (ChIP aasay)]. El ADN amplificado fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

Tal como se muestra en la figura 12, en los animales que realizaron el protocolo de ejercicio agudo excéntrico, se encontró una banda correspondiente a la unión de NF- $\kappa$ B al promotor del gen nNOS, al igual que en el grupo tratado con PDTC y con entrenamiento excéntrico. Esta banda es prácticamente indetectable en el caso de animales control. El mismo resultado se obtuvo cuando se analizó el promotor del gen iNOS y el del gen que codifica para eNOS. Como control negativo, se analizó la unión de NF- $\kappa$ B al promotor del HPRT, gen cuya expresión no está regulada por NF- $\kappa$ B. Como también se pone de manifiesto en las fotografías representativas, en este caso, no existe unión de NF- $\kappa$ B al

promotor en ninguno de los grupos experimentales estudiados (Figura 12).

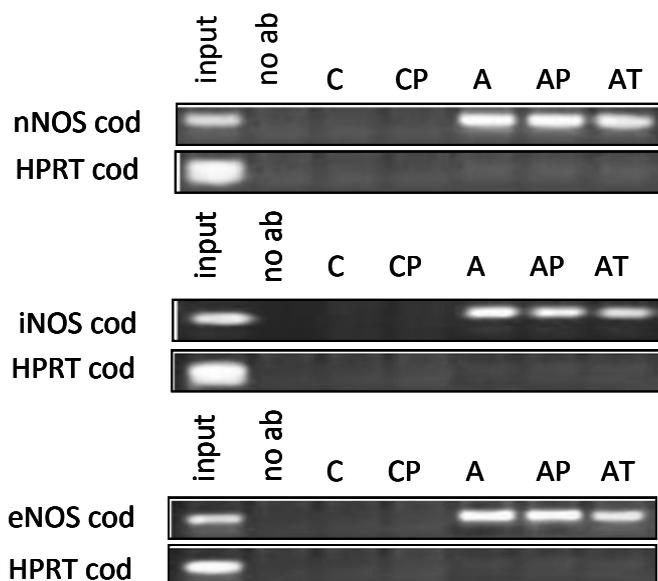


**Figura 12.- Inmunoprecipitación de los complejos NF- $\kappa$ B-ADN.** Se llevó a cabo la inmunoprecipitación de la cromatina fijada con formaldehído del músculo vastolateral en los diferentes grupos experimentales. Los inmunoprecipitados obtenidos utilizando un anticuerpo frente a NF- $\kappa$ B fueron alicuotados y posteriormente analizados por PCR utilizando oligonucleótidos específicos de los promotores de las isoformas de la NOS. Para cada caso se incluyó una muestra de la cromatina total (Input) en las reacciones de PCR. Como control negativo se incluyeron los productos de PCR obtenidos con oligonucleótidos específicos para el promotor del HPRT. Ab = Anticuerpo.

#### **4.5 Efecto de una sesión de ejercicio excéntrico agudo, de un programa de entrenamiento excéntrico o de la administración de PDTC, previos al ejercicio agudo, sobre la inmunoprecipitación de los complejos ARN polimerasa II-ADN**

Los resultados obtenidos previamente pusieron de manifiesto que el NF- $\kappa$ B está activo y se encuentra unido al promotor de los genes que codifican las isoformas de la NOS en los animales que fueron sometidos al protocolo de ejercicio excéntrico agudo. Por tanto, el paso siguiente consistió en averiguar si este hecho se traduce en una activación transcripcional de los genes, lo que implicaría la presencia de la ARN polimerasa II en la zona codificante de los mismos.

La Figura 13 representa el estudio de la posible unión de la ARN polimerasa II a la zona transcribible de los genes que codifican las isoformas de la NOS. Para ello se llevó a cabo la inmunoprecipitación del complejo ARN polimerasa II-ADN utilizando un anticuerpo policlonal, que reconoce a la ARN polimerasa II.



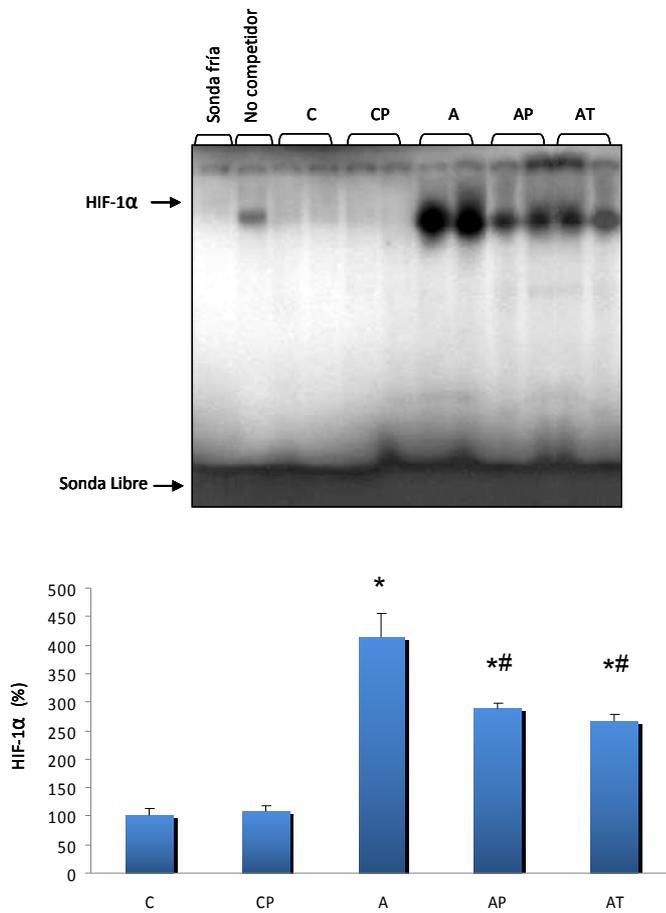
**Figura 13.-Inmunoprecipitación de los complejos ARN polimerasa II-ADN.** Se llevó a cabo la inmunoprecipitación de la cromatina fijada con formaldehído del músculo vastolateral en los diferentes grupos experimentales. Los inmunoprecipitados obtenidos utilizando un anticuerpo frente a ARN polimerasa II fueron alicuotados y posteriormente analizados por PCR utilizando oligonucleótidos específicos de la secuencia codificante (cod) de las isoformas de la NOS. Para cada caso se incluyó una muestra de la cromatina total (Input) en las reacciones de PCR. Como control negativo se incluyeron los productos de PCR obtenidos con oligonucleótidos específicos para el promotor del HPRT. Ab = Anticuerpo.

En la figura anterior se puede observar como la ARN polimerasa II se encuentra presente en la zona transcribible de los genes que codifican para las tres isoformas de la NOS en los tres grupos de animales sometidos a ejercicio excéntrico agudo. Este resultado implica que está teniendo lugar su transcripción, produciéndose de forma más notoria en el grupo únicamente con ejercicio agudo, que los tratados con PDTC y entrenados.

#### **4.6 Efecto de una sesión de ejercicio excéntrico agudo, de un programa de entrenamiento excéntrico o de la administración de PDTC, previos al ejercicio agudo, sobre la activación del HIF-1 $\alpha$**

HIF-1 es un heterodímero compuesto por dos subunidades (HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$ ), que participa en los fenómenos de adaptación al ejercicio. La translocación al núcleo de HIF-1 $\alpha$  y heterodimerización con HIF-1 $\beta$  son necesarias para su transactivación. Con el fin de evaluar la influencia del ejercicio sobre este factor de transcripción se estudió la activación del mismo en la fracción nuclear del músculo esquelético DVL, mediante la técnica de EMSA (Figura 14).

Como se observa en la Figura 14, existió una marcada activación de HIF-1 $\alpha$ , en los grupos que realizaron el ejercicio excéntrico agudo, comparado con el grupo control. Tanto un entrenamiento de 8 semanas de duración como el tratamiento con PDTC fue capaz de prevenir, parcialmente, la activación de HIF-1 $\alpha$ , aunque en ambos casos, los valores seguían siendo significativamente mayores que los detectados en los grupos control (C y CP).



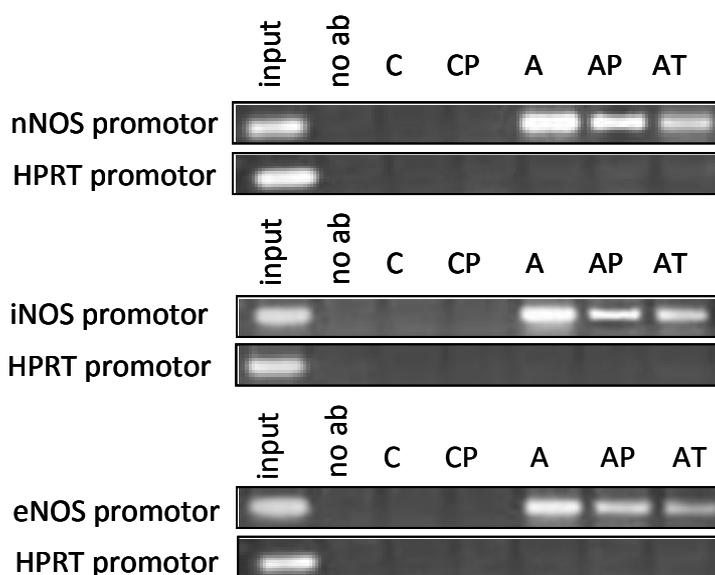
**Figura 14.- Activación del factor de transcripción HIF-1α en el extracto nuclear del músculo esquelético vastolateral profundo (DVL) en los distintos grupos experimentales. Valores medios  $\pm$  E.E.M = 8 ratas. \* Diferencias significativas respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ). # Diferencias significativas respecto al grupo con ejercicio excéntrico agudo ( $p < 0,05$ ).**

---

#### **4.7 Efecto de una sesión de ejercicio excéntrico agudo, de un programa de entrenamiento excéntrico o de la administración de PDTC, previos al ejercicio agudo, sobre la inmunoprecipitación de los complejos HIF1 $\alpha$ -ADN**

Al igual que ocurre con NF- $\kappa$ B, en el promotor de los genes que codifican las isoformas de la NOS se encuentran secuencias de unión específicas para HIF-1 $\alpha$ . Con el fin de seguir ahondando en los mecanismos responsables del control transcripcional de las isoformas de la NOS decidimos estudiar, también, la posible implicación de HIF1 $\alpha$  en este proceso. Asimismo, se pretendió comprobar si la posible unión de este factor de transcripción al promotor se traducía en una regulación transcripcional activa. Para ello se procedió a la inmunoprecipitación del complejo HIF-1 $\alpha$ -ADN, utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce a HIF-1 $\alpha$ .

Al igual que se hizo con la inmunoprecipitación de NF- $\kappa$ B-ADN, se extrajo el ADN de las fracciones Input, Unido y Sin anticuerpo y se analizaron cantidades iguales de cada fracción, utilizando oligonucleótidos que amplificasen la región promotora de las isoformas de la NOS (Figura 15).



**Figura 15.- Inmunoprecipitación de los complejos HIF-1 $\alpha$ -ADN.** Se llevó a cabo la inmunoprecipitación de la cromatina fijada con formaldehído del músculo vastolateral de animales controles, animales con ejercicio excéntrico agudo, con ejercicio excéntrico agudo tratados con PDTC y entrenado. Los inmunoprecipitados obtenidos utilizando un anticuerpo frente a HIF1 $\alpha$  fueron alicuotados y posteriormente analizados por PCR utilizando oligonucleótidos específicos de los promotores de las isoformas de la NOS. Para cada caso se incluyó una muestra de la cromatina total (Input) en las reacciones de PCR. Como control negativo se incluyeron los productos de PCR obtenidos con oligonucleótidos específicos para el promotor del HPRT. Ab = Anticuerpo.

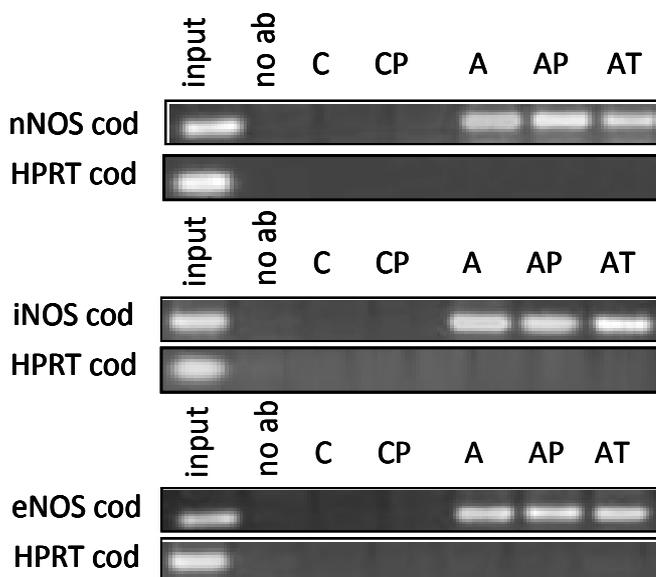
Tal como se muestra en la Figura 15, en el caso de HIF-1 $\alpha$  se detectaron bandas correspondientes a la unión de HIF-1 $\alpha$  al promotor de los genes de las isoformas de la NOS en el conjunto de animales sometidos a ejercicio excéntrico agudo. No se detectó la unión de HIF-1 $\alpha$  en el caso de animales controles. Como control negativo, se analizó la unión de HIF-1 $\alpha$  al promotor del HPRT, gen cuya expresión no está regulada por HIF-1 $\alpha$ . Como podemos observar en la figura, en este caso

tampoco existe unión de HIF-1 $\alpha$  al promotor ni en el grupo de animales control ni en el grupo de animales ejercitados.

#### **4.8 Efecto de una sesión de ejercicio excéntrico agudo, de un programa de entrenamiento excéntrico o de la administración de PDTC, previos al ejercicio agudo, sobre la inmunoprecipitación de los complejos ARN polimerasa II-ADN**

En los animales sometidos a un ejercicio excéntrico agudo, con o sin un tratamiento con PDTC o un entrenamiento previo, se observó que el HIF-1 $\alpha$  está activo y que se encontraba unido al promotor de los genes que codifican las isoformas de la NOS. Por ello, se decidió estudiar que podría estar sucediendo en la región transcribible de nNOS, iNOS y eNOS, utilizándose para ello oligonucleótidos específicos.

En la Figura 16 se puede observar como en los grupos A, AP y AT, la ARN polimerasa II se encuentra presente en la zona transcribible de los genes, lo que implica que está teniendo lugar su transcripción. La unión fue ligeramente más notoria en el grupo sólo con ejercicio agudo, que en los grupos con ejercicio agudo pero tratados con PDTC o entrenados.

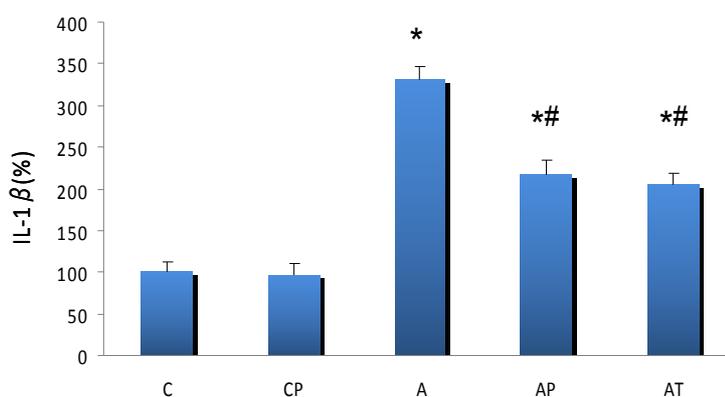


**Figura 16.- Inmunoprecipitación de los complejos ARN polimerasa II-ADN.** Se llevó a cabo la inmunoprecipitación de la cromatina fijada con formaldehído del músculo vastolateral de animales controles, animales con ejercicio excéntrico agudo, con ejercicio excéntrico agudo tratados con PDTC y entrenado. Los inmunoprecipitados obtenidos utilizando un anticuerpo frente a ARN polimerasa II fueron alicuotados y posteriormente analizados por PCR utilizando oligonucleótidos específicos de los promotores de las isoformas de la NOS. Para cada caso se incluyó una muestra de la cromatina total (Input) en las reacciones de PCR. Como control negativo se incluyeron los productos de PCR obtenidos con oligonucleótidos específicos para el promotor del HPRT. Ab = Anticuerpo.

#### 4.9 Efecto de una sesión de ejercicio excéntrico agudo, de un programa de entrenamiento excéntrico o de la administración de PDTC, previos al ejercicio agudo, sobre la expresión génica de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$

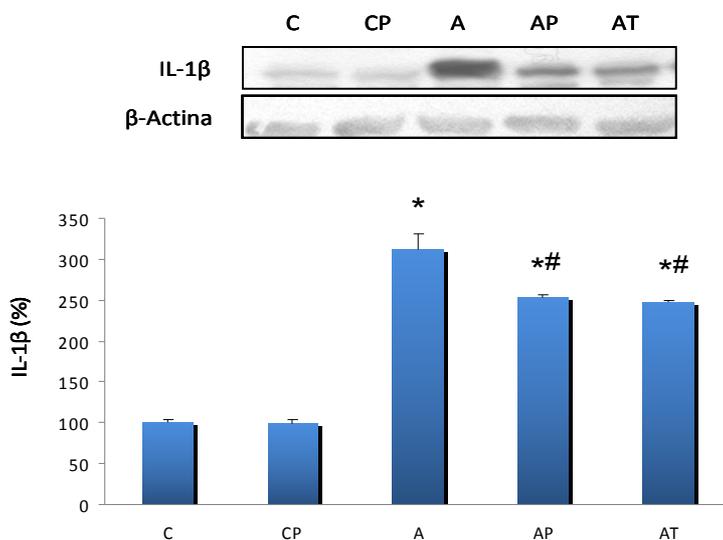
Las citoquinas, incluida la interleucina 1 $\beta$  juegan un papel muy importante en la respuesta inflamatoria aguda.

Tal y como se refleja en la Figura 17 el ARNm de IL-1 $\beta$  se incrementó de manera significativa en los grupos sometidos a una sesión de ejercicio excéntrico agudo en relación con los grupos control. Sin embargo, esta activación no fue tan marcada en el grupo con ejercicio excéntrico agudo tratado con PDTC y en el grupo con entrenamiento excéntrico.



**Figura 17.- Contenido de ARNm de IL-1 $\beta$  en los diferentes grupos experimentales.** Valores medios  $\pm$  E.E.M = 8 ratas. \* Diferencias significativas respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ). # Diferencias significativas respecto al grupo con ejercicio excéntrico agudo ( $p < 0,05$ ).

Los cambios observados en el ARNm se correlacionaron con un aumento significativo en el contenido proteico de los grupos ejercitados de forma aguda (Figura 18). El tratamiento con dos dosis de PDTC y 8 semanas de entrenamiento excéntrico, disminuyeron el incremento anterior pero sin llegar a los valores presentados por los grupos control.



**Figura 18.- Expresión de la proteína IL-1 $\beta$  en la fracción citosólica de músculo esquelético vastolateral profundo (DVL) en los diferentes grupos experimentales.** Bandas (1) IL-1 $\beta$  17 kDa (2)  $\beta$ -Actina 40kDa. El panel superior muestra Western blots representativos. El panel inferior muestra las variaciones de la proteína IL-1 $\beta$  en los distintos grupos de estudio expresadas como % respecto a su control. Valores medios  $\pm$  E.E.M = 8 ratas.\* Diferencias significativas respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ). # Diferencias significativas respecto al grupo con ejercicio excéntrico agudo ( $p < 0,05$ ).

## **5.- DISCUSIÓN**



### 5.1. Efectos de una sesión de ejercicio excéntrico agudo

El ejercicio físico está implicado en la generación de señales que son importantes en la fisiología de la célula muscular (Goodyear y cols., 1996; Yu y cols., 2003). Reid (2001) demostró que las EROs y el NO son producidos continuamente por el músculo esquelético de sujetos sanos y que estas moléculas modulan procesos como el desarrollo, el metabolismo, el flujo sanguíneo y la función contráctil. En la mayoría de los casos los autores especulan acerca del papel que las ERNs pueden tener como señales mediadoras de la respuesta adaptativa muscular al ejercicio (Jackson, 1999).

No obstante, existen numerosos estudios que consideran al ejercicio físico agudo o de elevada intensidad como una causa importante de daño en el músculo esquelético, específicamente en las fibras musculares. Además, es sabido que el estrés oxidativo y la inflamación juegan un papel muy importante en la progresión del daño en las fibras musculares después del inicio de la agresión mecánica.

La contracción excéntrica promueve, no sólo daño muscular sino también, la producción de EROs, que en combinación con la producción de NO elevada, es capaz de inducir la generación de peroxinitritos. La formación de peroxinitrito promueve, a su vez, el estrés oxidativo y nitrosativo. El metabolismo del NO culmina en la acumulación de nitritos y nitratos, dos derivados relativamente estables y que pueden ser cuantificados en los sistemas biológicos.

En apartados anteriores se ha reseñado la importancia del óxido nítrico en multitud de procesos fisiológicos en los cuales actúa como

vasodilatador, neurotransmisor, antimicrobiano e inmunomodulador. No obstante, el NO, con una misión defensiva y preservadora de la perfusión tisular, al ser liberado en cantidades masivas o crónicamente, actuaría como citotóxico y potenciador de una mala oxigenación de los tejidos (Nussler y Billiar, 1993; Nussler y cols., 1995).

La producción de NO varía en función del tejido estudiado, y también se ve estimulada de forma diferencial dependiendo del protocolo de ejercicio ejecutado. En el presente estudio se puso de manifiesto una elevación significativa de la nitración proteica en el músculo de aquellos animales que fueron sometidos a un ejercicio excéntrico agudo. La acción del PDTC contrarresta significativamente el marcado aumento en la nitración de los residuos de las proteínas celulares en ratas sometidas a un ejercicio excéntrico agudo, lo cual confirmó el papel antioxidante de esta molécula.

El ejercicio físico promueve una gran variedad de acontecimientos fisiológicos que pueden conducir, en última instancia, a la activación del NF- $\kappa$ B. El factor de transcripción NF- $\kappa$ B controla la expresión de un amplio abanico de genes relacionados con inflamación, inmunidad y otros procesos relacionados con el cáncer y la apoptosis (Galter y cols., 1994). NF- $\kappa$ B está compuesto por miembros de la familia Rel. En mamíferos estas proteínas incluyen: (NF- $\kappa$ B1), p65 (RelA), p52 (NF- $\kappa$ B2), RelB, c-Rel, p105, and p100 (Miyamoto y Verma, 1995; Baldwin, 1996). NF- $\kappa$ B se encuentra presente en el citoplasma en un estado inactivo, unido a las proteínas inhibitoras I $\kappa$ B. El factor nuclear puede ser activado por una gran cantidad de estímulos tales como: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ ), interleuquinas IL-1, IL-6 y/o LPS.

El proceso de activación se inicia con la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  (en las Ser-32 y Ser-36) e I $\kappa$ B $\beta$  (en las Ser-19 y Ser-23) por la I $\kappa$ B kinasa (IKK). La fosforilación por IKK, dispone al I $\kappa$ B para la ubiquitinación y posterior degradación proteolítica por el proteasoma 26S (Zamanian-Daryoush y cols., 2000). De esta forma, la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  es el estímulo que facilita la disociación y la traslocación al núcleo del complejo activo de NF- $\kappa$ B (p50/p65), el cual se une a la secuencia de ADN correspondiente de los distintos genes diana, entre los que se incluye la MnSOD, GCS, GPx e iNOS entre muchos otros (Baeuerle y Henkel, 1994).

El papel estimulador de las EROs/ERNs sobre el NF- $\kappa$ B fue confirmado por Zhou y cols. (2001), quienes constataron una mayor activación del mismo en células de músculo esquelético tratadas previamente con agentes prooxidantes como el paraquat y/o el peróxido de hidrógeno (Zhou y cols., 2001). En este mismo estudio también se observó, que la activación afecta a las subunidades p65, p50 y RelB, que serían las principales implicadas en la formación de dímeros activos en el músculo esquelético. La activación del NF- $\kappa$ B en el músculo esquelético en respuesta a diversos estímulos se asocia con el establecimiento y desarrollo de multitud de procesos, tales como la estimulación de la diferenciación celular (Penner y cols., 2001), la proteólisis muscular bajo condiciones de caquexia y sepsis (Hunter y cols., 2002), la atrofia muscular inducida por desuso, la distrofia muscular de Duchenne (Carlson y cols., 2005), etc. La mayor parte de estos procesos implican la activación de la ruta constitutiva del NF- $\kappa$ B, que conlleva la fosforilación y degradación del inhibidor I $\kappa$ B y en la que participa el dímero p50/p65.

Sin embargo, se han descrito rutas alternativas, como aquella en la que desempeña un papel relevante la subunidad p50, el miembro de la familia  $I\kappa B\alpha$ , Bcl3 que implica la activación del  $IKK\alpha$  y otras vías con patrones de activación en los que se observaría una respuesta bifásica y diferenciada en el tiempo del  $NF-\kappa B$  (Hunter y cols., 2002).

Hasta el momento los estudios acerca de la expresión del complejo proteico IKK en el músculo esquelético y su activación (fosforilación) ante circunstancias que implican un grado de estrés oxidativo/nitrosativo, son escasos y muy iniciales. Los resultados obtenidos en el presente trabajo corroboran los datos aportados por Li y cols. en un estudio publicado en 2004, en el que analizan el efecto de un ejercicio agudo en tapiz rodante sobre la ruta de activación del  $NF-\kappa B$  en la porción profunda del músculo vastolateral (DVL) de ratas (Li y cols., 1999). Así, la realización de un ejercicio excéntrico agudo parece activar la vía de señalización de  $NF-\kappa B$ , comprobándose que la activación de  $NF-\kappa B$  está acompañada por una cascada de procesos en el músculo ejercitado, entre los que se incluye:

- a) Incremento en la fosforilación de  $IKK\alpha$  e  $I\kappa B\alpha$ , y
- b) Depleción en los contenidos citosólicos de  $IKK\alpha$  e  $I\kappa B\alpha$

Todo esto corroboró la importancia de la vía de señalización  $NF-\kappa B$  en respuesta a un ejercicio excéntrico agudo.

Estudios previos han demostrado que la señalización del  $NF-\kappa B$  está regulada por elevaciones en el calcio intracelular y EROs, ambas situaciones ocurren como una consecuencia directa de la contracción del músculo esquelético.

La administración de antioxidantes de distintos orígenes, tales como la N-acetil-cisteína (NAC) (Majano y cols., 2004), el diclorometano de origen bacteriano, compuestos fenólicos, flavonoides etc., parece contribuir a la restauración de los valores normales bajo situaciones de estrés oxidativo/nitrosativo. Así multitud de trabajos muestran la acción de estos compuestos disminuyendo la activación de las distintas isoformas de la NOS, proceso que está mediado en la mayoría de los casos por una inhibición del NF- $\kappa$ B.

Fuera del tejido muscular, son muchos los estudios que demuestran como el uso del PDTC, como antioxidante, conduce a la inhibición de algunos factores de transcripción. Togashi y cols. (1997) estudiaron los efectos del PDTC sobre la activación del NF- $\kappa$ B y NO en astrocitos. La inactivación del NF- $\kappa$ B por el PDTC, en tejidos no neuronales, se cree que se debe, o bien a la inhibición de la liberación o a la degradación del I $\kappa$ B, a través de sus propiedades quelantes y antioxidantes de éste.

El PDTC se ha visto que bloquea al NF- $\kappa$ B en un amplio rango de tejidos, tipos celulares y en respuesta a diversos estímulos (Schreck y cols., 1992b).

El presente trabajo ratifica el papel antiinflamatorio y antioxidante atribuido por otros autores al PDTC. Las ratas que habían sido tratadas con PDTC y que habían sido sometidas a un ejercicio agudo excéntrico mostraron una menor activación del NF- $\kappa$ B en el músculo, junto con el correspondiente aumento en los contenidos de I $\kappa$ B $\alpha$  y el descenso en las formas fosforiladas de I $\kappa$ B $\alpha$  e IKK $\alpha$ .

En la mayoría de los casos los autores han especulado acerca del papel que el NO pueden tener como señal mediadora de la respuesta

adaptativa muscular al ejercicio (Jackson, 1999). Así se sabe que durante los procesos de contracción muscular intensos la producción de NO se incrementa de forma significativa. Todos estos datos son indicadores de un hecho indudable como es el que la actividad contráctil promueve cambios drásticos en la situación oxidativa del tejido muscular, con fuertes incrementos en la producción de EROs/ERNs, lo cual desencadena procesos de señalización intracelular que revierten sobre la expresión génica del tejido. Por ello, en las últimas décadas los investigadores se han volcado en el estudio de las posibles vías intracelulares que se ven estimulada por la actividad contráctil en el músculo esquelético.

El aumento significativo del NO fue el resultado de la sobreexpresión de las tres isoformas de la NOS, con su correspondiente aumento en el contenido proteico y en la expresión del ARNm. La práctica de ejercicio agudo excéntrico sobre la actividad y expresión de estas isoformas en el músculo esquelético se ha constatado con la publicación de diversos estudios orientados en esta dirección. Así Roberts y cols. (1999), observaron como un protocolo de ejercicio exhaustivo sobre tapiz rodante indujo, de forma estadísticamente significativa, la actividad de la NOS en el músculo gastrocnemio de las ratas participantes, indicando que ambas isoformas (nNOS y eNOS) aumentan con el ejercicio y que éstas, no sólo se expresan en el músculo constitutivamente, sino que su actividad es inducible cuando la demanda metabólica del músculo aumenta.

El papel que juegan las isoformas de la NOS en el ejercicio ha sido muy estudiado. La discreta localización de la nNOS en el músculo esquelético asociada al complejo distrofina-glicoproteína, forma un puente de unión entre el citoesqueleto y la matriz extracelular. Está

demostrado que esta isoforma juega un papel importante en la regulación de la glucosa, la actividad contráctil, y el flujo sanguíneo, sin embargo muy poco se sabe sobre la importancia funcional de la localización de la nNOS en el músculo.

La eNOS se conoce como una enzima esencial para el funcionamiento vascular con una localización específica en la mitocondria del músculo esquelético. La liberación de NO producido por eNOS juega un papel muy importante en la mejora de la regulación del flujo sanguíneo del músculo esquelético interaccionando con otros vasodilatadores. Esta isoforma también está relacionada con la mitocondria en ratones y se correlaciona con la respiración mitocondrial que ocurre en el músculo, y probablemente también participa en la fosforilación oxidativa. Por otra parte, un incremento de la expresión de la eNOS durante el ejercicio es considerado una adaptación importante a la presencia de pulso o el efecto cizalla que ocurre en el endotelio vascular (Grumbach y cols., 2005).

Una vez ya localizadas la nNOS y eNOS en el citoesqueleto y en la mitocondria respectivamente, es lógico pensar que el ejercicio puede promover la regulación de estas dos formas constitutivas a través del estrés mecánico y metabólico. Además Tidball y cols. (1998) encontraron que la nNOS aumentaba con ejercicios de carga, fortaleciendo así la teoría que cambios en el estrés mecánico alteran los niveles de nNOS en el músculo. El trabajo publicado en el 2002 por Momken y cols., estudió el papel de la eNOS utilizando como modelo ratones carentes de este gen. Los autores observaron que la delección de eNOS modula el perfil energético de los músculos con fibras oxidativas, mientras que los perfiles del músculo cardíaco o con fibras glucolíticas, permanece casi inalterado.

La ausencia del gen eNOS induce varias alteraciones anatómicas en los ratones; p.e. los animales presentan una disminución significativa de la longitud de la tibia. Estos resultados coinciden con otros más recientes que demuestran que eNOS está implicada en la regulación local del metabolismo y el crecimiento del hueso al influir en la función de los osteoblastos (Aguirre y cols., 2001) Otro resultado muy interesante obtenido de este mismo trabajo es el descenso marcado en la respiración mitocondrial que ocurre en el músculo. Este efecto, unido al descenso en un 40% en la actividad citrato sintasa, sugiere un descenso de eNOS en la población mitocondrial en los ratones knockout (Momken y cols., 2002).

Otros aspectos más novedosos sobre la localización de NOS indican, tras la realización de estudios inmunohistoquímicos, que estas tres isoformas están coexpresadas en el músculo esquelético humano (Punkt y cols., 2006) y exhiben una expresión muy marcada en las fibras glucolíticas rápidas, mientras que en las fibras oxidativas o glucolíticas existe una menor expresión de NOS, lo que sugiere que el NO puede estar implicado en el metabolismo oxidativo. Un año antes, Buchwalow demostró que estas isoformas también se expresaban en compartimentos intracelulares tales como el retículo sarcoplasmico o la mitocondria de las fibras contráctiles. La localización de NOS en la mitocondria y en las fibras contráctiles enfatiza todavía más el papel del NO en la respiración y sobre la función contráctil del músculo esquelético.

Estudios previos han demostrado que en músculos ejercitados, la regulación transcripcional es crucial para la producción excesiva de NO principalmente por la isoforma de la iNOS (Qi y cols., 2004). La síntesis de NO por parte de la enzima iNOS se ve inducida por multitud de factores

---

externos, como el liposacárido bacteriano, así como por situaciones en las que se da una condición inflamatoria (Nussler y Billiar, 1993). Ya en los primeros estudios y como hemos mencionado con anterioridad, se apunta al músculo como una importante fuente generadora de óxido nítrico (Marechal y Gailly, 1999).

El estudio de la expresión de iNOS en el músculo es relativamente reciente. Esta isoforma parece ejercer, a su vez, una función reguladora sobre el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual constituye una pieza clave en la estimulación de la expresión de la iNOS (Griscavage y cols., 1996). No obstante, los estudios acerca de la expresión de la isoforma de la iNOS en el músculo esquelético son muy controvertidos. Así, mientras ciertos autores postulan una inducción de esta enzima en el músculo esquelético únicamente bajo ciertas condiciones estimuladoras (Thompson y cols., 1996), otros apuntan a una expresión constitutiva de la misma (Gath y cols., 1996). En este sentido se ha demostrado que el músculo, durante el ejercicio, o bajo condiciones de estimulación eléctrica *in vitro*, libera compuestos nitrosilados al medio (Balon y Nadler, 1994; Kobzik y cols., 1994).

Fuera del tejido muscular, tal y como fue publicado por nuestro grupo de investigación, el ejercicio de tipo extenuante ejerce efectos estimuladores sobre la expresión de la iNOS en leucocitos circulantes (Jiménez-Jiménez y cols., 2008). El producto resultante de la acción de la iNOS, el óxido nítrico, ejerce a su vez una función reguladora sobre, el anteriormente citado, factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B, el cual constituye una pieza clave en la estimulación de la expresión de la iNOS (Qi y cols., 2004).

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B controla la regulación de un amplio abanico de genes que mayoritariamente se ha demostrado que son proinflamatorios y están implicados en los procesos de inflamación (Chung y cols., 2005). La activación del NF- $\kappa$ B es responsable de la transcripción de proteínas como iNOS, en cuyo promotor se ha constatado la presencia de secuencias específicas para la unión del NF- $\kappa$ B (Zaragozá y cols., 2005). En este punto resulta interesante citar uno de los trabajos realizados por este grupo en el que demuestran mediante *ChIP assay* la presencia de elementos *cis* reguladores del NF- $\kappa$ B en el promotor de la iNOS, induciendo su expresión.

El presente estudio demuestra, mediante la utilización de la técnica de *ChIP assay*, como tras un ejercicio excéntrico agudo el NF- $\kappa$ B es responsable, al menos en parte, del incremento de expresión de iNOS, ya que se encuentra presente en el promotor del gen. Además, de forma simultánea a la unión de NF- $\kappa$ B en la región promotora del gen, la presencia de la ARN polimerasa II en la zona transcribible parece indicar que esta unión provoca la activación transcripcional del mismo. Esto explicaría el aumento significativo en el contenido de ARNm y proteína. Por todo ello, el NF- $\kappa$ B puede ser un mediador directo de la inducción de la iNOS en el músculo vasto interno profundo y su activación beneficiosa para la adaptación de las células musculares del daño oxidativo estrés e inflamación.

La presente tesis también tuvo como finalidad demostrar no sólo que la práctica de un ejercicio físico excéntrico agudo podía activar la vía de señalización de NF- $\kappa$ B sino también determinar la posible participación de NF- $\kappa$ B en la regulación de las tres isoformas de la NOS en

---

el músculo esquelético de ratas. En este punto es importante destacar que son pocos los trabajos que profundizan en el efecto del ejercicio físico agudo sobre la regulación de las distintas isoformas de la NOS en el músculo. Aunque originalmente se pensó que la nNOS y la eNOS eran unas enzimas que se expresaban constitutivamente, cada vez es más evidente que su expresión puede estar modulada por estímulos químicos y físicos incluso las EROs (Boissel y cols., 1998).

Los datos aquí expuestos aportan información novedosa acerca de la regulación de las mismas, demostrando que el NF- $\kappa$ B interactúa con el promotor de la nNOS y la eNOS en respuesta a un ejercicio agudo excéntrico. Además, eNOS y nNOS responden activamente tras la sesión aguda de ejercicio aumentando su expresión en el músculo esquelético. El incremento en la expresión de ambos genes se tradujo paralelamente en un aumento de la cantidad de proteína. De nuevo, los resultados parecen confirmar que estas dos isoformas no sólo se expresan constitutivamente en el músculo sino que su actividad podría ser inducible cuando aumenta la demanda metabólica en dicho tejido.

La administración de PDTC no sólo inhibió a la iNOS sino que también inhibió parcialmente la unión del factor de transcripción a los promotores de las isoformas nNOS y eNOS y su posterior transcripción génica en respuesta a un ejercicio excéntrico agudo. Estos resultados confirman que el aumento de la expresión de los genes que codifican las isoformas de la NOS y la activación de NF- $\kappa$ B no son fenómenos independientes que se producen de forma simultánea, sino que se demuestra, de forma directa, mediante la técnica de *ChIP assay* que NF- $\kappa$ B está unido al promotor de estos genes y que por tanto podría ser responsable, por lo menos en parte, del incremento de su expresión.

Además, la presencia de la ARN polimerasa II en la zona transcribible simultáneamente a la unión de NF- $\kappa$ B en los genes que se produce en animales que llevaron a cabo un ejercicio excéntrico agudo, parece indicar que esta unión provoca la activación transcripcional de estos tres genes.

En resumen, los resultados expuestos ponen de manifiesto como el estrés nitrosativo generado por el ejercicio excéntrico agudo es capaz de activar la regulación transcripcional de los genes que codifican para las isoformas de la NOS mediante un mecanismo dependiente de NF- $\kappa$ B en el músculo esquelético. Este hecho muestra por primera vez la funcionalidad del sitio de unión de NF- $\kappa$ B, y el potencial papel regulador que éste puede ejercer sobre las tres isoformas de la NOS.

Sin embargo esto no excluye la contribución de otros factores de transcripción activados. En este sentido, otro de los factores de transcripción cuya expresión se ha visto alterada en nuestro modelo de ejercicio excéntrico agudo es el factor de transcripción inducible por hipoxia HIF-1 $\alpha$ .

Aunque son numerosos los estudios donde se demuestra la activación de HIF-1 $\alpha$  en condiciones patológicas (Jung y cols., 2003b), la relevancia fisiológica del sistema HIF-1 no ha sido muy estudiada. En la respuesta muscular al ejercicio existen ciertos cambios que parecen estar mediados por HIF-1 $\alpha$ . Debido a la demanda de oxígeno requerida por el músculo, éste sufre una serie de cambios orientados a aumentar el transporte de oxígeno y mejorar así sus capacidades metabólicas (Russell y cols., 2005). Ameln y cols. demostraron por primera vez, también en 2005, que el ejercicio físico induce la ruta de señalización de HIF en el

músculo esquelético de humanos. En el siguiente año, Lundby y cols. (2006) pusieron de manifiesto que un ejercicio agudo en condiciones de normoxia regula a dicho factor de transcripción y que éste puede ser el responsable de la inducción de la adaptación de ciertos genes. Estos cambios transcripcionales ponen de manifiesto un esfuerzo coordinado del músculo para adaptarse al estrés del ejercicio, otorgando al HIF-1 $\alpha$  un papel importante en la regulación de la función muscular.

La presencia del ARNm y de la proteína de HIF-1 en el músculo de animales está ampliamente estudiado (Stroka y cols., 2001). Sin embargo, aunque la función del HIF-1 en un músculo no entrenado y durante una sesión de ejercicio excéntrico agudo ha sido estudiada, aun no se ha llegado a comprender del todo. Un músculo no entrenado y en reposo tiene la proteína HIF-1 $\alpha$  estabilizada, lo que sugiere que HIF-1 posee un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis muscular. Esta hipótesis fue fuertemente apoyada por el grupo de Ameln y cols., en 2005 quienes mostraron como un ejercicio agudo aumentaba la estabilización de la proteína HIF-1 $\alpha$ , incrementando así la expresión de HIF y sus genes dianas en respuesta al ejercicio.

El mayor desencadenante de la acumulación de HIF es la hipoxia. En condiciones de normoxia HIF-1 $\alpha$  es rápidamente ubiquitinado y degradado por el proteosoma (Jewell cols., 2001). No obstante, en ausencia de oxígeno HIF-1 $\alpha$  es estabilizado y se acumula en el núcleo. Por lo tanto, en ejercicio la explicación más sencilla de por qué HIF-1 está inducido, sería que en el tejido hubiera condiciones de hipoxia. Curiosamente un trabajo llevado a cabo por el grupo de Honing y cols. a principio de los 90 sugirió que la distribución de oxígeno en el músculo podía ser más uniforme con el ejercicio que en reposo incrementando así

el flujo a las zonas menos oxigenadas protegiéndose así al tejido de la hipoxia (Honig y cols., 1991).

El trabajo llevado a cabo por Lundby y cols. (2006) puso de manifiesto como el aumento de HIF-1 $\alpha$  no parece depender de que exista hipoxia en el tejido. De hecho, la inducción de HIF-1 $\alpha$  ocurrió varias horas después de haber efectuado el ejercicio, cuando está asumido que ya no existe hipoxia en el músculo. De alguna manera HIF-1 ya no es afectado por la hipoxia, lo cual significaría que el dicho factor de transcripción y los mecanismos que lo regulan se adaptan y se hacen tolerantes a la misma. Por tanto, existen otros mecanismos distintos que explican que el ejercicio induzca un aumento de HIF-1 $\alpha$ . Los radicales libres son mediadores de adaptaciones celulares (Jackson y cols., 2007) y cabe recordar que han sido sugeridos como mediadores de las respuestas de hipoxia. El óxido nítrico puede aumentar la expresión de HIF-1, de modo que ésta podría ser una vía de comunicación, en el músculo, entre la hipoxia, los radicales libres y el factor.

Las ERNs juegan un papel muy significativo en los procesos biológicos, incluyendo la señalización de vías de determinados factores de transcripción como el HIF-1 $\alpha$ . Tradicionalmente las ERO/ERNs han recibido gran atención ya que han sido considerados deletéreas. Sin embargo, en la actualidad se sabe que pueden ser producidas de manera controlada en respuesta a la hipoxia y activar genes inducibles por la hipoxia mediante la estabilización de HIF-1 $\alpha$ . Teniendo en cuenta que el ejercicio de moderado a intenso, realizado en condiciones de normoxia ambiental, disminuye significativamente la pO<sub>2</sub> intracelular muscular, se ha planteado que las ERNs pueden en realidad estar mediando las respuestas adaptativas al ejercicio (Urbina-Pinilla, 2008).

En el presente trabajo se ha estudiado la activación de este factor de transcripción en el músculo esquelético de rata tras una sesión de ejercicio excéntrico agudo. Se pudo observar que HIF-1 $\alpha$  está activado en condiciones de normoxia con un ejercicio excéntrico agudo, sugiriendo así que el ejercicio, por si solo, puede provocar la regulación de HIF-1 en el músculo esquelético. El PDTC, inhibidor selectivo del NF- $\kappa$ B también bloqueó parcialmente al HIF-1 $\alpha$ , posiblemente debido a la naturaleza antioxidante de dicha molécula (Figueroa y cols., 2002).

HIF-1 también juega un papel destacado en la respuesta inflamatoria. El NO se comporta como un regulador positivo en la función muscular durante el ejercicio, pero la activación de la isoformas de la NOS pueden producir grandes cantidades de NO capaces de estimular el proceso inflamatorio.

En esta Tesis Doctoral se ha investigado el papel que tiene HIF 1 en la regulación de las isoformas de la NOS en el músculo esquelético de ratas, después de un ejercicio excéntrico agudo. Por primera vez se ha demostrado que HIF-1 $\alpha$  está unido, de manera directa, al promotor de éstas, eNOS, iNOS y nNOS, regulando la expresión de las tres isoformas de la óxido nítrico sintasa. Además la presencia de la polimerasa II en la zona transcribible simultáneamente a la unión de HIF-1 $\alpha$  en los tres genes de las ratas que fueron sometidas a una sesión de ejercicio excéntrico agudo, parece indicar que esta unión provoca la activación transcripcional de las isoformas. Este hecho muestra la funcionalidad del sitio de unión de HIF-1 $\alpha$ , y el papel regulador que éste puede ejercer sobre las isoformas de la NOS. Esta unión disminuyó parcialmente en los animales sometidos a una sesión aguda de ejercicio excéntrico pero tratados con dos dosis de PDTC.

La relación entre la hipoxia y NOS no está muy establecida, aunque posiblemente otros factores tales como la citoquina IL-1 $\beta$  pueden influenciar en la regulación de NOS a través de HIF-1 (Jung y cols., 2000).

Con el fin de dilucidar otras rutas intracelulares que conducen a la activación de la isoforma iNOS en el músculo esquelético se procedió al estudio de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ . Los estudios realizados hasta el momento que tratan de esclarecer las vías intracelulares implicadas en la estimulación de la expresión de la iNOS, apuntan a la participación de diferentes rutas de señalización en función del tipo de agente estimulador y del tipo celular estudiado. La acción de ciertas citoquinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$  o el TNF- $\alpha$ , promueven un incremento en la expresión de la iNOS y una subsiguiente producción masiva de NO en células del músculo liso vascular (Kanno y cols., 1993). Así, la IL-1 $\beta$  desempeña un papel central en el inicio de las reacciones inflamatorias. La investigación llevada a cabo por Adams y cols. (2002) se centró en analizar la influencia de determinadas citoquinas, en sistemas celulares *in vitro*, y en el músculo vastolateral de pacientes con fallo cardiaco crónico. Estos autores observaron que la acción conjunta de estas citoquinas ejerce un estímulo significativo sobre la expresión de la iNOS, estímulo que estaría fuertemente asociado a la previa activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Adams y cols., 2002). En nuestro estudio los contenidos de proteína se ven aumentados debido a la realización de un ejercicio excéntrico agudo. Con objeto de aportar más información sobre el mecanismo molecular implicado y comprobar si existía regulación a nivel transcripcional de esta citoquina se analizó el contenido de ARNm. Los resultados sugieren que, después de un ejercicio

excéntrico agudo se eleva de manera significativa la regulación de la IL-1 $\beta$  a nivel transcripcional.

## **5.2. Efecto de un programa de entrenamiento excéntrico previo a una sesión de ejercicio excéntrico agudo**

Las características particulares que acompañan al ejercicio excéntrico hacen que cada vez sean más los estudios enfocados a la serie de adaptaciones provocadas a largo plazo por dicho tipo de ejercicio. Así, estas adaptaciones supondrían una mayor resistencia al estrés oxidativo/nitrosativo inducido por el ejercicio excéntrico (Radak y cols., 2001). Es por ello que nos planteamos estudiar el efecto que un entrenamiento de 8 semanas tiene sobre la expresión de las isoformas de NOS y la activación del NF- $\kappa$ B.

Tras el programa de entrenamiento pudimos observar una adaptación traducida en una menor activación del NF- $\kappa$ B que la inducida por un ejercicio excéntrico agudo. Además, se observó una ausencia de cambios significativos de los niveles de proteína de I $\kappa$ B, I $\kappa$ B fosforilado, IKK e IKK fosforilado. Al comparar estos resultados con otros que evalúan la adaptación de la vía de señalización del NF- $\kappa$ B tras programas de entrenamiento, encontramos algunos estudios realizados con animales, en los que el ejercicio regular reduce la activación del NF- $\kappa$ B en células hepáticas (Radak y cols., 2004) y musculares (Song y cols., 2006). Otros estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio muestran cómo tras seis semanas de entrenamiento excéntrico específico no se produce una activación del NF- $\kappa$ B en células mononucleares de sangre periférica (García-López y cols., 2007). Los resultados de dicho estudio concuerdan

con otro realizado en personas mayores, en el cual tampoco se observaron cambios en el contenido de I $\kappa$ B fosforilado e I $\kappa$ B, tras un entrenamiento excéntrico de 8 semanas (Jiménez- Jiménez y cols., 2008).

Existen evidencias que el óxido nítrico tiene un importante papel como regulador hemodinámico y metabólico durante la realización de una sesión de ejercicio excéntrico agudo físico. Kingwell (2000) apuntaba que existen adaptaciones en este sistema como resultado del entrenamiento. Hasta la fecha todos los estudios del efecto del entrenamiento en el NO se han orientado sobre la regulación del tono vascular y el flujo sanguíneo, antes que sobre el metabolismo o sobre otros efectos. Estudios realizados en animales han puesto de manifiesto adaptaciones del sistema del NO en músculo esquelético, el cual se ha postulado como precursor de algunos de los beneficios metabólicos del entrenamiento. Por todo ello, no es de extrañar que este sistema se adapte como consecuencia del entrenamiento y que estas adaptaciones puedan contribuir a aumentar las capacidades durante el ejercicio, y reducir la inflamación. La influencia del entrenamiento con respecto a la producción de NO produjo una marcada reducción en la formación de nitrotirosina, indicando que 8 semanas de entrenamiento previnieron la producción de la especies reactivas del nitrógeno, generadas por la actividad de NOS después de un ejercicio excéntrico agudo.

Todos estos datos son indicadores de un hecho indudable como es el que pequeños cambios en la generación de NO pueden promover cambios marcados en la situación oxidativa del tejido muscular, con fuertes incrementos en la producción de ERNs, lo que finalmente desencadena procesos de señalización intracelular que revierten sobre la expresión génica del tejido. En los últimos años los investigadores han

profundizado en el estudio de las posibles vías intracelulares que se estimulan como consecuencia de la actividad muscular, hecho que según Jackson y cols. (2007), está mediada por la acción directa de las ERNs.

Como ya se apuntó anteriormente, no existen muchos estudios donde se halla evaluado la respuesta de las distintas isoformas de la NOS a una sesión aguda de ejercicio excéntrico llevada a cabo tras la realización de un entrenamiento crónico. En el presente estudio los animales que previamente fueron sometidos a un programa de entrenamiento mostraron un descenso significativo tanto en la expresión de ARNm, como en los contenidos proteicos de las tres isoformas de la NOS en comparación con el grupo que sólo realizó el protocolo de ejercicio excéntrico agudo. Este resultado coincide, además, con una menor activación de NF- $\kappa$ B, existiendo diferencias significativas con respecto a los valores obtenidos con el ejercicio excéntrico agudo.

El estudio de la expresión génica de las isoformas de la NOS, tanto en su contenido proteico como de ARNm, y la interacción de NF- $\kappa$ B con los promotores de estas tres isoformas, demostró claramente que la expresión de eNOS, iNOS y nNOS, en el músculo esquelético de ratas entrenadas, disminuyó significativamente cuando se compara con el grupo de ejercicio excéntrico agudo. Este resultado se ve reforzado por otros en los cuales se han puesto de manifiesto adaptaciones vasculares, antioxidantes o antiinflamatorias asociadas con el entrenamiento. Este hecho sugiere que la regulación transcripcional de las isoformas de la NOS mediada por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B juega un papel muy importante en las adaptaciones inducidas por el entrenamiento.

Por todo ello, el NF- $\kappa$ B se postula como un mecanismo de regulación que gobierna, no solo las respuestas a una sesión de ejercicio excéntrico agudo sino, otros importantes procesos biológicos en el músculo esquelético tales como la adaptación al ejercicio.

El ejercicio regular induce una serie de respuestas adaptativas que aumentan las capacidades oxidativas y metabólicas en el músculo (Gavin y cols., 2000). El músculo esquelético posee una habilidad para aclimatarse a un esfuerzo repetido, esta habilidad permite que esté mejor preparado para el ejercicio, cosa que el músculo consigue rápidamente. Existen multitud de estudios, llevados a cabo en animales y humanos entrenados, cuyo objetivo es comprender mejor el mecanismo de la adaptación muscular al ejercicio. El resultado final de un entrenamiento es que el músculo ha mejorado notablemente el reparto y la utilización del oxígeno disponible, lo que conduce a un aumento en el rendimiento y resistencia del mismo. Dado que el oxígeno es importante en estos cambios, es probable que HIF-1 esté fuertemente implicado en ayudar al músculo a que se aclimate a un ejercicio repetido. En general, el fin del aumento de HIF es aumentar el transporte de oxígeno y el metabolismo celular, hecho éste que se ha demostrado que ocurre con el entrenamiento (Mason y Jonson, 2007).

Existen estudios previos que han analizado la relación entre HIF-1 $\alpha$  y el entrenamiento (Vogt y cols., 2001; Ookawara y cols., 2002). La investigación realizada por Lundby y cols. en 2006 demostró que la inducción del ARNm de HIF-1 $\alpha$  estaba notablemente reducida en el músculo esquelético de sujetos que habían sido sometidos a un entrenamiento. Este estudio coincide con nuestros resultados donde podemos observar una adaptación traducida en una menor activación del

HIF-1 $\alpha$  tras el programa de entrenamiento. La actividad de HIF-1 $\alpha$  aumentó con un ejercicio excéntrico agudo, pero esta respuesta disminuyó después de 8 semanas de entrenamiento excéntrico. Este resultado indica que la activación de HIF-1 es mayor tras la realización de un ejercicio agudo y es por ello que puede ser considerado como un importante factor de transcripción implicado en la respuesta adaptativa al entrenamiento.

Al observar los datos obtenidos tras un entrenamiento de 8 semanas podemos comprobar un descenso significativo en la cantidad de la proteína de nNOS, iNOS, eNOS, lo que coincide con una menor activación de HIF-1 $\alpha$ . Dicha disminución se puede observar también en la unión del HIF-1 $\alpha$  a los promotores de las tres isoformas de la NOS como se demuestra mediante la técnica de CHIP assay.

Al igual que ocurre con el NF- $\kappa$ B, existen estudios previos que aseguran que la actividad de HIF-1 puede estar regulada por el óxido nítrico, la IL-1 $\beta$ , el factor de crecimiento de la insulina, la insulina, el factor de crecimiento epidérmico y/o el TNF- $\alpha$  (Sandau y cols., 2001). Por ello, se analizó si un entrenamiento de 8 semanas podía prevenir los efectos nocivos de una sesión de ejercicio agudo sobre las cascadas de señalización relacionadas con la inflamación. La expresión de la interleuquina IL-1 $\beta$ , conocida inductora del NF- $\kappa$ B, disminuyó de manera significativa tanto los contenidos de ARNm como los de proteína, en comparación con el ejercicio excéntrico agudo. Esta reducción de los factores locales de inflamación está asociada con la reducción de la expresión de las isoformas de la NOS y de óxido nítrico intracelular (Gielen y cols., 2003).



## **6.- CONCLUSIONES**



**CONCLUSIÓN PRIMERA:**

El protocolo de ejercicio excéntrico agudo utilizado provoca una inducción de la nitración proteica como consecuencia de la generación de peroxinitritos. El entrenamiento y el tratamiento con PDTC previenen parcialmente los incrementos en la nitración proteica producidos por el protocolo agudo en el músculo vastolateral profundo, lo que confirma que tanto la administración de antioxidantes como el entrenamiento crónico inducen adaptaciones que atenúan el estrés oxidativo/nitrosativo.

**CONCLUSIÓN SEGUNDA:**

El ejercicio excéntrico agudo induce, en el músculo esquelético de ratas, un incremento en la transactivación del factor nuclear NF- $\kappa$ B, acompañado de un incremento en la expresión del I $\kappa$ B $\alpha$ -fosforilado y de la forma fosforilada de la I $\kappa$ B kinasa  $\alpha$ , lo que indica la importancia de la ruta de señalización del NF- $\kappa$ B en la respuesta al ejercicio excéntrico. La administración de PDTC reduce el efecto estimulador que el ejercicio agudo ejerce sobre la ruta de activación del NF- $\kappa$ B, como se evidencia por las variaciones observadas en la expresión de las proteínas de dicha ruta. Este incremento en la activación de NF- $\kappa$ B y los cambios detectados en su ruta también se atenúan significativamente tras un periodo de entrenamiento.

### **CONCLUSIÓN TERCERA:**

La activación de NF- $\kappa$ B se correlaciona con un aumento en la expresión de las isoformas de NOS, con incrementos tanto en los contenidos del ARNm como en la concentración de proteína. Dichas alteraciones se atenúan significativamente por el tratamiento con PDTC y tras un entrenamiento excéntrico de 8 semanas de duración. Por tanto, NF- $\kappa$ B parece ser un mecanismo molecular clave para la inducción del ARNm de las diferentes isoformas de NOS en el músculo esquelético, y su activación puede considerarse como un mediador beneficioso de las adaptaciones inducidas por el ejercicio sobre el estrés celular y la inflamación.

### **CONCLUSIÓN CUARTA:**

La activación del NF- $\kappa$ B en el músculo de los animales sometidos a un ejercicio excéntrico agudo va acompañada de la unión del factor de transcripción a los promotores de los genes nNOS, iNOS, eNOS, como se ha demostrado mediante la técnica de *ChIP assay*. La unión de este factor a los promotores disminuye considerablemente en los animales tratados con PDTC o que siguen un programa de entrenamiento. Los datos obtenidos indican que en el músculo de los animales sometidos a un ejercicio excéntrico agudo el NF- $\kappa$ B ejerce un control transcripcional sobre los genes nNOS, iNOS y eNOS, como demuestra la presencia de la ARN polimerasa II en la zona transcribible de los genes que codifican para estas tres isoformas.

**CONCLUSIÓN QUINTA:**

El factor de transcripción inducible por la hipoxia, HIF-1 $\alpha$ , también se encuentra activado tras la realización de un ejercicio agudo excéntrico, siendo esta activación considerablemente menor en los animales previamente tratados con PDTC o en los entrenados. Mediante el ensayo de inmunoprecipitación de cromatina se demuestra el papel ejercido por HIF-1 $\alpha$  sobre el control transcripcional de las tres isoformas de NOS. Por todo ello, los efectos del ejercicio excéntrico sobre la expresión génica de las diferentes isoformas de NOS podrían ser explicados por la activación de, al menos, estos dos factores de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B y HIF-1 $\alpha$ .

**CONCLUSIÓN SEXTA:**

La administración del antioxidante PDTC contrarrestó significativamente el incremento en la expresión de otros genes antiinflamatorios tales como la IL-1 $\beta$  tras una sesión de ejercicio agudo. El entrenamiento excéntrico de 8 semanas también constituye un estímulo suficiente para disminuir de forma significativa la expresión de dicha interleuquina y, por consiguiente, la respuesta inflamatoria asociada con el ejercicio excéntrico agudo.



## **7.- BIBLIOGRAFÍA**



**Acker H.** The oxygen sensing signal cascade under the influence of reactive oxygen species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2005; 360: 2201-2210.

**Adams V., Nehrhoff B., Späte U., Linke A., Schulze P., Baur A., Gielen S., Hambrecht R., Schuler G.** Induction of iNOS expression in skeletal muscle by IL-1 $\beta$  and NF- $\kappa$ B activation: and in vitro and in vivo study. *Cardiovasc.* 2002; 54: 95-104.

**Aguirre J., Buttery L., O'Shaughnessy M., Afzal F., Fernandez de Marticorena I., Mika Hukkanen M., Huang P., MacIntyre I., Polak J.** Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstrate marked retardation in postnatal bone formation, reduced bone volume, and defects in osteoblast maturation and activity. *Am. J. Path.* 2001; 158: 247-257.

**Akimoto T., Furudate M., Saitoh M., Sugiura K., Waku T., Akama T., Konol.** Increased plasma concentrations of intracellular adhesion molecule-1 after strenuous exercise associated with muscle damage. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2002; 86: 185-190.

**Albina J.E., Mastrofrancesco B., Vessella J. A., Louis C. A., Henry W. L. Jr., Reichner J. S.** HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1 $\alpha$  induction in primary inflammatory cells by TNF- $\alpha$ . *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2000; 281: 1971-1977.

**Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.E.,** Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 2001; 357: 593-615.

**Allen D.G.** Eccentric muscle damage: mechanisms of early reduction of force. *Acta Physiol. Scand.* 2001; 171: 311-319.

**Ameln H., Gustafsson T., Sundberg C.J., Okamoto K., Jansson E., Poellinger L., Makino Y.** Physiological activation of hypoxia inducible factor-1 in human skeletal muscle. *FASEB J.* 2005; 19: 1009-1011.

**Armstrong R.B.** Initial events in exercise-induced muscular injury. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1990; 4: 429-435.

**Armstrong R.B., Ogilvie R.W., Schwane J.A.** Eccentric exercise-induced muscle fibre injury to rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 1983; 54: 80-93.

**Armstrong R.B., Warren G.L., Warren J.A.** Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury. *Sports Med.* 1991; 12: 184-207.

**Asakura A., Komaki M., Rudnicki M.** Muscle satellite cells are multipotent stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation* 2001; 68: 245-253.

**Asakura A., Seale P., Giris-Gabardo A., Rudnicki M.A.** Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 2002; 159: 123-134.

**Assreuy J., Cunha F.Q., Liew F.Y., Moncada S.** Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 1993; 108: 833-837.

**Astrand P.** Physical activity and fitness. *Am. J. Clin. Nutr.* 1992; 55: 1231-1236.

**Bachneff S.A.** Regional cerebral blood flow in schizophrenia and the local circuit neurons hypothesis. *Schizophr. Bull.* 1996; 22: 163-182.

**Baeuerle P.A., Henkel T.** Function and activation of NF-Kappa B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12: 141-179.

**Baghdiguian S., Richard I., Martin M., Coopman P., Beckmann J.S., Mangeat P., Lefranc G.** Pathophysiology of limb girdle muscular dystrophy type 2A: hypothesis and new insights into the I kappa B alpha/NF-kappa B survival pathway in skeletal muscle. *J. Mol. Med.* 2001; 79: 254-261.

**Baldwin Jr. A.S.** The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins. New discoveries and insights. *Ann. Rev. Immunol.* 1996; 14: 649-683.

**Balon T.W., Nadler J.L.** Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. *J. Appl. Physiol.* 1994; 77: 2519-2521.

**Barkett M., Gilmore T.D.** Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18: 6910-6924.

**Bates T.E., Loesch A. Burnstock G., Clark J.B.** Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 218: 40-44.

**Baumann H., Gauldie J.** Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. *Mol. Biol. Med.* 1990; 7: 147-159.

**Beckman J.S.** Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* 1996; 9: 836-844.

**Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A.** Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990; 87: 1620-1624.

**Beg A.A., Sha W.C., Bronson R.T., Ghosh S., Baltimore D.** Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- $\kappa$ B. *Nature* 1995; 376: 167-170.

**Biasucci L.M., Liuzzo G., Fantuzzi G., Caligiuri G., Rebuzzi A.G., Ginnetti F., Dinarello C.A. y Maseri A.** Increasing levels of interleukin (IL)-1Ra and IL-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events. *Circulation* 1999; 99: 2079-2084.

**Blomqvist C.G., Saltin B.** Cardiovascular adaptations to physical training. *Annu. Rev. Physiol.* 1983; 45: 169-189.

**Bochner B.S., Lusinskas F.W., Gimbrone M.A. Jr, Newman W., Sterbinsky S.A., Derse-Anthony C.P., Klunk D., Schleimer R.P.** Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin-1 activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecule. *J. Exp. Med.* 1991; 173: 1553-1557.

**Boissel J.P Schwarz P.M., Förstermann U.** Neuronal-type NO synthase: transcript diversity and expressional regulation. *Nitric Oxide* 1998; 2: 337-349.

**Bolanos J.P., Almeida A.** Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 411: 415-436.

**Borrás E.; Zaragoza R.; Morante M.; García C.; Gimeno A.; López-Rodas G.; Barber T.; Miralles V.J.; Viña J.R.; Torres L.** In vivo studies of altered expression patterns of p53 and proliferative control genes in chronic vitamin A deficiency and hypervitaminosis. *Eur. J. Biochem.* 2003; 270: 1493-1501.

**Bourcier T., Sukhova G., Libby P.** The nuclear factor Kappa B signaling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscles cells *in vitro* and in human atherosclerosis. *J. Bio. Chem.* 1997; 272: 15817-15824.

**Bredt D.S., Glatt C.E, Hwang P.M., Fotuhi M., Dawson T.M., Snyder S.H.** Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* 1991; 7: 615-624.

**Brennan P., O'Neill L.A.** 2-mercaptoethanol restores the ability of nuclear factor kappa B (NF kappa B) to bind DNA in nuclear extracts from interleukin 1-treated cells incubated with pyrrolidone dithiocarbamate (PDTC). Evidence for oxidation of glutathione in the mechanism of inhibition of NF kappa B by PDTC. *Biochem. J.* 1996; 320: 975-981.

**Buchwalow I.B. , Minin E.A., SamoiloVA V.E. , Boecker W., Wellner M., Schmitz W., Neumann J., Punkt K.** Compartmentalization of NO signaling cascade in skeletal muscles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 330: 615-621.

**Calatayud S., Barrachina D., Esplugues J.V.** Nitric oxide: relation to integrity, injury, and healing of the gastric mucosa. *Microsc. Res. Tech.* 2001; 53: 325-335.

**Callapina M., Zhou J., Schmid T., Köhl R., Brüne B.** NO restores HIF-1alpha hydroxylation during hypoxia: role of reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 2005; 39: 925-936.

**Cannon J.G., St Pierre B.A.** Cytokines in exertion-induced skeletal muscle injury. *Mol. Cell Biochem.* 1998; 179: 159-167.

**Carlson C.G., Samandi A., Siegel A.** Chronic treatment with agents that stabilize cytosolic I $\kappa$ B- $\alpha$  enhances survival and improves resting membrane potential in MDX muscle fibers subjected to chronic passive stretch. *Neurobiol. Dis.* 2005; 20: 719-730.

**Chaubourt E., Voisin V., Fossier P., Baux G., Israël M., De La Porte S.** Muscular nitric oxide synthase (muNOS) and utrophin. *J. Physiol.* 2002; 96: 43-52.

**Chen F., Castranova V., Shi X., Demers L.M.** New insights into the role of nuclear factor- $\kappa$ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin. Chem.* 1999; 45: 7-17.

**Chung F., Jung K.J., Yu B.P.** Molecular inflammation as an underlying mechanism of aging: The anti-inflammatory action of calorie restriction. En: Oxidative stress, Inflammation and Health. Surh Y.J., Packer L. Boca Ratón. Ed: *Marcel Dekker*. 2005; 387-419.

**Clementi E., Brown G.C., Foxwell N., Moncada S.** On the mechanism by which vascular endothelial cells regulate their oxygen consumption. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999; 96: 1559-1562.

**Coleman J.W.** Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int. Immunopharmacol.* 2001; 1: 1397-1406.

**Cramer T., Yamanishi Y., Clausen B. E., Forster I., Pawlinski R., Mackman N., Haase V. H., Jaenisch R., Corr M., Nizet V.** HIF-1 $\alpha$  is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 2003; 112: 645-657.

**Cuevas M.J., Almar M., García-Glez J.C., García López D., De Paz J.A., Alvear-Ordenes I., González-Gallego J.** Changes in oxidative stress markers and NF-Kappa B activation induced by sprint exercise. *Free Radic. Res.* 2005; 39: 431-439.

**Cunha F.Q., Moncada S., Liew F.Y.** Interleukin 10 inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon- $\gamma$  in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 186: 1155-1159.

**Davis M.E., Grumbach I.M., Fukai T., Cutchins A., Harrison D.G.** Shear stress regulates endothelial nitric-oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappaB binding. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 163-168.

**De Waal Malefyt R., Haanen J., Spits H., Roncarolo M.G., Te Velde A., Figdor C., Johnson K., Kastelein R., Yssel H., de Vries J.E.** Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigenic-specific human T cell proliferation by diminishing the antigenic-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J. Exp. Med.* 1991; 174: 915-924.

**Deudero J.J., Caramelo C., Castellanos M.C., Neria F., Fernández-Sánchez R., Calabia O., Peñate S., González-Pacheco F.R.** Induction of hypoxia-inducible factor 1alpha gene expression by vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 11435-11444.

**Dimmeler S., Fleming I., Fisslthaler B., Hermann C., Busse R., Zeiher A.M.** Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; 399: 601-605.

**Ding A., Nathan C.F., Grayca J., Derynck R., Stuehr D.J. y Srimal S.** Macrophage deactivating factor and transforming growth factor- $\beta$ 1 and  $\beta$ 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by INF- $\gamma$ . *J. Immunol.* 1990; 145: 940-944.

**El-Dwairi Q., Comtois A., Guo Y., Hussain S.N.** Endotoxin-induced skeletal muscle contractile dysfunction: contribution of nitric oxide synthases. *Am. J. Physiol.* 1998; 274: 770-779.

**Farrar M.A., Schreiber R.D.** The molecular biology of the interferon-gamma and its receptor. *Ann. Rev. Immunol.* 1993; 11: 571-611.

**Feldser D., Agani F., Iyer N.V., Pak B., Ferreira G., Semenza G.L.** Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res.* 1999; 59: 3915-3918.

**Figueroa Y.G., Chan A.K., Ibrahim R., Tang Y., Burow M.E., Alam J., Scandurro A.B., Beckman B.S.** NF-kappaB plays a key role in hypoxia-inducible factor-1-regulated erythropoietin gene expression. *Exp. Hematol.* 2002; 30: 1419-1427.

**Filonzi E.L., Zoellner H., Stanton H., Hamilton J.A.** Cytokine regulation of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and macrophage colony stimulating factor production in human arterial smooth muscle. *Atherosclerosis* 1993; 99: 241-252.

**Förstermann U., Boissel J.P., Kleinert H.** Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J.* 1998; 12: 773-790.

**Franchimont N., Canalis E.** Platelet derived growth factor stimulates the synthesis of interleukin-6 in cells of the osteoblast lineage. *Endocrinology* 1995; 136: 5469-5475.

**French J.F., Lambert L.E., Dage R.C.** Nitric oxide synthase inhibitors inhibit interleukin-1 beta-induced depression of vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991; 259: 260-264.

**Fukai T., Siegfried M.R., Ushio-Fukai M., Cheng Y., Kojda G., Harrison D.G.** Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J. Clin. Invest.* 2000; 105: 1631-1639.

**Galter D., Mihm S., Droge W.** Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factor kappa B and the activator protein-1. *Eur. J. Biochem.* 1994; 221: 639-648.

**García-López D., De Paz J.A., Jiménez-Jiménez R., Bresciani G., De Souza-Teixeira F., Herrero J.A., Alvear-Órdenes I., González Gallego J.** Early explosive force reduction associated with exercise-induced muscle damage. *J. Physiol. Biochem.* 2006; 62: 163-169.

**García-López D., Cuevas M.J. Almar M. Lima E., De Paz J.A., González-Gallego J.** Effects of eccentric exercise on NF-kappa activation in blood mononuclear cells. *Med. Sci.Sports Exerc.* 2007; 39: 653-644.

**Garcia-Moll X., Kaski J.C.** Ischaemic Heart Disease: inflammation markers and cardiovascular risk. *Rev. Esp. Cardiol.* 1999; 52: 990-1003.

**Gaston B.** Nitric oxide and thiol groups. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1411: 323-333.

**Gath I., Closs E.I., Godtel-Ambrust U., Schmitt S., Nakane M., Wessler I., Forstermann U.** Inducible NO synthase II and neuronal NO synthase I are constitutively expressed in different structures of guinea pig skeletal muscle: Implications for contractile function. *FASEB. J.* 1996; 10: 1614-1620.

**Gavin T.P., Spector D.A., Wagner H., Breen E.C., Wagner P.D.** Nitric oxide synthase inhibition attenuates the skeletal muscle VEGF mRNA response to exercise. *J. Appl. Physiol.* 2000; 88: 1192-1198.

**Gielen S., Adams V., Möbius-Winkler S., Linke A., Erbs S., Yu J., Kempf W., Schubert A., Schuler G., Hambrecht R.** Anti-inflammatory effects of exercise training in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 42: 861-868.

**Goodyear L.J., Chang P.Y. Sherwood D.J., Dufresne S.D., Moller D.E.** Effects of exercise and insulin on mitogen-activated protein kinase signaling pathways in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 1996; 271: 403-408.

**Gorbunov N.V., Osipov A.N., Day B.W., Zayas-Rivera B., Kagan V.E., Elsayed N.M.** Reduction of ferrylmyoglobin and ferrylmyoglobin by nitric oxide: a protective mechanism against ferryl hemoprotein-induced oxidations. *Biochemistry* 1995; 34: 6689-6699.

**Gorlach A., Diebold I., Schini-Kerth V.B., Berchner-Pfannschmidt U., Roth U., Brandes R.P., Kietzmann T., Busse R.** Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling

pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22 (phox)-containing NADPH oxidase. *Circ. Res.* 2001; 89: 47-54.

**Grange R.W., Meeson A., Chin E., Lau K.S., Stull J.T., Shelton J.M., Williams R.S., Garry D.J.** Functional and molecular adaptations in skeletal muscle of myoglobin-mutant mice *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001; 281: 1487-1494.

**Greenwald R.A.** Oxygen radicals, inflammation and arthritis: pathophysiological considerations and implications for treatment. *Semin. Arthritis Rheum.* 1991; 20: 219-240.

**Griscavage J.M., Wilk S., Ignarro L.J.** Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 1996; 93: 3308-3312.

**Grounds M.D., White J.D., Rosenthal N., Bogoyevitch M.A.** The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. *J. Histochem. Cytochem.* 2002; 50: 589-610.

**Grozdanic Z., Baumgarten H.G.** Nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: a signaling component of the dystrophin-glycoprotein complex. *Histol. Histopathol.* 1999; 14: 243-256.

**Grumbach I.M., Chen W., Mertens S.A., Harrison D.G.** A negative feedback mechanism involving nitric oxide and nuclear factor kappa-B modulates endothelial nitric oxide synthase transcription. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2005; 39: 595-603.

**Guo Z., Boekhoudt G.H., Boss J.M.** Role of the intronic enhancer in tumor necrosis factor-mediated induction of manganous superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 23570-23578.

**Gustafsson, T., Kraus, W. E.** Exercise-induced angiogenesis-related growth and transcription factors in skeletal muscle, and their modification in muscle pathology. *Front. Biosci.* 2001; 75-89.

**Harrison D.G., Widder J., Grumbach I., Chen W., Weber M., Searles C.** Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J. Int. Med.* 2006; 259: 351-363.

**Hawrylowicz C.M., Santoro S.A., Platt F.M., Unanue E.R.** Activated platelets express IL-1 activity. *J. Immunol.* 1989; 143: 4015-4018.

**Hellwig-Burgel T., Rutkowski K., Metzen E., Fandrey J., Jelkmann, W.** Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 1999; 94: 1561-1567.

**Hibbs J.B. Jr.** Infection and nitric oxide. *J. Infect. Dis.* 2002; 15: 9-17.

**Hibbs J.B.Jr., Taintor R.R., Vavrin Z., Rachlin E.M.** Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Bioch. Bioph. Res. Commun.* 1988; 157: 87-94.

**Hirose L., Nosakan K., Newton M., Laveder A., Kano M., Peake J., Suzuki K.** Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the elbow flexors. *Exerc. Immunol. Rev.* 2004; 10: 75-90.

**Hoffman E.C., Reyes H., Chu F.F., Sander F., Conley L.H., Brooks B.A., Hankinson O.** Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 1991; 252: 954-958.

**Honig C.R., Gayeski T.E., Clark A. Jr., Clark P.A.** Arteriovenous oxygen diffusion shunt is negligible in resting and working gracilis muscles. *Am. J. Physiol.* 1991; 261: 2031-2043.

**Huang L.E., Gu J., Schau M., Bunn H.F.** Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 7987-7992.

**Hudlicka O., Brown M., Egginton S.** Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol. Rev.* 1992; 72: 369-417.

**Hunter R.B., Stevenson E.J., Koncarevic A., Mitchell-Felton H., Essig D.A., Kandarian S.C.** Activation of an alternative NF- $\kappa$ B pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *FASEB J.* 2002; 16: 529-538.

**Husain K., Hazelrigg S.R.** Oxidative injury due to chronic nitric oxide synthase inhibition in rat: effect of regular exercise on the heart. *Biochim. Biophys. Acta* 2002; 1587: 75-82.

**Ishropoulos H., Zhu L., Chen J., Tsai M., Marin J.C., Smith C.D., Beckman J.S.** Peroxynitrite mediated tyrosine nitration catalysed by superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992; 298: 431-437.

**Israel A.** The IKK complex, an integrator of all signals that activate NF- $\kappa$ B? *Trends Cell Biol.* 2000; 10: 129-133.

**Jaakkola P., Mole D.R., Tian Y.M., Wilson M.I., Gielbert J., Gaskell S.J., Kriegsheim A., Hestreit H.F., Mukherji M., Schofield C.J., Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J.** Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; 292: 468-472.

**Jackson M.J.** Free radicals in skin and muscle: damaging agents or signals for adaptation? *Proc. Nutr. Soc.* 1999; 58: 673-676.

**Jackson M.J., Pye D., Palomero J.** The production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 2007; 102: 1664-1670.

**Jackson M.J.** Redox regulation of skeletal muscle. *IUBMB Life* 2008; 60: 497-501.

**Jewell U.R., Kvietikova I., Scheid A., Bauer C., Wenger R.H., Gassmann M.** Induction of HIF-1 $\alpha$  in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J.* 2001; 15: 1312-1314.

**Ji L.L., Gómez-Cabrera M.C., Steinhafel N., Viña J.** Acute exercise activates nuclear factor (NF)- $\kappa$ B signaling pathway in rat skeletal muscle. *FASEB J.* 2004; 18: 1499-1506.

**Jiang B.H., Zheng J.Z., Leung S.W.** Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J.Biol. Chem.* 1997; 272: 19253-19260.

**Jiménez-Jiménez R., Cuevas M.J, Almar M., Lima E., García-López D., De Paz J.A., González-Gallego J.** Eccentric training impairs NF-kappaB activation and over-expression of inflammation-related genes induced by acute eccentric exercise in the elderly. *Mech. Ageing Dev.* 2008; 129: 313-321.

**Jung F., Palmer L.A., Zhou N., Johns R.A.** Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 2000; 86: 319-325.

**Jung Y., Isaacs J.S., Lee S., Trepel J., Liu Z.G., Neckers L.** Hypoxia inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptorinteracting protein-dependent nuclear factor kappaB activation. *Biochem. J.* 2003; 370: 1011-1017.

**Jung Y.J., Isaacs J.S., Lee S., Trepel J., Neckers L.** IL-1 $\beta$ -mediated up-regulation of HIF-1 $\alpha$  via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J.* 2003; 17: 2115-2117.

**Kamata H., Hirata H.** Redox regulation of cellular signalling. *Cell. Signal.* 1999; 11: 1-14.

**Kamijo R., Harada H., Matsuyama T., Bosland M., Gercitano J., Shapiro D., Le J., Koh S.I., Kimura T., Green S.J.** Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* 1994; 263: 1612-1615.

**Kanner J., Harel S., Granit R.** Nitric oxide as an antioxidant. *Arch. Biochem. Biophys.* 1991; 289: 130-136.

**Kanno K., Hirata Y., Imai T., Marumo F.** Induction of nitric oxide synthase gene by interleukin in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1993; 22: 34-39.

**Karin M., Ben-Neriah Y.** Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 2000; 18: 621-663.

**Karin M., Cao Y., Greten F.R., Li Z.W.** NF- $\kappa$ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2: 301-310.

**Katschinski D.M., Le L., Heinrich D., Wagner K.F., Hofer T., Schindler S.G., H. Wenger R.H.** Heat induction of the unphosphorylated form of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is dependent on heat shock protein-90 activity. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 9262-9267.

**Kingwell B.A.** Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. *FASEB J.* 2000; 14: 1685-1696.

**Kobzik L., Reid M.B., Brecht D.S., Stamler J.S.** Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 1994; 372: 546-548.

**Kojima H., Gu H., Nomura S., Caldwell C. C., Kobata T., Carmeliet P., Semenza G. L., Sitkovsky M.V.** Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ -deficient chimeric mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99: 2170-2174.

**Kubes P.** Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. *Gut* 2000; 47: 6-9.

**Kucharczak J., Simmons M.J., Fan Y., Gelinas C.** To be, or not to be: NF- $\kappa$ B is the answer role of Rel/ NF- $\kappa$ B in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 2004; 23: 8961-8982.

**Kurt-Jones E.A., Beller D.I., Mizel S.B., Unanue E.R.** Identification of a membrane-associated interleukin-1 in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995; 82: 1204-1208.

**Kwon H., Wu G., Meininger C.J., Bazer F.W., Spencer T.E.** Developmental changes in nitric oxide synthesis in the ovine placenta. *Biol. Reprod.* 2004; 70: 679-686.

**Laemmli U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

**Lamas S., Marsden P.A. Li G.K., Tempst P., Michel T.** Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992; 89: 6348-6352.

**Lando D., Peet D.J., Whelan D.A., Gorman J.J., Whitelaw M.L.** Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 2002; 295: 858-861.

**Laughner E., Taghavi P., Chiles K., Mahon P.C., Semenza G.L.** HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol. Cell Biol.* 2001; 21: 3995-4004.

**Lee J., Clarkson P.M.** Plasma creatine kinase activity and glutathione after eccentric exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2003; 35; 930-936.

**Li N., Karin M.** Is Nf-kappaB the sensor of oxidative stress? *FASEB J.* 1999; 13: 1137-1143.

**Li Q., Estepa G., Memet S., Israel A., Verma I.M.** Complete lack of NF- $\kappa$ B activity in IKK1 and IKK2 double-deficient mice: additional defect in neurulation. *Genes Dev.* 2000; 14: 1729-1733.

**Li Y.P., Reid M.B.** NF-kappa B mediates the protein loss induced by TNF-alpha in differentiated skeletal muscle myotubes. *Am. J. Physiol.* 2000; 279: 1165-1170.

**Li Z.W., Chu W., Hu Y., Delhase M., Deerinck T., Ellisman M., Johnson R., Karin M.** The IKK $\beta$  subunit of I $\kappa$ B kinase (IKK) is essential for nuclear factor  $\kappa$ B activation and prevention of apoptosis. *J. Exp. Med.* 1999; 189: 1839-1845.

**Liew F.Y., Li Y., Severn A., Millot S., Schmidt H., Salter M., Moncada S.** A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of nitric oxide synthase on macrophages. *Eur. J. Immunol.* 1991; 21: 2489-2494.

**Lindstedt S.L., Lastado P.C., Reich T.E.** When active muscles lengthen: properties and consequences of eccentric contractions. *News Physiol. Sci.* 2001; 16: 256-61

**Livak K.J., Schmittgen T.D.** Análisis of relative gene expresión data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C (T)</sup> method. *Methods* 2001; 25: 402-408.

**Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.

**Lukashev D., Caldwell C., Ohta A., Chen P., Sitkovsky M.** Differential regulation of two alternatively spliced isoforms of hypoxia-inducible factor-1 alpha in activated T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 48754-48763.

**Lundby C., Gassmann M., Pilegaard H.** Regular endurance training reduces the exercise induced HIF-1alpha and HIF-2alpha mRNA expression in human skeletal muscle in normoxic conditions. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2006; 96: 363-369.

**Lyons C.R.** The role of nitric oxide in inflammation. *Adv. Immunol.* 1995; 60: 323-371.

**MacIntyre D.L., Reidw D., Lyster D.M., y McKenize D.C.** Different effects of strenuous eccentric exercise on the accumulation of neutrophils in muscle in women and men. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2000; 81: 47-53.

**Majano P.L., Medina J., Zubía I., Sunyer L., Lara-Pezzi E., Madonado-Rodríguez A., López-Cabrera M., Moreno-Otero R.** N-Acetyl-cysteine modulates inducible nitric oxide synthase gene expresión in human hepatocytes. *J. Hepatol.* 2004; 40: 632-637.

**Malm C., Sjøodin T.L., Sjøberg B., Lenkei R., Renstrom P., Lundberg I.E., Ekblom B.** Leukocytes, cytokines, growth factors and hormones in human skeletal muscle and blood after uphill or downhill running. *J. Physiol.* 2004; 556: 983-1000.

**Marechal G., Gailly P.** Effects of nitric oxide on the contraction of skeletal muscle. *Cell Mol. Life Sci.* 1999; 55:1088-1102.

**Markwell M.A., Haas S.M., Bieber L.L., Tolbert N.E.** A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 1978; 87: 206-210.

**Marshall H.E., Merchant K., Stamler J.S.** Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *FASEB J.* 2000; 14: 1889-1900.

**Mason S., Johanson R.S.** The role of HIF-1 in hypoxic response in the skeletal muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007; 618: 229-244.

**Mayer B., John M., Heinzel B., Werner E.R., Wachter H., Schultz G., Böhme E.** Brain nitric oxide synthase is a biopterin and flavin-containing multifunctional oxidoreductase. *FEBS Lett.* 1991; 288: 187-191.

**McCall T., Vallance P.** Nitric oxide takes centre-stage with newly defined roles. *Trend. Pharmacol. Sci.* 1992; 13: 1-6.

**McLaren A.T., Marsden P.A., Mazer C.D., Baker A.J., Stewart D.J., Tsui A.K., Li X., Yucel Y., Robb M., Boyd S.R., Liu E., Yu J., Hare G.M.** Increased expression of HIF-1 $\alpha$ , nNOS, and VEGF in the cerebral cortex of anemic rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007; 292: 403-414.

**Mecklenburgh K.I., Walmsley S.R., Cowburn A.S., Wiesener M., Reed B.J., Upton P.D., Deighton J., Greening A.P., Chilvers, E.R.** Involvement of a ferroprotein sensor in hypoxia-mediated inhibition of neutrophil apoptosis. *Blood* 2002; 100: 3008-3016.

**Meksawan K., Venkatraman J.T. Awad A.B., Pendergast D.R.** Effect of dietary fat intake and exercise on inflammatory mediators of the immune system in sedentary men and women. *J. Am. Coll. Nutr.* 2004; 23: 331-340.

**Miller M.D., Krangel M.S.** Biology and biochemistry of the chemokines; a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit. Rev. Immunol.* 1992; 12: 17-46.

**Miyagoe-Suzuki Y., Takeda S.I.** Association of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) with  $\alpha$ 1-syntrophin at the sarcolemma. *Microsc. Res. Tech.* 2001; 55: 164-170.

**Miyamoto S., Verma I.M.** Rel/NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B story. *Adv. Cancer Res.* 1995; 66: 255-292.

**Mizel S.B., Honko A.N., Moors M.A., Smith P.S., West A.P.** Induction of macrophage nitric oxide production by Gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric Toll-like receptor 5/Toll-like receptor 4 complexes. *J. Immunol.* 2003; 170: 6217-6223.

**Momken I., Fortin D., Serrurier B., Bigard X., Ventura-Clapier R., Veksler V.** Endothelial nitric oxide synthase (NOS) deficiency affects energy metabolism pattern in murine oxidative skeletal muscle. *Biochem. J.* 2002; 368: 341-347.

**Moncada S., Higgs E.A., Palmer R.M.J.** Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol.* 1991; 43: 109-142.

**Murphy M.P., Packer M.A., Scarlett J.L., Martin S.W.** Peroxynitrite: a biologically significant oxidant. *Gen. Pharmacol.* 1998; 31: 179-186.

**Nakshatri H., Bhat-Nakshatri P., Martin D.A., Goulet R.J. Jr., Sledge G.W. Jr.** Constitutive activation of NF-kappa B during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol. Cell. Biol.* 1997; 17: 3629-3639.

**Neilly P.J., Gardiner K.R., Kirk S.J., Jennings G., Anderson N.H., Elia M., Rowlands B.J.** Endotoxemia and cytokine production in experimental colitis. *Br. J. Surg.* 1995; 82: 1479-1482.

**Ng S.B., Tan Y.H., Guy G.R.** Differential induction of the interleukin-6 gene by tumor necrosis factor and interleukin-1. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 19021-19027.

**Nguyen H.X., Tidball J.G.** Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells in vitro. *J. Physiol.* 2003; 547: 125-132.

**Nguyen T., Brunson D., Crespi C.L. Penman B.W., Wishnok J.S. Tannenbaum S.R.** DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992; 89: 3030-3034.

**Nussler A.K., Billiar T.R.** Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J. Leukoc. Biol.* 1993; 54: 171-178.

**Nussler A.K., Di Silvio M., Liu Z.Z., Geller D.A., Freeswick P., Dorko K., Bartoli F., Billiar TR.** Further characterization and comparison of inducible nitric oxide synthase in mouse, rat and human hepatocytes. *Hepatology* 1995; 21: 1552-1560.

**Ookawara T., Suzuk K., Haga S., Ha S., Chung K.S., Toshinai K., Hamaoka T., Katsumura T., Takemasa T., Mizuno M., Hitomi Y., Kizaki T., Suzuki K., Ohno H.** Transcription regulation of gene expression in human skeletal muscle in response to endurance training. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 2002; 111: 41-54.

**Ostrowski K., Rohde T., Asp S., Schjerling P., Pedersen B.K.** Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J. Physiol.* 1999; 515: 287-291.

**Packer L.** Oxidants, antioxidants nutrients and the athlete. *J. Sports Sci.* 1997; 15: 353-363.

**Pahl H.L.** Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18: 6853-6866.

**Palombella V.J., Rando O.J., Goldberg A.L., Maniatis T.** The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- $\kappa$ B1 precursor protein and the activation of NF- $\kappa$ B. *Cell* 1994; 78: 773-785.

**Paulsen G., Benestad H.B., Strom-Gundersen I., Morkrid L., Lappegard K.T., Raastad T.** Delayed leukocytosis and cytokine response to high-force eccentric exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2005; 37: 1877-1883.

**Peake J., Nosaka K., Suzuki K.** Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exerc. Immunol. Rev.* 2005; 11: 64-85.

**Penner C.G., Gang G., Wray C., Fischer J.E., Hasselgren P.O.** The transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1 are differentially regulated in skeletal muscle during sepsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 281: 1331-1336.

**Peters D.G., Mitchell H.L. McCune S.A., Park S., Williams J.H., Kandarian S.C.** Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca (2+)-ATPase gene expression in congestive heart failure. *Circ. Res.* 1997; 81: 703-710.

**Petersen E.W., Ostrowski K., Ibfelt T., Richelle M., Offord E., Halkjaer-Kristensen J., Pedersen B.K.** Effect of vitamin supplementation on cytokine response and on muscle damage after strenuous exercise. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001; 280: 1570-1575.

**Petrone W.F., English D.K., Wong K., McCord J.M.** Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1980; 77: 1159-1163.

**Pfeilschifter J., Kunz D., Mühl H.** Nitric oxide: an inflammatory mediator of glomerular mesangial cells. *Nephron* 1993; 64: 518-525.

**Pizza F.X., Mitchell J.B., Davis B.H., Starling R.D., Holtz R.W., Bigelow N.** Exercise induced muscle damage: effect on circulating leukocyte and lymphocyte subsets. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1995; 27: 363-370.

**Punkt K., Fritzsche M., Stockmar C., Hepp P., Josten C., Wellner M., Schering S., Buchwalow I.B.** Nitric oxide synthase in human skeletal muscles related to defined fibre types. *Histochem. Cell Biol.* 2006; 125: 567-573.

**Qi W.N., Chaiyakit P., Cai Y., Allen D.M., Chen L.E., Seaber A.V., Urbaniak J.R.** NF- $\kappa$ B p65 involves in reperfusion injury and iNOS gene regulation in skeletal muscle. *Microsurgery* 2004; 24: 316-323.

**Radak Z., Taylor A.W., Ohno H., Goto S.** Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc. Immunol.* 2001; 7: 90-107.

**Radak Z., Chung H.Y., Natio H., Takahashi R., Jung K.J., Kim H.J., Goto S.** Age-associated increase in oxidative stress and nuclear factor kappa B activation are attenuated in rat liver by regular exercise: *FASEB J.* 2004; 18: 749-750.

**Reid M.B.** Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J. Appl. Physiol.* 2001; 90: 724-731.

**Reid M.B., Haack K.E., Franchek K.M., Valberg P.A., Kobzik L., West M.S.** Reactive oxygen in skeletal muscle. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J. Appl. Physiol.* 1992; 73: 1797-1804.

**Roberts C.K., Barnard R.J., Jasman A., Balon T.W.** Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 1999; 277: 390-394.

**Ross R., Reske-Kunz A.B.** The role of NO in contact hypersensitivity. *Int. Immunopharmacol.* 2001; 1: 1469-1478.

**Russell A.P., Hesselink M.K., Lo S.K., Schrauwen P.** Regulation of metabolic transcriptional co-activators and transcription factors with acute exercise. *FASEB J.* 2005; 19: 986-988.

**Saccani S., Pantano S., Natoli G.** Modulation of NF- $\kappa$ B activity by exchange of dimers. *Mol. Cell* 2003; 11: 1563-1574.

**Saenko E.L., Ananyeva N.M., Tuddenham E.G., Kemball-Cook G.** Factor VIII-novel insights into form and function. *Br. J. Haematol.* 2002; 119: 323-331.

**Saklatvala J., Pilsworth L.M., Sarsfield S. J., Gavrilovic J., Heath J.K.** Pig catabolin is a form of interleukin-1. *Biochem.* 1984; 224: 461-466.

**Sanceau J., Kaisho T., Hirano T., Wietzerbin J.** Triggering of the human interleukin-6 gene by interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in monocytic cells involves cooperation between interferon regulatory factor-1, NF- $\kappa$ B, and SP1 transcription factors. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 27920-27931.

**Sandau K.B., Fandrey J., Brune B.** Accumulation of HIF-1 $\alpha$  under the influence of nitric oxide. *Blood* 2001; 97: 1009-1015.

**Sarti P., Avigliano L., Gorlach A., Brune B.** Superoxide and nitric oxide participation in cell communication. *Cell Death Differ.* 2002; 9: 1160-1162.

**Schieffer B., Schieffer E., Hilfiker-Kleiner D., Hilfiker A., Kovanen P.T., Kaartinen M., Nussberger J., Harringer W. Drexler H.** Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques. Potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation* 2000; 101: 1372-1378.

**Schreck R., Albermann K., Baeuerle P.A.** Nuclear factor  $\kappa$ B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells. *Free Radic. Res. Commun.* 1992; 17: 221-237.

**Schreck R., Meier B., Mannel D.N., Droge W., Baeuerle P.A.** Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J. Exp. Med.* 1992; 175: 1181-1194.

**Schreck R., Rieber P., Baeuerle P.A.** Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- $\kappa$ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 1991; 10: 2247-2258.

**Semenza G.L., Nejfelt M.K., Chi S.M., Antonarakis S.E.** Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 5680-5684.

**Sen C.K.** Oxidants and antioxidants in exercise. *J. Appl. Physiol.* 1995; 79: 675-686.

**Sica A., Matsushima K., Van Damme J., Wang J.M., Polentarutti N., Dejana E., Colotta F., Mantovani A.** IL-1 transcriptionally activates the neutrophil chemotactic factor-IL-8 gene in endothelial cells. *Immunology* 1990; 69: 548-553.

**Siebenlist U., Franzoso G., Brown K.** Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1994; 10: 405-455.

**Sironi M., Breviario F., Prozerpio P.** IL-11 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J. Immunol.* 1989; 142: 549-555.

**Song W., Kwak H.B., Lawler J.M.** Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signalling in rat skeletal muscle. *Antioxid. Redox Signal.* 2006; 8: 517-528.

**Spencer V.A., Sun J.M., Li L., Davie J.R.** Chromatin immunoprecipitation; a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods* 2003; 31: 67-75.

**Spinella F., Rosano L., Di Castro V., Natali P.G., Bagnato A.** Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1alpha in ovarian carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 27850-27855.

**Stainsby W.N., Brechue W.F., Ameredes B.T., O'Drobinak D.M.** Fatigue of mammalian skeletal muscle in situ during repetitive contractions. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1991; 69: 226-229.

**Stambler J.S., Meissner G.** Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* 2001; 81: 209-237.

**Stauber W.T.** Eccentric action of muscles: physiology, injury and adaptation. *Exerc. Sport Sci.* 1989; 17:157-185

**Steel J.H., Terenghi G., Chung J.M., Na H.S., Carlton S.M., Polak J.M.** Increased nitric oxide synthase immunoreactivity in rat dorsal root ganglia in a neuropathic pain model. *Neurosci. Lett.* 1994; 169: 81-84.

**Stroka D.M., Burkhardt T., Desbaillets I., Wenger R.H., Neil D.A., Bauer C., Gassmann M., Candinas D.** HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J.* 2001; 15: 2445-2453.

**Stuehr D.J., Nathan C.F.** Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumour target cells. *J. Exp. Med.* 1989; 169: 1543-1555.

**Suzuki K., Nakaji S., Yamada M., Totsuka M., Sato K., Sugawara K.** Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. Cytokine kinetics. *Exerc. Immunol.* 2002; 8: 6-48.

**Tai S.C., Robb G.B., Marsden P.A.** Endothelial nitric oxide synthase: a new paradigm for gene regulation in the injured blood vessel. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24: 405-412.

**Tam W.F., Lee L.H., Davis L., Sen R.** Cytoplasmic sequestration of Rel proteins by I $\kappa$ B $\alpha$  requires CRM1-dependent nuclear export. *Mol. Cell. Biol.* 2000; 20: 2269-2284.

**Tamargo J., Delpon E., Valenzuela C.** Autacoides II. Péptidos: sistema renina-angiotensina-aldosterona. Cininas. Péptido natriurético auricular. Oxido nítrico. En: Velázquez Farmacología. Velasco, Lorenzo, Serrano y Andrés-Trelles. Ed: *Interamericana McGraw-Hill*. 1996; 222-237.

**Tanner J.E., Alfieri C., Chatila T.A., Diaz-Mitoma F.** Induction of interleukin-6 after stimulation of human B-cell CD21 by Epstein Barr virus glycoproteins gp350 and gp220. *J. Virol.* 1996; 70: 570-575.

**Tedgui A., Mallat Z.** Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Cir. Res.* 2001; 88: 877-887.

**Terenzi F., Casado M., Martín-Sanz P., Boscá L.** Epidermal growth factor inhibits cytokine-dependent nitric oxide synthase expression in hepatocytes. *FEBS Lett.* 1995; 386: 193-196.

**Tews D.S., Goebel H.H. Schneider I., Gunkel A., Stennert E., Neiss W.F.** Expression of different isoforms of nitric oxide synthase in experimentally denervated and reinnervated skeletal muscle. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1997; 56: 1283-1289.

**Thompson M., Becker L., Bryant D., Williams G., Levin D., Margraf L., Giroir B.P.** Expression of the inducible nitric oxide synthase gene in diaphragm and skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 1996; 81: 2415-2420.

**Tidball J.G.** Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med. Sci. Sports Exer.* 1995; 27: 1022-1032.

**Tidball J.G., Lavergne E., Lau K.S., Spencer M.J., Stull J.T., Wehling M.** Mechanical loading regulates NOS expression and activity in developing and adult skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 1998; 275: 260-266.

**Toft A.D., Jensen L.B., Bruunsgaard H., Ibfelt T., Halkjaer-Kristensen J., Febbraio M., Pedersen B.K.** Cytokine response to eccentric exercise in young and elderly humans. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2002; 283: 289-295.

**Togashi, H., Sasaki, M., Frohman, E., Taira, E., Ratan, R.R., Dawson, T.M., Dawson, V.L.** Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappaB activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 2676-2680.

**Tous J.** Nuevas tendencias en fuerza y musculación. Barcelona. Ed: *Ergo*. 1999.

**Tracey K.J., Lowry S.F., Fahey T.J., Albert J.D., Fong Y., Hesse D., Beutler B., Manogue K.R., Calvano S., Wei H.** Cachectin/tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone response in the dog. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1987; 164: 415-422.

**Tracey K.J., Vlassara H., Cerami A.** Cachectin/tumor necrosis factor. *Lancet* 1989; 1: 1122-1126.

**Urbina-Pinilla A.P.** Nuevo papel de los radicales libres de oxígeno en el ejercicio: ¿otra paradoja? *Colombia Médica* 2008; 39: 266-275.

**Urso M.L., Clarkson P.M.** Oxidative stress, exercise, and antioxidante supplementation. *Toxicology* 2003; 189: 41-54.

**Vallejo A.F., Schroeder E.T., Zheng L., Jensky N.E., Sattler F.R.** Cardiopulmonary responses to eccentric and concentric resistance exercise in older adults. *Age Ageing* 2006; 35: 291-297.

**Van den Berg R., Haenen G.R., Van den Berg H., Bast A.** Transcription factor NF-κB as a potential biomarker for oxidative stress. *Br. J. Nutr.* 2001; 86: 121-127.

**Vassilakopoulos T., Deckman G., Kebbewar M., Rallis G., Harfouche R., Hussain S.N.** Regulation of nitric oxide production in limb and ventilatory muscles during chronic exercise training. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2002; 284: 452-457.

**Vassilakopoulos T., Karatza M.H., Katsaounou P., Kollintza A., Zakynthinos S., Roussos C.** Antioxidants attenuate the plasma cytokine response to exercise in humans. *J. Appl. Physiol.* 2003; 94: 1025-1032.

**Verma I.M., Stevenson J.K., Schwarz E.M., Van Antwerp D., Miyamoto S.** Rel/NF-kappa B/I kappa B family. Intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* 1995; 9: 2723-2735.

**Vogt M., Puntchart A., Geiser J., Zuleger C., Billeter R., Hoppeler H.** Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. *J. Appl. Physiol.* 2001; 91: 173-182.

**Wang G.L., Semenza G.L.** General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 4304-4308.

**Wang G.L., Semenza G.L.** Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 1230-1237.

**Wang P., Wu P., Siegel M.I., Egan R.W., Billah M.M.** Interleukin (IL)10 inhibits nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) activation in human monocytes: IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 9558-9563.

**Wei X.Q., Charles I.G., Smith A., Ure J., Feng G.J., Huang F.P., Xu D., Muller W., Moncada S., Liew F.Y.** Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 375: 408-411.

**Weinmann, A.S., Farnham, P.J.** Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation. *Methods* 2002; 26: 37-47.

**Wells J., Farnham P.J.** Characterizing transcription factor binding sites using formaldehyde crosslinking and immunoprecipitation. *Methods* 2002; 26: 48-56.

**Wenger R.H.** Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J. Exp. Biol.* 2000; 203: 1253-1263.

**White C.W.** Commentary on Hypoxia, hypoxic signaling, tissue damage, and detection of reactive oxygen species (ROS). *Free Radic. Biol. Med.* 2006; 40: 923-927.

**Whiteside S.T., Israel A.** I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin. Cancer Biol.* 1997; 8: 75-82.

**Wink D.A., Vodovotz Y., Cook J.A., Krishna M.C., Kim S., Coffin D., DeGraff W., Deluca A.M., Liebmann J., Mitchell J.B.** The role of nitric oxide chemistry in cancer treatment. *Biochemistry* 1998; 63: 802-809.

**Yu M., Stepto N.K., Chibalin A.V., Fryer L.G.D., Carling D., Krook A., Hawley J.A., Zierath J.R.** Metabolic and mitogenic signal transduction in human skeletal muscle after intense cycling exercise. *J. Physiol.* 2003; 546: 327-335.

**Yun J.M., Kwon H., Hwang J.K.** *In vitro* anti-inflammatory activity of panduratin A isolated from *Kaempferia pandurata* in RAW264.7 cells. *Planta Med.* 2003; 69: 1102-1108.

**Zamanian-Daryoush M., Mogensen T.H. Di Donato J.A., Williams B.R.** NF-kappaB activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF-kappaB-inducing kinase and I kappa B kinase. *Mol. Cell Biol.* 2000; 20: 1278-1290.

**Zaragozá R., Miralles V.J., Rus A.D., García C., Carmena R., García-Trevijano E.R., Barber T., Pallardó F.V., Torres L., Viña J.R.** Weaning induces NOS-2 expression through NF-kappaB modulation in the lactating mammary gland: importance of GSH. *Biochem. J.* 2005; 391: 581-588.

**Zelzer E., Levy Y., Kahana C., Shilo B.Z., Rubinstein M., Cohen B.** Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. *EMBO J.* 1998; 17: 5085-5094.

**Zerba E., Komorowski T.E., Faulkner J.A.** Free radical injury to skeletal muscles of young, adult, and old mice. *Am. J. Physiol.* 1990; 258: 429-435.

**Zhong H., Chiles K., Feldser D., Laugener E., Hanrahan C., Georgescu M.M., Simons J.W., Semenza G.L.** Modulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res.* 2000; 60: 1541-1545.

**Zhong H. May M.J., Jimi E., Ghosh S.** The phosphorylation status of nuclear NF- $\kappa$ B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol. Cell* 2002; 9: 625-636.

**Zhou L.Z., Johnson A.P., Rando T.A.** NF- $\kappa$ B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 31: 1405-1416.