UNIVERSIDAD DE LEÓN

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

Influencia del polimorfismo genético Ala16Val del gen codificante de la SODMn en el estatus y la respuesta oxidativa al ejercicio físico de moderada intensidad y duración en una población universitaria joven y activa.

Guilherme Bresciani

León, junio de 2010

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)

Los Dres. **D. José Antonio de Paz Fernández** y **Dña. María José Cuevas González** como Directores de la Tesis Doctoral titulada "***Influencia del polimorfismo genético Ala16Val del gen codificante de la SODMn en el estatus y la respuesta oxidativa al ejericicio físico de moderada intensidad y duración en una población universitaria joven y activa***" realizada por D. **Guilherme Bresciani** en el **Departamento de Ciencias Biomédicas**, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 02 de mayo de 2010.

Fdo. José Antonio de Paz Fernández **Fdo. María José Cuevas González**

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 de ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada "***Influencia del polimorfismo genético Ala16Val del gen codificante de la SODMn en el estatus y la respuesta oxidativa al ejercicio físico de moderada intensidad y duración en una población universitaria joven y activa***", dirigida por el Dr. D. **José Antonio de Paz Fernández** y la Dra. Dña. **María José Cuevas González**, elaborada por D. **Guilherme Bresciani** y cuyo título en inglés es el siguiente "***Influence of the Ala16Val polymorphism on MnSOD gene expression, protein content, enzymatic activity, and oxidative stress levels after a moderate intensity submaximal exercise of long duration on young and healthy men***".

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 10 de mayo de 2010.

VºBº El Secretario,

Fdo. Maria Jesus Tuñon González **Fdo.Nélida Fernández Martínez**

Agradecimientos

Se me hace raro escribir los agradecimientos de la tesis como el último apartado; sinceramente, creo que este debería ser uno de los primeros, quizás el primero. A través de este apartado registro mi divergencia con la metodología vigente. Como personalmente no entiendo el "*quejarse por quejarse*" utilizaré esta oportunidad para proponer un nuevo método de desarrollo de este apartado: lo llamaré el "método cronológico".

Empecemos. En mi primer dia en la Universidad de León el **Dr. Javier González Gallego** me presentó al que sería mi futuro director de tesis, el **Dr. José Antonio de Paz Fernández.** A él mis agradecimientos, por haberme acogido en el Seminario 85 sin mayores restricciones. Hace 6 años cuando por primera vez nos tendimos las manos; desde entonces muchas cosas pasaron, muchos temas se discutieron, pero las puertas del 85 jamás me fueron cerradas. El aprendizaje es algo que se fortalece con el día a día y muchas veces debemos tener la humildad y la sabiduría para dar un paso hacia atrás para luego poder dar dos hacia adelante. Además, si somos un poco listos podemos aprender mucho más que apenas "cientificismos" dentro de un laboratorio; donde haya un ser humano habrá relaciones humanas y donde las haya habrá siempre la posibilidad de aprender de los demás. A ti, JA, mis más sinceros agredecimientos, por todo.

Pues JA me llevó al seminario 85 y allí conocí a los que serían mis futuros compañeros de trabajo.¡Cuánta gente! Desde el **Dr. David García López**, pasando por el **Dr. Rodrigo Jiménez Jiménez**, hasta llegar al **Dr. Aldo Hernández**; madre mía. Especial atención dedico a mis actuales "*colegas de 85*"; sin esa gente hubiera sido todavía más complicado acabar esta caminata. Al que comparte mesa conmigo, Rodri (**Rodrigo Fernández Gonzalo**). Grandísmo compañero de trabajo, con maravillosas cualidades profesionales y personales. A la **Dra. Fernanda de Souza Teixeira**, que en realidad no va mucho al 85, pero siempre que por ahí pasa nos brinda con su risa explosiva. A Cova (**Covadonga Diez Castro**), por la paciencia que tiene con "los chicos"; a Pumares (**Daniel**

Muñiz Pumares) por sus graciosísimos momentos de estrés; a **Ana Ribas** y su compañera de piso.

Sin embargo, luego hubo que dar un paso a más; más allá del 85. Me imagino que sea el momento de agradecer al **Dr. Javier González Gallego** por haberme abierto las puertas del entonces *Departamento de Fisiología*. Aquí veo una tremenda apuesta y por eso se lo agradezco: dejar que un licenciado en INEF empiece a moverse entre pipetas, balanzas de precisión, centrífugas, espectrofotómetros, etc, me parece de mucho valor. Cuando apenas se habla el idioma local no es fácil convencerle a la gente de que eres capaz de llevar a cabo un proyecto de este talante. Además, eran tiempos muy difíciles en muchos sentidos, pero aún así Javier me extendió la mano y me brindó con la posibilidad de llevar a cabo este estudio. Muchas gracias, Javier: lo que hiciste es *priceless*.

El tercer paso empieza cuando Javier me presenta a aquella señora (con el permiso) que seria la co-directora de este estudio. Como primera tarea tuvo la de enseñarme cómo moverme entre las centrífugas y todo lo demás que conlleva el manejo diario de un laboratorio. Tremenda suerte la mía de haber podido contar con la **Dra. María José Cuevas González**. No hablaré aquí de sus méritos profesionales (la obviedad es monótona), pero si de los personales. Gracias por todo, Mariajo. Por la paciencia, por la comprensión, por la calma, por entender los diversos momentos de inseguridad de un “inefto” en el laboratorio, por todo lo que me has enseñado, por ese temple tan tranquilo que tienes. Sin ti hubiera sido humanamente imposible llevar a cabo este estudio.

Ya es momento de agradecer a la gente que fui conociendo en el laboratorio. Al que le daba un toque “ibérico” al laboratorio, **Don Héctor Ferreras González**. A quien solía yo robar reactivos cuando se acababan los míos, la **Dra. Luzdivina Vila Fidalgo.** A la colega y encantadora **Elena Lima** que muchas veces me sacó de “dudas moleculares”; a la Dra. Pequeña Chicharra (**Gracia Mendoza**) por los momentos de pura risa y relajación; a la Dra. **Bea San Miguel**, con su visión práctica de las cosas y sus aportaciones del estilo “seguro que te sale, hombre”; a la del pueblo (**Irene Crespo**), con su visión más que graciosa

de la vida; a Toni (**Dr. Antonio Molina**) por compartir su siempre particular visón de la vida; a la **Dra. Su** y a **Chús**, esas dos mujeres indispensables en el IBIOMED.

A la gente que conocí después de todo, el trio dinámico: **Dra. Sonia Sánchez Campos, Dra. María Victoria García Mediavilla y el Dr. José Luiz Mauriz.** Siempre que no estaba Mariajo en ellos me apoyaba. Gracias por todo, chicos… de verdad.

Sin más, dejo constancia que mi ya débil memoria se habrá olvidado de algunos de vosotros, por supuesto. Pero no os lo tomeis a mal, por favor: son tan solo garabatos en una hoja de papel. Los que de verdad habéis contribuido para que esa tesis fuera posible significáis mucho más que un nombre en los agradecimientos de la misma; estáis en los agradecimientos de mi vida.

A mi familia, con todo mi cariño:
Omnia mea mecvm porto.

Influence of the Ala16Val polymorphism on MnSOD gene expression, protein content, enzymatic activity, and oxidative stress levels after a moderate intensity submaximal exercise of long duration on young and healthy men.

Introduction

Oxygen reduction process is complex. This is due to the fact that this molecule has two parallel unpaired electrons on its outermost orbital. Therefore, the only way to perform this reduction is one electron at a time, considering that it is impossible to reduce two electrons at the same time (Sen 2001).

During this process a small quantity of O_2 suffers a univalent reduction of the two electrodes producing a byproduct known as superoxide ion (O_2^-) (Sachdev & Davies 2008). This ion is also called superoxide radical, and is the first reactive oxygen species (ROS) produced in this pathway (Ambrosone et al., 1999). The O_2^- has a relatively long life span that permits its diffusion into the cells which can cause tissue damage. The O_2^- reacts with biological tissues such as cytochrome c and ascorbic acid, apart from oxidizing other biological materials (Powers & Jackson 2008).

Due to the great intrinsic reactivity of the ROS and its roll on cell membranes and organelles oxidation, aerobic organisms have developed antioxidant defenses against these species. Human body disposes of non-

enzymatic and enzymatic antioxidant defenses to prevent ROS tissue damage. These mechanisms assure human body homeostasis and genome integrity (Portakal et al., 2000, Chatgilialoglu & O´Neill 2001).

Among the enzymatic antioxidant defenses, superoxide dismutase (SOD) plays a major role catalyzing the dismutation of the O_2^- into molecular O_2 and H_2O_2. The SOD exists in three different isoforms on human organisms. Among them, the manganese SOD (MnSOD) is the only isoform present in the mitochondrion, which is one of the main ROS production *loci* in the human organism (Judge & Leeuwenburgh 2007; López-Lluch et al., 2008).

The MnSOD is a homotetramer with each subunit composed of 196 aminoacids and is encoded by a five exons gene localized in the 6q25 chromossome (Church et al., 1992, Wan et al., 1994). This enzyme is encoded by nuclear DNA to further be synthesized in the cytosol and finally transported into the mitochondrion (Wispé et al., 1989, Shimoda-Matsubayashi et al., 1996). The lack of MnSOD has been linked to severe consequences to organic survival (Strassburguer et al., 2005). In fact, Lebowitz et al. (1996) underlined the importance of this enzyme for the antioxidant system confirming the lethality of a homozigous null gene mutation ($MnSOD^{-/-}$).

Two genetic polymorphisms have been described for the MnSOD encoding gene. From both of them, the Ala16Val is the most frequently investigated genetic polymorphism for this gene (Bag & Bag 2008). Firstly

described by Shimoda-Matsubayashi et al. (1996), they have described two genetic variants found on a structural mutation substituting a thiamine (T) for a cytosine (C) on the exon 2. This substitution affects the codon 16, translating the valine aminoacid (GTT) into alanine (GCT). This modification of the protein produces a β-sheet secondary structure instead of the expected α-helix structure (Eras-Erdogan et al., 2009, McAtee & Yager 2009). Shimoda-Matsubayashi et al. (1996) affirmed that this change alters the secondary structure of the protein affecting the mitochondrial import of the enzyme (Sutton et al., 2003, Möllsten et al., 2009).

On the same line, this structural change can compromise the O_2^- neutralization, resulting in exacerbate protein oxidation, mitochondrial and nuclear DNA mutations (Rosenblum et al., 1996, Ambrosone et al., 1999). It is also believed that this genetic polymorphism can affect the mitochondrial control upon vital cellular functions and apoptosis (Ambrosone et al., 1999, Orth & Schapira 2001).

Previous data have demonstrated the association of physical exercise and ROS production (Ji 1995; Jackson 1999; Powers et al., 1999; Leeuwenburgh & Heinecke 2001; Johnson 2002; Urso & Clarkson 2003; Lamprecht et al., 2004; Goldfarb et al., 2005; Vollaard et al., 2005; Sachdev & Davies 2008). In fact, it is well-described that intense or unaccustomed exercise can increase the ROS production causing a phenomenon called oxidative stress (Bloomer 2008; Di

Francescomarino et al., 2009; Mergener et al., 2009; Gómez-Cabrera et al., 2010). Oxidative stress occurs when an imbalance between ROS production and antioxidant systems efficiency takes place, altering the redox status which contributes to endothelial dysfunction and/or apoptosis, among others (Iuchi et al., 2003; Madamanchi & Runge 2007).

Nevertheless, recent studies have pointed out that moderate intensity exercise increases the antioxidant defenses (Gómez-Cabrera et al., 2008; Ghosh et al., 2009; Romani et al., 2009; de Meirelles et al., 2009), enhancing the physiological modulation which seems to enhance the homeostasis maintenance of the human organism (Brigelius-Flohé 2009). Moreover, moderate-intensity exercise produces less oxidative stress when compared to intensive physical exercise (Seifi-Skishahr et al., 2008). Consequently, it seems that regular moderate-intensity exercise is a key aspect of a healthy way of life (Brigelius-Flohé 2009; Reichhold et al., 2009).

Therefore, we aimed to analyze Influence of the Ala16Val polymorphism on MnSOD gene expression, protein content, enzymatic activity, and oxidative stress levels after a moderate intensity submaximal exercise of long duration on young and healthy men.

Methods

Participants

On a first stage 60 participants volunteered to participate in the study. Participants were all Sports Sciences students at University of Leon and were full informed about the study procedures and objectives before given their written inform consent. An experienced physician carried out a full medical screening in order to assure volunteers' capability to enroll in the study. Participants taking inflammatory, hormonal or any kind of medication were excluded from the study. Smokers were also ruled out, since smoking can alter redox status. After that, a total of 55 (5 voluntarily abandoned the study) of them were genotyped for the MnSOD Ala16Val genetic polymorphism and carried out a maximal incremental cycloergometric test with oxygen uptake so as to obtained their VO_2peak values. A final 30 (10 *per* each MnSOD genotype) were randomly selected considering the sample showed no significant differences for anthropometric assessment. Partcipitants were then dividied into 3 groups: a) AA genotype (n=10), b) VV genotype (n=10), and c) AV genotype (n=10).

All procedures were approved by the local Institutional Review Board for the protection of human participants. Table 1 presents the descriptive characteristics of the three groups.

Table 1. Anthropometric assessment (mean ± SD) of 30 participants

	AA	AV	VV
Age (years)	21.0 ± 0.7	20.0 ± 0.5	20.9 ± 0.4
Weight (Kg)	76.4 ± 3.3	73.3 ± 2.2	75.2 ± 1.7
Height (cm)	176.0 ± 1.8	177.8 ± 1.7	177.3 ± 1.5
IMC	24.6 ± 0.8	23.2 ± 0.7	23.8 ± 0.2
Body Fat (%)	12.0 ± 1.1	10.6 ± 0.6	10.9 ± 0.5
VO_2max ($mL/Kg.min^{-1}$)	58.2 ± 2.8	60.0 ± 1.9	57.8 ± 0.9
Peak Power (W)	302.5 ± 9.4	312.5 ± 5.5	317.5 ± 7.5

Experimental design

The study consisted in two physical tests on a cycleergometer. At first, participants underwent a full medical examination and anthropometric data was collected. A blood sample was also obtained in order to genotype participants to the MnSOD gen. On a second visit participants performed a maximal incremental cycloergometric test in order to obtained VO_{2max} values. At this point sample was reduced to 30 participants out of 55 genotyped, (10 *per* MnSOD genotype). Respecting at least two weeks time the last laboratory trial took place. Participants performed a long duration submaximal test with constant work load on a cycle ergometer. Blood samples were drawn immediately before and 1 h post-exercise to analyze distinct parameters related do oxidative stress and MnSOD total status. Samples were further analyzed on the Institute of Biomedicine, University of Leon.

Maximal oxygen uptake test

After obtaining the anthropometric data, participants performed an incremental test on until exhaustion on a cycloergometer with electromagnetic brakes (Ergoline, GmH-Lindestrable, Bitz, Germany). Participants warmed up during 5 min with 25 W work load. Afterwards, work load was increased by 25 W every minute until exhaustion. Achievement of VO_{2max} was considered as the attainment of at least one of the following criteria: (a) participants' volitional exhaustion, (b) a plateau in VO_2, or (c) a HR ± 10 beats.min^{-1} of age-predicted maximal HR (220-age). Ventilatory and gas exchange variables were continuously monitored and collected breath-by-breath system using an automated and open-circuit (CPX plus, Medical Graphics, St. Paul, MN, USA). Data was averaged every 5 s and the metabolic cart was calibrated with calibration gas mixtures of known O_2 and CO_2 concentrations (accuracy 0.01%) which were provided by the manufacturer (Medical Graphics, St. Paul, MN, USA). The highest VO_2 obtained attained during the incremental exercise test was taken as the VO_2max whereas the intensity attained just before exhaustion is referred to as Wmax. Heart rate (HR) (b.min^{-1}) was also continuously monitored during the test (Polar S810, Polar Electro OY, Kempele, Finland).

Submaximal exercise

Participants have to maintain a pedal rate of approximately 70 r.min^{-1} during 40 min at 75 % of their VO_2max obtained during the maximal incremental

test previously performed. The W at VO_2 75% was adjusted by extrapolation depending on the VO_2max obtained during the maximal test protocol. Oxygen uptake was controlled at 4 different time points: 1) during the first 5 min (until VO_2 stabilized), 2) from minute 10 to minute 15, 3) from minute 20 to min 25, and 4) from minute 30 until the end of the test in order to control the VO_2 along the test. HR was continuously monitored along the exercise (Polar S810, Polar Electro OY, Kempele, Finland). Blood samples were obtained immediately before and 1 h after the test. Subjects drank 500 mL of commercial mineral water in between both blood samples with the purpose of avoiding test dehydration. Furthermore, a small amount of blood sample (approximately 10 µL) was used to haematocrit measurement (Haemofuge A, Heraeus Sepatech, Germany). Both VO_2 and W were measured using the same devices used on the maximal incremental test.

Blood lactate analysis

Blood lactate was determined from arterial blood samples collected on minutes 15, 30, and 40 (immediately after the test) of the submaximal exercise. Samples were obtained with a capillary tube after a small incision with a lance was made on the left earlobe of the participants (previously cleared with an alcohol swab and dried). Lactate concentration was determined using a portable lactate analyzer (Miniphotometer LP20, Dr. Bruno Lange GmbH & Co. KG, Berlin, Germany), and following Dr Lange's photometric method.

Genetic analysis

A peripheral blood sample (5 mL) from the antecubital vein was drawn using EDTA (1 mg/dL final concentration) as anticoagulant. Genomic DNA was isolated from leukocytes using a GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Biosciences Inc., Uppsala, Sweden). MnSOD genotyping was performed using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) techniques. A total volume of 50 µl containing 1.25 µl 10 mM dNTP, 0.5 µl containing 5.0 µl 10x buffer, 1.0 µl 25 mM $MgCl_2$, Taq polymerase (Gibco Inc., Billings, (MO), USA), 1.0 µl of 40 pmol of each primer, 3.0 µl genomic DNA (0.25 µg), 34.5 µl. The amplification primers (Gibco Inc.) for a 110-bp fragment of the human MnSOD gene were 5'-ACCAGCAGGCAGCTGGCGCCGG-3' (sense-strand) and 5'-GCGTTGATGTGAGGTT CCAG-3' (antisense-strand) with thermocycler parameters consisting of an initial cycle of 95ºC for 5 min followed by 35 cycles of 95ºC for 1 min and 61ºC for 1 min. The final cycle was followed by an extension period of 2 min at 72ºC. The PCR product (10 µl) was digested with *Hhae*III (15 U; at 37ºC for 6 h) (Gibco Inc.). Digested products were visualized on a 6% agarose gel (Amersham Biosciences Inc.) stained with ethidium bromide. A mutation was introduced by a primer mismatch to create a restriction cut site for *Hhae*III in the -9 codon, for what the following genotypes were observed: -9Ala/Ala (23 and 85 bp), -9Ala/Val (23, 85, and 110 pb) and -9Val/Val (110 pb) (Gottlieb et al., 2005). All genotypes were observed for at least two blinded

observers. When a conflicting in genotype identification was observed, PCR-RFLP was repeated and analyzed again in order to reduce potential confounding variable.

Blood sample preparation

Venous blood samples (35 mL) were taken using EDTA (1 mg/dL final concentration) as anticoagulant. Blood samples were obtained from the antecubital vein. Blood was immediately centrifuged at 1500 *g* for 10 min at 4 ºC, and plasma was separated and stored at -80 ºC. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated from the whole blood by density gradient centrifugation on Ficoll separating solution (Biochrom AG, Berlin, Germany), as previously described (Cuevas et al., 2005). Blood was diluted 1:1 with a phosphate-buffered saline solution (PBS buffer). For each sample, eight 15-mL centrifuge tubes were used to layer 7 mL of diluted blood onto 3 mL of Ficoll. The suspension was centrifuged for 30 min at 275 *g* and 20 ºC. The mononuclear cell layer was removed with manual pipetteing, washed once in PBS buffer and centrifuged for 10 min at 450 g on 20 ºC after washing. Washed cells were resuspended in 1 mL of PBS buffer. Analyses were performed on frozen cells.

Total glutathione and protein thiol content

The automated glutathione recycling method described by Anderson (1996) was used to assess the global total glutathione content of PBMC using a microtiter plate reader (Synergy^{TM} HT Multi-Mode Microplate Reader, Bio-Tek

Instruments Inc., Winooski (VT) USA). The protein thiol content of samples was analyzed by the method of Di Monte et al. (1984) adapted for use on a 96-well plate reader.

Reverse transcription and quantitative real-time polymerase chain reaction

Total RNA was isolated from PBMC by using a RiboPure^{TM} Blood Kit (Ambion Inc., Austin (TX) USA) and quantified by the fluorescent method Ribogreen RNA Quantification Kit (Molecular Probes). Residual genomic DNA was removed by incubating RNA with DNase I RNase-free DNase Archive Kit (Ambion Inc.). Firstly, standard DNA was synthesized using high-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City (CA) USA). The negative control (no transcriptase control) was performed in parallel. cDNA was amplified using TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) on an ABI7000 (Applied Biosystems) (García-Mediavilla et al., 2007). TaqMan primers and probes for MnSOD (Genbank M36693.1 and Hs00167309) and (housekeeping gene) 18S rRNA (Genbank X03205.1 and Hs 99999901_s1) were derived from the commercially available TaqMan® Assays-on-Demang Gene (Applied biosystems). Relative changes in gene expression levels were determine using the $2^{-\Delta\Delta ct}$ method as described previously (Livak & Schmittgen, 2001). The cycle number at which the transcripts were detectable (CT) was normalized to the cycle number of 18S detection, referred to as ΔCT.

Western blot analysis

For western blot analysis PBMC were homogenized with 150 μL of sucrose, 1mM EDTA, 10mM Tris and protease inhibitor cocktail (Tuñón et al., 2003). Protein concentration was determinate as described previously (Lowry et al., 1951). Samples containing 50 μg of protein were separated by SDS-polycrylamide gel electrophoresis (9 % acrylamide) and transferred to PVDF membranes. Non-specific binding was blocked by preincubation of the PVDV in PBS containing 5 % bovine serum albumin for 1 h. The membranes were then incubated overnight at 4 ºC with appropriate antibodies. Antibodies against MnSOD (25 kDa) were purchased from Stressgen Biotechnologies (Ann Arbor (MI) USA). Bound primary antibody was detected using a peroxidase-conjugated secondary antibody (Amersham Inc.). The density of the specific band was stripped in 6.25mM Tris, pH 6.7, 2 % SDS and 100mM mercaptoethanol at 50 ºC for 15 min and probed again for anti-beta-actin antibodies (Sigma-Aldrich, St. Louis (MO) USA) (42 kDa) to verify equal protein loading in each lane.

Antioxidant enzyme activity

The MnSOD activity was determined by using the inhibition by MnSOD of the reaction of O_2^- with NBT following a technique previously described (Oberley & Spitz, 1984). NaCN was added 1 h before the measurement in order to assay MnSOD activity. Enzymatic activity was expressed as U/mg protein.

Results

The genotype and allelic frequencies of the initial sample were calculated and 25% AA (n=14), 33% VV (n=19), and AV (n=42) were observed. Calculated allelic frequencies of the A and V alleles were of 0.456 and 0.544, respectively. The gene frequencies were all in Hardy-Weinberg equilibrium in the groups investigated (P=0.273), indicating the homogeneity of the sample, avoiding possible genetic variations. From this homogeneous sample 30 participants (10 per genotype) were randomly selected to carry on the second part of the study.

Submaximal exercise bout

Participants divided by genotype showed no statistical differences for VO_2 obtained along the submaximal exercise (P=0.321). The same trend was observed when values were normalized according to the maximal oxygen uptake test; no differences were found (P=0.622). We have also analyzed VO_2 data along the submaximal exercise in order to find out if the protocol was similar for the 3 groups on the different data collection points. No statistical differences were observed between genotypes (P=0.811; P=0.411; P=0.365; and P=0.386, respectively).

Table 2. VO_2 (mL/Kg.min^{-1}) obtained during the submaximal exercise bout (mean ± SD)

Collection time (m)	AA	AV	VV
00:00	39.7 ± 1.1	41.1 ± 1.5	40.1 ± 1.5
10:00	43.2 ±1.7	46.6 ± 1.9	44.2 ± 1.1
20:00	42.5 ± 2.1	45.4 ± 1.6	45.4 ± 1.0
30:00	42.6 ± 1.6	46.4 ±2.3	44.7 ±1.2
Total	42.8 ± 1.6	46.1 ±1.7	44.2 ± 1.0
% of max	74.2 ± 2.3	76.8 ± 1.7	76.7 ± 2.0

Table 2 assures participants had similar oxygen consumption along the submaximal exercise. Total VO_2 measured, VO_2 measured during the different collection points, and percentage of the VO_{2max} did not present statistical differences between AA, AV, and VV groups, confirming that subjects from distinct groups have performed the same submaximal outcome. Therefore, we can conclude that subjects had performed the submaximal exercise bout under the same conditions of oxygen consumption.

On the same line a HR monitor collected data during the submaximal exercise bout. Table 3 resumes the analyzed data.

Table 3. HR (bpm) registered during the submaximal exercise bout (mean ± SD)

	AA	AV	VV
Mean	174.7 ± 2.7	179.3 ± 2.7	173.8 ± 3.2
Maximal	183.8 ± 2.2	186.4 ± 2.5	183.9 ± 3.6

No significant differences were observed for mean (P=0.554) and maximal (P=0.501) HR registered during the submaximal exercise between the groups.

In order to register a possible hemodilution after the submaximal exercise bout haematocrit was measured before and after the exercise. The table 4 presents the results observed.

Table 4. Haematocrit (%) before and after the submaximal exercise bout (mean ± SD)

Haematocrit	AA	AV	VV
Before	44.3 ± 0.8	45.6 ± 0.8	46.2 ± 0.6
After	44.1 ± 0.8	45.6 ± 0.8	46.2 ± 0.6

Participants showed no differences on haematocrit before and after the submaximal exercise bout (P=0.873; P=0.901; and P=0898, respectively), avoiding a possible hemodilution effect after the exercise.

Blood lactate and respiratory quotient analysis

The same trend was observed for lactate concentration. Table 3 resumes the data found along the submaximal exercise.

Table 5. Lactate concentration (mmol/L) during the submaximal exercise (mean ± SD)

Collection time (m)	AA	AV	VV
15:00	7.1 ± 1.4	7.8 ± 0.6	7.5 ± 0.7
30:00	7.7 ± 1.0	8.1 ± 1.0	7.2 ± 1.1
40:00	6.5 ± 0.9	7.9 ± 0.5	7.1 ± 0.9

No significant differences were observed on the lactate concentration measured during different time points along the submaximal exercise between the three groups (P=0.871; P=0.851; and P=0.501, respectively), same trend observed for the VO_2 previously seen. Participants had the same lactate

concentration over the submaximal exercise bout, demonstrating that the three groups herein studied underwent similar performances outcomes.

To verify exercise intensity by other means the respiratory quotient (RQ) was also measured during the submaximal exercise. Table 6 presents the data found.

Table 5. Lactate concentration (mmol/L) during the submaximal exercise (mean ± SD)

Collection time (m)	AA	AV	VV
00:00	1.04 ± 0.0	1.02 ± 0.0	1.05 ± 0.0
10:00	0.99 ± 0.0	1.00 ± 0.0	1.00 ± 0.0
20:00	0.95 ± 0.0	0.97 ± 0.0	0.98 ± 0.0
30:00	0.95 ± 0.0	0.97 ± 0.0	0.96 ± 0.0

On the same line, RQ did not present significant differences during the submaximal exercise bout between the three groups (P=0.685; P=0.846; P=0.404; and P=0.746, respectively). Together with VO_2, HR, haematocrit, and lactate concentration we can conclude that participants underwent a very similar effort during the submaximal exercise bout, for what changes observed on biological markers cannot be attribute to different outcomes during the exercise performed.

Total glutathione and protein thiol content

The heterozygous group presented intermediate concentrations for the oxidative stress markers. The tGSH significantly increased (P=0.009) while the -SH content decreased, although no significant difference was observed (P=0.502).

Table 6 shows the results. The AA showed no statistical differences for both markers (P=0.161; and P=0.289, respectively), while VV homozygous showed no statistical differences for tGSH, but for -SH (P=0.079; and P=0.042, respectively). Table 6 resumes the analyzed data.

Tabla 9: Effect of the Ala16Val genetic polymorphism of the MnSOD enconding gene on the antioxidant response after a submaximal exercise bout (mean ± SD).

Parameter	**Time**	**AA**	**AV**	**VV**
tGSH ($\mu M/10^6$cells)	Baseline	4.1 ± 0.4	3.9 ± 0.4	3.85 ± 0.4
	Post	5.5 ± 0.9	5.2 ± 0.4*	5.39 ± 0.7
SH (nmol/mg prot)	Baseline	21.6 ± 2.2	23.3 ± 2.9	28.4 ± 2.7
	Post	23.6 ± 3.0	22.0 ± 2.2	23.2 ± 3.1*
mRNA (%)	Baseline	100.0	100.0	100.0
	Post	117.2.2 ± 2.2*	105.6 ± 6.4	102.2 ± 4.3
Protein (%)	Baseline	100.0 ± 1.3	100.0 ± 2.0	100.0 ± 1.2
	Post	107.8 ± 5.4	96.4 ± 2.9	94.5 ± 3.5#
Enzymatic activity (U/mg prot)	Baseline	2.7 ± 0.2	2.3 ± 0.6	2.8 ± 0.5
	Post	4.8 ± 0.72*	3.9 ± 0.9*	2.1 ± 0.5#

* significantly different from AA baseline; # significantly different from AA post. Significance was set at $p < 0.05$

Reverse transcription and quantitative real-time polymerase chain reaction

On table 6 mRNA gene expressions are also shown. Heterozygous and VV homozygous did not show statistical differences related to baseline (P=0.949; and P=0.700, respectively). Nevertheless, AA homozygous registered a significant increase on mRNA gene expression after the submaximal exercise bout (P=0.038).

Western blot analysis

No genotype effect was found for MnSOD protein content according to the distinct genotypes. The AV, AA, and VV genotypes showed no differences from baseline to post values (P=0.267; P=0.181; and P=0.153, respectively). Nevertheless, the AA genotype presented increased protein content after the submaximal exercise bout when compared to the VV group (P=0.044).

Antioxidant enzyme activity

The MnSOD enzymatic activity was significantly higher for the AV and AA genotypes (P=0.018; and; P=0.013, respectively). A decrease was observed for the VV participants, but no differences were observed (P=0.266). Moreover, a dose-response was observed for genotypes with at least one A allele (P=0.017).

Discussion

Oxidative stress measured in peripheral blood mononuclear cells

Proper tissue selection to correctly analyze exercise-induced changes is essential to avoid possible sample bias. Connolly et al (2004) pointed out that the genomic response of the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) is a promising field to identify the mechanisms behind the association of physical activity and health promotion. These data have been previously corroborated by our investigation group, demonstrating that PBMC can be a reliable sample to investigate the inflammatory/oxidative processes that take place in response to exercise (García-López et al., 2007; Jiménez-Jiménez et al., 2008).

Moreover, previous investigations have shown that muscle biopsies affect nearby myofibrils, and so as the serum enzymes (Aronson et al., 1998). It is also important to consider that the chirurgical intervention to obtain muscle biopsies can possibly contribute to the development of local inflammation (Malm et al., 2000), and local inflammation can produce leukocytosis (Forster y cols., 1986). Considering that some leukocytes, such as neutrophils, can improve tissue across ROS release and proteolytic enzymes (Hiltermann et al., 1998), the PBMC become a safe and relatively free-bias sample to work with when compared to muscle tissue. Therefore, PBMC becomes a reasonable tissue to analyze exercise-induced inflammatory/oxidative changes.

Total glutathione and protein thiol content

The glutathione peroxidase enzyme (GPx) decomposes H_2O_2 to produce glutathione disulfide (GSSG). Nevertheless, intracellular GSSG can be reduced back to GSH across the glutathione reductase enzyme (GR) (Elosua et al., 2003). Rietjens et al. (2007) demonstrated that GR enzymatic activity can be increased after a bout of eccentric exercise. On the same line, Bloomer et al. (2005) affirmed that transitory changes on GSH are due to the conversion of GSSG back to GSH across the GR activity. According to Sen et al. (1993) increases in GR activity can partially explain the upregulation of the tGSH due to increases on the GSH regeneration from GSSG.

Nevertheless, in this study heterozygous participants showed a significant increase on tGSH content after the submaximal exercise bout with no alterations on the oxidation of -SH groups. Therefore, it seems that the GR does not play a key role in this case, once -SH does not support a GSSG to GSH recycling task of GR.

Once GSH is synthesized it can exert its organic function or be degraded to participate in other metabolic processes such as the γ-gluthamil cycle which provides aminoacid precursors to the GSH synthesis (Dickinson & Forman, 2002). Nevertheless, during high intensity exercise the aminoacids necessary for the GSH synthesis can suffer concentration changes due to transamination and

cellular protein mobilization, which can limit the *de novo* synthesis of GSH (Deneke & Franburg, 1989).

On the same line, Vider et al. (2001) found higher tGSH concentrations 30 min after a maximal oxygen uptake test on a treadmill. According to the authors, the increases observed on tGSH after the trial were due to GSH uptake from peripheral tissues, such as muscles. It is well known that GSH is transporter to different tissues after its synthesis on the liver. Moreover, it is well known that cytosolic GSH of rat liver is renewed every 2-3 h (Dickinson & Forman, 2002). The post exercise blood of this study was collected 1 h after the exercise, which allows us to think the increase observed on the tGSH content is due to peripheral tissues uptake of GSH from the PBMC.

In this study the three groups present similar -SH groups content after 1 h of the submaximal exercise bout. This can also be explained by the sampling time. McArdle et al. (2001) found significant differences on the -SH group oxidation after 15 min of electric stimulation in rats, but no differences were found after 1 h. The mechanisms related to the decrease on tGSH and protein thiols after muscle contractile activity are still to be clarified, but a few investigators attributes it to the -SH group oxidation by the ROS produced during the physical activity (Ji y cols., 1992; Sastre y cols., 1992). It is well known that some ROS induce the decrease on the thiols as a response do oxidative stress (Rousseau y cols., 2006).

The O_2^- is the first ROS produced within the oxidative metabolism in the mitochondrion. Scarce lipid membrane permeability is among its main characteristics (Takahashi & Asada 1983), which restricts it to its production *loci*. Actually, the O_2^- is able to cross through the ionic channels, but dismutation takes place more oftenly. Bica et al. (2010) stated that the AA genotype may present higher O_2^- dismutation. As previsouly mentioned, O_2^- dismutation generates H_2O_2 and molecular O_2. The H_2O_2 is much more permeable to lipidic membranes than the O_2^-, for what cytosol can be reached. With less O_2^- inside accumulation AA mitochondrion would suffer less oxidative stress. However, the VV less dismutation would represent higher O_2^- inside the mitochondrion. The O_2^- toxicity is higher than H_2O_2 and its interactions with other ROS are also more dangerous, originating even more toxic species, such as the peroxynitrite ($ONOO^-$). The $ONOO^-$ is rapidly generated by O_2^- and $NO^\cdot$ (Pattwell & Jackson 2004) and is able to cross by lipidic membranes with little limitations (Marla et al. 1997). Moreover, it is known that the $ONOO^-$ directly oxidizes the thiols groups or be converted into $OH\cdot$ and nitrogen dioxide (NO_2) whose also react against thiols (Quijano et al. 1997). Therefore, the AA genotype presents higher O_2^- dismutation in the mitochondrion. This reaction would produce more H_2O_2 which can easily cross the lipidic membrane decreasing the oxidative stress levels on this organelle. Consequently, the lesser O_2^- dismutation by the VV genotype would represent higher levels of oxidative stress within the mitochondrion.

The AA participants showed no differences for tGSH and oxidation of -SH groups, indicating an antioxidant balance. Heterozygous participants showed increased tGSH content and no differences for oxidation of -SH, indicating a kinetics towards a redox status. Finally, VV participants showed no differences for tGSH, but a great -SH group oxidation after the submaximal exercise bout, being the only genotype which moved towards an oxidative state after the exercise.

Reverse transcription and quantitative real-time polymerase chain reaction

It becomes clear nowadays that the ROS produced by exercise also act as signaling molecules to enhance the expression of enzymes related to the muscle adaptation to exercise (Vina et al., 2005). In fact, it has been described that exercise can increase MnSOD mRNA expression in animals (Hollander et al., 2001), and its believed this increase is due, among other factors, to the ROS (Gomez-Cabrera y cols., 2005). It is well know, for example, that the H_2O_2 can induce the expression of MnSOD mRNA (Harris, 1992; Warner y cols., 1996, Röhrdanz y Kahl, 1998). Sureda et al. (2008) investigated the differences on H_2O_2 production between men and women after a bout of exercise. They found out that men had higher MnSOD mRNA expression and enzymatic activity on lymphocytes, and they also produced more H_2O_2. The authors concluded that the

higher H_2O_2 production by men lead to a increase on MnSOD mRNA expression and also increased enzymatic activity.

The H_2O_2 could be the key molecule implicated on the increases of the MnSOD mRNA expression of the AA participants. The higher O_2^- dismutation performed by the AA participants would result in greater H_2O_2 concentrations. Due to its membrane permeability, H_2O_2 would easily reach cytosol, where signaling pathways would activate distinct transcription factors (such as NF-kB, and AP-1). On its turn, the encoding gene for MnSOD would express more mRNA. The AV and VV participants would not be able to do so, as the H_2O_2 dismutation would not be effective.

On the same line, Sutton et al. (2005) investigated HuH7 human hepatoma cells transfected with vectors encoding for the Ala- or Val-variants. The Ala variant resulted in a 4-fold higher levels of the mature exogenous protein and MnSOD activity than the Val-variant. The MnSOD mRNA levels were 2-fold higher for the Ala-encoding mRNA than the Val-mRNA. The authors concluded that the slowly imported Val-MnSOD is degraded by the proteasome in cells, and that the slower mitochondrial import of the Val-variant may be associated with decreased nRNA estability, possibly due to cotranslational import.

Therefore, the MnSOD mRNA expression on AA participants may be due to the higher producción of H_2O_2 and its consequent stimulation of sensitive

pathways. Moreover, a possible instability on the Val variant may affect the MnSOD mRNA content of the enzyme.

Western blot analysis

No differences were found after the submaximal exercise bout for MnSOD protein content. Nevertheless, AA participants showed higher protein content than VV after the exercise, which may be related with the higher MnSOD mRNA expression of the AA participants.

Morton et al. (2006) did not find differences on the MnSOD protein content after running on a treadmill at the lactate threshold. The authors found that the baseline values displayed marked individual variation up to 1.5-fold. Hollander et al. (2001) were also unable to find differences on MnSOD protein content after a bout of exercise in rats. According to the authors the change on protein synthesis was probably too small to be detected.

Sutton et al. (2003) demonstrated that the Val-MnSOD precursor was partly arrested within the inner mitochondrial membrane comparing to the Ala-proteins. The Ala-MnSOD precursor generated 30-40% more of the active, matricial, processed MnSOD homotetramer then the Val-MnSOD precursor. The VV participants showed less MnSOD content probably due to the deficient import of the protein into the mitochondrion.

Antioxidant enzyme activity

The A allele played a key role on enzymatic activity of the MnSOD after exercise. The AA and AV participants show higher enzymatic activity compared to both on baseline values. Moveover, AA genotype presented higher activity after the submaximal exercise bout than homozygous VV; furthermore, a dose-response was reached for this parameter, determining the decisive role of the A allele.

Previous research demonstrated that the enzymatic activity of MnSOD on mouse heart increases on a two-step fashion after X-ray irradiation. The first peak is reached at 1 h due to the enzymatic activation of the antioxidant system, and the second is related to *de novo* protein synthesis (Oberle et al. 1987). We have also observed the first peak within 1 h on the A allele carriers participants, for what exercises may also increase the MnSOD activation on oxidative stress situations.

Another investigation found a significant increment of 12% on protein carbonyls on exercised rats, and authors hypothesized that the increase was due to a reduction on the MnSOD enzymatic activity (Judge et al. 2005). A study with $MnSOD^{+/-}$ young rats that presented a 50% less MnSOD activity also showed a 80% increase on protein carbonyls comparing to $MnSOD^{+/+}$ young rats, confirming the MnSOD enzymatic activity importance on the redox status (Bota et al. 2002). On the same line, another investigation with mitochondria extracted

from $MnSOD^{+/-}$ and $MnSOD^{+/+}$ rat livers concluded that the MnSOD enzymatic activity is physiological relevant (Williams et al. 1998). The $MnSOD^{+/-}$ rats presented 50% less enzymatic activity than $MnSOD^{+/+}$ rats, together with a 30% decrement on GSH concentration on the $MnSOD^{+/-}$ rats. The protein carbonyls and 8-OhdG content was also increased on the $MnSOD^{+/-}$ rats.

We have observed a same tendency in this study, considering that the V participants were the only to not increase the MnSOD enzymatic activity and the ones that experimented higher levels of -SH groups. The A allele carriers show an increased MnSOD activity and did not present -SH groups oxidation.

Concluding remarks

Firstly, considering the data herein analyzed we can conclude that the Ala16Val genetic polymorphism of the MnSOD encoding gene did not influence on the maximal oxygen uptake observed on the participants of this study. On the same line, redox status baseline values were not affected by the polymorphism, once no differences were observed between the distinct genotype before the exercise on the biological markers analyzed. Nevertheless, the genotypes demonstrated differentiated responses to the submaximal exercise bout. The AA genotype presented higher MnSOD mRNA expression and enzymatic activity after the exercise, while the AV genotype showed higher values for tGSH and also to the MnSOD enzymatic activity after the exercise bout. The VV genotype was the only to not present increases on the biological markers measured, but

increased the -SH groups oxidation. The A allele is related to a more efficient enzymatic activity of the MnSOD once a dose-response was found for this allele, once AA and AV genotypes increased the MnSOD activity, despite de VV genotype. Therefore, VV genotype was the only genotype to present a insufficient antioxidant defense against the oxidative stress produced by the submaximal exercise bout. The maintenance or mRNA expression, protein content, and enzymatic activity seems to be responsible for the higher oxidation of -SH groups, while A-carriers genotypes were less affected by oxidative stress across modulation of the MnSOD pathways.

References

All the references cited in the *resumé* are listed on the "*Referencias bibliográficas*" part at the end of this thesis.

Índice

Abreviatura y símbolos 40

Índice de figuras 45

Índice de tablas 47

Índice de fotografías 49

1 Introducción 51

2 Estrés oxidativo 56

2.1 Papel de la mitocondria en la producción de energía 58

2.2 Especies reactivas de oxígeno 60

2.2.1 Anión superóxido (O_2^-) 60

2.2.2 Peroxido de hidrógeno (H_2O_2) 61

2.2.3 Radical hidroxilo (OH·) 61

2.2.4 Óxido nítrico (NO·) 62

2.2.5 Peróxinitrito ($ONOO^-$) 63

2.2.6 Ácido hipocloroso (HOCl) 63

2.2.7 Singlete de Oxígeno ($^1O_2$) 64

2.3 Las especies oxidativas de oxígeno y sus acciones en el organismo 64

2.3.1 Peroxidación lipídica 65

2.3.2 Oxidación y glucosilación de proteínas y enzimas 66

2.3.3 Interrupción del flujo iónico y rotura de pasos metabólicos 67

2.3.4 Oxidación del material genético nuclear y mitocondrial 67

2.4 Mecanismos de defensa antioxidante y reparación del estrés oxidativo 69

2.4.1 Sistema antioxidante no enzimático 69

2.4.2 Sistema antioxidante enzimático 71

2.4.2.1 Superóxido dismutasa 72

2.4.2.2 Catalasa 74

2.4.2.3 Glutatión peroxidasa 75

3 Polimorfismos genéticos 76

3.1 Superóxido dismutasa mitocondrial y sus polimorfismos genéticos 77

4 Ejercicio físico 83

4.1 Consumo máximo de oxígeno 85

4.2 Bioenergética del ejercicio físico – de los aspectos metabólicos generales a la producción de especies reactivas de oxígeno 87

4.3 Ejercicio físico y producción de especies reactivas de oxígeno – estrés oxidativo 89

4.3.1 El glutatión – estructura y funciones orgánicas 90

4.4 Ejercicio físico: ¿qué hay después del estrés oxidativo? 93

5 Objetivos 96

5.1 Objetivo general 96

5.2 Objetivos específicos 96

6 Diseño experimental 99

7 Metodología 101

8 Material y métodos 104

8.1 Participantes 104

8.2 Valoración antropométrica 104

8.3 Esfuerzo físico máximo 105

8.4. Estimación de micro y macronutrientes 105

8.5 Esfuerzo físico submáximo 106

8.6 Recogida de muestra sanguínea 106

8.6.1 Procesado de La muestra sanguínea 107

8.7 Análisis bioquímicos y moleculares 108

8.7.1 Concentración de proteínas 108

8.7.2 Concentración de glutatión total 109

8.7.3 Concentración de los grupos sulfidrilos 110

8.7.4 Cuantificación del ARN mensajero de la SODMn por RT-PCR: transcriptasa inversa y reacción en cadena de la polimerasa 111

8.7.5 Cuantificación de la proteína SODMn por Western-blot 112

8.7.6 Actividad enzimática de la SODMn 114

8.8 Análisis del polimorfismo genético Ala16Val de la SODMn 116

8.8.1 Aislamiento del ADN nuclear 116

8.8.2 Amplificación del ADN nuclear 117

8.8.3 Digestión del ADN nuclear amplificado 118

9 Análisis estadístico 122

10 Resultados 124

10.1 Distribución de los genotipos – homogeneidad de la muestra 124

10.2 Esfuerzo físico máximo 124

10.3 Esfuerzo físico submáximo – parámetros ergométricos y metabólicos 125

10.4 Análisis bioquímicos y moleculares del esfuerzo submáximo 131

11 Discusión 139

11.1 Estrés oxidativo en células mononucleares de sangre periférica – elección de la muestra 144

11.2 Modulación del estrés oxidativo tras el esfuerzo físico submáximo 145

11.2.1 Concentración de glutatión total 145

11.2.2 Concentración de grupos sulfidrilos 149

11.2.3 Cuantificación del ARNm de la SODMn por RT-PCR 152

11.2.4 Cuantificación de la proteína SODMn por Western Blot 155

11.2.5 Actividad enzimática de la SODMn 157

12 Conclusiones 161

13 Referencias 163

Abreviaturas y símbolos

AA: alanina/alanina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

Ala: alanina

ANOVA: análisis de la varianza

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATP: adenosina-trifosfato

AV: alanina/valina

CAT: catalasa

cGMP: guanosín monofosfato cíclico

CMSP: células mononucleares de sangre periférica

Cols.: colaboradores

CTE: cadena transportadora de electrones

Cu: cobre

DETAPAC: ácido dietilentriaminopentacético

dNTP: desoxinucleótidos trifosfatos

DTNB: ditio-bis-nitrobenzoato

ECL: *enhanced luminol-based chemiluminescent*

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

E.E.M.: error estándar de la media

EE.UU.: Estados Unidos

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial (o tipo 3)

ERN: especie reactiva de nitrógeno

ERO: especie reactiva de oxígeno

FADH: flavina-adenina dinucleótido

FC: frecuencia cardíaca

Fe: hierro

FO: fosforilación oxidativa

GPx: glutatión peroxidasa

GR: glutatión reductasa

GSH: glutatión (forma reducida)

GSHt: concentración de glutatión total

GSSG: glutatión (forma oxidada)

GST: glutatión transferasa

h: hora

HRP: peroxidasa de rábano picante

Hz: hercios

Ile: isoleucina

IMC: índice de masa corporal

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible (o tipo 2)

kDa: kilodaltons

min: minutos

MDA: malondialdehído

Mn: manganeso

MPO: mieloperoxidasa

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosforilada

NBT: azul de nitrotetrazolio

nNOS: óxido nitrito sintasa neuronal (o tipo 1)

NOS: óxido nítrico sintasa

P: significación estadística

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

Post: toma de sangre 1h después del esfuerzo submáximo

Pre: toma de sangre antes del esfuerzo submáximo

PVDF: Polivinildenedifloride

RQ: cociente respiratorio

RFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

rpm: revoluciones por minuto

RT: transcripción inversa

s: segundo

Se: selenio

SNP: polimorfismo de nucleótido simple

SOD: superóxido dismutasa

SODCuZn: superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc

SODMn: superóxido dismutasa dependiente de manganeso (o SOD2)

SOD1: superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc citosólica

SOD3: superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc extracelular

SSA: ácido 5-sulfosalicílico

Thr: treonina

V: voltios

Val: valina

Vol: volumen

VO_2: consumo de oxígeno

VO_{2max}: consumo máximo de oxígeno

VV: valina/valina

W: vatios

Wmax: potencia máxima

XO: xantina oxidasa

γ-GCS: γ-glutamilcisteína sintetasa

Zn: zinc

8-OhdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

Índice de figuras

Figura 1: Interacciones de los radicales libres en el metabolismo humano 53

Figura 2: Producción de ATP 59

Figura 3: Dismutación del anión superóxido 61

Figura 4. Producción de peróxido de hidrógeno 61

Figura 5: Producción de radical hidroxilo 62

Figura 6: Reacción de producción de óxido nítrico 62

Figura 7: Reacción de producción de peroxinitrito 63

Figura 8: Formación de ácido hipocloroso 63

Figura 9: Singlete de oxígeno 64

Figura 10. Producción de radicales libres y acción del sistema antioxidante enzimático 72

Figura 11: Dismutación del anión superóxido por la superóxido dismutasa 72

Figura 12: Dismutación del peróxido de hidrógeno por la catalasa 74

Figura 13: Dismutación del peróxido de hidrógeno por la glutatión peroxidasa 75

Figura 14: Estructura secundaria de la proteína 81

Figura 15: Estructura química del glutatión 91

Figura 16: Ciclo del glutatión 93

Figura 17: Diseño del estudio 99

Figura 18: Contenido protéico de la SODMn para los distintos genotipos

diferencia significativa con AA post 136

Figura 19: Actividad enzimática de la SODMn para los disntitos genotipos. 137

$ diferencia significativa pre; # diferencia significativa con AA post

Índice de tablas

Tabla 1: Caracterización de la muestra. Valores medios ± E.E.M. 125

Tabla 2: Valores de VO_2 y $\%VO_{2max}$ alcanzados por los participantes durante el esfuerzo submáximo. Valores medios ± E.E.M. 126

Tabla 3: VO_2 en distintos momentos del esfuerzo submáximo. Valores medios ± E.E.M. 127

Tabla 4: Concentración de lactato en distintos momentos del esfuerzo submáximo. Valores medios ± E.E.M. 128

Tabla 5: RQ durante el esfuerzo submáximo. Valores medios ± E.E.M. 129

Tabla 6: valores de FCmedia y FCmax alcanzados durante el esfuerzo submáximo. Valores medios ± E.E.M. 129

Tabla 7: valores en porcentaje (%) de hematocrito antes y después del esfuerzo submáximo. Valores medios ± E.E.M. 130

Tabla 8: Estimación de las cantidades diarias de micro y macro nutrientes en la dieta. Valores medios ± E.E.M. 131

Tabla 9: Efecto del polimorfismo genetico Ala16Val del gen codificante de la SODMn en la concentración de GSHt en CMSP. Valores medios ± E.E.M. 132

Tabla 10: Efecto del polimorfismo genético Ala16Val del gen codificante de la SODMn en los contenidos de -SH en CMSP. Valores medios ± E.E.M. 133

Tabla 11: Efecto del polimorfismo genético Ala16Val del gen codificante de la SODMn en la expresión génica de ARNm de la 133

SODMn (%) en CMSP. Valores medios ± E.E.M.

Tabla 12: Efecto del polimorfismo genético del Ala16Val del gen codificante de la SODMn en el contenido protéico de SODMn (%) en CMPS. Valores medios ± E.E.M. 134

Tabla 13: Efecto del polimorfismo genético del Ala16Val del gen codificante de la SODMn en la actividad enzimática de la SODMn en CMPS. Valores medios ± E.E.M. 135

Índice de fotografías

Fotografía 1: Muestras de ADN nuclear. 116

Fotografía 2: Marcador de peso molecular, control negativo y producto de PCR. 118

Fotografía 3. Producto de PCR digerido. 120

Fotografía 4: SODMn (25 kDa) 136

Fotografía 5: β-actina (40 kDa) 136

Introducción

1 Introducción

En las últimas décadas investigadores de distintas áreas de la salud han dedicado especial atención a un fenómeno fisiológico presente en los organismos aeróbicos, conocido por *estrés oxidativo.* Éste fenómeno ha despertado la atención de los científicos por algunas características peculiares que a continuación explicaremos.

El oxígeno es una molécula vital para los organismos aeróbicos. Durante el proceso evolutivo, esta molécula jugó un papel fundamental debido a sus propiedades singulares que le permiten ser el aceptor final de electrones en la cadena respiratoria (Johnson, 2002). Sin la presencia del oxígeno los organismos vivos no habrían tenido la oportunidad de evolucionar a formas más complejas; la producción de energía sería menos eficiente y se reduciría, por lo que las necesidades biológicas de reproducción se quedarían afectadas. Sin embargo, los dos electrones desapareados que posee el oxígeno en su órbita más externa giran en el mismo sentido. Esa particular característica le convierte en un birradical – un potencial radical libre (Sen, 2001). Los radicales libres derivados del oxígeno se producen durante el metabolismo celular incluyendo la producción de energía en el organismo (Triantaphylidès y Havaux, 2009).

La importancia de los radicales libres está en el hecho de ejercer funciones fisiológicas o patológicas en los organismos aeróbicos. Están involucrados en la modulación de la transducción de señales y expresión génica, activación de receptores y factores de transcripción nuclear, acciones antimicrobianas y citotóxicas de las células del sistema inmune (neutrófilos y macrófagos) (Ji, 2007). Efectivamente, se considera a los radicales libres como uno de los principales componentes en la cascada de señalización de las respuestas inflamatorias, por la estimulación de las moléculas de adhesión y por la producción de moléculas quimiotáxicas (Frangogiannis, 2008).

Sin embargo, el incremento no controlado de estas moléculas en el organismo puede conducir a daño celular y tisular, como por ejemplo la

oxidación de componentes celulares tales como el ácido desoxirribonucleico (ADN) (Mena y cols., 2009) estrechando así su relación con las enfermedades degenerativas multifactoriales. Consecuentemente, los radicales libres producidos por el metabolismo celular normal, cuando no son controlados, pueden desencadenar procesos dañinos para el organismo (Alessio y cols., 2000). Por lo tanto, podemos deducir que estas moléculas están implicadas en ambos estados de salud y de enfermedad (Lamprecht y cols., 2004).

Considerando su importancia a nivel celular, el estrés oxidativo ha sido investigado exhaustivamente en las últimas tres décadas. Estudios desde diferentes áreas de la salud han aportado datos interesantes sobre éste fenómeno como el descubrimiento de algunas de las principales vías de producción de radicales libres (como la vía mitocondrial), lo que permitió establecer vínculos potenciales de dicho fenómeno con numerosas enfermedades. La asociación de los radicales libres con el daño en el proceso vital fue reconocida de manera pionera por Harman (1956), afirmando que el envejecimiento es un proceso que, en parte, se debe al daño tisular y celular causado por los radicales libres (Johnson, 2002).

Entre las enfermedades asociadas con el estrés oxidativo podemos destacar las cardíacas (Sam y cols., 2005), el cáncer (Hitchler y Domann, 2009) y las enfermedades degenerativas (Kadenbach y cols., 2009). La importancia en la etiología de estas enfermedades se puede ver ejemplificada a través de su papel en la oxidación de lipoproteínas de baja intensidad, considerado este proceso como una de las primeras etapas en el desarrollo de la aterosclerosis (Singh y Jialal, 2006). El daño oxidativo del ADN también puede actuar en el desarrollo de otros procesos patológicos como es la carcinogénesis (Kawanishi y cols., 2002).

Estas evidencias sugieren que un equilibrio adecuado entre agentes prooxidantes y antioxidantes es fundamental para el mantenimiento de la salud (Elosua y cols., 2003). Además, un desequilibrio prooxidante puede resultar en respuestas patológicas, llevando a desordenes funcionales importantes y sus

enfermedades asociadas (Watson y cols., 2005), como acabamos de apuntar en el anterior párrafo.

Sin embargo, muchas de las causas y/o consecuencias de estas enfermedades y su asociación con el estrés oxidativo están todavía por aclararse. Actualmente, se están investigando los posibles mecanismos moleculares que puedan establecer esa asociación. Un ejemplo es la investigación acerca de los efectos e implicaciones que los genes pueden tener en el desarrollo y defensa frente a los radicales libres. En la misma línea, estudios epidemiológicos y experimentales están intentando establecer relaciones entre la producción de estrés oxidativo y las interferencias que algunos genes puedan tener sobre ello. La Figura 1 sintetiza las relaciones metabólicas más importantes

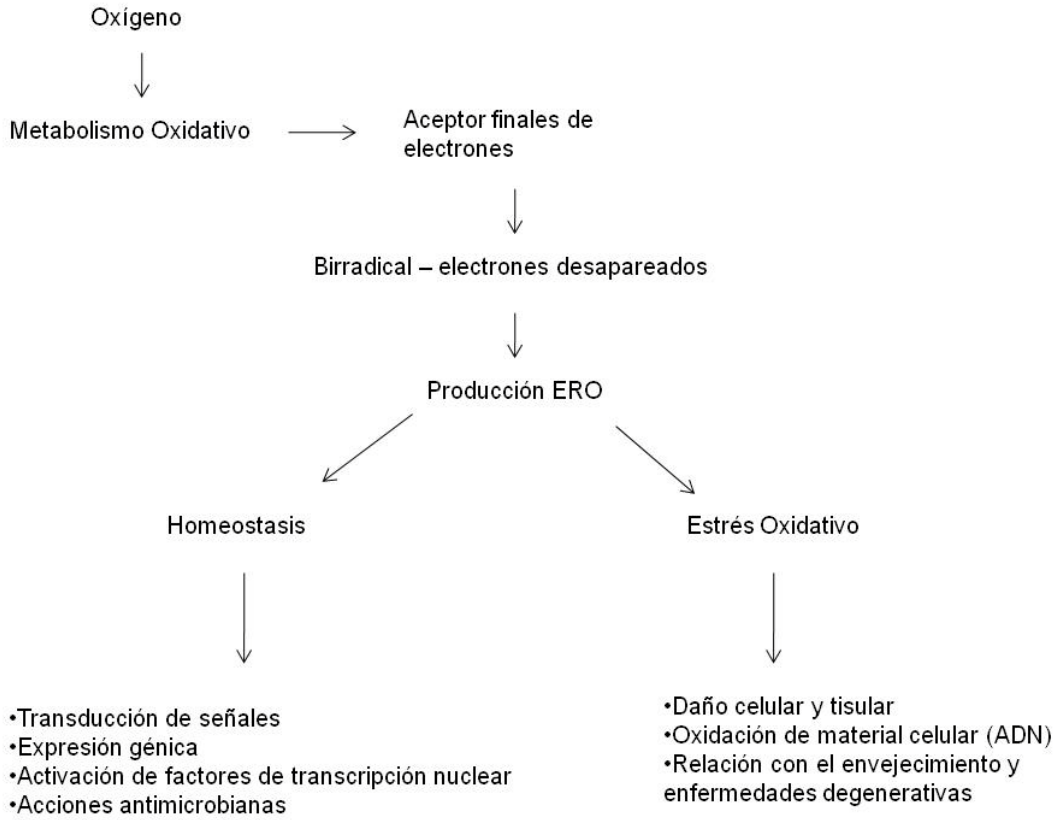


Figura 1: Interacciones de los radicales libres en el metabolismo humano.

También debemos señalar la importancia de la regulación del aporte y consumo de energía corporal y su capacidad para afectar directamente el equilibrio oxidativo. Es lógico pensar que la realización de la actividad física requiere más aporte de energía y consecuentemente de oxígeno al organismo, convirtiendo al ejercicio físico en un proceso potencialmente peligroso para el organismo. Efectivamente, numerosos estudios han demostrado que el ejercicio físico está asociado con la producción de radicales libres (Ji, 1995; Jackson, 1999; Powers y cols., 1999; Leeuwenburgh y Heinecke, 2001; Johnson, 2002; Urso y Clarkson, 2003; Lamprecht y cols., 2004; Goldfarb y cols., 2005; Vollaard y cols., 2005; Sachdev y Davies, 2008).

El ejercicio físico intenso y/o no habitual puede aumentar la producción de radicales libres, produciendo estrés oxidativo (Bloomer, 2008; Di Francescomarino y cols., 2009; Gómez-Cabrera y cols., 2009; Mergener y cols., 2009). Sin embargo, se ha descubierto que el ejercicio físico moderado puede aumentar las defensas antioxidantes (Gómez-Cabrera y cols., 2008; Romani y cols., 2009; Ghosh y cols., 2009; de Meirelles y cols., 2009). Todo ello permite una modulación fisiológica equilibrada que parece estimular/auxiliar el mantenimiento de la homeostasis del organismo (Brigelius-Flohé, 2009). Además, se ha visto que el ejercicio físico moderado produce menos estrés oxidativo que el ejercicio físico intenso (Seifi-Skishahr y cols., 2008).

Es decir, que la regulación de la producción de radicales libres depende tanto de factores intrínsecos, como de factores extrínsecos (McEligot y cols., 2005), entre los que podríamos incluir el ejercicio físico.

Desafortunadamente, hasta el momento no se ha estudiado de modo satisfactorio la posible relación que puedan tener estrés oxidativo, factores genéticos y ejercicio físico. Quizás este menor número de investigaciones esté directamente relacionada con la falta de métodos apropiados para la realización de ese tipo de estudios hasta la década de 90, cuando las herramientas de la biología molecular se popularizaron. Desde nuestro punto de vista, es de relevancia científica el profundizar en ese tema con la realización de estudios

sobre los posibles efectos que el ejercicio físico y los genes puedan tener en la producción de radicales libres. Por estos motivos, creemos que estudios complementarios con ejercicio físico y factores genéticos nos podrían esclarecer muchas de las cuestiones que todavía están por aclarar en el ámbito de la producción de radicales libres. Por lo tanto, considerando las posibles limitaciones metodológicas que pueda presentar, éste estudio pretende contribuir al conocimiento de la interrelación existente entre el ejercicio físico-genes con los procesos de modulación orgánica del estrés oxidativo.

2 Estrés Oxidativo

Hace 2 o 3 mil millones de años la concentración de oxígeno se incrementó de modo importante en la atmósfera terrestre a través de la evolución de los organismos fotosintéticos liberadores de oxígeno. En un período de varios millones de años, el contenido de oxígeno del aire atmosférico fue incrementándose hasta alcanzar aproximadamente el 21% de las moléculas presentes en la atmósfera. Este cambio a un ambiente con mayor concentración de oxígeno, dada su toxicidad, produjo una evolución selectiva de los organismos consumidores de oxígeno y resistentes a su toxicidad. Los organismos aeróbicos, desde las procariotas hasta las eucariotas desarrollaron elaboradas secuencias de mecanismos adaptados para regular la homeostasis del oxígeno (Beckman y Ames, 1998). Ese proceso desencadenó la evolución de los organismos multicelulares complejos y de reproducción sexuada. Es decir, que la concentración de oxígeno de la atmósfera conlleva a la paradoja del oxígeno: el oxígeno es esencial para el organismo pero a la vez dañino para las formas de vida aeróbicas (Jenkins, 2000).

Considerando su importante función en la producción de energía, el oxígeno desempeña un destacado papel entre las moléculas determinantes de la actividad física. En un primer abordaje, se consideraba su importancia en la adquisición, transporte y utilización por los distintos sistemas. Pero hoy en día sabemos que el oxígeno interviene en otras reacciones orgánicas importantes. El proceso de oxidación biológica utiliza los substratos energéticos y proporciona al organismo aeróbico energía para mantener la vida y realizar las funciones orgánicas vitales. Sin embargo, ese proceso no representa una reacción directa del oxígeno molecular con el substrato, sino una transferencia de electrones mediada por varios sistemas enzimáticos, en la que el oxígeno juega un papel fundamental como aceptor final de electrones (Nelson y Cox, 2005).

El proceso de reducción del oxígeno es complejo debido a que esta molécula posee dos electrones desapareados en su órbita más externa. Para ser reducido en una sola reacción serían necesarios dos electrones órbitando en

dirección opuesta con respeto a la valencia de los electrones del oxígeno. Aún así, deberían orbitar en la misma dirección uno respecto del otro para poder entrar de manera simultánea en la órbita atómica más externa del oxígeno. Sin embargo, eso es imposible según el principio de exclusión de Pauli (dos fermiones no pueden ocupar el mismo estado cuántico simultáneamente). Por lo tanto, la única manera de hacerlo es mediante la reducción univalente del oxígeno (Sen, 2001).

Debido a esa reacción, los intermediarios en el proceso de reducción del oxígeno son conocidos como "radicales libres" - moléculas que contienen un electrón desapareado - radical - y que son capaces de sobrevivir de manera independiente - libre - (Sen, 2001). Los radicales libres son también conocidos como especies reactivas de oxígeno (EROs) o especies reactivas de nitrógeno (ERNs).

La existencia de radicales libres en los tejidos bilógicos se descubrió hace aproximadamente 50 años (Commoner y cols., 1954). Posteriormente, Harman sugirió la hipótesis de que los radicales de oxígeno se formaban como productos de desecho de actividades enzimáticas *in vivo* (Harman, 1956). Años más tarde el própio Harman describiría los radicales libres como la *"Caja de Pandora"* debido a su implicación en el daño celular, mutagénesis, cáncer y en el proceso degenerativo del envejecimiento (Harman, 1981).

El exceso de EROs en el organismo humano puede desencadenar procesos dañinos en diversos tejidos. El *Estrés Oxidativo* ocurre cuando se produce un desequilibrio entre la producción de EROs y la eficiencia de los sistemas antioxidantes celulares, induciendo alteraciones en el estatus redox que pueden contribuir a disfunciones endoteliales y/o muerte celular (Iuchi y cols., 2003; Madamanchi y Runge, 2007). En términos químicos, el estrés oxidativo es un aumento significativo en el potencial reductor celular o una disminución en la capacidad reductora de las defensas antioxidantes celulares como tales el glutatión (Schafer y Buettner, 2001).

Los efectos del estrés oxidativo dependerán de la magnitud de las alteraciones en el estado redox celular. Las células del organismo son capaces de mantener estable el estatus redox a niveles moderados de producción de radicales libres, pero cuando las defensas antioxidantes no son suficientes para ello se desarrollan procesos muchas veces dañinos para el organismo, es decir, estrés oxidativo (Margaritis y Rousseau, 2008). Como veremos a lo largo de estos antecedentes, las alteraciones en el estado redox pueden provocar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres, que pueden dañar diferentes componentes celulares, muchas veces de manera irreversible.

Una de las principales fuentes de producción de radicales libres en el organismo es la mitocondria (Judge y Leeuwenburgh, 2007; López-Lluch y cols., 2008). Esta vía de producción de EROs ocurre a través de la pérdida de átomos de oxígeno activados durante la *Fosforilación Oxidativa* (FO) en la C*adena Transportadora de Electrones* de la mitocondria (CTE) como veremos a continuación. Paradójicamente, la mitocondria es el orgánulo celular de producción de energía para el mantenimiento biológico. Por lo tanto, para que entendamos mejor estas relaciones se hace necesario revisar el proceso de producción de energía en la mitocondria.

2.1 Papel de la mitocondria en la producción de energía

La producción de EROs en la mitocondria y la acumulación de daños ocasionados por esas sustancias a las biomoléculas a lo largo de la vida, reduce la capacidad fisiológica de gran parte de los sistemas: cardiovascular, respiratorio, metabólico y neuromuscular (Pansarasa y cols., 2002). Daños en estos sistemas orgánicos harían al individuo más susceptible a enfermedades crónicas como las cardiovasculares, neurodegenerativas y neoplásicas (Ambrosone y cols., 1999).

En la mitocondria se produce gran parte de la energía celular. Esa energía se produce en forma de adenosina-trifosfato (ATP) a través de la FO que implica usar el oxígeno disponible en la producción ATP. Ese proceso ocurre en la membrana interna de la mitocondria a través de la utilización de hidrógenos

obtenidos en diferentes pasos de las reacciones catabólicas de los carbohidratos y de las grasas, principalmente. Los electrones liberados en las vías catabólicas de los hidratos de carbono o de los ácidos grasos, captados por la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y flavina-adenina dinucleótido (FADH), actúan como lanzadores de estos electrones en la CTE, localizada en la membrana interna mitocondrial. Esto crea un gradiente electroquímico a lo largo de la membrana interna. Cuando disminuyen los niveles de ATP los protones vuelve a entrar en la matriz a través de la ATP sintasa y la energía liberada en esta reacción es la responsable de la síntesis de ATP (Fromenty y Pessayre, 1995; Pessayre, 2007). La producción de agua (H_2O) y ATP ocurre a través de una reacción de reducción tetravalente de utilización de oxígeno. La fosforilación puede ser resumida en dos reacciones parciales, como describe la Figura 2 (Brooks y cols., 2005):

$$2H^+ + PO_4^{3-} \longrightarrow H_2O + PO_{3-}^{5}$$

$$PO_{3-}^{5} + ADP^{3-} \longrightarrow ATP^{4-}$$

Figura 2: Producción de ATP.

Sin embargo, durante este proceso una pequeña cantidad de oxígeno disponible (del 2 al 4%) sufre una reducción univalente, formando un subproducto denominado superóxido (O_2^-) (Sachdev y Davies, 2008). El radical O_2^- es una EROs y es la primera forma de EROs producida por esa ruta (Ambrosone y cols., 1999). Además de la respiración celular, las EROs también pueden ser producidas por la autooxidación de la catecolaminas, la activación de células del sistema inmune, por isquemia y/o el daño producido por la hipoxia/reoxigenación (Sachdev y Davies, 2008). También existen fuentes externas o ambientales de formación de EROs que incluyen radiación, agentes químicos citotóxicos y drogas.

Las EROs pueden ser un átomo o una molécula que posee un electrón desapareado en su órbita más externa, tornándose extremadamente inestables y reactivas (Ambrosone y cols*.,* 1999; Sen y cols., 2000). De este modo, las EROs reaccionan con otros átomos o moléculas a través de reacciones de oxido-reducción que a su vez desencadenan un proceso en cascada, resultando en la producción de nuevas EROs. Las EROs también pueden interaccionar con biomoléculas tales como proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucléicos (principalmente ADN), membranas citoplasmáticas y orgánulos (Ambrossone y cols., 1999; Russell y cols., 2005; Gómez-Cabrera y cols., 2006; Ikeda y cols., 2006; Ji y cols., 2006).

Entre las EROs más frecuentes están el radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), el anión o radical superóxido (O_2^{-}), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el óxido nítrico (NO), los peroxinitritos ($ONOO^{-}$), moléculas singlete de oxígeno ($^1O_2$), el ácido hipocloroso (HOCl) y, este último también considerado una ERO, a pesar de no poseer electrón despareado en su última órbita, como el H_2O_2 . A continuación describiremos la principales EROs.

2.2 Especies reactivas de oxígeno

2.2.1 Anión superóxido (O_2^{-})

El anión O_2^{-} se produce en primer lugar como intermediario de algunas reacciones bioquímicas, posee carga negativa y es relativamente impermeable a las membranas celulares. Sin embargo, comparado con otros radicales libres, tiene una vida media relativamente larga, lo que permite su difusión hacia el interior de las células, aumentando, de esta manera, los posibles efectos deletéreos que pueda producir en los orgánulos celulares.

Aunque la reactividad del O_2^{-} se considera baja cuando se compara con otros radicales libres, éste puede reaccionar rápidamente con otros radicales como pueden ser el NO y formar compuestos altamente reactivos (Powers y Jackson, 2008). El O_2^{-} puede tanto reducir moléculas biológicas, por ejemplo el citocromo C, como oxidar otros materiales biológicos, por ejemplo el ácido

ascórbico (vitamina C). Además, se sabe que las células del sistema inflamatorio producen grandes cantidades de O_2^- para la defensa del organismo frente a agentes invasores (Powers y Jackson, 2008).

Figura 3: Dismutación del anión superóxido

2.2.2 Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

El H_2O_2 es relativamente estable, permeable a las membranas celulares y posee una vida media relativamente larga. A pesar de ser una ERO se le considera un agente citotóxico poco oxidativo. Debido a su débil capacidad oxidativa el H_2O_2 no es capaz de oxidar directamente ácidos nucléicos (ADN) ni tampoco lípidos, pero sí puede inactivar algunas enzimas. Además, puede producir rápidamente radicales libres, como el NO·, en circunstancias específicas.

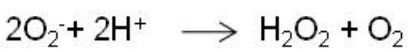


Figura 4. Producción de peróxido de hidrógeno

La citotoxicidad del H_2O_2 reside principalmente en su capacidad de producir radicales OH· a través de reacciones con metales de transición, como la reacción de Fenton (Leeuwenburgh y Heinecke, 2001).

2.2.3 Radical hidroxilo (OH·)

Los radicales OH· son altamente reactivos y poseen gran capacidad oxidante. Estos radicales dañan moléculas vecinas a su sitio de producción y

debido a su gran reactividad no son permeables a las membranas. Se consideran los radicales libres más potentes presentes en el organismo y su reactividad es tan grande que se puede comprobar su existencia solamente a través del análisis específico de sus productos de reacción (Powers y Jackson, 2008).

Figura 5: Producción de radical hidroxilo

2.2.4 Óxido nítrico (NO·)

El NO· se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina en distintos tipos celulares. Su síntesis ocurre a través de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) que se presenta en tres isoformas distintas: la NOS neuronal (nNOS o tipo 1), la NOS endotelial (eNOS o tipo 3) y la NOS inducible (iNOS o tipo 2). Los distintos tipos de NOS convierten la L-arginina en NO· y L-citrulina usando, para ello, NADPH. El NO· se une rápidamente a metales de transición y entre sus principales acciones en la célula está la de asociarse al grupo hemo de la enzima guanilato ciclasa, activándola y resultando en la producción de guanosín monofosfato cíclico (cGMP). El NO· es un agente reductor débil y reacciona rápidamente con el O_2 para formar dióxido nítrico y con O_2^- para formar el peroxinitrito ($ONOO^-$) (Powers y Jackson, 2008).

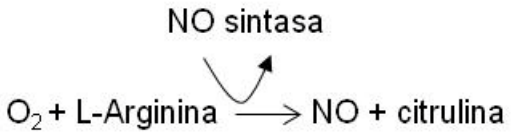


Figura 6: Reacción de producción de óxido nítrico

2.2.5 Peroxinitrito ($ONOO^-$)

La reacción del O_2^- con el NO· para sintetizar $ONOO^-$ ocurre, aproximadamente, tres veces más rápido que la dismutación del O_2^- a H_2O_2 y todavía más rápido que la reacción del NO· con hemoproteínas.

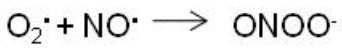


Figura 7: Reacción de producción de peroxinitrito

El $ONOO^-$ es un potente agente oxidante y puede llevar a la depleción de grupos tioles, a producir daños al ADN y a nitrosar proteínas. Además, el $ONOO^-$ disminuye la biodisponibilidad de O_2^- y NO· (Powers y Jackson, 2008).

2.2.6 Ácido hipocloroso (HClO)

En la producción de HClO está implicada directamente la mieloperoxidasa (MPO), una enzima del sistema inmune que se encuentra principalmente en los neutrófilos. La MPO utiliza el H_2O_2 resultante de la dismutación del O_2^- para formar HOCl.

Figura 8: Formación de ácido hipocloroso

Los neutrófilos son la principal fuente de producción de HClO. Este radical libre puede dañar diversas moléculas a través de su acción oxidante sobre tioles, lípidos, ascorbato y NADPH, produciendo muchos subproductos (Powers y Jackson, 2008).

2.2.7 Singlete de oxígeno ($^1O_2$)

El $^1O_2$ es otra forma reactiva del oxígeno. Éste se produce en tejidos biológicos y se caracteriza por su corta vida media, además de ser permeable a las membranas celulares. El $^1O_2$ es un estado de excitación del oxígeno molecular y no se engloba como un radical libre propiamente dicho al no poseer electrones despareados en su órbita más externa. Sin embargo, al haberse eliminado la restricción cinética que supone tener dos electrones desapareados con giros paralelos, su reactividad se incrementa de manera significativa. La dismutación del anión O_2^- en agua puede conllevar a la formación del $^1O_2$ (Powers y Jackson, 2008).

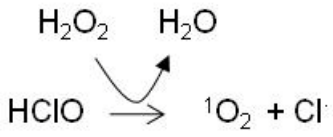


Figura 9: Singlete de oxígeno

2.3 Las especies reactivas de oxígeno y sus acciones en el organismo

Las EROs tienen importantes funciones fisiológicas pero, como ya hemos comentado anteriormente, también pueden ser deletéreas para el organismo. Un contenido bajo de EROs así como la presencia de determinadas especies de EROs, tales como el O_2^- y el NO·, son indispensables en muchos procesos bioquímicos, incluyendo señalización intracelular, diferenciación y progresión celular o la detención del crecimiento celular, apoptosis, inmunidad y defensa contra microorganismos, y modulación del sistema vascular (Zhong y cols., 1997; Matés y cols., 1999; Kannan y Jain, 2000; Landmesser y Harrison, 2001).

No obstante, elevadas concentraciones de EROs y de determinadas especies reactivas pueden ser extremadamente perjudiciales para el organismo.

Un ejemplo es el OH·, que parece ser la forma más nociva de EROs, más reactivo incluso que el O_2^-. Las reacciones de producción del OH· son raras y se ven facilitadas por la existencia de metales de transición tales como el cobre y el hierro. En vertebrados, la formación de OH· a partir de H_2O_2 puede ser catalizada por el hierro derivado de la ferritina, hemoglobina o mioglobina, a través de una reacción no enzimática conocida como *Fenton y Haber-Weiss.* La vida media del OH· es corta debido a su naturaleza altamente reactiva. De esta manera, en condiciones fisiológicas sólo se encuentra en concentraciones muy bajas en las células del organismo humano (Richter y cols., 1995).

El daño provocado en el organismo por las EROs, ocurre cuando se produce una alteración en la homeostasis entre los mecanismos de actividad prooxidante y los antioxidantes (Kannan y Jain, 2000). Este desequilibrio lleva a una mayor interacción de las EROs con moléculas biológicas esenciales, ocasionandose así alteraciones metabólicas perjudiciales y acumulativas (Ambrosone y cols,. 1999; Pansarasa y cols., 1999). Sin embargo, para comprender mejor este importante fenómeno es necesario entender la acción de las EROs sobre las moléculas y como van a reaccionar los mecanismos de defensa y reparación contra el estrés oxidativo.

2.3.1 Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es un proceso fisiológico que se da en las membranas celulares. Además, es una importante etapa en la biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos, así como en los procesos de fagocitosis, pinocitosis y digestión de dichas membranas. La peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados se produce como consecuencia de un debilitamiento de los dobles enlaces, formación de dienos conjugados (-C=C-C=C-), reacción con oxígeno, formación de un radical peroxi (R-OO) y sustracción del hidrógeno de una molécula lipídica a partir de una reacción en cadena. Teniendo en cuenta que las células no poseen mecanismos capaces de utilizar los productos finales de este proceso, se considera la peroxidación lipidica un fenómeno irreversible (Milei y cols., 2007). La incapacidad de reaprovechar estos productos puede

generar efectos acumulativos. Los efectos de la peroxidación lipídica sobre las membranas celulares están clasificados en, por lo menos, cuatro grupos: a) cambios en el ambiente lipídico de enzimas asociadas a la membrana, canales iónicos y receptores, activando o inhibiendo la actividad de estas proteínas (García y cols., 1997); b) formación de nuevos canales de permeabilidad celular (Hennig y Chow, 1988); c) formación de uniones cruzadas entre proteínas y fosfolípidos, con inactivación proteica irreversible (Toborek y cols., 1992) y d) oxidación de grupos sulfidrilos (-SH) en los sitios activos de las enzimas integradas en la membrana, ocasionando la pérdida de sus propiedades funcionales (Nishida y cols., 1998). Además, dependiendo de la intensidad de acción de las EROs, también se observa la pérdida de fluidez y la inhibición de la función secretora de las membranas citoplasmáticas. El daño ocasionado a las membranas de orgánulos celulares como los lisosomas permite, a su vez, la liberación de fosfolipasas y otras enzimas que aceleran la degradación de las membranas. Finalmente, el aumento en la permeabilidad acelera el daño a la membrana, pues permite la entrada de iones calcio en el interior de la célula, aumentando la actividad de las fosfolipasas y generando un ciclo retroalimentable (García y cols., 2005).

2.3.2 Oxidación y glucosilación de proteínas y enzimas

La acción de las EROs sobre las enzimas y proteínas estructurales, reguladoras, transportadoras y receptoras puede llevar a la oxidación de grupos tales como -SH, metionina y aminoácidos residuales, además de la introducción de grupos carbonilos, lo que afecta a la estructura, función y actividad de estas moléculas (Linton y cols., 2001; Levine y Stadtman, 2001). Algunos de estos grupos como el -SH se oxidan fácilmente y los daños oxidativos son irreversibles, de forma similar a lo que ocurre con los lípidos (Thomas y Mallis, 2001).

La acción de las EROs sobre las proteínas puede conducir a la formación de cruzamientos, agregados protéicos o desnaturalización, pudiendo también causar daños en cascada (Squier, 2001). La influencia de este proceso puede

extenderse sobre las enzimas inhibidoras de proteasas y producir su inactivación lo que, a su vez, puede ocasionar alteraciones fisiológicas importantes. En otros casos, moléculas potentes, tales como la colagenasa, pueden ser activadas por la presencia de EROs. Estas moléculas pueden exacerbar los daños histológicos, llevando a la pérdida o alteración de su función. Además, es importante resaltar que la pérdida de proteínas que forman parte de los canales iónicos de las membranas puede llevar a la inactivación celular por desequilibrio iónico incluso antes de que daños mayores ocurran en las demás proteínas (Hitschke y cols., 1994).

2.3.3 Interrupción del flujo iónico y rotura de pasos metabólicos

La coenzima NADH transporta metabólicamente gran parte de la energía química en forma reducida. La captación de electrones por las EROs, interfiere con el proceso de oxidación del NADH al estado NAD^+, impidiendo que el NADH pueda ser utilizado en diversas tareas de mantenimiento, tales como la defensa antioxidante y procesos de síntesis, entre ellos la propia síntesis de ATP (Smith y cols*.,* 1979). Así, la acción de las EROs sobre estas moléculas transportadoras, que actúan a nivel basal en el organismo, puede ser crucial para el metabolismo.

2.3.4 Oxidación del material genético nuclear y mitocondrial

La acción de las EROs sobre la molécula de ADN y sobre la regulación de los genes también tiene especial trascendencia. La expresión génica está modulada, en general, por estímulos fisiológicos y ambientales, y se cree que el estrés oxidativo actúa como modulador pleiotrópico en ambos casos (Kannan y Jain, 2000). En condiciones controladas se ha descrito que diversas EROs, en concentraciones controladas, desempeñan un papel fundamental en los procesos bioquímicos relacionados con los factores de crecimiento y las citoquinas (Matés y cols*.,* 1999). Estudios adicionales demuestran que las EROs podrían también modular muchos factores de transcripción (Jackson y cols., 1998; Janssen-Heininger y cols., 2000).

El ADN puede sufrir daños por acción directa de las EROs, principalmente debido al H_2O_2 y el OH·, o también pueden existir fallos en sus mecanismos de reparación. Todo ello puede conducir a la acumulacuión de mutaciones. La presencia de nucleótidos modificados y rupturas en las hebras de ADN son algunos de los posibles perjuicios ocasionados por las EROs al ADN (Chatgilialoglu y O´Neill, 2001). El daño de mayor entidad tiene lugar en el punto de unión de las pirimidinas a la desoxirribosa, generando la ruptura del enlace azúcar-fosfato y liberándose así las bases de los nucleótidos (Halliwell y Gutteridge, 1999). Además, a pesar de que la mayoría de esas lesiones causadas al ADN por las EROs sean de simple y fácil corrección, múltiples lesiones en nucleótidos cercanos (lesiones tándem) parecen desafiar la maquinaria de reparación del ADN (Chatgilialoglu y O´Neill, 2001). Según estos autores (2001) dichas lesiones serían sólo débilmente reparadas, llevando, a largo plazo, a una acumulación de cambios genéticos deletéreos. Por tanto, esta acción de las EROs sobre el ADN puede desarrollar procesos carcinogénicos.

El daño causado por las EROs al ADN mitocondrial es otro tema de mucha importancia. La mitocondria posee su propio ADN y produce ácidos ribonucleicos (ARNs) específicos que, a su vez, son necesarios para el funcionamiento de dicho orgánulo. Algunos estudios demostraron que los ARNs mitocondriales sufren degradación a través de la acción de las EROs (Crawford y cols., 1998). Cuando se compara el ADN genómico con el ADN mitocondrial, se observa que éste último es mucho más sensible al daño oxidativo. El ADN mitocondrial no presenta maquinaria enzimática de reparación y, además, la mitocondria es el sitio de mayor producción intracelular de EROs vía metabolismo aeróbico. Otras evidencias sugieren que la acumulación de daños oxidativos en la mitocondria y en el ADN mitocondrial, a lo largo de la vida, pueden aumentar la tasa de mutación llevando a un progresivo declive en la función energética y un incremento en la disfunción celular (Crawford y cols., 1998).

Finalmente, considerando la totalidad de las acciones de las EROs en el organismo podemos notar que resulta importante el desarrollo de una

maquinaria antioxidante endógena, así como la absorción de moléculas antioxidantes en la dieta que auxilien a la maquinaria antioxidante. En éste estudio enfocaremos principalmente la maquinaria antioxidante endógena por estar directamente influenciada por la genética del individuo.

2.4 Mecanismos de defensa antioxidante y reparación del estrés oxidativo

Debido a la elevada reactividad de las EROs y su papel en el daño a las membranas y macromoléculas célulares, el organismo cuenta con mecanismos enzimáticos y no enzimáticos de defensa antioxidante y reparación de los daños producidos por las EROs. Estos mecanismos garantizan la integridad del genoma y la homeostasis corporal (Portakal y cols*.,* 2000; Chatgilialoglu y O´Neill, 2001).

2.4.1 Sistemas antioxidantes no enzimáticos

El sistema antioxidante no enzimático está compuesto por una gran variedad de moléculas antioxidantes como retinol, ácido ascórbico, tocoferol, flavonoides, tioles, ubiquinona (Coenzima Q10), ácido úrico, bilirrubina, ferritina y determinados micronutrientes (Finaud y cols., 2006). A continuación procederemos a estudiar las principales acciones antioxidantes de cada una de esas moléculas.

Retinol (vitamina A)

El β-caroteno desactiva algunas especies de EROs, especialmente el $^1O_2$ y radicales lípidicos (Beckman y Ames, 1997).

Ácido ascórbico (vitamina C)

La vitamina C tiene dos papeles fundamentales como antioxidante. Por una parte, puede neutralizar directamente los radicales O_2^-, OH· e hidroperóxidos lipídicos y, por otra, juega un papel fundamental en la resíntesis del tocoferol (Sen y cols., 2000).

Tocoferol (vitamina E)

La vitamina E desempeña una función importante a la hora de convertir O_2^-, OH· y radicales lipoperoxídicos en especies menos reactivas (Sen y cols., 2000).

Flavonoides

Actuán en la inhibición de enzimas prooxidantes. También pueden atrapar determinadas EROs a través de donación de iones H^+ (Finaud y cols., 2006).

Ubiquinona (Coenzima Q10)

La ubiquinona posee una acción antioxidante directa sobre radicales peroxilo e indirecta sobre la resíntesis de las vitaminas C y E (Crane, 2001).

Ácido úrico

Actúa como importante neutralizador de OH· a nivel intra y extracelular (Sen y cols., 2000).

Bilirrubina

Evita la lipoperoxidación de los ácidos grasos unidos a la albúmina en condiciones de baja tensión de O_2 (Sen y cols., 2000).

Ferritina

La ferritina minimiza el estrés oxidativo capturando hierro en la sangre y en las células, evitando así la producción de EROs vía la *reacción de Fenton* (Arosio y Levi, 2002).

Micronutrientes (Elementos traza)

Actúan principalmente como cofactores de las enzimas del sistema antioxidante enzimático, el cual será discutido en el próximo apartado. La isoforma mitocondrial de la superóxido dismutasa (SOD), enzima del sistema antioxidante enzimático, necesita manganeso (Mn) para realizar sus actividades catalíticas (Speich y cols., 2001). El cobre (Cu) es necesario para la correcta utilización del hierro y también en procesos de protección celular contra el estrés oxidativo a través de la activación de dos isoformas de la SOD. Por su parte, el zinc (Zn) protege el organismo gracias a la activación de las mismas isoformas de la SOD que son activadas por el Cu (Lukaski, 1995).

Tioles

Los tioles están distribuidos de manera aleatoria en las formas de vida aeróbicas y presentan distintas funciones, incluyendo un papel antioxidante fundamental. Son una clase de sulfuros orgánicos caracterizados por la presencia de residuos de -SH en su sitio activo. Químicamente los tioles son mercaptanos (C-SH) y estas moléculas se denominan comúnmente biotioles, los cuales pueden ser clasificados en tioles protéicos de gran peso molecular o bien tioles libres, de bajo peso molecular. Los agentes reductores como los tioles poseen potenciales de reducción negativos y, por lo tanto, actúan como receptores inmediatos de electrones. De esta manera, cuando ocurre una interacción “agente oxidante-tiol”, se neutraliza el oxidante convirtiéndolo en un desecho metabólico menos tóxico a expensas de la capacidad reductora del tiol, que se oxida, a su vez, y se convierte en un disulfuro (C-S-S-C) (Sen y Packer, 2000).

2.4.2 Sistemas antioxidantes enzimáticos

El sistema antioxidante enzimático está compuesto por moléculas como coenzimas donadoras de hidrógeno y por enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT), todas ellas extremadamente necesarias para la homeostasis celular (Portakal y cols., 2000).

En la Figura 10 se puede apreciar la acción final de las principales enzimas antioxidantes.

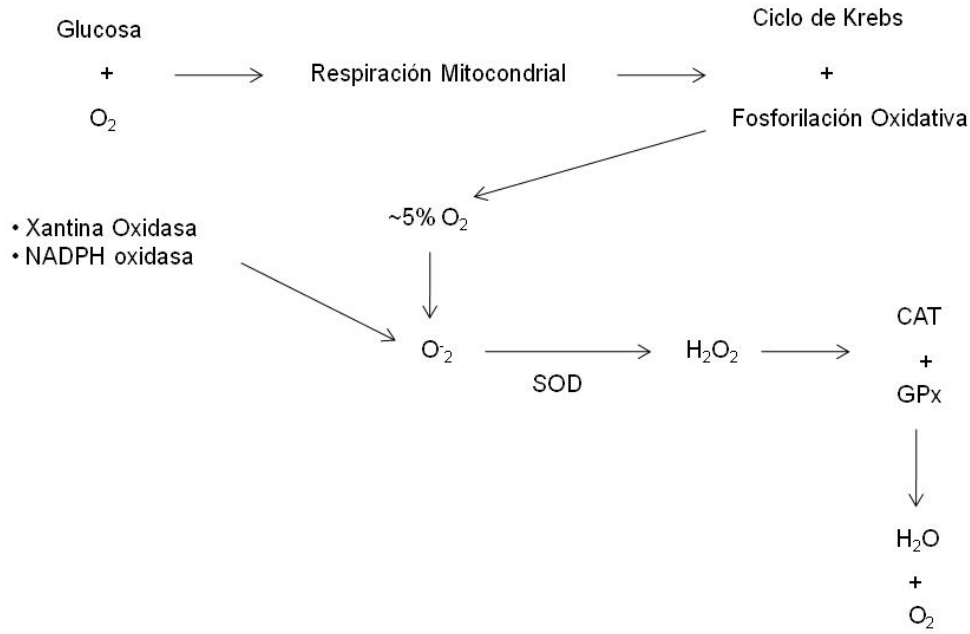


Figura 10. Producción de radicales libres y acción del sistema antioxidante enzimático

2.4.2.1 Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa (SOD) es la primera enzima antioxidante en la línea de defensa del organismo contra las EROs ya que cataliza la dismutación del altamente reactivo anión O_2^- a oxígeno y H_2O_2, siendo el último meno reactivo. La producción de estas dos EROs evita la formación del potente radical OH·.

$$O_2^- \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Figura 11: Dismutación del anión superóxido por la superóxido dismutasa

En humanos se han descrito tres isoformas de la SOD: 1) SOD citosólica dependiente de cobre y zinc (SODCuZn o SOD1), 2) SOD mitocondrial dependiente de manganeso (SODMn o SOD2) y 3) SOD extracelular dependiente de cobre y zinc (SODCuZn o SOD3). Cada isoforma de la SOD necesita un metal de transición redox activo en su sitio activo para poder catalizar la dismutación del O_2^-, de ahí la importancia de los micronutrientes en la dieta (Culotta y cols., 2006).

La SOD1 necesita de cobre y zinc como cofactores para actuar frente a las EROs. Esta enzima se encuentra en el citosol, núcleo, peroxisomas, y en el espacio intermembrana de la mitocondria (Quin y cols., 2008). La SOD1 es de fundamental importancia en la maquinaria antioxidante del organismo ya que se ha observado que mutaciones en su gen pueden llevar a la apoptosis de neuronas de la médula espinal, resultando en esclerosis lateral amiotrófica (Fridovich, 1995). De la misma manera, la SOD3 también necesita de cobre y zinc como cofactores para su activación redox. Producida por las células de la musculatura lisa vascular y segregadas en el espacio extracelular, la SOD3 tiene como principales funciones la producción de NO· y evitar la inactivación de las enzimas endoteliales mediada por los radicales O_2^- (Strålin y cols., 1995; Culotta y cols., 2006). La SOD3 está presente, en concentraciones elevadas, en los vasos sanguíneos, corazón, pulmones, riñones, placenta y fluidos extracelulares (Quin y cols., 2008). Además, estudios previos han atribuido un papel fundamental de la SOD3 en enfermedades neurológicas, pulmonares y artríticas (Nozik-Grayck y cols., 2005).

A diferencia de las dos anteriores, la SODMn necesita manganeso como cofactor para poder realizar sus actividades antioxidantes. La SODMn es la única isoforma de la familia de las SODs presente en la matriz mitocondrial, por lo que su ausencia está asociada con importantes consecuencias en relación a la supervivencia del organismo (Strassburguer y cols., 2005). Considerando su localización, esta isoforma de la SOD ha ganado mucha importancia, ya que la mitocondria es el sitio de mayor producción de radicales libres. De esta manera, la SODMn adquiere gran protagonismo en el sistema antioxidante siendo

considerada la primera enzima de defensa antioxidante en el organismo. De hecho, se ha visto que la mutación homocigótica nula en el gen ($SODMn^{-/-}$) es letal, mientras que ratones *knockout* para los genes que codifican para la SODCuZn y la GPx no presentaron mayores modificaciones (Lebowitz y cols., 1996). Al mismo tiempo, ratones *knockout* para el gen de la SODMn mostraron daños severos en la mitocondria, como disminución en los contenidos celulares de glutatión, aumento de carbonilos protéicos, incremento en la concentración de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OhdG) y disminución en el control de la respiración (Willians y cols., 1998; van Remmen y cols., 2001). De esta manera, los ratones *knockout* no sobreviven hasta la edad adulta, muriéndose prematuramente justo después de su nacimiento. Por lo tanto, la SODMn juega un papel fundamental no sólo en el mantenimiento de la homeostasis antioxidante celular sino también para la propia supervivencia del individuo.

2.4.2.2 Catalasa

La catalasa (CAT) es un homotetrámero con un peso molecular total de 240 kDa y necesita de hierro como cofactor (Kirkman y Gaetani, 2007). La CAT está implicada en diversas funciones bioquímicas, sin embargo su principal papel es catalizar la ruptura del H_2O_2 en H_2O y O_2.

$$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O_2$$

Figura 12: Dismutación del peróxido de hidrógeno por la catalasa

Esta enzima está presente en todas las células del organismo y especialmente en los peroxisomas, que son estructuras celulares que usan O_2^- para desintoxicar sustancias tóxicas y producir H_2O_2 (Antunes y cols., 2002). La catalasa comparte con la glutatión peroxidasa la misma función catalítica sobre el H_2O_2, aunque la CAT presenta una menor afinidad por el H_2O_2 en bajas concentraciones que la glutatión peroxidasa (Powers y cols., 1999).

2.4.2.3 Glutatión peroxidasa

La glutatión peroxidasa está presente en el citosol y en la mitocondria. Esta enzima interviene en la transformación del H_2O_2 y de los hidroperóxidos (ROOH) en H_2O o en alcohol (ROH), respectivamente (Finaud y cols., 2006; Powers y Jackson, 2008). Se han identificado cinco tipos de GPx en mamíferos (Drevet, 2006). Si bien se cree que las distintas GPx están implicadas en la misma catalización anteriormente mencionada, las diferente isoformas difieren en la especificidad de substratos y localización celular (Brigelius-Flohé, 1999). Este hecho parece optimizar las funciones antioxidantes celulares de esta enzima (Powers y Jackson., 2008).

$$H_2O_2 \xrightarrow{GPx} H_2O + O_2$$

Figura 13: Dismutación del peróxido de hidrógeno por la glutatión peroxidasa

Sin embargo, puede que la acción de dichas actividades enzimáticas se vea afectada por distintos factores que interfieren en el organismo. Como sabemos, el ser humano afecta y se deja afectar por el ambiente que le rodea. El hombre provoca alteraciones en el medio ambiente a través de sus acciones sobre dicho entorno y se deja afectar en la medida que este ambiente puede provocar cambios en su organismo, los cuales pueden ser momentáneos o definitivos. Las repercusiones que los contaminantes del aire, la radiación solar, la dieta y el consumo de alcohol, entre otros, representan a nivel molecular pueden tornarse definitivas, una vez que se produzcan pequeñas mutaciones en moléculas como por ejemplo el ADN. Tal vez este hecho pueda llegar a entenderse mejor gracias a los avances en la biología molecular y de la genética, que posibilitan la integración entre estudios genéticos y moleculares. El descifrado del genoma humano y el consecuente catálogo de las variaciones genéticas indica el camino a seguir.

3 Polimorfismos genéticos

Las variaciones genéticas son comunes y se producen debido a alteraciones en nucleótidos a lo largo de la secuencia del ADN. Los cambios poco frecuentes en la secuencia de bases en el ADN se llaman *mutaciones genéticas*. Según el *Diccionario Oxford de Bioquímica y Biología Molecular* (Cammack y cols., 2006) *mutación (mutation)* es el proceso por el cual el material genético sufre cambios estructurales detectables y heredables. Entre las 3 subdivisiones que presenta el término encontramos la de *mutación genética (gene mutation),* que viene a ser una alteración estructural de un gen a nivel molecular.

En muchos casos ocurre la alteración de un único nucleótido por otro, lo que se denomina *polimorfismo de nucleótido simple (SNP).* Según el mismo diccionario, *SNP (single nucleotide polymorphism)* se define como una posición específica en la secuencia genómica en la cual alelos alternativos se disponen en una frecuencia considerable en la población. Los SNPs son importantes en el ámbito biomédico debido a su papel como marcador en mutaciones asociadas a determinadas enfermedades (Wang y cols., 1998). Estos SNPs se caracterizan por una presencia mayor/igual al 1 % en la población (Zhang y cols., 2009).

Se estima que pueden existir millones de SNPs en el genoma humano (Zhang y cols., 2009), los cuales pueden estar presentes en regiones codificadoras o bien reguladoras de los genes, teniendo mucha importancia en la expresión y/o función del producto génico. Mientras que algunas variantes o polimorfismos pueden ser “silenciosos” y no tener consecuencias sobre el organismo, otras pueden dar lugar a fenotipos alterados, tanto en la función de determinada proteína como en la modulación de su actividad, lo que puede comprometer la homeostasis corporal (Forsberg y cols., 2001).

Los SNPs constituyen hasta el 90% de todas las variaciones genómicas humanas (Sunyaev y cols., 2000). En humanos se ha estimado que existe un SNP por cada 1,000/2,000 bases de ADN genómico, pudiendo llegar a un SNP a cada 300 bases según la región dónde se encuentre (Wang y cols., 1998;

Dawson, 1999). Estas variaciones en la secuencia del ADN pueden afectar a la respuesta de los individuos a enfermedades, bacterias, virus, productos químicos, fármacos, etc (Wang y cols., 1998).

Los SNPs que se localizan dentro de una secuencia codificante pueden modificar la cadena de aminoácidos codificados por el gen y se llaman SNPs no-sinónimo. Los SNPs no-sinónimos están siendo estudiados debido a su obvio impacto en la actividad proteica (Chorley y cols., 2008). Sin embargo, los SNPs sinónimo (o mutación silenciosa) probablemente presenten efectos mínimos en la expresión génica. Los que se encuentran en regiones no codificantes pueden tener consecuencias en el proceso de traducción, sobre todo en procesos como el *splicing*, la unión de factores de transcripción o modificando la secuencia de RNA no codificante (Emara y Kim, 2003).

Los polimorfismos genéticos, sea en los genes estructurales que determinan la síntesis de la maquinaria antioxidante, sea en los genes reguladores que actúan en la expresión y producción de enzimas antioxidantes, podrían estar asociados a la funcionalidad de los sistemas antioxidantes del organismo humano. Por lo tanto, se hace necesario investigar diferentes polimorfismos genéticos de las enzimas del sistema antioxidante y su posible influencia en la producción y/o actividad de dichas enzimas.

3.1 Superóxido dismutasa mitocondrial y sus polimorfismos genéticos

Dentro del contexto de programación y regulación genética del organismo humano, las variaciones en los genes de enzimas que participan en rutas metabólicas, que tengan un papel fisiológico sistémico y de gran importancia en el mantenimiento de la homeostasis corporal, como son las enzimas del sistema antioxidante, podrían contribuir para el conocimiento de los mecanismos involucrados en el proceso de producción y neutralización de las EROs.

Como anteriormente se ha mencionado, la SOD es la primera enzima antioxidante en la línea de defensa del organismo contra las EROs, pues cataliza

la dismutación de la primera ERO formada en la ruta del metabolismo del O_2, el radical O_2^-.

La SODMn es un homotetrámero con cada subunidad compuesta de 196 aminoácidos (Wispé y cols., 1989; Pechenino y Brown., 2006; Bag y Bag, 2008). Esta isoforma está codificada por un gen que posee cinco exones y está ubicado en el cromosoma 6q25 (Zelko y cols., 2002; Mitrunen y Hirvonen, 2003; Pani y cols., 2004; Bergman y cols., 2005). Esta enzima se expresa a partir del ADN nuclear, se sintetiza en el citosol y se transporta hacia dentro de la mitocondria, donde ejecuta su actividad antioxidante (Shimoda-Matsubayashi y cols., 1996; Culotta y cols., 2006; Bag y Bag, 2008). La SODMn está presente en células procariotas y en las mitocondrias de las células eucariotas, usualmente en la matriz mitocondrial (Scandalios, 2005; Culotta y cols., 2006).

La actividad enzimática de la SODMn se induce de manera directa a través de las EROs y su inducción también puede aumentar la actividad de las enzimas GPx y CAT, lo que sugiere una respuesta compensatoria al incremento en el contenido de H_2O_2 (St. Clair y cols., 1991; Zelko y cols., 2002; Ji y cols., 2007; Wang y cols., 2010), aunque en algunos estudios no se ha visto aumento en la inducción de la CAT (Hussain y cols., 2004).

Como hemos anteriormente mencionado, la SODMn parece ser esencial para la vida y su importancia puede ser mejor entendida, quizás, a través de investigaciones en modelos experimentales (Andersen y cols., 2004). Estudios realizados con ratas demostraron que una linaje *knockout* sin el gen de la SODMn no sobrevivió más de tres semanas, presentando varios problemas fisiológicos tales como daño neuronal en el sistema nervioso central y cardiomiopatía dilatada, a la vez que ratas *knockout* para el gen de la SODCuZn y SODCuZn (extracelular) presentaron daños fisiológicos no letales (Li y cols 1995). Las ratas que expresaban solamente el 50% del contenido normal de SODMn presentaron un incremento en la susceptibilidad al estrés oxidativo y disfunciones mitocondriales severas resultantes de una mayor cantidad de EROs (Macmillan-Crow y Cruthirds., 2001). Estos datos revelan la importancia de la

SODMn en el mantenimiento de la homeostasis antioxidante (Ji, 2007). Es posible que esta importancia resida en el hecho de que la SODMn sea la primera enzima de defensa del sistema antioxidante enzimático.

Muchos son los estudios que describen la asociación entre disfunciones en la actividad/contenido de la SODMn y enfermedades en humanos tales como el cáncer (St. Clair, 2004; Liu y cols 2005; Bag y Bag, 2008), artritis reumatoide (Yen y cols., 2003, Yen y cols., 2003b; Scaife y cols., 2004), Alzheimer (Li y cols., 2004; Anantharaman y cols., 2006; Sompol y cols., 2008), diabetes (Kanwar y cols., 2007; García-Ramírez y cols., 2008; Munusamy y MacMillan-Crow, 2009), cardiomiopatías (Shen y cols., 2006; Wen y cols., 2006; French y cols., 2008) y obesidad (Kojima y cols., 2009).

No obstante, los mecanismos relacionados con la pérdida de actividad o deficiencia de la SODMn están todavía sin esclarecerse. Una deficiencia en la expresión del gen de la SODMn u otras modificaciones genéticas que pueden interferir en la actividad enzimática causados por factores genéticos y/o epigenéticos, serían clave en la eficiencia de esta enzima en la defensa del organismo frente a las EROs. Muchos de los cambios post-traduccionales han producido disminuciones en la actividad de las SODs (Yakamura y Kawasaky, 2009). Macmillan-Crow y Cruthirds (2001) pusieron de manifiesto que las modificaciones post-traduccionales pueden comprometer la actividad de la SODMn.

Zelko y cols. (2002) han aportado un interesante artículo de revisión sobre las distintas isoformas de la SOD y su evolución. Según los autores, la estructura génica completa de la SODMn ha sido determinada en humanos, ratas y ratones, donde la estructura y secuencia de la SODMn se encuentra bien conservada. Sin embargo, en la literatura científica se han descrito algunas variaciones génicas en el gen de la SODMn en humanos.

Se han descrito dos polimorfismos genéticos que afectarían el gen codificante de la SODMn. Ho y Capro (1988) describieron el polimorfismo Ile58Thr de la SODMn en la población humana. Este polimorfismo se caracteriza

por la posibilidad de tener isoleucina (Ile) o treonina (Thr) en la posición 58 del aminoácido. Se ha visto que esta sustitución es capaz de disminuir hasta 3 veces la actividad enzimática de la SODMn y reducir el efecto de supresión que la enzima tiene sobre la carcinogénesis (Tomblyn y cols., 1998; Zhang y cols., 1999).

El polimorfismo genético de la SODMn más frecuentemente estudiado es el Ala16Val (Bag y Bag, 2008). Shimoda-Matsubayashi y cols. (1996) han descrito dos variantes genéticas derivadas de una mutación estructural de sustitución de una timina (T) por una citosina (C) en el exon 2, afectando al códon 16, convirtiendo el aminoácido valina (GTT) en alanina (GCT). Shimoda-Matsubayashi y cols. (1996) afirmaron que este cambio de aminoácidos alteraría la estructura secundaria de la proteína, lo que podría afectar la eficacia en el transporte de la enzima hacia el interior de la mitocondria y comprometer la neutralización de los radicales O_2^- (Sutton y cols., 2003; Möllsten y cols., 2009).

Este cambio en la estructura secundaria de la proteína resultaría en menores niveles de dismutación de los radicales O_2^-, conllevando a la oxidación de proteínas, y mutaciones en el ADN mitocondrial y nuclear de manera mas acentuada (Rosenblum y cols*.,* 1996; Ambrosone y cols*.,* 1999). Además, este polimorfismo podría afectar al control de la mitocondria sobre el mantenimiento de las funciones celulares vitales y apoptóticas (Ambrosone y cols., 1999; Orth y Schapira, 2001). Esta modificación en la proteína generaría una estructura secundaria en forma de β-lámina plegada en vez de la estructura normal α-hélice (Eras-Erdogan y cols., 2009; McAtte y Yager, 2010), como se puede apreciar en la Figura 14.

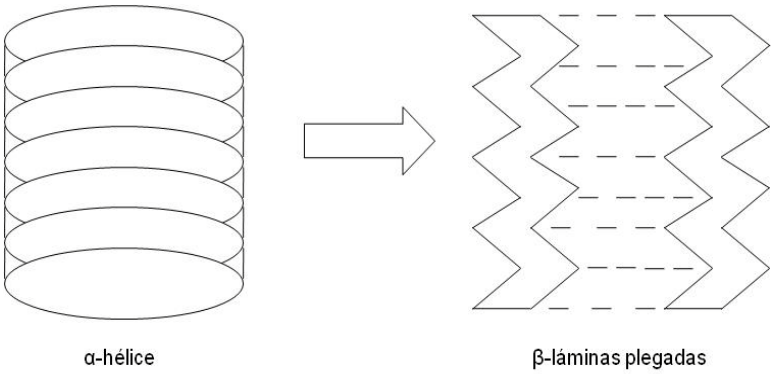


Figura 14: Estructura secundaria de la proteína

Los niveles de actividad de la SODMn se pueden ver afectados por este polimorfismo genético (Ambrossone y cols., 2005). Tanto los genotipos VV como el AA podrían presentar un desequilibrio oxidativo por catalizar el O_2^- en H_2O_2 sin un consiguiente mecanismo compensatorio en la actividad de la GPx o de la CAT, o por no ejecutar la dismutación de manera eficiente. Ambos genotipos han presentado asociaciones con enfermedades crónicas como el cáncer o enfermedades e disfunciones cardiovasculares (Eras-Erdogan y cols., 2009; Iguchi y cols., 2009; Gottlieb y cols., 2005; Fujimoto y cols., 2008; Möllsten y cols., 2009).

No obstante, aún son pocos los estudios que relacionan el polimorfismo Ala16Val de la SODMn con posibles interferencias a nivel molecular. Los estudios realizados acerca de este polimorfismo todavía se limitan a investigaciones de la acción de la enzima en el control y regulación del estrés oxidativo en enfermedades tales como el cáncer. Los estudios sobre la asociación de variables genéticas en seres humanos bajo factores ambientales prooxidantes también son escasos. La relevancia de los estudios realizados en este área está directamente relacionada a la clarificación de posibles respuestas individualizadas a una determinada situación prooxidante y también del conocimiento fisiológico de ese proceso.

Por lo tanto, el punto principal de este estudio sería la respuesta fisiológica en la modulación del metabolismo oxidativo frente a un esfuerzo submáximo. Para ello, a continuación se presneta una breve revisión de la

literatura existente analizando evidencias previamente publicadas sobre la asociación entre el ejercicio físico y la producción de radicales libres.

4 Ejercicio físico

Muchos de los procesos biológicos que son la base de nuestro trabajo físico tienen muchos millones de años de evolución. En realidad un libro de bioquímica escrito hace 1.500 millones de años todavía sería actual en lo que refiere a las funciones de las células eucariotas. El ser humano que habitó este planeta hace 50.000 años probablemente tenía el mismo potencial para realizar tareas físicas e intelectuales que cualquier ser humano de la actual sociedad (Åstrand, 2003).

El hombre, así como todos los animales superiores, está “diseñado” para moverse. En consecuencia, nuestro aparato locomotor y los órganos a su servicio constituyen la mayor parte de nuestra masa corporal. De hecho, cerca del 100% de la existencia biológica de nuestra especie ha estado dominada por la actividad física; estamos genéticamente preparados para ese estilo de vida (Åstrand, 2003) y por ello no sorprende el hecho que el hombre y el chimpancé sean genéticamente semejantes, compartiendo más de 95% del genoma (Willians y Ramsden, 2005).

El ejercicio físico es una actividad que desarrollan todos los seres humanos, en distintos grados, durante su existencia, siendo la práctica de actividades físicas una variable importante relacionada con la salud (Hallal y cols., 2006). Por tanto es fundamental entender los mecanismos fisiológicos que sirven de base para que podamos optimizar sus beneficios sobre la salud.

Existen varios tipos de ejercicios físicos y es importante categorizarlos según las demandas fisiológicas que imponen al cuerpo. Aunque los mismos grupos musculares puedan intervenir en un mismo ejercicio físico, los patrones de contracción muscular, consumo de energía y flujo sanguíneo no serán los mismos. El ejercicio físico se realiza con movimientos corporales producidos por las contracciones musculares de los músculos esqueléticos. La teoría del *Filamento Deslizante* afirma que la contracción muscular ocurre a través del desplazamiento de los filamentos de actina sobre los filamentos de miosina. Este movimiento acorta la distancia entre las bandas Z, por lo tanto acortando el

sarcómero (Rassier y cols., 1999). Las contracciones musculares pueden ser divididas en tres tipos principales: isométricas, concéntricas y excéntricas. De manera global, en la contracción isométrica el músculo se activa, pero no se produce acortamiento y tampoco estiramiento. En la contracción concéntrica el músculo produce más tensión que la resistencia externa impuesta y se acorta, mientras que en la excéntrica la resistencia es mayor que la tensión producida por el músculo y el músculo se estira (Fridén y Lieber, 2001). Además, la velocidad con la que se produce la contración, debido al número y tipo de fibras musculares reclutadas, modifica el coste energético de la contracción y por tanto la cantidad y la vía metabólica empleada (Ferguson y cols., 2001).

Indiscutiblemente, un aumento en las demandas energéticas de los músculos activados ocurre en la transición entre los estadios de descanso y ejercicio físico. El ATP es la primera fuente de energía química disponible para cada ciclo de contracción muscular (Myburgh, 2004). Durante el ejercicio físico la energía producida puede incrementarse hasta en 400 veces respeto a los niveles en reposo. De la misma manera, el aumento en el consumo de oxígeno (VO_2) por parte de los músculos activos se puede ver aumentado hasta 100 veces (Tonkonogi y Sahlin, 2002; Radak y cols., 2008).

En una interesante y actual revisión científica acerca de los aspectos bioenergéticos del aporte energético al tejido muscular, Wells y cols (2009), afirman que en el tejido muscular ocurren una serie de pasos metabólicos. Según el tipo de ejercicio físico a realizar el sistema energético que podrá sustentarlo cambiará. Así el sistema glucolítico es capaz de mantener actividades de corta y/o moderada duración y alta intensidad, mientras que el sistema del fosfágeno es el único capaz de mantener actividades de corta duración y muy alta intensidad. El sistema aeróbico es capaz de atender las necesidades energéticas en actividades más duraderas de baja y/o moderada intensidad.

Durante los ejercicios físicos de alta intensidad las células musculares establecen la demanda de oxígeno y, considerando que el 90% del oxígeno del

cuerpo humano se consume en las mitocondrias musculares, no sorprende el hecho de que la producción EROs en la mitocondria se vea significativamente incrementada durante el ejercicio físico (Davies y cols., 1982).

4.1 Consumo máximo de oxígeno

La vía de transporte de oxígeno implica 3 estructuras principales: los pulmones, la circulación sanguínea y el tejido muscular. La respiración es un proceso regulado y se ajusta a las demandas del metabolismo aeróbico: según aumente el consumo de ATP muscular, la demanda de oxígeno se incrementará de manera proporcional (Hoppeler y Weibel, 1998). Sin embargo, la respiración es un proceso limitado y el límite de la capacidad máxima de utilización de oxígeno se denomina *consumo máximo de oxígeno (VO_{2max})* (Midgley y cols., 2006; Wells y cols., 2009).

El VO_{2max} es uno de los parámetros más usados para cuantificar la capacidad funcional en las ciencias del deporte y se considera uno de los parámetros fisiológicos más determinantes en el rendimiento de ejercicios de resistencia (Evans, 2002, Midgley y cols., 2006). En una actual revisión bibliográfica sobre el tema, Millet y cols (2009) señalan el VO_{2max} como un reflejo del aumento de la capacidad celular para usar el oxígeno en una actividad específica. Además, reiteran la hipótesis acerca del VO_{2max} más aceptada en la actualidad que es que, a más masa muscular usada para realizar una determinada tarea, más elevado será el VO_{2max} medido (VO_{2pico}, también llamado el valor de VO_2 más alto medido durante la realización de un esfuerzo).

Aunque todas las conexiones en el transporte y utilización del oxígeno sean limitaciones potenciales y la capacidad oxidativa de los músculos sea un factor importante en el VO_{2max} (Ivy y cols., 1980), existen evidencias que sugieren que diversos factores pueden ser limitantes en este proceso. Richardson y cols. (1999) confirmaron que el aporte de oxígeno a los músculos activos es el paso más importante y a la vez limitante en la determinación de dicho parámetro. En una interesante revisión bibliográfica sobre el tema, Bassett y Howley (2000) señalan que la vía por la que tiene que pasar el oxígeno desde la atmósfera

hasta la mitocondria está compuesta por muchos pasos, siendo cada uno de ellos un potencial limitador en el flujo de oxígeno: 1) la capacidad pulmonar de difusión, 2) el gasto cardíaco máximo, 3) la capacidad de transporte de oxígeno y 4) las características del músculo esquelético. Según los autores, los 3 primeros se podrían definir como factores "centrales", mientras que el cuarto factor sería de origen "periférico".

Mediante la utilización de protocolos experimentales se ha comprobado que atletas de élite puede ser más susceptibles a la desaturación arterial de oxígeno en una prueba física máxima cuando son comparados con participantes normales (Dempsey y cols., 1984). El transporte de oxígeno se puede considerar uno de los principales factores limitantes del VO_{2max} (Yasaka y cols., 1997). En un estudio clásico, Saltin y cols. (1968) comprobaron que la diferencia en el VO_{2max} entre participantes entrenados y participantes no entrenados reside principalmente en la diferencia que presentan en el gasto cardiaco. Por lo tanto, no se puede negar la evidencia de que el VO_{2max} se puede ver limitado por la capacidad de transporte de oxígeno, por el gasto cardiaco y, en algunos casos, por el sistema pulmonar (Bassett y Howley, 2000).

Sin embargo, Calbet y cols. (2007) detectaron una disminución en la tasa de incremento del gasto cardíaco y un aumento en la presión media arterial antes del agotamiento en un protocolo exhaustivo en clicloergómetro. El gasto cardíaco parece ser insuficiente para atender las demandas tisulares de oxígeno tanto para los principales músculos locomotores como para los menos activados. Concluyen los investigadores que el VO_{2max} en participantes normales se puede ver limitado por el gasto cardíaco y por el flujo sanguíneo muscular.

Por conseguiente, el VO_{2max} refleja la capacidad máxima de transporte y utilización del oxígeno atmosférico por los tejidos corporales. Con todo, también lo podemos relacionar con el aporte de energía de los sistemas aeróbicos de resíntesis de ATP. Siendo el VO_{2max} una herramienta para determinar la capacidad aeróbica máxima, podemos deducir que esta medida refleja la capacidad de producción de ATP por la vía oxidativa de metabolismo del

oxígeno. Por lo tanto, el VO_2 es un factor importante en la práctica de distintos tipos de actividades deportivas, siendo el metabolismo del oxígeno clave en el aporte energético a la hora de practicar ejercicio físico. Sin embargo, es importante subrayar que el VO_2, sea a nivel basal o durante el ejercicio físico, puede producir a procesos dañinos contra los cuales el organismo tendrá que defenderse.

4.2 Bioenergética del ejercicio físico – de los aspectos metabólicos generales a la producción de especies reactivas de oxígeno

La fuente básica de energía que se aporta al organismo proviene de los nutrientes de la ingesta alimentaria. Sin embargo, la energía de los alimentos se dispone lentamente para ser utilizada directamente por las actividades celulares. La energía de las uniones químicas de los nutrientes se tiene que transferir para la síntesis de la "moneda energética" común: el ATP (Åstrand, 2003). Prácticamente todos los procesos celulares necesitan aporte de ATP para su viabilidad. El metabolismo energético para generar ATP consiste en una secuencia de transformaciones químicas que, al final, van a degradar una molécula de glucosa (o de un ácido graso) en H_2O y dióxido de carbono (CO_2). El metabolismo aeróbico es el que más energía puede producir, pero necesita de la presencia de oxígeno para ello.

Como antes hemos mencionado, el oxígeno representa aproximadamente el 21% de la composición de la atmósfera terrestre y su presencia resulta imprescindible para la existencia de los organismos aeróbicos. No obstante, esta molécula presenta una interesante paradoja: en determinadas formas, el oxígeno puede resultar dañino para los tejidos corporales. El oxígeno juega un papel fundamental en la respiración celular y la producción de EROs; a su vez las EROs poseen un importante papel como moléculas señalizadoras intracelulares (D'Autréaux y Toledano, 2008).

Los beneficios de la actividad física regular están muy bien documentados en la literatura científica. La práctica de actividades físicas es uno de los factores más importantes para lograr una condición saludable (Cooper y

cols 2002). El ejercicio físico presenta diversos efectos positivos sobre distintos procesos fisiopatológicos, como las enfermedades cardíacas, hipertensión, diabetes y depresión (Polidori y cols., 2000). Sin embargo, durante el ejercicio físico los músculos activados pueden aumentar su flujo de oxígeno en hasta 100 veces su nivel basal (Sen, 1999). Además, considerando las informaciones anteriores de que las EROs se producen en parte por el metabolismo aeróbico, se originó la hipótesis del daño causado por el oxígeno molecular como aceptor final de electrones en el metabolismo oxidativo. Desde entonces un gran número de estudios ha demostrado la toxicidad del oxígeno molecular en las células animales (Halliwell y Gutteridge, 1999). Actualmente se sabe que el ejercicio físico agudo y extenuante es capaz de producir radicales libres (Leeuwenburgh y Heinecke, 2001; Halliwell, 2007; Packer y cols., 2008).

El ejercicio físico intenso está asociado con un importante incremento en el VO_2, tanto a nivel corporal como muscular. De hecho, muchos son los estudios que han relacionado ejercicio físico, aumento en el VO_2 y estrés oxidativo (Ji, 1995; Ji, 1999, Dosek y cols, 2007). Chance y cols. (1979) estimaron que por cada 25 moléculas de oxígeno reducidas por la respiración normal se produce un radical libre.

Las evidencias científicas actuales sugieren que el ejercicio físico induce estrés oxidativo (Ji, 1999; Urso y Clarckson, 2003, Vollaard y cols., 2005, Reichhold y cols., 2009). En la misma línea, parece ser que la actividad aeróbica de los músculos que se contraen durante el ejercicio físico está asociada con la producción de EROs en estos músculos (Johnson y cols., 2002). Además, el incremento de estas moléculas en el organismo podría estar directamente relacionado con la intensidad del ejercicio físico. Es decir, cuanto más intenso y extenuante sea, mayor será la producción de EROs. Efectivamente, el ejercicio físico de alta intensidad y duración parece ser el modelo más propenso a una producción de EROs suficiente para superar las defensas antioxidantes (Møller y cols., 1996; Goto y cols., 2003; Quindry y cols., 2003; Knez y cols., 2006).

No obstante, es importante señalar que no solo el aumento en el VO_2 puede conducir a estrés oxidativo, ya que otras rutas se han propuesto en los últimos años. Las reacciones catalizadas por la xantina oxidasa (XO) y la activación de las células del sistema inmune son otras posibles vías para la producción de EROs durante el ejercicio físico (Ji, 1999; Sachdev y Davies, 2008).

4.3 Ejercicio físico y producción de especies reactivas de oxígeno - estrés oxidativo

Actualmente, se podría decir que hay un consenso entre los investigadores de las ciencias de la actividad física y del deporte consistente en que el ejercicio físico extenuante puede imponer determinados niveles de estrés oxidativo a los músculos esqueléticos (y otros órganos) debido al incremento en la generación de EROs (Ji, 2007).

El ejercicio físico está metabólicamente relacionado con la modulación de EROs. Sin embargo, las EROs son de difícil detección debido a su naturaleza altamente reactiva e inestable (Bachur y cols., 1978). De esta manera, el modo de cuantificarlas en los tejidos es a través de productos finales o intermediarios de las reacciones mediadas por los radicales (Sachdev y Davies, 2008). Los subproductos que con más frecuencia se miden son los de la peroxidación lipídica (Wolf y cols., 1986; Nikolaidis y cols., 2008; Sachdev y Davies, 2008), pero cambios en el estatus de compuestos antioxidantes, como pueden ser el glutatión (GSH), proteínas y productos de oxidación del ADN, y diferentes actividades enzimáticas también han sido utilizados (Alessio y cols., 2000; Elousa y cols., 2003; van Helvoort y cols., 2005; Reichhold y cols., 2009). Todas ellas se consideran medidas indirectas de la actividad de los radicales libres (Urso y Clarkson, 2003).

Existen numerosos estudios que describen que sesiones agudas de ejercicio físico incrementan los niveles sanguíneos de malondialdehído (MDA), un subproducto de la peroxidación de lípidos (Marzatico y cols., 1997; Child y cols., 2000; Santos-Silva, 2001). Cuando las EROs reaccionan con los residuos

de aminoácidos protéicos se forman carbonilos proteicos (Griffiths, 2000; Urso y Clarckson, 2003). El ejercicio físico intenso también es capaz de aumentar la concentración de carbonilos proteicos en distintos tejidos (Alessio y cols., 2000; Hurst y cols., 2009; Theodorou y cols., 2009). La 8-OhdG está considerada un marcador de oxidación del ADN frente a los radicales libres (Rall y cols., 2000). Su concentración en la orina parece incrementarse después del ejercicio físico, indicando daño oxidativo al ADN (Okamura y cols., 1997; Orhan y cols., 2004; Morillas-Ruiz y cols., 2005).

4.3.1 El Glutatión – estructura y funciones orgánicas

Las diferentes EROs presentan una fuerte tendencia a transferir electrones a otras moléculas, es decir, oxidarlas. El GSH es un tripéptido constituido por los aminoácidos glicina, cisteína y ácido glutámico y está considerado la fuente no protéica de tioles más importante del organismo (Ji, 1995; Sun y cols., 2000). Los tioles son una clase de derivados de sulfuro orgánico caracterizados por la presencia de residuos -SH y tiene como importante papel principal actuar como agentes reductores (Sen y Packer, 2000; Nikolaidis y cols., 2008).

El descubrimiento de los biotioles se remonta al año de 1888, cuando Rey-Pailhade observó en células de levadura una sustancia que facilitaba la formación de sulfuro de hidrógeno cuando se rompían las células con sulfuro elemental. Debido a su alta reactividad con los iones sulfuro el descubridor la llamó *philothion* (*philo*=amigo de y *thion*=sulfuro, en griego). En el 1921, Hopkins observó que el *philothion* en músculo, hígado y levadura podía ser extraído con agua, lo que le llevó a sospechar que la molécula era un dipéptido formado por glutamato y cisteína (Hopkins, 1921). Años más tarde Hopkins y Kendal descubrieron, de manera independiente, que el GSH era en realidad un tripéptido y que el péptido contenía, también, glicina (Hopkins 1929; Kendall y cols., 1929). Hoy en día se sabe que el GSH es la fuente de tioles no proteica más abundante en las células eucariotas (Nikolaidis y cols., 2008; Margaritis y cols., 2009). La Figura 15 describe la estructura química del GSH.

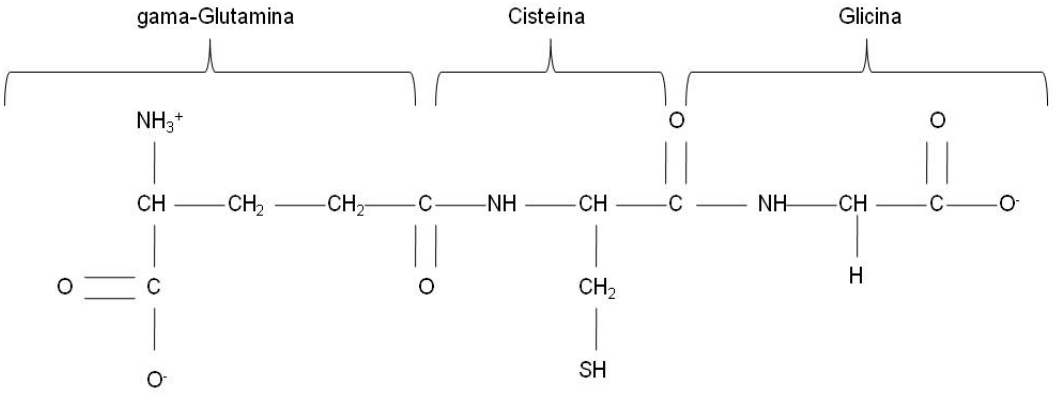


Figura 15: Estructura química del glutatión

El GSH se sintetiza en el hígado y luego es transportado hasta los tejidos a través del torrente sanguíneo (Lu, 1999; Sen y cols., 2000). La concentración de GSH celular se expresa en milimolar, aunque exista mucha variabilidad en su contenido entre distintos tipos de tejidos. La variabilidad en la concentración de GSH depende del equilibrio entre su captación desde la circulación y su aclaración (Malmezat y cols., 2000). En los órganos más importantes, como el hígado, los riñones o el corazón la concentración final está entre 2-3 mM y su concentración en la musculatura esquelética parece depender del tipo de fibra muscular y de la especie animal, variando de un 3 mM en fibras musculares tipo I a un 0,5 mM en fibras tipo II en ratas (Ji, 1995).

El GSH presenta múltiples funciones en la defensa antioxidante celular. En primer lugar, participa en la destrucción del H_2O_2 y de los peróxidos lípidos a través del aporte de GSH a las peroxidasas (Mrtenson y Mesiter, 1991). De hecho, una de las funciones antioxidantes más importantes del GSH es la de aclarar peróxidos. A través de una reacción catalizada por la GPx, el GSH dismuta lipoperóxidos en agua y alcohol, reacción que no puede ser realizada por la CAT (Robertson y cols., 2003). Al donar dos átomos de hidrógeno, se produce la oxidación de dos moléculas de GSH a GSSG, la forma oxidada del GSH (Powers y Lennon, 1999). Sin embargo, la glutatión reductasa (GR) reduce

el glutatión oxidado (GSSG) a través de la acción reductora del NADPH, promocionando un ciclo redox para el mantenimiento de las concentraciones de GSH, además de mantener bajo el contenido de GSSG en la gran mayoría de los tejidos corporales (Ji, 1995; Meloni y cols., 2003). La oxidación del GSH a GSSG se considera un marcador preciso de estrés oxidativo (Sen, 1999; Sachdev y Davies, 2008). La familia de las glutatión transferasas (GSTs) también está relacionada con el GSH. Las GSTs catalizan la detoxificación de xenobióticos (Menegon y cols., 1998; Edwards y cols., 2000).

Desde su descubrimiento hasta nuestros días, la investigación de este tripéptido ha atraído especial atención debido a su localización aleatoria en todas las células del organismo. Actualmente, el GSH se reconoce como un importante antioxidante fisiológico, no solo por su acción directa contra las EROs, sino también por la mejoría que aporta en la funcionalidad de otros antioxidantes exógenos fundamentales, como las vitaminas E y C (Bast y Haenen, 2003; Manoharan y cols., 2006) y antioxidantes endógenos, como la GPx (Collinson, 2002; Forgione y cols., 2002; Blankenberg y cols., 2003). La Figura 16 resume en ciclo del GSH.

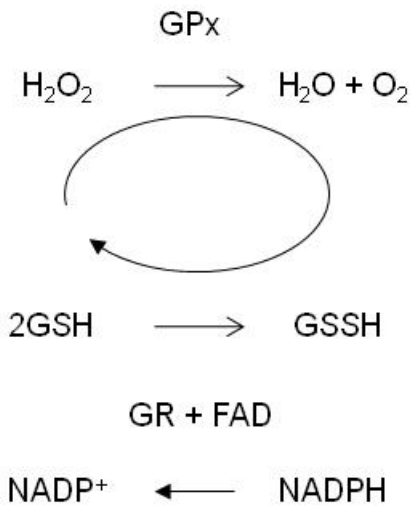


Figura 16: Ciclo del glutatión

Por tanto, el GSH es un antioxidante clave en la protección y detoxificación del organismo frente a las EROs (Meister, 1994; Hatcher y cols., 1995; Samiec y cols., 1998; Haddad y cols., 2000; Meloni y cols., 2003). Numerosos estudios señalan un aumento en la oxidación del GSH tras la realización de ejercicio físico (Laaksonen y cols., 1999; Sastre y cols., 1992; Van Helvoort y cols., 2005).

4.4 Ejercicio físico: ¿qué hay después del estrés oxidativo?

Todas esas informaciones juntas ponen de manifiesto la necesidad de un equilibrio entre la generación de radicales libres y la eficacia del sistema antioxidante.

A pesar que el ejercicio físico exhaustivo puede aparentemente ser dañino para el organismo, estudios actuales apuntan que el ejercicio moderado puede ser considerado un agente antioxidante (Navarro y cols., 2004; Boveris y Navarro, 2008; Radak y cols., 2008b; Gómez-Cabrera y cols., 2008). En líneas

generales, el cuerpo dispone de reservas antioxidantes suficientes para afrontar la producción de EROs en condiciones fisiológicas normales. Los sistemas antioxidantes mantienen la homeostasis corporal para la realización de las funciones celulares normales en descanso y/o durante el ejercicio moderado.

Davies y cols. (1982) propusieron que la formación de radicales libres inducida por el ejercicio con entrenamiento crónico podría estimular la síntesis de nuevas mitocondrias, hecho que explicaría los efectos benéficos de la actividad física o del ejercicio moderado. El mayor número de mitocondrias celulares aumentaría la capacidad funcional vía incremento del soporte energético y aumento del metabolismo antioxidante de manera proporcional (Ji y Fu, 1992; Alessio, 1993; Nies y cols., 1996; Irrcher y cols., 2003; Menshikova y cols., 2007; Viña y cols., 2009; Hood, 2009).

En la misma línea, evidencias científicas sugieren que el ejercicio físico puede incrementar la actividad antioxidante en los músculos ejercitados. Estudios recientes indican que la actividad enzimática de la SODMn se adapta al ejercicio físico y presenta una activdad aumentada tras un entrenamiento físico (Oh-ishi y cols., 1997; Hollander y cols., 1999; Pansarasa y cols., 2002; Ookawara y cols., 2003; French y cols., 2008; Lawler y cols., 2009). Powers y cols. (1999) también postularon que el entrenamiento de resistencia puede ser capaz de aumentar la actividad enzimática de la SODMn.

Objetivos

5 Objetivos

Considerando lo previamente expuesto, las evidencias científicas de los últimos 20 años ponen de manifiesto que el entrenamiento físico es capaz de generar adaptaciones en respuesta a una mayor producción de EROs, modulando de modo positivo la producción de EROs, los mecanismos protectores frente a ellas, y/o disminuyendo la aparición de disfunciones. Considerando que los factores genéticos también se caracterizan como responsables importantes de la respuesta oxidativa en el organismo, sería de interés científico investigar las posibles influencias que el polimorfismo de un gen clave en la defensa antioxidante pudiera tener en el equilibrio oxidativo frente al ejercicio físico. Esta aproximación podría explicar muchas respuestas relacionadas con el estrés oxidativo que hasta hoy no han sido del todo esclarecidos. Revisando la bibliografía científica se puede constatar que no se han realizado investigaciones acerca del ejercicio físico, estrés oxidativo producido y la posible influencia que el polimorfismo genético de Ala16Val de la SODMn pueda tener sobre ello.

5.1 Objetivo general

Por todo ello, este estudio tiene como objetivo principal analizar la influencia del polimorfismo genético de la SODMn en la respuesta al estrés oxidativo producido por un ejercicio submáximo de larga duración.

5.2 Objetivos específicos

1. Describir la distribución del polimorfismo genético de la SODMn en la población universitaria joven española.

2. Estudiar la influencia de los distintos genotipos del gen estudiado en la expresión génica, contenido protéico y actividad enzimática de la SODMn

3. Cuantificar el impacto agudo oxidativo que un ejercicio submáximo de larga duración produce en el organismo en función de los distintos genotipos de la SODMn.

Diseño experimental

6 Diseño experimental

La Figura 17 resume la metodología empleada en el estudio.

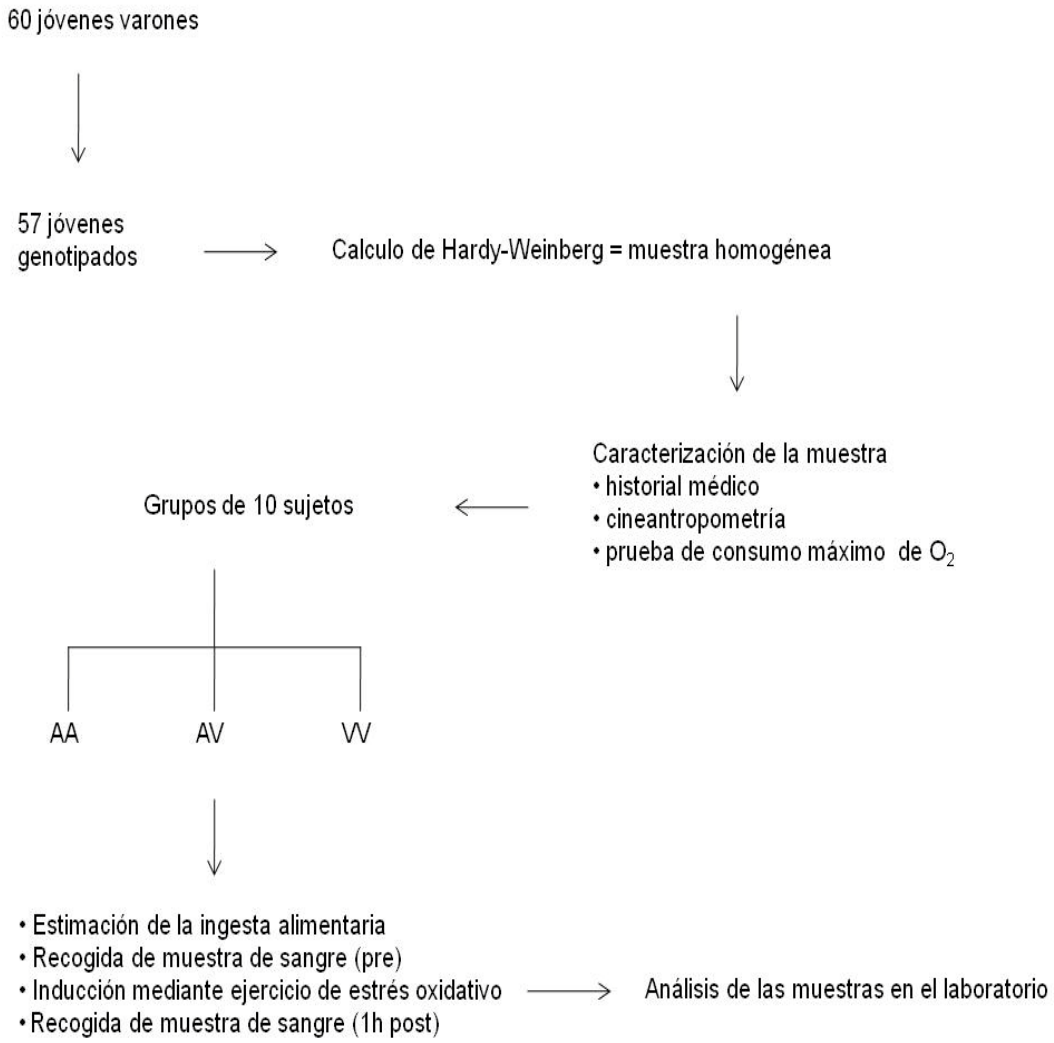


Figura 17: Diseño del estudio

Metodología

7 Metodología

En una primera visita al Laboratorio de Fisiología del Ejercicio de la Universidad de León se recogieron los datos antropométricos de los participantes para la caracterización descriptiva de la muestra. Parámetros como edad, altura, peso, pliegues cutáneos, perímetros y una muestra de sangre para el genotipado del polimorfismo Ala16Val del gen codificante de la SODMn, fueron tomados para llevar a cabo dicha caracterización.

Con un margen de 2 semanas los participantes fueron nuevamente citados. En la segunda visita al laboratorio realizaron una ergoespirometría hasta el agotamiento para la determinación del VO_{2max}. La prueba se realizó en un cicloergómetro de freno electromagnético partiendo de una carga de 25 W, con incrementos cada minuto de 25 W, hasta el agotamiento. El VO_2 se midió con un analizador de gases. En la prueba se midió la máxima potencia producida y el VO_{2max} alcanzados por cada participante.

Con un margen de 2 semanas se citaron 30 participantes (10 de cada genotipo) para la realización de un esfuerzo submáximo durante 40 minutos alrededor del 70% del VO_{2max} obtenido en la segunda visita al laboratorio. En esta prueba también se utilizaron el cicloergómetro de freno electromagnético y el analizador de gases que habían sido empleados en la prueba de esfuerzo físico máximo. Antes de empezar la prueba a los participantes se les sacó una muestra de sangre para los distintos análisis sanguíneos. Una hora después del final de la prueba se les sacó otra muestra de sangre, para ver las posibles alteraciones en los mismos parámetros previos a la realización de un esfuerzo submáximo. Se controló la frecuencia cardíaca, el VO_2, cociente respiratorio (RQ) y lactato durante toda la realización de la prueba. Conviene resaltar que se controló también la pérdida líquida de los participantes mediante el pesaje en una báscula de precisión (20 g) antes y después del esfuerzo (XR-150S,Gram Precision, España).

Las muestras de sangre fueron llevadas al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biomedicina de la Universidad de León. En una primera fase se realizó la extracción de células monucleares de sangre periférica (CMSP) y, una vez obtenidas las muestras, se congelaron a -80ºC para analizar los posibles cambios en el estado oxidativo de los participantes tras un esfuerzo submáximo.

Material y métodos

8 Material y métodos

8.1 Participantes

En la primera parte del estudio se reclutaron 60 jóvenes varones, todos estudiantes de Ciencias de la Actividad Física y del Deporte de la Universidad de León. De los 60 participantes iniciales un total de 57 optaron por seguir participando en el estudio. Tras recoger una muestra de sangre de cada participante se procedió a la realización de los análisis genéticos de genotipado del polimorfismo Ala16Val del gen codificante de la SODMn para conocer el genotipo da cada participante del estudio.

Para la realización del esfuerzo submáximo se excluyeron los fumadores, los que presentaban un índice de masa corporal (IMC) superior a 23, los que pasaban por tratamiento médico con fármacos antiinflamatorios y los que estuvieran tomando cualquier tipo de esteroides anabólicos o suplementos antioxidantes. La selección de los participantes restantes fue aleatoriazada por el IMC. A partir de este momento, se reclutaron 30 participantes de los 55 que participaron en la primera parte del estudio.

Los participantes se dividieron en 3 grupos distintos: 10 AA, 10 AV y 10 VV. Cabe resaltar que los participantes firmaron una hoja de consentimiento para que pudieran participar, pero no sin que antes fueran informados sobre todos los procedimientos que se les realizaría a lo largo del estudio.

8.2 Valoración antropométrica

Para la caracterización descriptiva de la muestra se obtuvieron datos antropométricos de los 57 participantes de los cuales se había recogido una muestra de sangre para el genotipado del gen codificante de la SODMn. La valoración antropométrica se llevó a cabo cuantificándose altura (estadímetro Detecto D52, EE. UU.), peso (báscula Cobol 20®, España) y el porcentaje de grasa corporal fue estimado a través de la medición de 6 pliegues cutáneos (plicómetro Holtain, Reino Unido) mediante la ecuación de Yuhasz modificada

por Faulkner como se cita en Carter (1984). También se midió la circunferencia del brazo contraído y relajado, de la pierna y del muslo. Con los datos de altura y peso se calculó el IMC de los participantes.

Todas las mediciones de la valoración antropométrica, que fueron llevadas a cabo por un único investigador, se tomaron por triplicado, considerando la media aritmética de los valores. Además, todas las medidas antropométricas fueron tomadas en el lado derecho del cuerpo, siguiéndose las indicaciones del grupo español de cineantropometría.

8.3 Esfuerzo físico máximo

Para la realización del esfuerzo máximo se utilizó un cicloergómetro de freno electromagnético (Ergoline 900, GMH-Lindestrable, Alemania). El VO_{2max} de los participantes se midió con un analizador de gases *breath-by-breath* (CPX plus, Medical Graphics, EE.UU.). Se les aplicó un protocolo ergoespirométrico continuo escalonado con una carga inicial de 25 W con incrementos de carga de 25 vatios (W) cada minuto hasta el agotamiento, o hasta que el participante era incapaz de mantener la frecuencia de pedaleo por encima de 60 revoluciones por minuto (rpm). Los participantes mantuvieron una cadencia de pedaleo cercana a las 70 rpm a o largo del protocolo.

Un pulsómetro (Polar S810i, Polar Electronics, Finlandia) recogía los datos de frecuencia cardiaca a lo largo de la prueba que posteriormente fueron analizados con el uso del software *Polar Precision Performance 4.03* (Polar Electronics, Finlandia).

8.4 Estimación de micro y macronutrientes

En los 3 días anteriores a la prueba de esfuerzo submáximo los participantes rellenaron un registro alimentario relativo a su ingesta alimentaria en esos 3 días. El registro contenía el tipo de alimento, la cantidad, la hora y el modo de preparación del mismo. Se tabularon los datos y se estimaron los micro y macronutrientes con el uso del software NUTRIBER (Nutriber 1.1.3, España).

Se prohibió el consumo de zumos y frutas en el desayuno anterior al esfuerzo submáximo.

8.5 Esfuerzo físico submáximo

Para la valoración del esfuerzo submáximo se empleó el mismo cicloergómetro utilizado en la ergoespirometría inicial máxima. Durante el esfuerzo los participantes mantuvieron una cadencia de pedaleo cercana a las 70 rpm durante 40 minutos y pedelearon venciendo una carga relativa a aproximadamente el 70% del VO_{2max} obtenido en la valoración del esfuerzo máximo. Partiendo de 25 W se iba incrementando la carga hasta alcanzar la carga objetivo a los 5 minutos. Durante el esfuerzo se midió el VO_2 en 4 momentos distintos a lo largo de la prueba: 1) en el comienzo de la prueba, para ajustar la carga; 2) a los 15 minutos; 3) a los 30 minutos y 4) 5 minutos antes del final de la prueba. Cada medición duró aproximadamente 4 minutos, para verificar el VO_2 y el RQ y estimar la intensidad fisiológica individual y reajustar la carga si esta intensidad estaba por debajo o por encima de la prefijada para 40 minutos.

Durante la valoración del esfuerzo submáximo se recogió sangre periférica del lóbulo de la oreja derecha de los participantes con tubos capilares (Küvetten-test-pipetten 10 µl, Lange, Alemania) para la determinación de lactato sanguíneo a través del uso del analizador de lactato Dr Lange (Miniphotometer LP20, Dr. Bruno Lange GmbH & Co. KG, Alemania). Se recogieron muestras de sangre periférica en los minutos 15, 30 y 40 y datos de frecuencia cardiaca a lo largo de la prueba con un pulsómetro (Polar S810i, Polar Electronics, Finlandia). Los participantes ingirieron a demanda 500 ml de agua mineral entre el comienzo del ejercicio y la recogida de la segunda muestra de sangre.

8.6 Recogida de muestra sanguínea

Se recogieron muestras de sangre periférica de los participantes en dos momentos distintos con el uso de tubos de 4,5 ml con vacío y 0,1 % de EDTA (concentración final de 1 mg/dL) (Terumo Venoject®, Bélgica). Tras un intervalo

de 10 minutos de su llegada al laboratorio se sacaba la primera muestra de sangre de la vena braquiocefálica derecha. Una hora después de haber terminado el esfuerzo submáximo se sacó la segunda muestra de sangre de la vena braquiocefálica izquierda. El volumen total extraído por toma fue de 35 ml de sangre. Se utilizó 10µL de sangre por toma para medir el hematocrito, que fue recogido con tubos capilares (Haematocrit Capillaries, Deltalab S.L., España) y posteriormente centrifugado con el uso de una centrífuga específica para hematocrito (Haemofuge A, Heraeus Sepatech, Alemania).

8.6.1 Procesado de la muestra sanguínea

- Reactivos:
  - Tampón fosfato salino estéril (PBS): NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 7,8 mM, KH_2PO_4 1,7 mM pH 7,4).

Las muestras de sangre fueron inmediatamente centrifugadas a 1500 xg durante 10 minutos a 4ºC. Después de la centrifugación el plasma fue extraído y repartido en alícuotas de 1 ml (tubos Eppendorf®) que fueron congeladas a -80ºC. Un volumen de PBS equivalente al plasma extraído fue añadido a los tubos, siendo a continuación agitados suavemente para la reconstitución total de la sangre. Posteriormente, 30 ml de dicha sangre reconstituida fueron repartidos en 2 tubos Falcon® de 50 ml (15 ml por tubo Falcon®) y diluida 1:1 con PBS. La sangre diluida fue repartida cuidadosamente en 9 tubos Falcon de 15 ml, en cada uno de los cuales se había añadido previamente 3 ml de solución separadora Ficoll® (Biochrom AG, Alemania). De esta forma, los 9 tubos con 3 ml de solución separadora Ficoll® y 8 - 9 ml de sangre cada uno eran centrifugados durante 40 minutos a 250 xg a temperatura ambiente. Una vez concluida la centrifugación, la interfase celular obtenida fue extraída mediante pipeteo manual y depositada en 4 nuevos tubos Falcon®. Las CMSP así obtenidas se lavaron con PBS, hasta completar el volumen de 10 ml, siendo posteriormente sometidas a una nueva centrifugación de 10 minutos a 900 xg y temperatura ambiente. Una vez finalizada esta segunda centrifugación, se

desechó el sobrenadante, extrayéndose todo el líquido sobrante, de manera que el precipitado, perfectamente visible en el fondo de cada tubo, quedase lo más seco posible. Dicho precipitado fue resuspendido en 500 µl (para cada tubo Flacon®) de PBS y pasado a 4 tubos Eppendorf® estériles de 1,5 ml. Estos tubos fueron centrifugados durante 5 minutos a 2630 xg (Centrifuge 5415C, Eppendorf, Alemania) y temperatura ambiente. El sobrenadante fue cuidadosamente extraído, congelándose posteriormente el precipitado de CMSP a -80ºC hasta el momento del análisis.

En uno de los tubos se resuspendió el pellet de CMSP en 1 ml de ácido 5-sulfosalicílico (SSA) al 1%. La mezcla fue incubada en hielo durante 15 minutos y posteriormente centrifugada a 2630 xg durante 10 minutos a 4ºC. Se extrajo el sobrenadante y se congeló a -80ºC para el posterior análisis de la concentración de GSH total (GSHt). También se congeló el con objeto de determinar la oxidación de los grupos -SH.

8.7 Análisis bioquímicos y moleculares

8.7.1 Concentración de proteínas

- Fundamento:

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

- Reactivos:
  - Reactivo A: carbonato sódico al 2%, hidróxido sódico al 0,4%, tartrato sódico 0,16% y SDS al 1%
  - Reactivo B: sulfato de cobre al 4%
  - Reactivo C: Folin Ciocalteu al 50%

- Método:

La siguiente mezcla: 5 µl de muestra, 495 µl de agua destilada, 1,5 ml de reactivo D (100 ml de reactivo A + 1 ml de reactivo B) se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 150 µl 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) con concentraciones crecientes de 0,125 a 1,0 mg/ml.

8.7.2 Concentración de glutatión total

- Fundamento:

El ensayo para cuantificar la concentración de GSHt se llevó a cabo mediante la técnica enzimática de Anderson (1985).

- Reactivos:
  - SSA 1 %
  - GR (600 U/ml)
  - GSSG 50 µM
  - GSH 50 µM
  - Tampón sódico: Na_2HPO_4 143 mM, pH 7,5
  - Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) tretrazoluim 6,3 mM
  - Tampón de reacción: NADPH 0,3 mM
  - Ditio-bis-nitrobenzoato (DTNB) 6 mM

- Método

Los sobrenadantes de las muestra resuspendidas en SSA al 1% fueron usados para determinar la concentración de GSHt. Los estándares se prepararon a partir de una solución de 50 µM de GSSG y 50 µM de GSH en SSA al 1% entre un rango de 0,081 y 10,4 µM. La solución de SSA al 1 % se utilizó como blanco.

Se preparó una mezcla con 5,25 ml de tampón de reacción, 750 µl de DTNB, 750 µl de H_2O milli Q y 75 µl de GR. En cada pocillo de la placa se cargaron 20 µl de estándar, muestra o blanco y 200 µl de la mezcla de reacción. La placa se agitó y se incubó durante 10 minutos antes de leer la absorbancia a 415 nm en un lector de placas (Synergy^{TM} HT Multi-Mode Microplate Reader, Bio-Tek Instruments Inc., EE.UU.) precalentado a 37 ºC.

8.7.3 Concentración de los grupos sulfidrilos

Fundamento

El ensayo para cuantificar la oxidación de los grupos -SH se llevó a cabo mediante la técnica enzimática de Dimonte y cols (1984).

- Reactivos
  - Tampón Tris/HCl 0,5 M, pH 7,6
  - DTNB 1,1 mM
  - SSA 1 %
  - GSH 5 mM
- Método

Los precipitados de las células mononucleares en SSA al 1% se resuspendieron en 200 µl de tampón Tris/HCl. Las muestras se diluyeron, a continuación, 1:11 en tampón Tris/HCl. Las diluciones se utilizaron,

posteriormente, para el ensayo de los grupos -SH, analizándose el contenido protéico de las mismas por la técnica de Lowry. 20 µl de DTNB y 200 µl de muestra, estándar o blanco (tampón Tris/HCl) se añadieron en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Después de centrifugar la placa a 20.000 xg durante 1 minuto se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Al final de la incubación se leyó la placa a una absorbancia de 415 nm en un lector de placas (Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader, Bio-Tek Instruments Inc., EE.UU.). Para la cuantificación de los grupos-SH se preparó una recta patrón entre 0,4 y 50 µM a partir de una solución de 5 mM de GSH.

8.7.4 Cuantificación del ARN mensajero de la SODMn por RT-PCR: transcriptasa inversa y reacción en cadena de la polimerasa

- Fundamento

La cuantificación del ARN mensajero (ARNm) de la SODMn se realizó utilizando la técnica de RT-PCR en dos pasos: Transcripción Inversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

- Método:

El ARN de las CMSP se aisló utilizando el kit RiboPureTM-Blood (Ambion Inc., EE.UU.) y fue cuantificado en un Nanodrop (ND-1000, Nanodrop, EE.UU). El ADN genómico residual se eliminó tras incubación del ARN con DNase I RNase-free DNase (Ambion Inc., EE.UU.). El ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir del ARN, utilizando la enzima transcriptasa inversa del kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, Reino Unido). Un control negativo (control sin transcriptasa) se desarrolló en paralelo. El ADNc se amplificó utilizando TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Reino Unido) en un equipo RT-PCR cuantitativa a tiempo real ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Reino Unido) utilizando iniciadores específicos para el gen considerado. Sondas e iniciadores Taqman para SODMn (Genbank M03205.1) y Hs00167309-m1) y 18S ARNr (Genbank X03205.1 y Hs99999901_s1) se obtuvieron comercialmente de TaqMan® Assays-on-Demand Gene (Applied

Biosystems, Reino Unido). Los cambios relativos en los niveles de expresión génica se determinaron usando el método del $2^{-\Delta\Delta CT}$ como previamente se ha descrito (Livak y Schmittgen, 2001). El número de ciclos al cual los transcriptos fueron detectables (CT) se normalizó respecto al número de ciclos para la detección del 18S, refiriéndose como ΔCT.

8.7.5 Cuantificación de la proteína SODMn por Western blot

- Fundamento:

La determinación de la proteína SODMn se llevó a cabo mediante la técnica de *Western blot* utilizando el método de Laemmli (1970).

- Reactivos:

  - Tampón de sonicación: sacarosa 0,25 mM, Tris 10 mM y EDTA sódico 1 mM, pH 7,4;
  - Mezcla de inhibidores de proteasas: PMSF, aprotinina e inhibidor de tripsina
  - Tampón de lisis: NaCl 140 mM, EDTA 15 mM, glicerol 10% y tris 20 mM, pH 8
  - Solución de ebullición: H_2O, Tris/HCl 2 M (pH 6,8), glicerol 60%, SDS 10% y pirrolina 0,5%
  - Tampón de electroforesis: Tris 25 mM, glicina 0,2 M y SDS 3,5 mM, pH8
  - Tampón de transferencia: Tris 25 mM, glicina 0,2 M y metanol 20%
  - PBS: NaCl 0,14 M, KH_2PO_4 1,4 mM, $NaHPO_4$ 8 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4

- PBS-tween: 0,05%
- Solución de bloqueo y de incubación de anticuerpos: 4% y 3% de leche en polvo desnatada en PBS-Tween 0,05%
- Tampón de deshibridación: Tris 6,25 mM pH 6,7, SDS 2% y mercaptoetanol 100 mM

- Método:

En primer lugar se realizó la sonicación de la muestra en hielo. Las CMSP se sonicaron en 150 µl de tampón de sonicación, al que previamente se la había añadido la mezcla de inhibidores de proteasas, durante 2 ciclos de 20 segundos con 10 segundos de descanso entre ambos y una amplitud de ciclo de 100%.

Tras el análisis de la concentración de proteína por Lowry, se tomó una cantidad de muestra equivalente a 20 µg de proteína a la que se añadió el tampón de lisis y se incubó durante 2 minutos a 100ºC. A continuación se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en tampón de electroforesis

Una vez separadas las proteínas, fueron transferidas a una membrana de PVDF Immobilon-P (Millipore, EE.UU.) 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 (Transfer Blot-SD, Biorad, EE.UU). Para comprobar que la transferencia fue correcta se introdujo la membrana de PVDF en una solución de rojo Ponceau para visualizar las bandas de las proteínas. La membrana se lavó en agitación durante 5 minutos con agua y durante otros 5 minutos con PBS. Después se incubó durante media hora en solución de bloqueo (4% de leche en polvo desnatada en PBS-Tween) a 37ºC.

A continuación la membrana se incubó durante una noche con un anticuerpo específico para la SODMn (25 kDa) de conejo obtenido en ratón

(Stressgen, Canada). Transcurrido ese tiempo la membrana se lavó 6 veces con PBS-Tween. Posteriormente se incubó durante 1 hora y media con un anticuerpo antiinmunoglobulina de ratón unido a peroxidasa de rábano picante (HRP) (DAKO A/S, Dinamarca). Tras la incubación con el anticuerpo secundario se volvió a lavar 5 veces en PBS-Tween más un lavado final con PBS.

La detección de la proteína se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido) 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, Reino Unido), durante aproximadamente 1 minuto.

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, EE.UU.).

Con objeto de verificar que se había cargado la misma cantidad de proteína en cada pocillo del gel, las membranas se lavaron en tampón de deshibridación durante 15 minutos a 50ºC y se expusieron posteriormente a anticuerpos β-actina (42kDa) (Sigma Corporation of America, EE.UU.).

8.7.6 Actividad enzimática de la SODMn

- Fundamento:

La actividad enzimática de la SODMn se determinó en extractos de CMSP utilizando la inhibición por SOD de la reacción de O_2^- con azul de nitrotetrazolio (NBT), siguiendo la técnica de Oberley y Spitz (1984) con ligeras modificaciones.

- Reactivos:
  - Tampón fosfato potásico 0,05 M, pH 7,8
  - Xantina 1,8 mM

- NaCN 0,33 M
- NBT 2,24 mM
- DETAPAC 1,33 mM
- CAT 40 U/ml
- XO 0,01 U/ml

- Método:

En primer lugar, se prepararon los tampones de la reacción: tampón para SOD total y tampón para SODMn. Las mezclas de reacción se prepararon añadiendo 0,8 ml del tampón para SOD total o tampón para SODMn a cada tubo de ensayo correspondiente. Se añadíeron también 100µl de muestra o de tampón fosfato, en el caso del blanco. Posteriormente se añadíeron 10µl de XO y se leyó el cambio de absorbancia en un espectrofotómetro (U-2000 spectrophotometer, Hitachi, Japón) a 560 nm y 25ºC durante al menos 5 minutos, desechando los primeros 15 segundos para el cálculo final. En el caso de la SODMn, se incubaba la muestra con los 0,8 ml del tampón SODMn durante 45 minutos a 25ºC. Finalizada la incubación se leía la muestra a 560 mM durante 5 minutos, desechando los primeros 15 segundos para el cálculo final. Se ajustaba la absorbancia a un rango de absorbancia de 0,020 ± 0,01 por minuto.

La linealidad de la determinación se mantuvo entre 40 y 60% de la inhibición lo que se correspondía a la pendiente entre 0,01 y 0,015 unidades de absorbancia por minuto. Los valores se expresaron como U/mg prot. Se utilizó el siguiente cálculo para medir la actividad de la enzima SODMn:

(V/Vc) -1 x (vol final cubeta ml /vol de muestra ml) x 1/dilución muestra

Siendo:

V = velocidad de generación de O_2^- sin muestra, es decir, sin inhibición por parte de la SOD

Vc = velocidad de generación de O_2^- en presencia de muestra, es decir, con inhibición por parte de la SOD

8.8 Análisis del polimorfismo genético Ala16Val de la SODMn

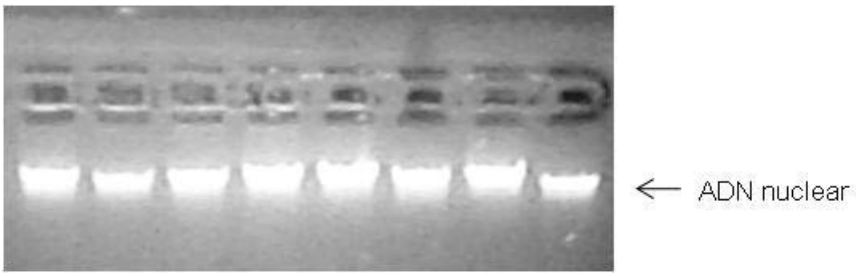
8.8.1 Aislamiento del ADN nuclear

- Fundamento:

El aislamiento de ADN nuclear se realizó mediante uso de un kit comercial específico para extracción de ADN a partir de muestras de sangre.

- Método:

El ADN nuclear se obtuvo a partir de leucocitos de sangre periférica recogida con tubos de 4,5 ml con vacío y 0,1 % de EDTA (concentración final de 1 mg/dL) (Terumo Venoject®, Bélgica). La sangre recogida se llevó al Laboratorio de Biología Molecular donde, inmediatamente, se realizó la extracción de ADN. El ADN genómico se aisló a partir de los leucocitos utilizando un kit de extracción específico (GFX™ Genomic Blood DNA Purification, Amersham Biosciences Inc. Co., EE.UU.). Las muestras fueran congeladas a -20ºC para su posterior genotipado. Se verificó la cantidad de ADN de cada muestra (Chemidoc XRS, Biorad, Italia) en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (Merck KGaA, Alemania):



Fotografia 1: Muestras de ADN nuclear.

8.8.2 Amplificación del ADN nuclear

- Fundamento:

La amplificación del ADN nuclear se realizó utilizando la técnica de amplificación génica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

- Método:

Los iniciadores de amplificación de la SODMn codificaron un fragmento de 110 pares de bases (pb) y estaban compuestos por la siguiente secuencia de nucleotidos: 5' GCC CAG CCT GCG TAG ACG GTC CCG C 3' (iniciador sentido), y 5' TGC CTG GAG CCC AGA TAC CCC AAG 3' (iniciador antisentido). Para la PCR se preparó una mezcla con los siguientes reactivos para cada muestra (SuperTaq^{TM}, Ambiom Inc., Reino Unido):

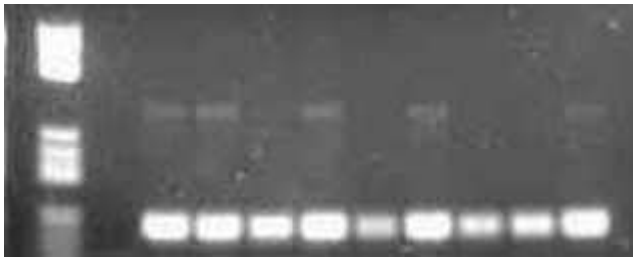
- Taq polimerasa
- 40 pmol del primer *sentido*
- 40 pmol del primer *antisentido*
- 25 mM de $MgCl_2$
- 10 mM de dNTPs
- tampón de la enzima (10x)
- dimetil sulfóxido
- H_2O libre de nucleasas

Las muestras fueron colocadas en un termociclador (PTC-200 Peltier Thermal Cycler, Biorad, EE.UU.) y bajo el siguiente programa de amplificación:

- 1 clico de 95ºC durante 6 minutos (desnaturación)

- 35 ciclos de:
    - 95ºC durante 1 minuto (desnaturación)
    - 60ºC durante 1 minuto (hibridización)
    - 72ºC durante 1 minuto (extensión)
- 1 ciclo de 72ºC durante 7 minutos

El producto de PCR resultado de la amplificación se corrió en un gel de agarosa (Amersham Biosciences Inc. Co.,Suécia) al 6%, teñido con bromuro de etidio (Merck KGaA, Alemania). Se empleó un control negativo para descartar posibles contaminaciones en las muestras. El producto amplificado se visualizó en un transiluminador con luz ultravioleta (Chemidoc XRS, Biorad, Italia):



Fotografía 2: Marcador de peso molecular, control negativo y producto de PCR.

8.8.3 Digestión del ADN nuclear amplificado

- Fundamento:

La digestión del ADN amplificado se realizó según la técnica de análisis molecular de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) descrita por Taufer y cols (2005).

- Método:

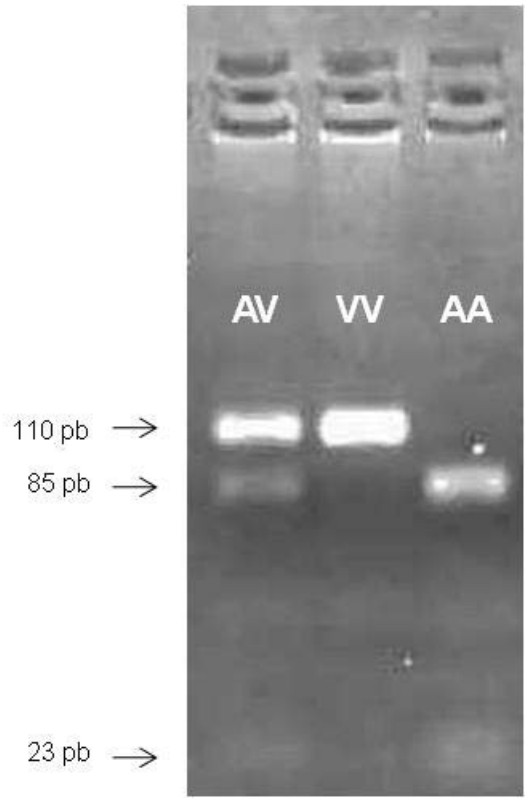
El producto de PCR fue digerido con la enzima de restricción *Hhae*III (Gibco Inc. Co., EE.UU.). Para la digestión se preparó una reacción de digestión que contenía por muestra:

- 15 U de la enzima de restricción
- tampón de la enzima
- H_2O libre de nucleasas

A la mezcla se añadieron 10 µl de producto de PCR. Para activar la endonucleasa de restricción se incubaron las muestras a 37ºC durante 6 h.

Los productos digeridos tenían un tamaño de 23 y 85 pares de base y fueron visualizados (Chemidoc XRS, Biorad, Italia) en un gel de agarosa al 6% teñido con bromuro de etidio. Los genotipos observados fueron los siguientes.

- -9Ala/Ala (23 y 85 pb);
- -9Ala/Val (23, 85 y 110 pb);
- -9Val/Val (110 pb).



Fotografia 3. Producto de PCR digerido.

Análisis estadístico

9 Análisis estadístico

En un primer momento, se aplicó el cálculo de Hardy-Weinberg para verificar el equilibrio de la muestra con el objeto de confirmar la homogeneidad genética de la muestra investigada, comprobando que todas las variables cuantificadas presentaban una distribución normal. Este cálculo se hizo con el uso del software Excel 2007 para Windows.

A continuación se realizó el tratamiento de los datos mediante el uso del paquete estadístico SPSS 13.0 para Windows (SPSS Inc., EE.UU.). La estadística descriptiva de los resultados se muestra mediante valor de la media ± el error estándar de la media. La presentación gráfica de las variables se realizó con el programa Excel 2007 para Windows. El estudio de la normalidad de la distribución de las variables fue examinado con las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. El análisis estadístico de los resultados cuantitativos se realizó mediante el test de la *t* de student pareada para el estudio de la respuesta individual. Para la comparación de medias entre cada uno de los momentos de recogida de muestra y para el estudio intergrupos se empleó el cálculo de análisis de varianza (ANOVA) de un factor, con prueba *Post Hoc* de Bonferroni, cuando era necesario.

Resultados

10 Resultados

10.1 Distribución de los genotipos – homogeneidad de la muestra

Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de la muestra inicial observándose una frecuencia del 25% del genotipo AA (*n*=14), 33% del VV (*n*=19) y 42% del AV (*n*=24). Las frecuencias alélicas calculadas de los alelos A y V fueran de 0,456 y 0,544, respectivamente. El cálculo de Hardy-Weinberg comprobó que las frecuencias observadas eran similares a las esperadas (*P*=0,273) indicando que la muestra comparte las mismas características genéticas, desechando posibles diferencias étnicas. Este dato nos sirve para desechar una posible influencia de variaciones genéticas en la respuesta al ejercicio físico exhaustivo asociado al polimorfismo Ala16Val del gen codificante de la SODMn.

Partiendo de esta muestra inicial, el estudio comparó los niveles basales de indicadores de estrés y estatus oxidativo en 30 adultos jóvenes activos con diferentes genotipos sometidos a una prueba de esfuerzo físico submáximo en cicloergómetro, observándose los resultados que se detallan a continuación. En total, se reclutaron 10 participantes por cada genotipo del polimorfismo Ala16Val del gen codificante de la SODMn.

10.2 Esfuerzo físico máximo

Los participantes seleccionados con diferentes genotipos para el estudio de intervención fueron comparados en primer lugar en función de sus variables antropométricas (Tabla 1), no presentando diferencias significativas entre los grupos para ninguna de las variables estudiadas.

Características de la muestra

	AA	AV	VV	*P*
Edad (años)	21,0 ± 0,7	20,0 ± 0,5	20,9 ± 0,4	0,433
Peso (Kg)	76,4 ± 3,3	73,3 ± 2,2	75,2 ± 1,7	0,680
Talla (cm)	176,0 ± 1,8	177,8 ± 1,7	177,3 ± 1,5	0,758
IMC	24,6 ± 0,8	23,2 ± 0,7	23,8 ± 0,2	0,338
Porcentaje Graso (%)	12,0 ± 1,1	10,6 ± 0,6	10,9 ± 0,5	0,479
VO_{2max} ($ml/Kg.min^{-1}$)	58,2 ± 2,8	60,0 ±1,9	57,8 ± 0,9	0,724
Potencia Máxima (W)	302,5 ± 9,4	312,5 ± 5,5	317,5 ± 7,5	0,385

Tabla 1: Caracterización de la muestra. Valores medios ± E.E.M.

De la misma manera, en la Tabla 1 podemos evidenciar que no se encontraron diferencias significativas entre los distintos genotipos a la hora de comparar el VO_{2max} y la potencia máxima obtenidos en la prueba de esfuerzo físico máximo, comprobando la uniformidad de la muestra frente a estos parámetros.

10.3 Esfuerzo físico submáximo – parámetros ergométricos y metabólicos

Las siguientes tablas exponen los resultados de los VO_2 promedios obtenidos en la prueba de esfuerzo submáximo. En la Tabla 2 podemos ver el VO_2 medio obtenido a lo largo del esfuerzo submáximo así como el porcentaje de

dichos valores frente a la prueba de esfuerzo máximo. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Consumo de oxígeno

	AA	**AV**	**VV**	***P***
VO_2 (ml/Kg/min^{-1})	42,8 ± 1,6	46,1 ± 1,7	44,2 ± 1,0	0,321
% VO_{2max}	74,2 ± 2,3	76,8 ± 1,7	76,7 ± 2,0	0,622

Tabla 2: Valores de VO_2 y %VO_{2max} alcanzados por los participantes durante el esfuerzo submáximo. Valores medios ± E.E.M.

El VO_2 de los participantes a lo largo del esfuerzo submáximo fue controlado en distintos puntos. Se adoptó esta metodología para poder asegurar la realización de la prueba en condiciones iguales, manteniendo el VO_2 aproximadamente al 70% relativo al VO_{2max}. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos para esta variable. La Tabla 3 demuestra los valores de VO_2 obtenidos en los distintos momentos del esfuerzo submáximo.

	Consumo de oxígeno (ml/Kg.min^{-1})			
Tiempo de prueba (min)	**AA**	**AV**	**VV**	***P***
00:00	39,7 ± 1,1	41,1 ± 1,8	40,1 ± 1,5	0,811
10:00	43,2 ± 1,7	46,6 ± 1,9	44,2 ± 1,1	0,411
20:00	42,5 ± 2,1	45,4 ± 1,6	45,4 ± 1,0	0,365
30:00	42,6 ± 1,6	46,4 ± 2,3	44,7 ± 1,2	0,382

Tabla 3: VO_2 en distintos momentos del esfuerzo submáximo. Valores medios ± E.E.M.

Como parámetros de esfuerzo metabólico se midieron la cantidad de lactado en sangre periférica y el RQ en distintos momentos del esfuerzo submáximo. Los participantes no presentaron diferencias en la cantidad de lactato en sangre periférica en ninguno de los distintos momentos de la prueba. La Tabla 4 refleja la concentración de lactato detectada a los 15, 30 y 40 minutos de la prueba de esfuerzo submáximo, respectivamente.

Concentración de lactato (mmol/l)

Tiempo de prueba (min)	AA	AV	VV	*P*
15:00	7,1 ± 1,4	7,8 ± 0,6	7,5 ± 0,7	0,871
30:00	7,7 ± 1,0	8,1 ± 1,0	7,2 ± 1,1	0,851
40:00	6,5 ± 0,9	7,9 ± 0,5	7,1 ± 0,9	0,501

Tabla 4: Concentración de lactato en distintos momentos del esfuerzo submáximo. Valores medios ± E.E.M.

La intensidad de la prueba también se controló a través del RQ. En los mismos momentos del esfuerzo submaximo que se medía el VO_2 se cuantificaba el RQ. En la Tabla 5 se muestra los valores encontrados. Es importante destacar que el promedio final de los datos tampoco presentó diferencias significativas (*P*=0,772).

Cociente Respiratorio

Tiempo de prueba (min)	AA	AV	VV	*P*
00:00	1,04 ± 0,0	1,02 ± 0,0	1,05 ± 0,0	0,685
10:00	0,99 ± 0,0	1,00 ± 0,0	1,00 ± 0,0	0,846
20:00	0,95 ± 0,0	0,97 ± 0,0	0,98 ± 0,0	0,404
30:00	0,95 ± 0,0	0,97 ± 0,0	0,96 ± 0,0	0,746

Tabla 5: RQ durante el esfuerzo submáximo. Valores medios ± E.E.M.

También se recogieron datos de frecuencia cardíaca a lo largo del esfuerzo submáximo. No hubo diferencias significativas entre los grupos con relación a las frecuencias cardíacas máximas y medias a lo largo de la prueba. En la Tabla 6 apreciamos las frecuencias cardíacas media y máxima, respectivamente, obtenidas en la prueba de esfuerzo submáximo.

Frecuencia cardíaca (lpm)

	AA	AV	VV	*P*
Media	174,7 ± 2,7	179,3 ± 2,7	173,8 ± 3,2	0,554
Máxima	183,8 ± 2,2	186,4 ± 2,5	183,9 ± 3,6	0,778

Tabla 6: valores de FCmedia y FCmax alcanzados durante el esfuerzo submáximo. Valores medios ± E.E.M.

Con objeto de disminuir la posible hemoconcentración como consecuencia del ejercicio, se estandarizó la ingestión de 500 ml de agua mineral comercial por participante entre el comienzo del esfuerzo submáximo y la segunda toma de muestra sanguínea. La Tabla 7 refleja los niveles de hematocrito antes y después de la prueba. De nuevo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos.

Hematocrito (%)

Genotipo	**Pre**	**Post**	***P***
AA	44,3 ± 0,8	44,1 ± 0,8	0,873
AV	45,6 ± 0,8	45,7 ± 0,8	0,901
VV	46,2 ± 0,6	46,3 ± 0,6	0,898

Tabla 7: valores en porcentaje (%) de hematocrito antes y después del esfuerzo submáximo. Valores medios ± E.E.M.

Para minimizar el posible efecto de la dieta en la capacidad antioxidante de los participantes se les pasó un recordatorio alimentario de 3 días antes de la realización del esfuerzo submáximo. No se detectaron diferencias significativas en ninguna de las variables estimadas. La Tabla 8 muestra los valores obtenidos de los principales micro y macronutrientes ingeridos con la dieta por grupo. Los valores se refieren al promedio de los 3 días de estimación evaluados.

Estimación de micro y macronutrientes

	AA	AV	VV	*P*
Energía (Kcal/día)	1778,7 ± 150,0	1799,1 ± 109,4	1849,0 ± 108,5	0,924
Colesterol (g)	382,2 ± 53,4	411,2 ± 74,4	404,0 ± 76,0	0,955
Fe (mg)	16,5 ± 2,2	17,1 ± 1,5	15,9 ± 1,4	0,898
Cu (mg)	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,690
Zn (mg)	9,4 ± 1,0	10,2 ± 0,7	12,0 ± 1,9	0,422
Mn (mg)	3,5 ± 0,6	4,4 ± 2,0	3,6 ± 0,9	0,844
Se (µg)	65,5 ± 8,0	62,6 ± 8,0	62,7 ± 6,1	0,951
Ácido ascórbico (mg)	128,6 ± 44,6	139,4 0± 29,6	130,0 ± 32,0	0,978
Retinol (µg)	593,4 ± 86,0	687,1 ± 83,3	802,3 ± 169,8	0,507
Calciferol (µg)	7,0 ± 3,2	4,2 ± 1,6	7,3 ± 1,9	0,667
Tocoferol (mg)	9,2 ± 2,4	6,9 ± 0,5	7,5 ± 0,9	0,613

Tabla 8: Estimación de las cantidades diarias de micro y macro nutrientes en la dieta. Valores medios ± E.E.M.

10.4 Análisis bioquímicos y moleculares del esfuerzo submáximo – pre y post

En un primer momento se determinaron y se compararon los contenidos basales de la concentración de GSHt y oxidación de los grupos -SH, así como la expresión génica de ARNm, la cantidad de proteína específica y la actividad

enzimática de la SODMn. Como se podrá observar a lo largo de este apartado no se observaron diferencias entre los genotipos en condiciones basales. Sin embargo, transcurrida una hora desde la realización de la prueba submáxima de esfuerzo, los contenidos relacionados con la modulación de la enzima SODMn se encontraban modificados, así como los marcadores de estrés oxidativo.

	Concentración de glutatión total ($\mu M/10^6$cells)		
Genotipo	**Pre**	**Post**	***P***
AA	4,1 ± 0,4	5,3 ± 0,9	0,106
AV	3,9 ± 0,4	5,2 ± 0,4	**0,009**
VV	3,8 ± 0,4	5,3 ± 0,7	0,079

Tabla 9: Efecto del polimorfismo genetico Ala16Val del gen codificante de la SODMn en la concentración de GSHt en CMSP. Valores medios ± E.E.M.

El grupo de individuos heterocigotos (AA y VV) presentó concentraciones intermedias entre los genotipos homocigotos para este marcador GSHt. En el grupo AV, aumentaron significativamente las concentraciones de GSHt tras el ejercicio (*P*=0,009); sin embargo, aunque los valores de los grupos -SH disminuyeron no llegaron a alcanzar significación estadística (*P*=0,502). En la Tabla 11 se observan los resultados obtenidos en los contenidos de los grupos -SH.

Grupos sulfidrilos (nmol/mg prot)

Genotipo	Pre	Post	*P*
AA	21,6 ± 2,2	23,6 ± 3,0	0,289
AV	23,3 ± 2,9	22,0 ± 2,2	0,502
VV	28,4 ± 2,7	23,2 ± 3,1	**0,042**

Tabla 10: Efecto del polimorfismo genético Ala16Val del gen codificante de la SODMn en los contenidos de -SH en CMSP. Valores medios ± E.E.M.

La expresión génica de ARNm de la enzima SODMn se vio afectada tras la realización del ejercicio. Aun así, solamente los individuos homocigotos AA presentaron una mayor expresión génica después ejercicio (*P*=0,038). Los participantes heterocigotos y los homocigotos VV presentaron patrones de expresión génica similares (Tabla 12).

Contenido de ARNm de la SODMn

Genotipo	Pre	Post	*P*
AA	100,0	117,0 ± 2,2	**0,038**
AV	100,0	105,6 ± 6,4	0,949
VV	100,0	102,2 ± 4,3	0,700

Tabla 11: Efecto del polimorfismo genético Ala16Val del gen codificante de la SODMn en la expresión génica de ARNm de la SODMn (%) en CMSP. Valores medios ± E.E.M.

En la tabla 13 se pone de manifiesto que no existe ningún efecto del genotipo sobre la concentración total de la proteína SODMn tras la prueba de esfuerzo submáximo. En los individuos AA se detectó una mayor cantidad de proteína tras el ejercicio (aproximadamente un 8% más que en condiciones basales), pero no se alcanzó significancia estadística (*P*=0,181). Por el contrario, los individuos AV y VV presentaron una menor concentración de proteína después del ejercicio físico (con decensos del 2 y 6%, respectivamente), pero tampoco se alcanzaron diferencias significativas (*P*=0,267 y *P*=0,153, respectivamente).

Contenido protéico de la SODMn

Genotipo	Pre	Post	*P*
AA	100,0 ± 1,3	107,8 ± 5,4	0,181
AV	100,0 ± 2,0	96,4 ± 2,9	0,267
VV	100,0 ± 1,2	94,5 ± 3,5	0,153

Tabla 12: Efecto del polimorfismo genético del Ala16Val del gen codificante de la SODMn en el contenido protéico de SODMn (%) en CMPS. Valores medios ± E.E.M.

Como puede observarse en la Tabla 14, los participantes heterocigotos y homocigotos AA presentaron una mayor actividad enzimática que los participantes después del esfuerzo sumbáximo (*P*=0,018; *P*=0,013, respectivamente), mientras que los participantes VV presentaron una disminución el la actividad enzimática, aunque no se observaron cambios significativos (*P*=0,266).

Actividad enzimática de la SODMn (U/mg prot)			
Genotipo	**Pre**	**Post**	***P***
AA	2,7 ± 0,2	4,8 ± 0,7	**0,013**
AV	2,3 ± 0,6	3,9 ± 0,9	**0,018**
VV	2,8 ± 0,5	2,1 ± 0,5	0,266

Tabla 13: Efecto del polimorfismo genético del Ala16Val del gen codificante de la SODMn en la actividad enzimática de la SODMn en CMPS. Valores medios ± E.E.M.

A continuación se procedió a la comparación de la respuesta al ejercicio submáximo para cada grupo de individuos en relación a sus distintos genotipos. Se comprobaron los cambios en los marcadores de estrés oxidativo utilizados en el estudio. No se encontraron diferencias significativas en el GSHt y tampoco en los grupos -SH entre los distintos genotipos.

El análisis estadístico también sirvió para comparar los contenidos de ARNm de la SODMn y se verificó que, nuevamente, los individuos AA presentaron mayor expresión génica de ARNm cuando se comparaban con los individuos AV y VV, aunque no se han encontrado diferencias significativas (*P*=0,072). Una vez que se puso de manifiesto que no existían diferencias en el ARNm entre los participantes portadores de los genotipos AV y VV (ambos presentaron un aumento medio de apenas 5 y 2% sobre los contenidos basales de ARNm), se pudo observar el efecto de dosis. Es decir, es necesaria la presencia de un genotipo recesivo (AA) para obtener una expresión génica media de un 17% en comparación a su condición basal en respuesta a una prueba de esfuerzo submáximo.

Los contenidos de proteína de la SODMn analizados después de la prueba de esfuerzo submáximo también fueron distintos entre los genotipos. Se llevó a cabo un análisis estadístico para comparar los contenidos de proteína entre los participantess portadores del genotipo AA y VV después del esfuerzo submáximo y se pusieron de manifiesto mayores contenidos de proteína en individuos AA (un 7% por encima de las condiones basales), mientras que los demás genotipos presentaron una tendencia a disminuir los contenidos de esta proteína en relación a los valores basales (4% para el AV y 6% para el VV), alcanzando esta diferencia significancia estadística entre los homocigotos (*P*=0,044). La Figura 18 resume los datos encontrados y en las fotografías 4 y 5 podemos apreciar el western blot respresentativo del contenido protéico de la SODMn y β-actina, respectivamente

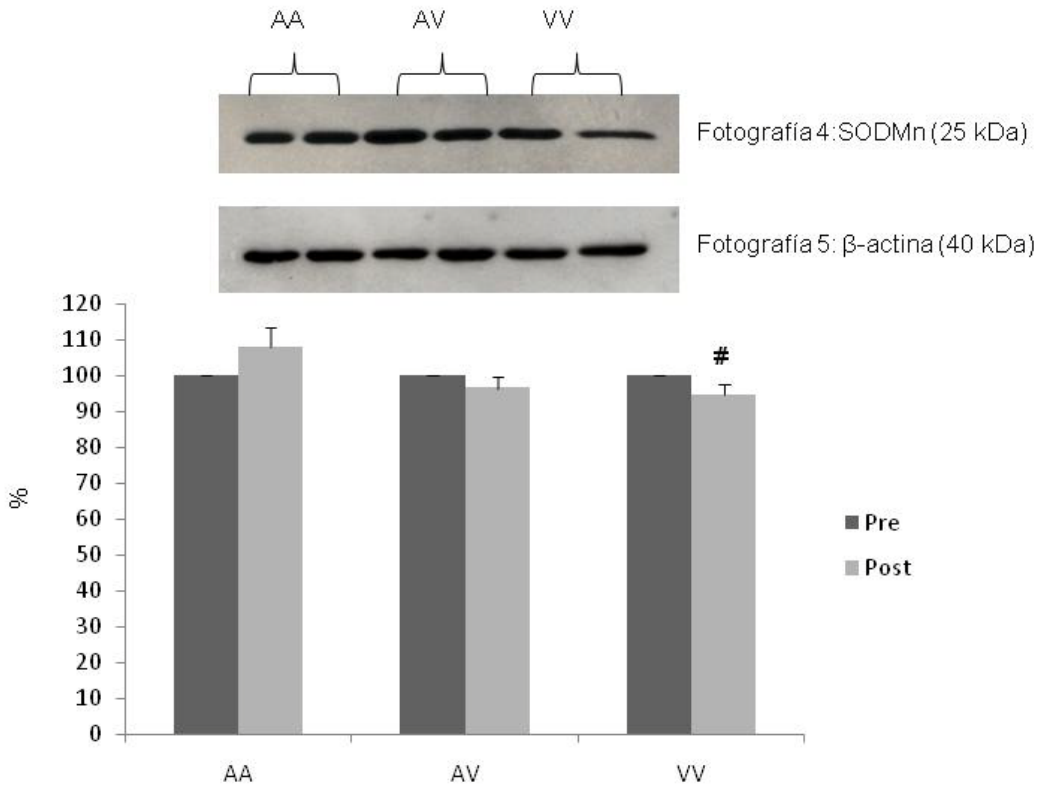


Figura 18: Contenido protéico de la SODMn para los distintos genotipos

diferencia significativa con AA post

La actividad enzimática de la SODMn fue significativamente más elevada en los individuos con el genotipo AA comparados con los individuos VV, mientras que los heterocigotos presentaron valores intermediarios de actividad enzimática en relación a los homocigotos (*P*=0,048). La Figura 19 pone de manifiesto los datos encontrados:

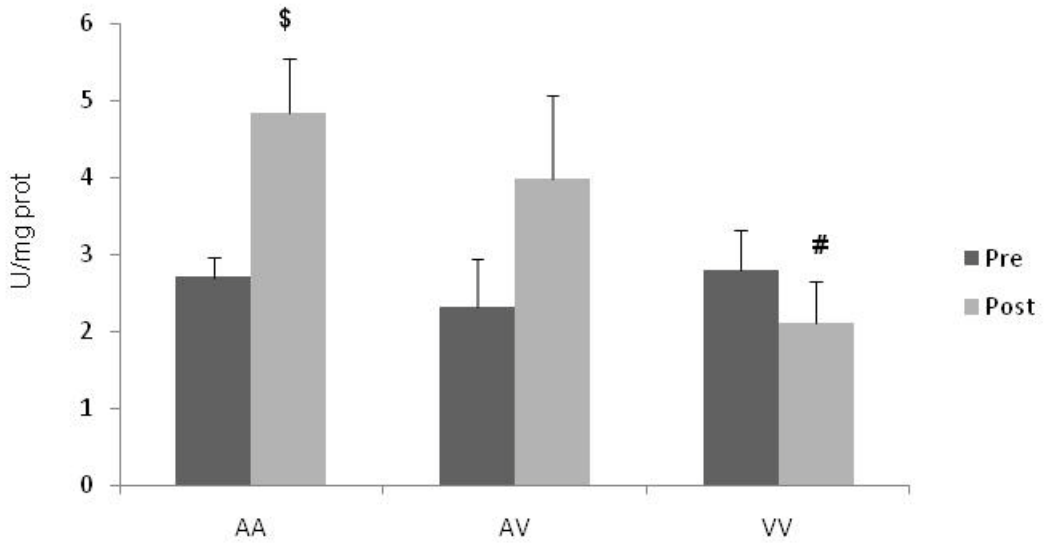


Figura 19: Actividad enzimática de la SODMn para los disntitos genotipos.
$ diferencia significativa pre; # diferencia significativa con AA post

Con los resultados obtenidos se realizó un nuevo análisis estadístico para verificar un posible efecto de dosis. En este análisis, los individuos AA y AV fueran considerados como un unico grupo frente al genotipo VV. No se observaron diferencias significativas considerando la posibilidad de dominancia del alelo A en la producción de proteína de la SODMn (*P*=0,158). Por lo contrario, en la figura podemos apreciar que también se ha encontraro efecto de dosis del alelo A frente al V en la actividad enzimática (*P*=0,017).

Discusión

11 Discusión

El presente estudio analiza la posible influencia del polimorfismo Ala16Val del gen codificante de la SODMn en la modulación de marcadores del metabolismo oxidativo en adultos jóvenes activos sometidos a un esfuerzo submáximo. Los resultados encontrados en este estudios sugieren una asociación entre el polimorfismo estudiado y la respuesta al estrés oxidativo producido por una prueba de esfuerzo submáximo. Aunque existe un número importante de investigaciones científicas que demuestran la asociación entre el ejercicio físico intensificado y el estrés oxidativo, en la revisión de la literatura disponible hasta el momento no se han encontrado estudios previos que aborden el tema de ejercicio físico y el estrés oxidativo asociado al polimorfismo genético Ala16Val del gen codificante de la SODMn.

La principal relevancia de ésta investigación, en cuanto a los resultados aquí descritos, está de acuerdo con la visión contemporánea de que existen interacciones entre genes y actividad física que afectan directamente a la respuesta al ejercicio físico (Rankinen y cols., 2008) y que, por lo tanto, la práctica del mismo debe de ser cada vez más personalizada. No obstante, por tratarse de un área de investigación relativamente novedosa, todavía quedan por responder innumerables cuestiones relacionadas con la interacción gen-ejercicio, así como limitaciones metodológicas que pueden interferir en los resultados obtenidos y en la interpretación de los mismos. Por este motivo, nuestra discusión sobre los resultados anteriormente descritos se centrará en dos grandes grupos de consideraciones: aspectos metodológicos del estudio y posibles mecanismos biológicos asociados con las respuestas observadas en el metabolismo oxidativo según los genotipos de la SODMn analizados.

Iniciaremos la discusión de los aspectos metodológicos a partir de comentarios relacionados con la selección de la muestra, aspecto fundamental para la implantación de la fase de intervención (prueba de esfuerzo submáximo y recogida de sangre). Con relación a los aspectos metodológicos es fundamental resaltar que, las investigaciones que relacionan las posibles interacciones genes-

ambiente sobre el metabolismo implican un diseño que permita excluir el mayor número de variables potencialmente influyentes. Dicha exclusión se hace compleja, ya que sólo se puede hacer de modo comparativo entre los participantes del estudio, anulando y/o corrigiendo, de esta manera, la influencia de una variable dada sobre el objeto de estudio. El diseñó inicial de este estudio intenta corregir en la muestra parámetros que, en el caso de ser distintos, podría dar lugar a una desviación experimental. Por lo tanto, considerando que en este estudio se hicieron análisis genéticos, su diseño experimental incluyó algunos aspectos destacados por Little y cols. (2002) en su estudio sobre la selección y análisis de datos de prevalencia de genotipos y de asociaciones genes-enfermedad, los cuales también se pueden aplicar a estudios sobre interacción genes-ejercicio-físico.

Por tanto, desde el principio se tuvo la precaución de analizar un número de individuos suficientemente grande (57) para que se pudiera asegurar la homogenicidad de la muestra. Dicha homogenicidad se estimó por la Ley de Hardy-Weinberg que mostró el equilibrio genético de la población total del estudio, es decir, que el grupo inicial de individuos compartía, potencialmente, el mismo conjunto étnico-genético (Crow, 1999).

Una vez considerado el equilibrio de la muestra inicial se seleccionaron 10 participantes de cada genotipo para participar en el estudio. Los criterios para la inclusión de participantes fueron que éstos no fuesen fumadores y que tampoco estuviesen tomando ningún tipo de medicación que pudiese interferir con los análisis de sangre (como antiinflamatorios, por ejemplo). Los datos relativos al perfil antropométrico, a la prueba de esfuerzo submáximo (Wmax y VO_{2max}) y al control de la frecuencia cardíaca no presentaron diferencias significativas cuando se compararon los distintos grupos, comprobándose así la similitud de la muestra. Dicha similitud se considera de fundamental importancia ya que sugiere que los participantes de distintos genotipos presentaban el mismo perfil fisiológico frente al ejercicio físico.

Además, se hizo un control y posterior análisis del consumo de alimentos, principalmente antioxidantes, durante los tres días previos a la prueba de esfuerzo submáximo. La estimación del consumo de micro y macronutrientes puso de manifiesto una similitud entre los grupos y, además, un equilibrio con relación a las ingestas diarias recomendadas (*National Research Council*, 1991). Al mismo tiempo, se pidió a los participantes que no consumieran alimentos ricos en antioxidantes en el desayuno previo a la prueba de esfuerzo submáximo. La importancia del control de la dieta antes de la fase de intervención proviene de estudios como los de Tauler y cols., (2006) que comprobaron que, en atletas, la dieta antioxidante puede influir en la actividad antioxidante de eritrocitos y linfocitos después del ejercicio. Los linfocitos mostraron una elevada sensibilidad a la suplementación antioxidante, mejorando la respuesta de las enzimas antioxidantes tanto en el entrenamiento como en la respuesta al ejercicio agudo. Considerando que este estudio se centró en las respuestas metabólico-oxidativas en linfocitos y monocitos, creemos que el control de los alimentos antioxidantes antes de la realización de la fase de intervención se constituye como un factor clave en el control de esta variable como posible factor interviniente. Considerando la totalidad de los resultados obtenidos con el análisis de las variables anteriores, podemos concluir que la muestra escogida fue lo suficientemente uniforme como para disminuir posibles variaciones en la respuesta fisiológica del metabolismo oxidativo al ejercicio en su relación con el polimorfismo genético estudiado.

Asimismo, también se tomaron medidas de control para evaluar la uniformidad de la muestra en la parte de intervención del estudio. Para ello, el VO_2, el lactato sanguíneo, el hematocrito y el RQ también fueron controlados. Todas estas variables se monitorizaron a lo largo de la realización de la prueba, con excepción del hematocrito, que se controló solamente antes y después de la prueba. Como se puso de manifiesto en los resultados anteriormente descritos, todos estos parámetros se mostraron similares entre los distintos grupos de genotipos, indicando una respuesta fisiológica parecida frente al ejercicio submáximo.

Además, también se tuvo la precaución de controlar el nivel hídrico de los participantes a lo largo de la prueba de esfuerzo submáximo. Para ello, los participantes obligatoriamente ingerían 500 ml de agua mineral comercial entre la primera recogida de muestra (pre) y la recogida post-ejercicio. Este aspecto metodológico es de gran relevancia para evitar errores a la hora de interpretar los datos y comparar los momentos antes y después de la prueba. La inclusión de la ingestión de agua está basada en el estudio descrito por Blomstrand y cols. (1996) quienes evaluaron el efecto de la ingestión de un cóctel de aminoácidos a lo largo de una prueba de esfuerzo submáximo. Al grupo control del mencionado estudio se le administró un placebo de agua y no encontraron diferencias significativas entre los momentos antes y después del ejercicio en ninguno de los parámetros medidos. Considerando que nuestro estudio se centraba únicamente en las alteraciones oxidativas, se optó por adaptar dicho protocolo en el sentido de ofrecer suficiente hidratación para evitar el desencadenamiento de mecanismos fisiopatológicos asociados con la presión y volumen sanguíneos.

El período de realización de la prueba de esfuerzo submáximo se fijó siempre por las mañanas, en un intento de eliminar posibles interferencias que las cargas hormonales y metabólicas pudieran producir a lo largo del día y, por lo tanto, interferencias en las respuestas observadas (Åstrand, 2003).

La recogida de sangre una hora después del término de la prueba de esfuerzo submáximo también se basó en estudios previos. Un ejemplo es el estudio de Orhan y cols. (2004) que demostraron tener en ese momento suficientes diferencias metabólicas en la respuesta a un ejercicio exhaustivo en relación con los marcadores de estrés oxidativo. Además, también se optó por este momento de recogida con el objeto de evitar que los participantes necesitaran ingerir cualquier tipo de bebida y/o realizar actividades físicas. No obstante, en base a los resultados aquí descritos se pueden diseñar futuras investigaciones para verificar la dinámica de los marcadores estudiados en otros períodos de tiempo post-ejercicio.

Las consideraciones sobre los aspectos relacionados con la selección y el control de las condiciones de la muestra estudiada en esta tesis doctoral sugieren que los resultados obtenidos se ven mínimamente afectados por dichas variables. No obstante, el número relativamente pequeño de participantes incluidos en el estudio podría ser considerado como una limitación metodológica, así como la inclusión de solamente participantes activos. Aún así, por tratarse de un primer estudio preliminar estas limitaciones no llegan a comprometer la investigación. Sin embargo, son necesarios estudios complementarios que confirmen estos resultados y que evalúen la posible aparición de respuestas diferenciadas en otros grupos poblacionales (por ejemplo en mujeres).

En la presente investigación se observó que los cambios en el estrés oxidativo, en respuesta a una prueba de esfuerzo submáximo, están asociados con variaciones en el gen codificante de la SODMn. Esta observación crea precedentes para cuestiones que se discutirán a continuación. Un número cada vez más consistente de investigaciones científicas sugieren que el ejercicio produce estrés oxidativo solamente cuando es de carácter exhaustivo (Sastre y cols., 1992; Vollaard y cols., 2005; Knez y cols., 2006). En general, el mecanismo por el cual el ejercicio aumenta la producción de EROs está basado en el concepto de que el ejercicio físico aumenta el VO_2 por parte de la mitocondria, lo que hace que también se incremente la producción de EROs por parte de este orgánulo. No obstante, no parece existir una relación lineal entre el aumento de la intensidad del ejercicio físico y el aumento de la producción de EROs, como propuso el estudio de Chance y cols. (1979), el cual apuntó que aproximadamente el 2% del oxígeno utilizado en la mitocondria se convierte en EROs.

11.1 Estrés oxidativo en células mononucleares de sangre periférica – elección de la muestra

La elección del tejido en el cual analizar los posibles cambios que se puedan producir con el ejercicio físico es fundamental, dado que esta elección puede interferir de manera importante en los resultados. En el 2004, Connolly y cols., afirmaron que la respuesta génica de las CMSP al ejercicio físico se puede configurar en un área importante para la investigación con el fin de determinar los mecanismos que aúnan la actividad física con la salud. Estos datos han sido recientemente corroborados por nuestro grupo de investigación, que ha comprobado que las CMSP pueden ser una muestra fiable para investigar la presencia de procesos inflamatorio-oxidativos en respuesta al ejercicio físico (García-López y cols., 2007; Jiménez-Jiménez y cols., 2008).

Además, publicaciones previas indican que las biopsias musculares afectan a las fibras musculares adyacentes, así como a las enzimas séricas (Aronson y cols., 1998). También debemos considerar que el procedimiento para obtener biopsias musculares puede contribuir para el desarrollo de focos de inflamación local (Malm y cols., 2000) y que la inflamación local puede producir leucocitosis (Forster y cols., 1986). Considerando que algunos leucocitos, como los neutrófilos, pueden causar aún más daño a través de la liberación de EROs y enzimas proteolíticas (Hiltermann y cols., 1998), las CMSP se convierten en una opción segura y relativamente libre de las posibles interferencias que el tejido muscular pueda tener a la hora de analizar los resultados. Por lo tanto, esta población celular se convierte en una muestra interesante a la hora de analizar los posibles cambios inflamatorio-oxidativos que el ejercicio físico de larga duración y/o moderada intensidad puede provocar en el organismo.

En general, se cree que durante y justamente después del ejercicio físico el recuento total de leucocitos en el torrente sanguíneo aumenta, estando esta leucocitosis directamente relacionada con la intensidad del ejercicio (Rowbottom y Green., 2000). Sin embargo, la tendencia en el post-ejercicio es a una disminución en el recuento de los linfocitos y monocitos por debajo de los

contenidos basales (Sorichter y cols 2006) mientras que el recuento de neutrofilos suele aumentar (Chinda y cols., 2003). Aunque todavía no se sabe perfectamente los mecanismos que inducen esta linfocitopenia (Malm y cols., 2004) se ha sugerido que este efecto se debe, por lo menos en parte, a la disfunción del sistema inmune en el post-ejercicio (Fehrenbach y Schneider., 2006). Mientras que el ejercicio físico de corta y media duración puede que apenas produzca perturbaciones en las células del torrente sanguíneo durante los primeros 60 minutos después de la realización del ejercicio, la homeostasis puede verse afectada durante varias horas tras la realización de un ejercicio físico de larga duración y/o alta intensidad (McCarthy y cols., 1991).

Además, las respuestas fisiológicas al ejercicio físico implican una serie de cambios en el equilibrio oxidativo y en el metabolismo de algunas moléculas importantes (Banfi y cols., 2006). Entre las posibles consecuencias de este cambio prooxidativo está la oxidación de macromoléculas orgánicas, como veremos a continuación.

11.2 Modulación del estrés oxidativo tras el esfuerzo submáximo

11.2.1 Concentración de glutatión total

En este estudio las concentraciones de GSHt relfejaron un estatus oxidativo gradual entre los distintos grupos de participantes. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes genotipos sí se observó una tendencia cuando se analizaron los participantes dentro de sus genotipos y dicha tendencia indica un claro efecto del genotipo en la respuesta oxidativa frente a una prueba de esfuerzo submáxima. Los participantes AA no presentaron diferencias significativas antes y después en relación con la concentración de GSHt y de grupos -SH, indicando un equilibrio biológico en la concentración de GSHt después del esfuerzo submáximo. Los participantes AV sí presentaron diferencia significativa entre los momentos antes y después para el GSHt, aunque no se apreciara diferencia significativa en los grupos -SH. Por lo tanto, se puede considerar que estos cambios se deben a un aumento en la

concentración de GSHt tras la prueba de esfuerzo submáximo, conduciendo a un estado de estrés oxidativo.

La enzima GPx cataliza la descomposición de H_2O_2 produciendo GSSG. Sin embargo, el GSSG intracelular puede ser nuevamente reducido a GSH a través de otra enzima, la GR (Elosua y cols., 2003). La actividad enzimática de la GR juega un papel importante en las defensas antioxidantes regenerando el GSH biológicamente activo usando NADPH como sustrato para catalizar la reacción (Tauler y cols., 2002). El GSH, a su vez, es de fundamental importancia en el mantenimiento de las reservas reducidas de las vitaminas C y E (Husain, 2003). Investigadores como Rietjens y cols. (2007) demostraron que la actividad enzimática de la GR se puede ver aumentada tras un protocolo de ejercicio excéntrico. En la misma línea, Bloomer y cols. (2005) afirmaron que los cambios transitorios del GSH se deben a la rápida conversión del GSSG en GSH a través de la actividad de la GR. Atalay y cols. (2000) oservaron que ratas sometidas a un entrenamiento en tapiz rodante de 8 semanas y suplementadas con aceite de pescado y vitamina E presentaban mayor actividad enzimática de la GR que ratas suplementadas con aceite de soja y vitamina E. Cabe resaltar que ambos grupos suplementados con aceite de pescado (control y experimental) presentaban mayor actividad enzimática que los grupos suplementados con aceite de soja (control y experimental). Según los autores, esta diferencia en la actividad enzimática de la GR puede ser la clave para entender la menor disminución en los contenidos hepáticos de GSHt en las ratas tratadas con aceite de pescado frente a las ratas tratadas con aceite de soja. Según Sen y cols. (1993), el aumento en la actividad de la GR puede parcialmente explicar la sobreepresión de los contenidos de GSHt a través del aumento en la regeneración de GSH a partir de GSSG.

En nuestro estudio, los participantes AV mostraron un incrmento en los contenidos de GSHt después del esfuerzo submáximo sin que se pudiera detectar cambios en la cantidad de grupos -SH. Este hecho nos lleva a pensar que la actividad de la GR reciclando GSSG a GSH no se aplicaría en este caso, una vez que los niveles de -SH no se vieron alterados.

El GSH es sintetizado a partir de L-glutamato, L-cisteína y L-arginina por la acción consecutiva de las enzimas γ-glutamilcisteína sintetasa (γ-GCS) y la glutatión sintasa. La γ-GCS cataliza la primera reacción; esta enzima es limitante de la velocidad del proceso completo y que requiere de la presencia de Mg^{2+} y Mn^{2+} como cofactores. El segundo paso en la síntesis de GSH está catalizado por la glutatión sintasa y no está sometida a un proceso de inhibición por retroalimentación (Lu, 1999). Un vez sintetizado, el GSH puede ejercer su función o bien ser degradado para participar en otros procesos metabólicos como el ciclo γ-glutamilo que aporta precursores de aminoácidos para la síntesis del propio GSH (Dickinson y Forman, 2002). Sin embargo, durante el ejercicio de alta intensidad los aminoácidos necesarios para la síntesis del GSH pueden ver modificadas sus concentraciones a causa de procesos de transaminación y movilización de proteínas celulares, lo cual puede resultar limitante para la síntesis *de novo* de GSH (Deneke y Franburg, 1989). No obstante, se sabe que en situaciones de fuerte estrés oxidativo, elevadas cantidades de GSH son liberadas por el hígado al torrente sanguíneo, desde donde pueden ser captadas por otros tejidos (Lu y cols., 1990).

En la misma línea, Vider y cols., (2001) investigaron la respuesta del GSHt, entre otros marcadores, en atletas varones. Para ello los participantes realizaron una prueba de esfuerzo máximo incremental en tapiz rodante, con captación directa de oxígeno, encontrándose mayores concentraciones de GSHt en sangre a los 30 minutos después de la realización de la prueba. Según los investigadores, este aumento en los contenidos de GSHt tras la prueba de esfuerzo máximo posiblemente se deba a la exportación del mismo desde tejidos periféricos, como los músculos esqueléticos.

Es conocido que gran parte del GSH es transportado a otros tejidos por la sangre después de su síntesis en el hígado. Por lo tanto, el análisis de los datos y la revisión bibliográfica lleva a pensar que el aumento en la concentración total de GSHt se debe a un desplazamiento de la molécula desde otros tejidos hacia los CMSP. Además, se ha descrito que el GSH citosólico del hígado de rata se renueva rápidamente con vida media de 2-3 h (Dickinson y Forman, 2002).

Considerando el esfuerzo realizado por los participantes en la prueba de esfuerzo submáximo, que podría impedir la síntesis de GSH según lo visto anteriormente, y el momento de la segunda toma de sangre (1 h después del término del esfuerzo), el aumento en la concentración de GSHt experimentado por los participantes AV podría deberse a la movilización de esta molécula desde otros tejidos.

Los participantes AA no presentaron diferencias significativas en la concentración GSHt y tampoco en los grupos -SH, indicando un equilibrio entre la disponibilidad de GSH y su cantidad en los CMSP. Los participantes AV presentaron un incremento significativo en la concentración de GSHt, pero no se observaron diferencias significativas en los grupos -SH, lo que indica que, posiblemente, el desplazamiento de GSH hacia este tejido haya colaborado en el restablecimiento de los valores basales del mismo.

Por el contrario, los participantes VV no presentaron diferencias significativas en la concentración de GSHt, pero sí en la oxidación de los grupos -SH, presentando una menor cantidad después de la prueba de esfuerzo submáximo. No obstante, se pudo observar una fuerte tendencia de aumento en la concentración de GSHt en estos participantes, lo que podría sugerir la existencia de un efecto compensatorio, donde en este momento el desplazamiento de GSH de otros tejidos hacia los CMSP tiene como objetivo restaurar los contenidos basales de los grupos -SH. Posiblemente, otra toma sanguínea posterior a la hora (a las 2 h, por ejemplo) podría ayudar a entender mejor la cinética de la relación entre GSHt y -SH y sus posibles combinaciones.

Finalmente, la técnica empleada para medir el GSHt en este estudio fue la de Anderson (1985). Quizás sea una limitación del estudio el no haber medido por separado el GSSG, pero creemos que los grupos -SH nos pueden dar una buena información adicional y complementaria acerca de lo que esta pasando con la concentración de GSHt.

11.2.2 Concentración de los grupos sulfidrilos

Actualmente, uno de los grandes desafíos en la investigación sobre el estrés oxidativo es la detección del mismo. Cada día son más las herramientas proporcionadas por la biología molecular que nos permiten acceder a los cambios oxidativos experimentados por distintos organismo frente a diferentes situaciones. Sin embargo, es importante elegir correctamente las herramientas para una lectura fiable de los procesos oxidativos que están ocurriendo a nivel celular.

Considerando la naturaleza ubicua de las proteínas en las células y tejidos corporales, además de su susceptibilidad a modificaciones oxidativas, las mismas se configuran en interesantes marcadores de estrés oxidativo (Shacter, 2000). El daño oxidativo a una proteína especifica en cualquier ubicación, pero especialmente en su sitio activo, puede inducir una pérdida progresiva en algunas de sus funciones biológicas (Sohal, 2002), como puede ocurrir con los tioles.

En nuestro estudio no se apreciaron diferencias significativas entre los distintos genotipos en lo que se refiere a los contenidos de grupos -SH. Los tres grupos presentaron cantidades similares en el contenido de -SH, tanto antes como 1 h después del esfuerzo submáximo. Este hecho se puede deber, en parte, al momento de recogida de la muestra. McArdle y cols. (2001) encontraron diferencias significativas en la oxidación de los grupos -SH en el momento inmediatamente posterior a un periodo de 15 minutos de estimulación eléctrica en ratas (100 Hz y 70 V durante 0,5 s a cada 5 s) y a los 15 minutos, pero a la hora ya se habían restablecido los contenidos basales. Sin embargo, el grupo de participantes VV presentó una diferencia significativa en la oxidación de los grupos -SH frente a las concentraciones basales, presentando una disminución de los mismos después de la prueba de esfuerzo submáximo. Este dato podría sugerir que los participantes del grupo VV experimentaron un mayor grado de estrés oxidativo que los demás participantes del estudio.

Los mecanismos subyacentes a la disminución de los niveles de GSHt y la concentración de tioles protéicos que se observan después de distintas actividades contráctiles está todavía por aclararse, pero mucho son los investigadores que se lo atribuyen a la oxidación de los grupos tioles por parte de las EROs generadas durante la actividad física (Ji y cols., 1992; Sastre y cols., 1992). Corroborando este dato, en el presente estudio se encontraron menores contenidos protéicos de grupos -SH en los participantes VV después del ejercicio. Se sabe que varias son las EROs que pueden inducir una disminución en los grupos tioles y que ello es una respuesta inmediata al estrés oxidativo (Rousseau y cols., 2006).

Muchos tipos de modificaciones proteicas son inducidas por las EROs, incluyendo la pérdida de los grupos -SH (Shacter, 2000). Los grupos tioles se caracterizan por su importancia en moderar y reciclar otros agentes antioxidantes en los tejidos, ayudando a mantener el estado redox celular (Ji, 1995). Como se ha apuntado previamente, la pérdida de grupos -SH se puede inducir por una amplia variedad de EROs y es una de las respuestas más inmediatas a un aumento en los niveles de estrés oxidativo (Stadtman y Berlett, 1997). Las consecuencias funcionales de la pérdida de los grupos -SH incluyen pérdida del plegamiento, inactivación catalítica, disminución de la capacidad antioxidante y pérdida de algunas funciones específicas como la unión de metales pesados y aminoácidos sulfurados por la albúmina, entre otras (Shacter, 2000).

Se sabe que la reducción en el contenido de grupos tioles puede reflejar destiolación o s-tiolación de un grupo relativamente específico de proteínas. Varios procesos celulares clave en las células musculares, como por ejemplo la homeostasis iónica, dependen del mantenimiento de los contenidos celulares de tioles en su estado reducido y por tanto esta disminución en las concentraciones de los grupos -SH puede ser fundamental en los eventos que desencadenan daños celulares (McArdle y cols., 1999).

En nuestro estudio, se puso de manifiesto que solamente los participantes VV presentaron menores contenidos de grupos -SH después del esfuerzo submáximo. Como previamente se ha comentado, la primera ERO producida por el metabolismo oxidativo es el anión O_2^- en la mitocondria. Entre las características de éste anión se encuentra su escasa permeabilidad por las membranas lipídicas (Takahashi y Asada, 1983), lo que le restringe a su sitio de producción; en este caso, la mitocondria. En realidad, el anión O_2^- puede pasar por los canales iónicos, pero ese fenómeno es ineficiente comparado con la dismutación del mismo. Bica y cols. (2010) postularon que el genotipo AA de la SODMn posiblemente presente mayor tasa de dismutación del anión O_2^-. Como se ha señalado con anterioridad, la dismutación de dicho anión produce H_2O_2 y O_2 molecular. El H_2O_2 es más permeable en las membranas lipidicas que el anión O_2^-, por lo tanto tiene más posibilidades de salir de la mitocondria hacia el citosol. La mitocondria, en este caso, sufriría un menor grado de estrés oxidativo ya que no se produciría el acúmulo de aniones O_2^- en su interior. Sin embargo, la menor tasa de dismutación consecuente del genotipo VV, haría que se acumularan aniones O_2^- en la mitocondria. El O_2^- es más tóxico que el H_2O_2 y su interacción con otras EROs puede formar especies todavía más tóxicas para el organismo, como el $ONOO^-$. El $ONOO^-$ se genera rápidamente desde el anión O_2^- y $NO^·$ (Pattwell y Jackson, 2004) y tiene la capacidad de pasar por membranas lipídicas con pequeñas limitaciones (Marla y cols., 1997). Además, se sabe que el $ONOO^-$ oxida directamente a los tioles o se puede convertir en OH· o dióxido de nitrógeno (NO_2), que también reaccionan con los grupos tioles (Quijano y cols., 1997). De esta manera, el genotipo AA dismutaría más aniones O_2^- en la mitocondria. Este fenómeno generaría más H_2O_2 que podría salir más fácilmente de la mitocondria por su permeabilidad a las membranas lipídicas, disminuyendo la tasa de estrés oxidativo en este orgánulo. Consecuentemente, el hecho de que el VV presente menor tasa de dismutación del anión O_2^- aumentaría los niveles de estrés oxidativo en este orgánulo a través de la generación de distintas y más potentes EROs.

También se podía atribuir el cambio observado a un menor nivel de Zn en la ingesta diaria de los participantes VV, una vez que se ha documentado que el

Zn previene la unión entre los tioles y los iones hierro, lo que genera radicales libres (Savarino y cols., 2001). No obstante, como anteriormente se mencionó, no se encontraron diferencias significativas en ningún parámetro de la ingesta alimentaria, por lo que ese cambio en los grupos tioles no se puede deber a una menor cantidad de Zn en la dieta.

Por lo tanto, los datos obtenidos ponen de manifiesto que los participantes VV fueron los únicos en presentar un grado elevado de oxidación de los grupos -SH, y, por lo tanto, mayores niveles de estrés oxidativo que los participantes poseedores de, por lo menos, un alelo A. Por ello, se puede concluir que el genotipo VV presenta menor defensa antioxidante frente a las EROs, resultando en mayores niveles de estrés oxidativo cuando se compara con participantes poseedores de, al menos, un alelo A.

11.2.3 Cuantificación del ARN mensajero de la SODMn por RT-PCR

A lo largo de los últimos años han aumentado las evidencias de que el equilibrio redox intracelular es importante en la regulación de la expresión génica (Ji, 2008). Las EROs procedentes de las fuentes intra y extracelular pueden generar cambios en la señalización celular. Se han identificado más de 100 genes en el genoma de los mamíferos que se pueden ver regulados por el estado redox de las células. Igualmente, los dramáticos cambios en la liberación de agentes oxidantes durante las contracciones musculares y sus conocidas funciones en otros tipos celulares sugiere que estas sustancias pueden jugar un papel importante en la expresión génica resultante de la actividad contráctil muscular (Pattwell y Jackson, 2004).

En lo relativo a la expresión de ARNm de la SODMn también se han encontrado datos interesantes. Los resultados del estudio apuntan a que los participantes AA presentan mayor contenido de ARNm de la SODMn después de la prueba de esfuerzo máximo comparado con las condiciones basales. Por lo tanto, parece ser que el alelo V presenta menor tasa de expresión génica a nivel de ARNm y, además, es determinante ya que solo el genotipo AA presentó aumentos en la expresión del ARNm de la SODMn.

Como se ha mencionado anteriormente, está claro que las EROs producidas durante el ejercicio físico actúan como señalizadores para aumentar la producción de enzimas implicadas en la adaptación de los músculos al ejercicio físico (Viña y cols., 2005). De hecho, se ha descrito que el ejercicio físico es capaz de aumentar los contenidos de ARNm de la SODMn en animales (Hollander y cols., 2001), y se cree que este aumento se puede deber, entre otros factores, a las EROs (Gomez-Cabrera y cols., 2005). Se sabe que el H_2O_2, por ejemplo, es capaz de inducir la expresión génica de la SODMn (Harris, 1992; Warner y cols., 1996, Röhrdanz y Kahl, 1998). Recientemente, Sureda y cols. (2008) corroboraron este hecho en un estudio llevado a cabo para comparar las diferencias en la producción de H_2O_2 entre mujeres y hombres adolescentes. Los participantes fueron sometidos a un protocolo de natación al 75% de su capacidad máxima y se obtuvieron muestras sanguíneas antes de la prueba e inmediatamente después de la misma. Al comparar las diferencias entre hombres y mujeres se encontraron diferencias significativas tanto en la expresión génica y actividad enzimática de la SODMn en linfocitos, como en la producción de H_2O_2. Los autores concluyeron que los hombres producen más H_2O_2 que las mujeres, lo que conllevaba una mayor expresión génica y actividad de la SODMn, confirmando que esta ERO induce la expresión génica de dicha enzima clave para el sistema endógeno antioxidante.

El H_2O_2 podría ser la molécula clave implicada en el aumento de la expresión génica de los participantes con el genotipo AA. La elevada tasa de dismutación del anión O_2^- generado en la mitocondria llevada a cabo por los participantes AA conduciría a la producción de grandes cantidades de H_2O_2. Por su permeabilidad a las membranas, éste llegaría fácilmente al citosol, donde empezaría la cascada de señalización que activaría distintos factores de transcripción (por ejemplo, el factor de transcripción nuclear kappa B o el activador de proteínas-1). A su vez, esto produciría la activación del gen codificante para la SODMn, aumentando, por tanto, la expresión génica de dicha enzima. Los participantes AV y VV, al no tener la misma capacidad de dismutación, no serían capaces de producir las mismas cantidades de H_2O_2,

estando, de esa manera, imposibilitados para estimular la expresión génica a través de esta vía.

Igualmente, Sutton y cols. (2005) llevaron a cabo un estudio con células transfectadas humanas de hepatoma (HuH7) con vectores codificantes para variantes Ala o Val de la SODMn. La variante Ala resultó en un aumento de 4 veces en la cantidad de proteína exógena madura y actividad enzimática cuando se comparaba con la variante Val. De la misma manera, la expresión de ARNm se vio incrementada dos veces a las 36h de la transfección comparado con la variante Val. Los autores concluyeron que la variante Val es degradada por el proteasoma celular debido a un retraso en su transporte hacia el interior de la mitocondria. Además, afirmaron que este retraso en el transporte de la variante Val puede estar asociado con una disminución de la estabilidad de ARNm en esta variante.

De la misma manera, Devries y cols., (2008) investigaron los efectos de la obesidad y del entrenamiento físico en marcadores de estrés oxidativo, defensa antioxidante e inflamación en mujeres obesas. Los investigadores no encontraron diferencias significativas en el contenido protéico de la SODMn al repetir una prueba de esfuerzo máximo con captación directa de oxígeno después de 12 semanas de entrenamiento aeróbico. Los investigadores concluyeron que probablemente las EROs generadas por la obesidad inducirían daños que afectarían a la maquinaria transcripcional y/o traduccional de las enzimas antioxidantes o a la estabilidad del ARNm y/o contenido protéico.

Por lo tanto, la mayor expresión génica de la SODMn en los participantes AA podría deberse al hecho de una posible mayor producción de H_2O_2 y su consiguiente estimulación de los factores de transcripción y, además, a una posible inestabilidad del ARNm relacionada con la variable Val debido a un retraso en su transporte hacia el interior de la mitocondria y, por lo tanto, su exposición y posterior degradación por el proteasoma.

11.2.4 Cuantificación de la proteína SODMn por Western blot

Existen numerosas evidencias que confirman que la adaptación al entrenamiento desde el punto de vista de la capacidad antioxidante se debe a la alteración en la expresión génica, que, a su vez, produce incrementos en los contenidos de ARNm y proteína (Ji, 2008).

En el presente estudio la cantidad total de proteína específica no se vió afectada por la prueba de esfuerzo submáxima. Los participantes AA presentaron aproximadamente un 7% más de proteína después de la realización de la prueba, pero no se alcanzaron diferencias significativas. Los participantes AV presentaron una pequeña disminución cercana al 2% que tampoco fue significativa. Los participantes VV no sólo no presentaron incremento sino que disminuyó el contenido protéico después del ejercicio en este genotipo. Por tanto, no se encontraron diferencias significativas en relación a la prueba de esfuerzo submáxima en los distintos genotipos del polimorfismo Ala16Val del gen codificante de la SODMn. Cuando se realizó la comparación entre grupos se observaron diferencias significativas para los distintos genotipos en respuesta a la prueba de esfuerzo submáxima. Los participantes AA presentaron un mayor contenido protéico que los VV después del esfuerzo submáximo, alcanzando significación estadística. Esta diferencia podría demostrar un posible efecto del ejercicio frente al contenido protéico de la SODMn, hecho que, además, se podría relacionar con la tendencia a la mayor expresión génica de los participantes AA frente a los ps VV.

Morton y cols. (2006) encontraron diferencias significativas en el contenido protéico de SODMn. En su estudio, 8 varones activos realizaron una prueba física en tapiz rodante durante 45 minutos a una velocidad correspondiente a su umbral de lactato. Se obtuvieron biopsias musculares antes de la prueba, inmediatamente después, a las 24 h, 48 h, 72 h y 7 días. No se detectaron cambios en el contenido proteico de SODMn en ninguno de los puntos de muestreo. Los investigadores atribuyeron la ausencia de diferencias significativas en las tomas de muestra post-ejercicio a una gran dispersión en el

contenido proteico basal, llegando a presentar diferencias de hasta 1,5 veces entre participantes. Los investigadores apuntaron que estas diferencias en los contenidos basales podrían deberse, a su vez, a una diferencia en el tipo de fibras obtenidas a través de la biopsia muscular.

Hollander y cols. (2001) tampoco encontraron diferencias significativas en contenido proteíco de la SODMn después de una prueba de esfuerzo en ratas. El protocolo agudo consistió en correr durante 1 h a 25m/min con 5 % de inclinación, lo que, según los autores, representaría aproximadamente el 65 % del VO_{2max} de las ratas. Según los autores, el cambio en la síntesis de la proteína fue probablemente muy pequeño para que se pudiera detectar. Además, proponen que un incremento significativo en la SODMn posiblemente exija una estimulación continua y acumulativa de las vías redox sensibles, lo que se podría lograr con el entrenamiento físico.

En el citosol celular ocurre la síntesis de SODMn que, después de modificaciones post-transcripcionales, se transporta hacia el interior de la mitocondria, donde se convertirá en un homotetrámero. Shimoda-Matsubayashi y cols. (1996) propusieron que el alelo V del polimorfismo Ala16Val codificaría para una conformación *β-láminas plegadas* en lugar de para una estructura *α-hélice*, lo que favorecería el transporte de la proteína hacia la mitocondria. Sutton y cols. (2003) demostraron que el precursor Ala-SODMn está adecuadamente encauzado hacia el interior de la mitocondria, mientras que el precursor Val-SODMn es parcialmente retenido en la membrana interna de la mitocondria. En dicho estudio el transporte del precursor Ala-SODMn presentó 30%-40% más de SODMn activa, matricial y procesada que el precursor Val. Por tanto, parece ser que distintas proteínas podrán presentar distintos tipos de problemas como resultado de una disminución en el potencial electroquímico de la membrana (Mackenzie y Payne, 2007).

En nuestro estudio no se encontraron diferencias en el contenido proteico antes y después del esfuerzo submáxima. No obstante, sí se observaron diferencias significativas entre los genotipos AA y VV en el post-ejercicio.

Considerando la información previamente discutida, se podría atribuir esta menor cantidad de proteína a la limitación presentada por el alelo V a la hora de transportar la enzima hacia la mitocondria. De ser así, se esperaría que la cantidad total de proteína del genotipo VV fuese menor que la del AA, ya que parte de la proteína inmadura se quedaría atrapada en la membrana interna y jamás llegaría a ser proteína madura y, por lo tanto, cuantificable a través de técnicas de western blot. Sin embargo, es importante resaltar que el contenido proteico de las enzimas antioxidantes no es necesariamente indicador de su actividad enzimática (Devries y cols., 2008).

11.2.5 Actividad enzimática de la SODMn

Las EROs no solo causan daño celular sino que también poseen un papel importante en la señalización celular (Jackson, 1999; Ji y cols., 2004). El daño celular es proporcional al incremento en la actividad enzimática de muchas de las enzimas del sistema antioxidante (Sureda y cols., 2005). De hecho, se han documentado incrementos en la regulación de enzimas antioxidantes sin que se observaran cambios en marcadores de estrés oxidativo (Salminen y Vihko, 1983). Aunque algunos estudios discrepan en los resultados (Oh-ishi y cols., 1997; Oh-ishi y cols., 1998; Itoh y cols., 2004), se sabe que el ejercicio físico es capaz de aumentar la actividad de enzimas antioxidantes, tales como la SOD y la CAT (Tauler y cols., 2002; Metin y cols., 2003), en los tejidos activos. De hecho, parece ser que la SODMn juega un papel fundamental en la lucha contra el estrés oxidativo producido por el ejercicio de alta intensidad.

En nuestro estudio también se han podido apreciar cambios en la actividad enzimática de la SODMn. Los participantes AA presentaron mayor actividad enzimática en el post esfuerzo que los participantes VV. Este hecho indica claramente un efecto del genotipo AA sobre el VV en lo que se refiere a la respuesta al ejercicio realizado por los participantes en este estudio. Además, el alelo A se mostró determinante en la actividad enzimática, una vez que los genotipos AA y AV presentaron, ambos, diferencias significativas en la respuesta al ejercicio, incrementando la misma después del esfuerzo submáximo. No en

vano esta fue la única variable medida que nos apuntó un efecto de dosis, asociándose el alelo A con una mayor actividad enzimática de la SODMn en relación a la prueba de esfuerzo submáximo realizada en este estudio.

Oberley y cols. (1987) demostraron que la actividad de la SODMn en corazones de ratas se incrementaba en respuesta a la irradiación con rayos-X en dos fases, el primer pico se producía a la hora y se debía a la activación de las enzimas disponibles en el organismo. El segundo pico ocurría a través de la síntesis *de novo* de la proteína. En nuestro estudio se pudo constatar un aumento en la actividad enzimática de los participantes poseedores de, al menos, un alelo A una hora después de la realización de la prueba de esfuerzo. Por lo tanto, parece ser que el ejercicio físico también es un factor importante en la activación de la SODMn frente al estrés oxidativo.

La SODMn es la principal responsable del incremento en la actividad enzimática de la SOD total, mientras que la actividad de las isoformas SODCuZn (intra y extracelular) se ve poco afectada (Ji y cols., 1988). No en vano se considera crítica la actividad enzimática de la SODMn ya que protege a la mitocondria de los efectos citotóxicos del radical OH· producido por la reacción de Haber-Weiss, radical éste que puede generar daños oxidativos a membranas lipídicas, aminoácidos, ADN mitocondrial y enzimas (Williams y cols., 1998).

Judge y cols. (2005) en un estudio con ratas encontraron un incremento significativo de 12% en los carbonilos protéicos en el grupo experimental ejercitado en una rueda durante 21 meses comparado con el grupo sedentario. Según los autores, este aumento se podía deber, en parte, a una reducción significativa de la actividad enzimática de la SODMn en el grupo experimental. El mismo grupo de investigación había comprobado, en un estudio anterior, que a pesar de una reducción en la concentración de H_2O_2 y en la actividad enzimática de la SODMn, la cantidad de carbonilos protéicos en el grupo experimental con dieta restringida era más elevada que en el de ratas alimentadas *ad libitum* (Judge y cols., 2004). De la misma manera, Bota y cols. (2002) describieron que ratas jóvenes $SODMn^{+/-}$, que presentaban una disminución del 50% en la

actividad enzimática de la SODMn, también presentaban un aumento del 80% en los carbonilos protéicos comparados con las ratas jóvenes $SODMn^{+/+}$. Aquí se puede apreciar, una vez más, la importancia de mantener el equilibrio y una suficiente actividad de la enzima SODMn para el mantenimiento de un estado redox favorable. Williams y cols. (1998) habían aportado con anterioridad datos directos y detallados acerca da la importancia de la SODMn en la defensa antioxidante. Los investigadores estudiaron mitocondrias obtenidas de hígados de ratas $SODMn^{+/-}$ y $SODMn^{+/+}$ y concluyeron que la actividad enzimática de la SODMn es fisiológicamente fundamental. Las ratas $SODMn^{+/-}$ presentaron un 50% menos de actividad enzimática de la SODMn que las ratas $SODMn^{+/+}$. También encontraron una diferencia del orden de un 30% en la concentración de GSH en las ratas $SODMn^{+/-}$ comparadas con las $SODMn^{+/+}$. Además, la reducción en la actividad enzimática de la SODMn en ratas $SODMn^{+/-}$ se correlacionó con un incremento en los niveles de estrés oxidativo experimentados por la mitocondria, ya que las actividad de enzimas como la Aconitasa y la NADH oxireductasa también se vieron disminuidas. Por otro lado, en éstas ratas los contenidos de carbonilos protéicos y 8-OHdG se incrementaron, confirmando el mayor nivel de estrés oxidativo en las ratas $SODMn^{+/-}$.

En nuestro modelo se pudo observar la misma tendencia en la actividad enzimática, ya que los participantes VV no presentaron diferencias significativas en la actividad enzimática SODMn antes y después del esfuerzo submáximo, siendo los únicos que experimentaron disminución en los contenidos de grupos -SH. Queda en evidencia, por tanto, la debilidad del alelo V en cuanto eficacia a la hora de proteger el organismo frente al ataque de las EROs.

Conclusiones

12 Conclusiones

Conclusión primera

El polimorfismo genético Ala16Val del gen que codifica para la SODMn no influyó en el VO_{2max} alcanzado por los distintos participantes que llevaron a cabo este estudio.

Conclusión segunda

Los 57 participantes inicialmente genotipados mostraron una distribución normal de lo genotipos. La distribución alélica en la muestra fue coherente con la que se esperaba encontrar, indicando que la muestra respeta el equilibrio postulado por *Hardy-Weinberg*. Esto sugiere que todos los datos aquí reflejados no se deben a un proceso evolutivo de la población estudiada.

Conclusión tercera

El polimorfismo genético Ala16Val del gen que codifica para la SODMn no implica alteraciones en el estado redox basal en la población joven activa, ya que no se observaron diferencias entre genotipos antes del esfuerzo submáximo en ninguno de los parámetros analizados. De hecho, ni la concentración de GSHt, ni los grupos -SH, ni la expresión génica de ARNm, ni el contenido protéico ni la actividad enzimática de la SODMn se ven afectados, en condiciones basales, por el polimorfismo genético descrito en este estudio.

Conclusión cuarta

Los distintos genotipos del polimorfismo genético Ala16Val del gen que codifica para la SODMn responden de manera diferenciada al esfuerzo submáximo. Así, en el genotipo AA se observó una mayor expresión génica de ARNm y una mayor actividad enzimática de la SODMn después del esfuerzo submáximo. El genotipo AV presentó mayor contenido de GSHt después del esfuerzo submáximo y, a la vez, más actividad enzimática de la MnSOD también en el post esfuerzo. Sin embargo, el genotipo VV no mostró incrementos en

ninguno de los parámetros medidos a excepción de un mayor grado de oxidación de los grupos -SH, lo que puede sugerir niveles más elevados de estrés oxidativo.

Conclusión quinta

La presencia del alelo A en el genotipo del polimorfismo genético del gen de la SODMn esta relacionada con una mayor actividad enzimática de la SODMn. Se ha encontrado efecto de dosis para esta variable, ya que los genotipos AA y AV fueron los únicos en los que se puso de manifiesto un incremento en la actividad enzimática en el post esfuerzo submáximo. En la misma línea, la presencia del genotipo AA frente al genotipo VV asegura un mayor contenido protéico en las mismas condiciones.

Conclusión final

Los sujetos con genotipos VV parecen ser los únicos que presentan una defensa antioxidante insuficiente frente a la prueba de esfuerzo submáximo realizada en el estudio. El mantenimiento en los contenidos de ARNm y proteína de la SODMn observados en estos participantes parece indicar un mayor grado de estrés oxidativo comparado con los genotipos que portan el alelo A. De esta manera, parece ser fundamental la presencia del alelo A en el genotipo de la SODMn para poder desarrollar una defensa antioxidante celular eficaz frente al esfuerzo submáximo.

Referencias bibliográficas

13 Referencias bibliográficas

Alessio HM. **1993**. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc, 25(2): 218-224*.

Alessio HM, Hagerman AE, Fulkerson Bk, Ambrose J, Rice RE, Wiley RL. **2000**. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc, 32(9): 1576-1581.*

Ambrosone CB, Ahn J, Singh KK, Rezaishiraz H, Furberg H, Sweeney C, Coles B, Trovato A. **2005**. Polymorphisms in genes related to oxidative stress (MPO, MnSOD, CAT) and survival after treatment for breast cancer. *Cancer Res, 65(3): 1105-1111.*

Ambrossone CB, Freudenheim JL, Thompson PA, Bowman E, Vena JE, Marshall JR, Graham S, Laughlin R, Nemoto T, Shields PG. **1999**. Manganese superoxide dismutase (SODMn) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. *Cancer Res, 59 (3): 602-606.*

Anantharaman M, Tangpong J, Keller JN, Murphy MP, Markesbery WR, Kiningham KK, St Clair DK. **2006**. Beta-amyloid mediated nitration of manganese superoxide dismutase: implication for oxidative stress in a APPNLH/NLH X PS-1P264L/P264L double knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol. 2006 May;168(5):1608-18.*

Anderson ME. **1985**. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods enzymol, 113: 548-555.*

Andresen JJ, Faraci FM, Heistad DD. **2004**. Vasomotor responses in SODMn-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol, 287(3):H1141-148.*

Antunes F, Han D, Cadenas E. **2002**. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H_2O_2 detoxification in vivo conditions. *Free Radic Biol Med, 33(9): 1260-1267.*

Aronson D, Wojtaszewski JF, Thorell A, Nygren J, Zangen D, Richter EA, Ljungqvist O, Fielding RA, Goodyear LJ. **1998**. Extracellular-regulated protein kinase cascades are activated in response to injury in human skeletal muscle. *Am J Physiol, 275(2 Pt 1): C555-C561.*

Arosio P y Levi S. **2002**. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radic Biol Med, 33(4): 457-463.*

Atalay M, Laaksonen DE, Khanna S, Kaliste-Korhonen E, Hänninen O, Sen CK. **2000**. Vitamin E regulates changes in tissue antioxidants induced by fish oil and acute exercise. *Med Sci Sports Exerc, 32(3): 601-607.*

Åstrand P-O y Rodahl K. **1986**. Textbook of Work Physiology. *McGraw-Hill, 3rd edition: NY, USA.*

Bachur NR, Gordon SL, Gee MV. **1978**. A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Cancer Res. 1978 Jun;38(6):1745-50.*

Bag A y Bag N. **2008**. Target sequence polymorphism of human manganese superoxide dismutase gene and its association with cancer risk: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 17(12): 3298-3305.*

Banfi G, Malavazos A, Iorio E, Dolci A, Doneda L, Verna R, Corsi MM. **2006**. Plasma oxidative stress biomarkers, nitric oxide and heat shock protein 70 in trained elite soccer players. *Eur J Appl Physiol, 96(5): 483-486.*

Bassett DR Jr y Howley ET. **2000**. Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. *Med Sci Sports Exerc, 32(1): 70-84.*

Bast A y Haenen GR. **2003**. Lipoic acid: a multifunctional antioxidant. *Biofactors, 17 (1-4): 207-213.*

Beckman KB y Ames BN. **1998**. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev, 78: 547-581.*

Beckman KB y Ames BN. **1997**. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem, 272(32): 19633-19636.*

Bergman M, Ahnström M, Palmebäck Wegman P, Wingren S. **2005**. Polymorphism in the manganese superoxide dismutase (SODMn) gene and risk of breast cancer in young women. *J Cancer Res Clin Oncol, 131(7): 439-444.*

Bica CG, da Silva LL, Toscani NV, Zettler CG, Gottlieb MG, Alexandre CO, Graudenz MS, Mânica da Cruz IB. **2010.** Polymorphism (ALA16VAL) correlates with regional lymph node status in breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet, 196(2): 153-158.*

Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L, Smieja M, Cambien F, Meyer J, Lackner KJ. **2003**. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med, 349(17): 1605-1613.*

Blomstrand E, Ek S, Newsholme EA. **1996**. Influence of ingesting a solution of branched-chain amino acids on plasma and muscle concentrations of amino acids during prolonged submaximal exercise. *Nutrition, 12(7-8): 485-490.*

Bloomer RJ**. 2008**. Effect of exercise on oxidative stress biomarkers. *Adv Clin Chem, 46: 1-50.*

Bloomer RJ, Goldfarb AH, Wideman L, McKenzie MJ, Consitt LA. **2005**. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res, 19(2): 276-285.*

Bota DA, Van Remmen H, Davies KJ. **2002**. Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress. *FEBS Lett, 532(1-2): 103-106.*

Boveris A y Navarro A. **2008**. Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free Radic Biol Med, 44(2): 224-229.*

Brigelius-Flohé R. **1999**. Tissue-specific functions of indvidual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med, 27(9-10): 951-965.*

Brigelius-Flohé R. **2009**. Commentary: oxidative stress reconsidered. *Genes Nutr, 4(3):161-163.*

Brooks GA, Fahey TD, Baldwin KM. **2005**. Exercise Physiology: human bioenergetics and its applications. *McGraw Hill, 4th edition: NY, USA.*

Calbet JA, González-Alonso J, Helge JW, Søndergaard H, Munch-Andersen T, Boushel R, Saltin B. **2007**. Cardiac output and leg and arm blood flow during incremental exercise to exhaustion on the cycle ergometer. *J Appl Physiol, 103(3): 969-978.*

Cammack R, Atwood T, Campbell P, Parish H. **2006**. Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology. *Oxford University Press, 2º edition: Oxford, UK.*

Carter, J.E.L. and Yuhasz, M.S. Skinfolds and body composition of Olympic athletes. **en** Carter JEL (ed.). **1984**. Physical Structure of Olympic Athletes. Part II: Kinanthropometry of Olympic Athletes. *Karger, pp. 144-182: Basel, Switzerland.*

Chance B, Sies H, Boveris A. **1979**. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev, 59(3): 527-605.*

Chatgilialoglu C y O'Neill P. **2001**. Free radicals associated with DNA damage. *Exp Gerontol, 36(9): 1459-1471.*

Child RB, Wilkinson DM, Fallowfield JL. **2000**. Effects of a training taper on tissue damage indices, serum antioxidant capacity and half-marathon running performance. *Int J Sports Med, 21(5): 325-331.*

Chinda D, Nakaji S, Umeda T, Shimoyama T, Kurakake S, Okamura N, Kumae T, Sugawara K. **2003**. A competitive marathon race decreases neutrophil functions in athletes. *Luminescence, 18(6): 324-329.*

Chorley BN, Wang X, Campbell MR, Pittman GS, Noureddine MA, Bell DA. **2008**. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: current and developing technologies. *Mutat Res, 659(1-2): 147-157.*

Crane FL. **2001**. Biochemical fucntions of coenzyme Q10. *J Am Coll Nutr, 20(6): 591-598.*

Crawford DR, Abramova NE, Davies KJ. **1998**. Oxidative stress causes a general calcium-dependent degradation of mitochondrial polynucleotides. *Free Radic Biol Med, 25(9): 1106-1111.*

Crow JF. **1999**. Hardy, Weinberg and language impediments. *Genetics, 152(3): 821-825.*

Collinson EJ, Wheeler GL, Garrido EO, Avery AM, Avery SV, Grant CM. **2002**. The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J Biol Chem, 277(19): 16712-16717.*

Commoner B, Townsend J, Pake GE. **1954**. Free radicals in biological materials. *Nature, 174(4432) :689-691.*

Connolly PH, Caiozzo VJ, Zaldivar F, Nemet D, Larson J, Hung SP, Heck JD, Hatfield GW, Cooper DM. **2004**. Effects of exercise on gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. *J Appl Physiol, 97(4): 1461-1469.*

Cooper CE, Vollaard NB, Choueiri T, Wilson MT. **2002**. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans, 30(2): 280-285.*

Culotta VC, Yang M, O'Halloran TV. **2006**. Activation of superoxide dismutases: putting the metal on the pedal. *Biochim Biophys Acta, 1763(7): 747-758*.

D'Autréaux B y Toledano MB. **2007**. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol, 8(10): 813-824.*

Davies KJA, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. **1982**. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun, 107: 1198-1205.*

Dawson E. **1999**. SNP maps: more markers needed? *Mol Med Today, 5(10): 419-420.*

de Meirelles LR, Mendes-Ribeiro AC, Mendes MA, da Silva MN, Ellory JC, Mann GE, Brunini TM. **2009**. Chronic exercise reduces platelet activation in hypertension: upregulation of the L-arginine-nitric oxide pathway. *Scand J Med Sci Sports, 19(1): 67-74.*

Dempsey JA, Hanson PG, Henderson KS. **1984**. Exercise-induced arterial hypoxaemia in healthy human subjects at sea level. *J Physiol, 355: 161-175.*

Deneke SM y Fanburg BL. **1989**. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol, 257(4 Pt 1): L163-173.*

Devries MC, Hamadeh MJ, Glover AW, Raha S, Samjoo IA, Tarnopolsky MA. **2008**. Endurance training without weight loss lowers systemic, but not muscle, oxidative stress with no effect on inflammation in lean and obese women. *Free Radic Biol Med, 45(4): 503-511.*

Dickinson DA y Forman HJ. **2002**. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol, 64(5-6): 1019-1026.*

Di Francescomarino S, Sciartilli A, Di Valerio V, Di Baldassarre A, Gallina S. **2009**. The effect of physical exercise on endothelial function. *Sports Med, 39(10): 797-812.*

Dimonte D, Ross D, Bellomo G, Eklow L, Orrenius S. **1984**. Alterations in intracellular SH homeostasis during metabolism of menadione by isolated rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys, 235(2): 334-342.*

Drevet JR. **2006**. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol Cell Endocrinol, 250(1-2): 70-79.*

Dosek A, Ohno H, Acs Z, Taylor AW, Radak Z. **2007**. High altitude and oxidative stress. *Respir Physiol Neurobiol, 158(2-3): 128-131.*

Edwards R, Dixon DP, Walbot V. **2000**. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci, 5(5): 193-198*.

Elosua R, Molina L, Fito M, Arquer A, Sanchez-Quesada JL, Covas MI, Ordoñez-Llanos J, Marrugat J. **2003**. Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. *Atherosclerosis, 167(2): 327-334.*

Emara MG y Kim H. **2003**. Genetic markers and their application in poultry breeding. *Poult Sci. 2003 Jun;82(6):952-957*

Eras-Erdogan N, Akbas E, Senli H, Kul S, Colak T. **2009**. Relationship between polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene and breast cancer. *Mutation, 680(1-2): 7-11.*

Evans WJ. **2002**. Physical function in men and women with cancer. Effects of anemia and conditioning. *Oncology (Williston Park), 16(9 Suppl 10): 109-115.*

Fehrenbach E y Schneider ME. **2006**. Trauma-induced systemic inflammatory response versus exercise-induced immunomodulatory effects. *Sports Med, 36(5): 373-384.*

Ferguson RA, Ball D, Krustrup P, Aagaard P, Kjaer M, Sargeant AJ, Hellsten Y, Bangsbo J. **2001**. Muscle oxygen uptake and energy turnover during dynamic exercise at different contraction frequencies in humans. *J Physiol, 536(Pt 1): 261-271.*

Finaud J, Lac G, Filaira. **2006**. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med, 36(4): 327-358.*

Fridén J y Lieber RL. **2001**. Eccentric exercise-induced injuries to contractile and cytoskeletal muscle fibre components. *Acta Physiol Scand, 171(3): 321-326.*

Fromenty B y Pessayre D. **1995**. Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol Ther, 67(1): 101-154.*

Forgione MA, Cap A, Liao R, Moldovan NI, Eberhardt RT, Lim CC, Jones J, Goldschmidt-Clermont PJ, Loscalzo J. **2002**. Heterozygous cellular glutathione peroxidase deficiency in the mouse: abnormalities in vascular and cardiac function and structure. *Circulation, 106(9): 1154-1158.*

Forsberg L, de Faire U, Morgenstern R. **2001**. Oxidative stress, human genetic variation, and disease. *Arch Biochem Biophys. 389(1): 84-93.*

Foster NK, Martyn JB, Rangno RE, Hogg JC, Pardy RL. **1986**. Leukocytosis of exercise: role of cardiac output and catecholamines. *J Appl Physiol, 61(6): 2218-2223.*

Frangogiannis NG. **2008**. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res, 58(2): 88-111.*

Fridovich I. **1995**. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem, 64: 97-112.*

French JP, Hamilton KL, Quindry JC, Lee Y, Upchurch PA, Powers SK. **2008**. Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: SODMn, calcium-handling proteins, and calpain. *FASEB J, 22(8): 2862-2871.*

Fujimoto H, Taguchi J, Imai Y, Ayabe S, Hashimoto H, Kobayashi H, Ogasawara K, Aizawa T, Yamakado M, Nagai R, Ohno M. **2008**. Manganese superoxide dismutase polymorphism affects the oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis of macrophages and coronary artery disease. *Eur Heart J, 29(10): 1267-1274.*

García-López D, Häkkinen K, Cuevas MJ, Lima E, Kauhanen A, Mattila M, Sillanpää E, Ahtiainen JP, Karavirta L, Almar M, González-Gallego J. **2007**. Effects of strength and endurance training on antioxidant enzyme gene expression and activity in middle-aged men. *Scand J Med Sci Sports, 17(5): 595-604.*

García JJ, Reiter RJ, Guerrero JM, Escames G, Yu BP, Oh CS, Muñoz-Hoyos A. **1997**. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS Lett, 408(3): 297-300.*

García N, Correa F, Chávez E. **2005**. On the role of the respiratory complex I on membrane permeability transition. *J Bioenerg Biomembr, 37(1): 17-23.*

García-Ramírez M, Francisco G, García-Arumí E, Hernández C, Martínez R, Andreu AL, Simó R. **2008**. Mitochondrial DNA oxidation and manganese superoxide

dismutase activity in peripheral blood mononuclear cells from type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab, 34(2): 117-124.*

Ghosh S, Khazaei M, Moien-Afshari F, Ang LS, Granville DJ, Verchere CB, Dunn SR, McCue P, Mizisin A, Sharma K, Laher I. **2009**. Moderate exercise attenuates caspase-3 activity, oxidative stress, and inhibits progression of diabetic renal disease in db/db mice. *Am J Physiol Renal Physiol, 296(4): F700-708.*

Goldfarb AH, Bloomer RJ, McKenzie MJ. **2005**. Combined antioxidant treatment effects on blood oxidative stress after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc, 37(2): 234-239.*

Gómez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardó FV, Sastre J, Ji LL, Viña J. **2005**. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol, 567(Pt 1): 113-120.*

Gómez-Cabrera MC, Domenech E, Viña J. **2008**. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med, 44(2): 126-131.*

Gómez-Cabrera MC, Martínez A, Santangelo G, Pallardó FV, Sastre J, Viña J. **2006**. Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. *Br J Nutr, 96 (Suppl 1): S31-33.*

Gómez-Cabrera MC, Viña J, Ji LL. **2009**. Interplay of oxidants and antioxidants during exercise: implications for muscle health. *Phys Sportsmed, 37(4): 116-123.*

Goto C, Higashi Y, Kimura M, Noma K, Hara K, Nakagawa K, Kawamura M, Chayama K, Yoshizumi M, Nara I. **2003**. Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. *Circulation, 108(5): 530-535.*

Gottlieb MG, Schwanke CH, Santos AF, Jobim PF, Müssel DP, da Cruz IB. **2005**. Association among oxidized LDL levels, SODMn, apolipoprotein E

polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. *Genet Mol Res, 4(4): 691-703.*

Griffiths HR. **2000**. Antioxidants and protein oxidation. *Free Radic Res, 33 (Suppl): S47-S58.*

Haddad JJ, Olver RE, Land SC. **2000**. Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1alpha and NF-kappa B redox sensitivity. Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem, 275(28): 21130-21139.*

Hallal PC, Victora CG, Azevedo MR, Wells JC. **2006**. Adolescent physical activity and health: a systematic review. *Sports Med, 36(12): 1019-1030.*

Halliwell B. **2007**. Oxidative stress and cancer: have we moved forward*? Biochem J, 401(1): 1-11.*

Halliwell B y Gutteridge JMC. **1999**. Free radicals in biology and medicine. *Oxford Biosciences, 3rd edition: NY, USA.*

Harman D. **1956**. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol, 11(3): 298-300.*

Harman D. **1981**. The aging process. *Proc Natl Acad Sci, 78(11): 7124-7128.*

Harris ED. **1992**. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J, 6(9): 2675-2683.*

Hatcher EL, Chen Y, Kang YJ. **1995**. Cadmium resistance in A549 cells correlates with elevated glutathione content but not antioxidant enzymatic activities. *Free Radic Biol Med, 19(6): 805-812.*

Hennig B y Chow CK. **1988**. Lipid peroxidation and endothelial cell injury: implications in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med, 4(2): 99-106.*

Hiltermann TJ, Peters EA, Alberts B, Kwikkers K, Borggreven PA, Hiemstra PS, Dijkman JH, van Bree LA, Stolk J. **1998**. Ozone-induced airway hyperresponsiveness in

patients with asthma: role of neutrophil-derived serine proteinases. *Free Radic Biol Med, 24(6): 952-958.*

Hitchler MJ y Domann FE. **2009**. Metabolic defects provide a spark for the epigenetic switch in cancer. *Free Radic Biol Med, 47(2): 115-127*.

Hitschke K, Bühler R, Apell HJ, Stark G. **1994**. Inactivation of the Na, K-ATPase by radiation-induced free radicals. Evidence for a radical-chain mechanism. *FEBS Lett, 353(3): 297-300.*

Ho YS y Crapo JD. **1988**. Isolation and characterization of complementary DNAs encoding human manganese-containing superoxide dismutase. *FEBS Lett, 229(2): 256-260.*

Hollander J, Fiebig R, Gore M, Bejma J, Ookawara T, Ohno H, Ji LL. **1999**. Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific adaptation to endurance training. *Am J Physiol, 277(3 Pt 2): R856-862.*

Hollander J, Fiebig R, Gore M, Ookawara T, Ohno H, Ji LL. **2001**. Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle. *Pflugers Arch, 442(3): 426-434.*

Hood DA. **2009**. Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab, 34(3): 465-472.*

Hopkins FG. **1921**. On an autoxidisable constituent of the cell. *Biochem J, 15(2): 286-305*.

Hopkins FG. **1929**. On glutathione: a reinvestigation. *J Biol Chem.*

Hoppeler H y Weibel ER. **1998**. Limits for oxygen and substrate transport in mammals. *J Exp Biol, 201(Pt 8): 1051-1064.*

Hu H, Luo ML, Du XL, Feng YB, Zhang Y, Shen XM, Xu X, Cai Y, Han YL, Wang MR. **2007**. Up-regulated manganese superoxide dismutase expression increases

apoptosis resistance in human esophageal squamous cell carcinomas. *Chin Med J (Engl), 120(23): 2092-2098.*

Hurst SM, Lyall KA, Hurst RD, Stevenson LM. **2009**. Exercise-induced elevation in plasma oxidative generating capability augments the temporal inflammatory response stimulated by lipopolysaccharide. *Eur J Appl Physiol, 107(1): 61-72.*

Husain K. **2003**. Interaction of physical training and chronic nitroglycerin treatment on blood pressure, nitric oxide, and oxidants/antioxidants in the rat heart. *Pharmacol Res, 48(3): 253-261.*

Hussain SP, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I, Ichimiya M, Sengupta S, Mechanic L, Okamura S, Hofseth LJ, Moake M, Nagashima M, Forrester KS, Harris CC. **2004**. p53-induced up-regulation of SODMn and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Res, 64(7): 2350-2356.*

Iguchi T, Sugita S, Wang CY, Newman NB, Nakatani T, Haas GP. **2009**. SODMn genotype and prostate cancer risk as a function of NAT genotype and smoking estatus. *In Vivo, 23(1): 7-12.*

Ikeda Y, Suehiro T, Yamanaka S, Kumon Y, Takata H, Inada S, Ogami N, Osaki F, Inoue M, Arii K, Hashimoto K. **2006**. Association between serum ferritin and circulating oxidized low-density lipoprotein levels in patients with type 2 diabetes. *Endocr J, 53(5): 665-670.*

Irrcher I, Adhihetty PJ, Joseph AM, Ljubicic V, Hood DA. **2003**. Regulation of mitochondrial biogenesis in muscle by endurance exercise. *Sports Med, 33(11): 783-793.*

Itoh M, Oh-Ishi S, Hatao H, Leeuwenburgh C, Selman C, Ohno H, Kizaki T, Nakamura H, Matsuoka T. **2004**. Effects of dietary calcium restriction and acute exercise on the antioxidant enzyme system and oxidative stress in rat diaphragm. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 287(1): R33-38.*

Iuchi T, Akaike M, Mitsui T, Ohshima Y, Shintani Y, Azuma H, Matsumoto T. **2003**. Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. *Circ Res, 92(1): 81-87.*

Ivy JL, Costill DL, Maxwell BD. **1980**. Skeletal muscle determinants of maximum aerobic power in man. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol, 44(1): 1-8.*

Jackson MJ. **1999**. Free radicals in skin and muscle: damaging agents or signals for adaptation? *Proc Nutr Soc, 58(3): 673-676.*

Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA. **2000**. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic Biol Med, 28(9): 1317-1327*

Jackson MJ, McArdle A, McArdle F. **1998**. Antioxidant micronutrients and gene expression. *Proc Nutr Soc, 57(2): 301-305.*

Jenkins RR. **2000**. Exercise and oxidative stress methodology: a critique. *Am J Clin Nutr, 72 (suppl): 670-674.*

Ji LL. **1995**. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radic Biol Med, 18(6): 1079-1086.*

Ji LL. **1999**. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med, 222(3): 283-92.*

Ji LL. **2007**. Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Exp Gerontol, 42(7): 582-593.*

Ji LL. **2008**. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radic Biol Med, 44(2): 142-152.*

Ji LL, Fu R, Mitchell EW. **1992**. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol, 73(5): 1854-1859.*

Ji LL y Fu R. **1992**. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J Appl Physiol, 72: 549-554.*

Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Steinhafel N, Vina J. **2004**. Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. *FASEB J, 18(13): 1499-1506.*

Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J. **2006**. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci, 1067: 425-435.*

Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Viña J. **2007**. Role of nuclear factor kappa B and mitogen-activated protein kinase signaling in exercise –induced antioxidant enzyme adaptation. *Appl Physiol Nutr Metab, 32(5): 930-935.*

Ji LL, Stratman FW, Lardy HA. **1988**. Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. *Arch Biochem Biophys, 263(1): 150-160.*

Jiménez-Jiménez R, Cuevas MJ, Almar M, Lima E, García-López D, De Paz JA, González-Gallego J. **2008**. Eccentric training impairs NF-kappaB activation and over-expression of inflammation-related genes induced by acute eccentric exercise in the elderly. *Mech Ageing Dev, 129(6): 313-321.*

Johnson P. **2002**. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 133(4): 493-505.*

Judge S, Jang YM, Smith A, Selman C, Phillips T, Speakman JR, Hagen T, Leeuwenburgh C. **2005**. Exercise by lifelong voluntary wheel running reduces subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial hydrogen peroxide production in the heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 289(6): R1564-R1572.*

Judge S, Judge A, Grune T, Leeuwenburgh C. **2004**. Short-term CR decreases cardiac mitochondrial oxidant production but increases carbonyl content. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 286(2): R254-R259.*

Judge S y Leeuwenburgh C. **2007**. Cardiac mitochondrial bioenergetics, oxidative stress, and aging. *Am J Physiol Cell Physiol, 292(6): C1983-C1992.*

Kadenbach B, Ramzan R, Vogt S. **2009**. Degenerative diseases, oxidative stress and cytochrome c oxidase function. *Trends Mol Med, 15(4): 139-147.*

Kannan K y Jain SK. **2000**. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology, 7(27): 153-163.*

Kanwar M, Chan PS, Kern TS, Kowluru RA. **2007**. Oxidative damage in the retinal mitochondria of diabetic mice: possible protection by superoxide dismutase. *Invest Ophthalmol Vis Sci, 48(8): 3805-3811.*

Kawanishi S, Oikawa S, Inoue S, Nishino K. **2002**. Distinct mechanisms of oxidative DNA damage induced by carcinogenic nickel subsulfide and nickel oxides. *Environ Health Perspect, 110 (Suppl 5): 789-791.*

Kendall E, McKenzie B, Mason H. **1929**. A study of glutathione: 1 its preparation in crystalline form and its identification. *J Biol Chem.*

Kirkman HN y Gaeetani GF. **2007**. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci, 32(1): 44-50.*

Kojima T, Norose T, Tsuchiya K, Sakamoto K. **2009**. Mouse 3T3-L1 cells acquire resistance against oxidative stress as the adipocytes differentiate via the transcription factor FoxO. *Apoptosis, 15(1): 83-93.*

Knez WL, Coombes JS, Jenkins DG. **2006**. Ultra-endurance exercise and oxidative damage: implications for cardiovascular health. *Sports Med, 36(5): 429-441.*

Laaksonen DE, Atalay M, Niskanen L, Uusitupa M, Hänninen O, Sen CK. **1999**. Blood glutathione homeostasis as a determinant of resting and exercise-induced oxidative stress in young men. *Redox Rep, 4(1-2): 53-59.*

Laemmli UK. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, 227(5259): 680-685.*

Lamprecht M, Greilberger J, Oettl K. **2004**. Analytical aspects of oxidatively modified substances in sports and exercises. *Nutrition, 20(7-8): 728-730.*

Landmesser U y Harrison DG. **2001**. Oxidant stress as a marker for cardiovascular events: Ox marks the spot. *Circulation, 104(22): 2638-2640.*

Lawler JM, Kwak HB, Kim JH, Suk MH. **2009**. Exercise training inducibility of SODMn protein expression and activity is retained while reducing prooxidant signaling in the heart of senescent rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 296(5): R1496-1502.*

Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright Jr J, Dionne L, Lu N., Huang S, Matzuk MM. **1996**. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA, 93(18): 9782-9787.*

Leeuwenburgh C y Heinecke JW. **2001**. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem, 8(7): 829-838.*

Levine RL y Stadtman ER. **2001**. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol, 36(9): 1495-1502.*

Li F, Calingasan NY, Yu F, Mauck WM, Toidze M, Almeida CG, Takahashi RH, Carlson GA, Flint Beal M, Lin MT, Gouras GK. **2004**. Increased plaque burden in brains of APP mutant SODMn heterozygous knockout mice. *J Neurochem, 89(5): 1308-1312.*

Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ. **1995**. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature Genet, 11(4): 376-381.*

Linton S, Davies MJ, Dean RT. **2001**. Protein oxidation and ageing. *Exp Gerontol, 36(9): 1503-1518.*

Little J, Bradley L, Bray MS, Clyne M, Dorman J, Ellsworth DL, Hanson J, Khoury M, Lau J, O'Brien TR, Rothman N, Stroup D, Taioli E, Thomas D, Vainio H, Wacholder S, Weinberg C. **2002**. Reporting, appraising, and integrating data on genotype prevalence and gene-disease associations. *Am J Epidemiol. 156(4): 300-310.*

Liu Y, Borchert GL, Donald SP, Surazynski A, Hu CA, Weydert CJ, Oberley LW, Phang JM. **2005**. MnSOD inhibits proline oxidase-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Carcinogenesis, 26(8): 1335-1342.*

Livak KJ y Schmittgen TD. **2001**. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T). *Method Methods, 25(4): 402-408.*

López-Lluch G, Irusta PM, Navas P, de Cabo R. **2008**. Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Exp Gerontol, 43(9): 813-819.*

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr Al, Randall RJ. **1951**. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem, 193(1): 265-275.*

Lu SC. **1999**. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J, 13(10): 1169-1183.*

Lu SC, García-Ruiz J, Kuhlenkamp M, Ookhtens M, Salas-Prato M, Kaplowitz N. **1990**. Hormonal regulation of glutathione efflux. *J Biol Chem, 265(27): 1608S-1609S.*

Lukaski HC. **1995**. Micronutrients (magnesium, zinc, and copper): are mineral supplements needed for athletes? *Int J Sport Nutr, 5 (Suppl): S74-S83.*

MacKenzie JA y Payne RM. **2007**. Mitochondrial protein import and human health and disease. *Biochim Biophys Acta, 1772(5): 509-523.*

Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL. **2001**. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic Res, 34(4): 325-336.*

Madamanchi NR y Runge MS. **2007**. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res, 100(4): 460-473.*

Malm C, Ekblom O, Ekblom B. **2004**. Immune system alteration in response to increased physical training during a five day soccer training camp. *Int J Sports Med, 25(6): 471-476.*

Malm C, Nyberg P, Engstrom M, Sjodin B, Lenkei R, Ekblom B, Lundberg I. **2000**. Immunological changes in human skeletal muscle and blood after eccentric exercise and multiple biopsies. *J Physiol, 529 (1): 243-262.*

Malmezat T, Breuillé D, Capitan P, Mirand PP, Obled C. **2000**. Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. *J Nutr, 130(5): 1239-1246.*

Manoharan S, Kavitha K, Senthil N, Renju GL. **2006**. Evaluation of anticarcinogenic effects of Clerodendron inerme on 7,12-dimethylbenz(a) anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Singapore Med J, 47(12): 1038-1043.*

Margaritis I, Rousseau AS, Marini JF, Chopard A. **2009**. Does antioxidant system adaptive response alleviate related oxidative damage with long term bed rest? *Clin Biochem, 42(4-5): 371-379.*

Margaritis I y Rousseau AS. **2008**. Does physical exercise modify antioxidant requirements? *Nutr Res Rev; 21(1): 3-12.*

Marla SS, Lee J, Groves JT. **1997**. Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci, 94(26): 14243-14248.*

Marzatico F, Pansarasa O, Bertorelli L, Somenzini L, Della Valle G. **1997**. Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J Sports Med Phys Fitness, 37(4): 235-239.*

Matés JM, Segura JM, Pérez-Gómez C, Rosado R, Olalla L, Blanca M, Sánchez-Jiménez FM. **1999**. Antioxidant enzymatic activities in human blood cells after na allergic reaction to pollen or house dust mite. *Blood Cells Mol Dis, 25(7): 103-109.*

Mrtensson J y Meister A. **1991**. Glutathione deficiency decreases tissue ascorbate levels in newborn rats: ascorbate spares glutathione and protects. *Proc Natl Acad Sci U S A, 88(11): 4656-4660.*

McArdle A, Pattwell D, Vasilaki A, Griffiths RD, Jackson MJ. **2001**. Contractile activity-induced oxidative stress: cellular origin and adaptive responses. *Am J Physiol Cell Physiol, 280(3): C621-627.*

McArdle A, van der Meulen JH, Catapano M, Symons MC, Faulkner JA, Jackson MJ. **1999**. Free radical activity following contraction-induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats. *Free Radic Biol Med, 26(9-10): 1085-1091.*

McAtee BL y Yager JD. **2010**. Manganese superoxide dismutase: effect of the ala16val polymorphism on protein, activity, and mRNA levels in human breast cancer cell lines and stably transfected mouse embryonic fibroblasts. *Mol Cell Biochem, 335(1-2): 107-118.*

McCarthy DA, Grant M, Marbut M, Watling M, Wade AJ, Macdonald I, Nicholson S, Melsom RD, Perry JD. **1991**. Brief exercise induces an immediate and a delayed leucocytosis. *Br J Sports Med, 25(4): 191-195.*

McEligot AJ, Yang S, Meyskens FL Jr. **2005**. Redox regulation by intrinsic species and extrinsic nutrients in normal and cancer cells. *Annu Rev Nutr, 25: 261-295.*

Meister A. **1994**. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem, 269(13): 9397-9400.*

Meloni DA, Oliva MA, Martinez CA, Jos Cambraia J. *2003*. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environ Exp Bot, 49: 69-76.*

Mena S, Ortega A, Estrela JM. **2009**. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutat Res; 674(1-2): 36-44.*

Menegon A, Board PG, Blackburn AC, Mellick GD, Le Couteur DG. **1998**. Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase polymorphisms. *Lancet, 352 (9137): 1344-1346.*

Menshikova EV, Ritov VB, Ferrell RE, Azuma K, Goodpaster BH, Kelley DE. **2007**. Characteristics of skeletal muscle mitochondrial biogenesis induced by moderate-intensity exercise and weight loss in obesity. *J Appl Physiol, 103(1): 21-27.*

Mergener M, Martins MR, Antunes MV, da Silva CC, Lazzaretti C, Fontanive TO, Suyenaga ES, Ardenghi PG, Maluf SW, Gamaro GD. **2009**. Oxidative stress and DNA damage in older adults that do exercises regularly. *Clin Biochem, 42(16-17):1648-1653*.

Metin G, Atukeren P, Alturfan AA, Gulyasar T, Kaya M, Gumustas MK. **2003**. Lipid peroxidation, erythrocyte superoxide-dismutase activity and trace metals in young male footballers. *Yonsei Med J, 44(6): 979-986.*

Midgley AW, McNaughton LR, Wilkinson M. **2006**. Is there an optimal training intensity for enhancing the maximal oxygen uptake of distance runners?: empirical research findings, current opinions, physiological rationale and practical recommendations. *Sports Med, 36(2): 117-132.*

Milei J, Forcada P, Fraga CG, Grana DR, Iannelli G, Chiariello M, Tritto I, Ambrosio G. **2007**. Relationship between oxidative stress, lipid peroxidation, and ultrastructural damage in patients with coronary artery disease undergoing cardioplegic arrest/reperfusion. *Cardiovasc Res, 73(4): 710-719.*

Millet GP, Vleck VE, Bentley DJ. **2009**. Physiological differences between cycling and running: lessons from triathletes. *Sports Med, 39(3): 179-206.*

Mitrunen K y Hirvonen A. **2003**. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutat Res, 544(1): 9-41.*

Morillas-Ruiz J, Zafrilla P, Almar M, Cuevas MJ, López FJ, Abellán P, Villegas JA, González-Gallego J. **2005**. The effects of an antioxidant-supplemented beverage on exercise-induced oxidative stress: results from a placebo-controlled double-blind study in cyclists*. Eur J Appl Physiol, 95(5-6): 543-549.*

Morton JP, MacLaren DP, Cable NT, Bongers T, Griffiths RD, Campbell IT, Evans L, Kayani A, McArdle A, Drust B. **2006**. Time course and differential responses of the major heat shock protein families in human skeletal muscle following acute nondamaging treadmill exercise. *J Appl Physiol, 101(1): 176-182.*

Møller P, Wallin H, Knudsen LE. **1996**. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chem Biol Interact, 102(1): 17-36.*

Möllsten A, Jorsal A, Lajer M, Vionnet N, Tarnow L. **2009**. The V16A polymorphism in SOD2 is associated with increased risk of diabetic nephropathy and cardiovascular disease in type 1 diabetes. *Diabetologia, 52(12): 2590-2593.*

Munusamy S y MacMillan-Crow LA. **2009**. Mitochondrial superoxide plays a crucial role in the development of mitochondrial dysfunction during high glucose exposure in rat renal proximal tubular cells. *Free Radic Biol Med, 46(8): 1149-1157.*

Myburgh KH. **2004**. Can any metabolites partially alleviate fatigue manifestations at the cross-bridge? *Med Sci Sports Exerc, 36(1): 20-27.*

National Research Council. **1991**. Raciones dietéticas recomendadas. *Ediciones Consulta, 1ªedición: Barcelona, España.*

Navarro A, Gomez C, López-Cepero JM, Boveris A. **2004**. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 286(3): R505-511*.

Nelson DL y Cox MM. **2005**. Lehninger, principios de bioquímica. *Editorial Omega, 4ª edición: Barcelona, España.*

Nies AM, Hartmann A, Grunert-Fuchs M, Poch B, Speit G. **1996**. DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int J Sports Med, 17(6): 397-403.*

Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kouretas D. **2008**.The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports Med, 38(7): 579-606.*

Nishida K, Ohta Y, Ishiguro I. **1998**. Relation of inducible nitric oxide synthase activity to lipid peroxidation and nonprotein sulfhydryl oxidation in the development of stress-induced gastric mucosal lesions in rats. *Nitric Oxide, 2(4): 215-223.*

Nozik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi CA. **2005**. Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Biol, 37(12): 2466-2471.*

Oberley LW y Spitz DR. **1984**. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol, 105: 457-464.*

Oberley LW, St Clair DK, Autor AP, Oberley TD. **1987**. Increase in manganese superoxide dismutase activity in the mouse heart after X-irradiation. *Arch Biochem Biophys, 254(1): 69-80.*

Oh-ishi S, Kizaki T, Nagasawa J, Izawa T, Komabayashi T, Nagata N, Suzuki K, Taniguchi N, Ohno H. **1997**. Effects of endurance training on superoxide dismutase activity, content and mRNA expression in rat muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol, 24(5):326-332.*

Oh-ishi S, Kizaki T, Ookawara T, Toshinai K, Haga S, Karasawa F, Satoh T, Nagata N, Ji LL, Ohno H. **1998**. The effect of exhaustive exercise on the antioxidant enzyme system in skeletal muscle from calcium-deficient rats. *Pflugers Arch, 435(6): 767-774.*

Okamura K, Doi T, Sakurai M, Hamada K, Yoshioda Y, Sumida S, Sugawa-Katayama Y. **1997**. Effect of endurance exercise on the tissue 8-hydroxy-deoxyguanosine content in dogs. *Free Radic Res, 26(6): 523-528.*

Ookawara T, Haga S, Ha S, Oh-Ishi S, Toshinai K, Kizaki T, Ji LL, Suzuki K, Ohno H. **2003**. Effects of endurance training on three superoxide dismutase isoenzymes in human plasma. *Free Radic Res, 37(7): 713-719.*

Orhan H, van Holland B, Krab B, Moeken J, Vermeulen NP, Hollander P, Meerman JH. **2004**. Evaluation of a multi-parameter biomarker set for oxidative damage in man: increased urinary excretion of lipid, protein and DNA oxidation products after one hour of exercise. *Free Radic Res, 38(12): 1269-1279.*

Orth M y Schapira AH. **2001**. Mitochondria and degenerative disorders. *Am J Med Genet, 106(1): 27-36.*

Packer L, Cadenas E, Davies KJ. **2008**. Free radicals and exercise: an introduction. *Free Radic Biol Med, 44(2): 123-5.*

Pani G, Colavitti R, Bedogni B, Fusco S, Ferraro D, Borrello S, Galeotti T. **2004**. Mitochondrial superoxide dismutase: a promising target for new anticancer therapies. *Curr Med Chem, 11(10): 1299-1308.*

Pansarasa O, Bertorelli L, Vecchiet J, Felzani G, Marzatico F. **1999**. Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med, 27(5-6): 617-622.*

Pansarasa O, Felzani G, Vecchiet J, Marzatico F. **2002**. Antioxidant pathways in human aged skeletal muscle: relationship with the distribution of type II fibers. *Exp Gerontol, 37(8-9): 1069-1075.*

Pattwell DM y Jackson MJ. **2004**. Contraction-induced oxidants as mediators of adaptation and damage in skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev, 32(1): 14-18.*

Pechenino AS y Brown TR. **2006**. Superoxide dismutase in the prostate lobes of aging Brown Norway rats. *Prostate, 66(5): 522-535.*

Pedersen BK, Bruunsgaard H, Klokker M, Kappel M, MacLean DA, Nielsen HB, Rohde T, Ullum H, Zacho M. **1997**. Exercise-induced immunomodulation--possible roles of neuroendocrine and metabolic factors. *Int J Sports Med, 18(Suppl 1): S2-S7.*

Pessayre D. **2007**. Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol, 22(Suppl 1): S20-S27.*

Polidori MC, Mecocci P, Cherubini A, Senin U. **2000**. Physical activity and oxidative stress during aging. *Int J Sports Med, 21(3): 154-157.*

Portakal O, Özkaya Ö, Inal ME, Bozan B, Koşan M, Sayek I. **2000**. Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant estatus in tissues of breast cancer patients. *Clin Biochem, 33(4): 279-284.*

Powers SK y Jackson MJ. **2008**. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev, 88(4): 1243-1276.*

Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C. **1999**. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc, 31(7): 987-997.*

Powers SK y Lennon SL. **1999**. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc, 58(4): 1025-1033.*

Qin Z, Reszka KJ, Fukai T, Weintraub NL. **2008**. Extracellular superoxide dismutase (ecSOD) in vascular biology: an update on exogenous gene transfer and endogenous regulators of ecSOD. *Transl Res, 151(2): 68-78.*

Quijano C, Alvarez B, Gatti RM, Augusto O, Radi R. **1997**. Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochem J, 322 (Pt 1): 167-173.*

Quindry JC, Stone WL, King J, Broeder CE. **2003**. The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc, 35(7): 1139-1145.*

Radak Z, Chung HY, Goto S. **2008**. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med, 44(2): 153-159.*

Radak Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW, Goto S. **2008 (b)**. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev, 7(1):34 – 42.*

Rall LC, Roubenoff R, Meydani SN, Han SN, Meydani M. **2000**. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) as a marker of oxidative stress in rheumatoid arthritis and aging: effect of progressive resistance training. *J Nutr Biochem, 11(11-12): 581-584.*

Rankinen T y Bouchard C. **2008**. Gene-physical activity interactions: overview of human studies. *Obesity (Silver Spring), 16(Suppl 3): S47-S50.*

Rassier DE, MacIntosh BR, Herzog W. **1999**. Length dependence of active force production in skeletal muscle. *J Appl Physiol, 86(5): 1445-1457.*

Reichhold S, Neubauer O, Bulmer AC, Knasmüller S, Wagner KH. **2009**.Endurance exercise and DNA stability: is there a link to duration and intensity? *Mutat Res, 682(1): 28-38.*

Richardson RS, Grassi B, Gavin TP, Haseler LJ, Tagore K, Roca J, Wagner PD. **1999**. Evidence of O2 supply-dependent VO2 max in the exercise-trained human quadriceps. *J Appl Physiol, 86(3): 1048-1053.*

Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, Schweizer M, Suter M, Walter P, Yaffee M. **1995**. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim Biophys Acta, 1271(1): 67-74.*

Rietjens SJ, Beelen M, Koopman R, VAN Loon LJ, Bast A, Haenen GR. **2007**. A single session of resistance exercise induces oxidative damage in untrained men. *Med Sci Sports Exerc, 39(12): 2145-2151.*

Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. **2003**. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes, 52(3): 581-587.*

Röhrdanz E y Kahl R. **1998**. Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide*. Free Radic Biol Med, 24(1): 27-38.*

Romani R, De Medio GE, di Tullio S, Lapalombella R, Pirisinu I, Margonato V, Veicsteinas A, Marini M, Rosi G. **2009**. Modulation of paraoxonase 1 and 3 expression after moderate exercise training in the rat. *J Lipid Res, 50: 2036-2045.*

Rosenblum JS, Gilula NB, Lerner PA. **1996**. On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. *Proc Natl Acad Sci USA, 93(9): 4471-4473.*

Rousseau AS, Margaritis I, Arnaud J, Faure H, Roussel AM. **2006**. Physical activity alters antioxidant estatus in exercising elderly subjects. *J Nutr Biochem, 17(7): 463-470.*

Rowbottom DG y Green KJ. **2000**. Acute exercise effects on the immune system. *Med Sci Sports Exerc, 32(7 Suppl): S396-S405.*

Russell AP, Hesselink MK, Lo SK, Schrauwen P. **2005**. Regulation of metabolic transcriptional co-activators and transcription factors with acute exercise. *FASEB J, 19(8): 986-988.*

Sachdev S y Davies KJ. **2008**. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic Biol Med, 44(2): 215-223.*

Salminen A y Vihko V. **1983**. Lipid peroxidation in exercise myopathy. *Exp Mol Pathol, 38(3): 380-388.*

Saltin B, Blomqvist G, Mitchell JH, Johnson RL Jr, Wildenthal K, Chapman CB. **1968**. Response to exercise after bed rest and after training. *Circulation, 38(5 Suppl): VII1-78*.

Sam F, Kerstetter DL, Pimental DR, Mulukutla S, Tabaee A, Bristow MR, Colucci WS, Sawyer DB. **2005**. Increased reactive oxygen species production and functional alterations in antioxidant enzymes in human failing myocardium. *J Card Fail, 11(6): 473-480.*

Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg P Jr, Reed RL, Jones DP. **1998**. Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med, 24(5): 699-704.*

Santos-Silva A, Rebelo MI, Castro EM, Belo L, Guerra A, Rego C, Quintanilha A. **2001**. Leukocyte activation, erythrocyte damage, lipid profile and oxidative stress imposed by high competition physical exercise in adolescents. *Clin Chim Acta, 306(1-2): 119-226.*

Sastre J, Asensi M, Gascó E, Pallardó FV, Ferrero JA, Furukawa T, Viña J. **1992**. Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione estatus in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol, 263(5 Pt 2): R992-R995.*

Savarino L, Granchi D, Ciapetti G, Cenni E, Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Mattioli R. **2001**. Serum concentrations of zinc and selenium in elderly people: results in healthy nonagenarians/centenarians. *Exp Gerontol, 36(2): 327-339.*

Scaife S, Brown R, Kellie S, Filer A, Martin S, Thomas AM, Bradfield PF, Amft N, Salmon M, Buckley CD. **2004**. Detection of differentially expressed genes in synovial fibroblasts by restriction fragment differential display. *Rheumatology (Oxford), 43(11): 1346-52.*

Scandalios JG. **2005**. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res, 38(7): 995-1014.*

Schafer FQ y Buettner GR. **2001**. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med, 30(11): 1191-1212.*

Seifi-Skishahr F, Siahkohian M, Nakhostin-Roohi B. **2008**. Influence of aerobic exercise at high and moderate intensities on lipid peroxidation in untrained men. *J Sports Med Phys Fitness, 48(4): 515-521.*

Sen CK. **1999**. Glutathione homeostasis in response to exercise training and nutritional supplements. *Mol Cell Biochem, 196(1-2): 31-42.*

Sen CK. **2001**. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling introduction. *Med Sci Sports Exerc, 33 (3): 368-370.*

Sen CK y Packer L. **2000**. Thiol homeostasis and supplements in physical exercises. *Am J Clin Nutr, 72(2 suppl): 653-669.*

Sen CK, Paker L, Hänninen O. **2000**. The handbook of oxidants and antioxidants in exercise. *Elservier: Amsterdan, The Netherlands.*

Sen CK, Rahkila P, Hänninen O. **1993**. Glutathione metabolism in skeletal muscle derived cells of the L6 line. *Acta Physiol Scand, 148(1): 21-26.*

Shacter E. **2000**. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev, 32(3-4): 307-326.*

Shen X, Zheng S, Metreveli NS, Epstein PN. **2006**. Protection of cardiac mitochondria by overexpression of SODMn reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes, 55(3): 798-805.*

Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y. **1996**. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun, 226(2): 561-565.*

Singh U y Jialal I. **2006**. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology, 13(3): 129-142.*

Smith JR, Kay NE, Gottlieb AJ, Oski FA. **1979**. Abnormal erythrocyte metabolism in hepatic disease: effect of NADP repletion. *Am J Hematol, 6(4): 313-321.*

Speich M, Pineau A, Ballereau. **2001**. Minerals, trace elements and related biological variables in athletes and during physical activity. *Clin Chim Acta, 312(1-2): 1-11.*

Squier TC. **2001**. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp Gerontol. 36(9): 1539-1550.*

Sohal RS. **2002**. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic Biol Med, 33(1): 37-44.*

Sompol P, Ittarat W, Tangpong J, Chen Y, Doubinskaia I, Batinic-Haberle I, Abdul HM, Butterfield DA, St Clair DK. **2008**. A neuronal model of Alzheimer's disease: an insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury. *Neuroscience, 153(1): 120-130.*

Sorichter S, Martin M, Julius P, Schwirtz A, Huonker M, Luttmann W, Walterspacher S, Berg A. **2006**. Effects of unaccustomed and accustomed exercise on the immune response in runners. *Med Sci Sports Exerc, 38(10): 1739-1745.*

St Clair D. **2004**. Manganese superoxide dismutase: genetic variation and regulation. *J Nutr, 134(11): 3190S-3191S.*

St Clair DK, Oberley TD, Ho YS. **1991**. Overproduction of human Mn-superoxide dismutase modulates paraquat-mediated toxicity in mammalian cells. *FEBS Lett, 293(1-2): 199-203.*

Stadtman ER y Berlett BS. **1997**. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol, 10(5): 485-494.*

Strålin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL. **1995**. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol, 15(11): 2032-2036.*

Strassburger M, Bloch W, Sulyok, Schüller J, Keist AF, Schmidt A, Wenk J, Peters T, Wlaschek M, Krieg T, Hafner M, Kümin A, Werner S, Müller W, Scharffetter-Kochanek K. **2005**. Heterozygous deficiency of manganese superoxide dismutase results in severe lipid peroxidation and spontaneous apoptosis in murine myocardium in vivo. *Free Radic Biol Med, 38(11): 1458-1470.*

Sun H, Yan SC, Cheng WS. **2000**. Interaction of antimony tartrate with the tripeptide glutathione implication for its mode of action. *Eur J Biochem, 267(17): 5450-5457.*

Sunyaev S, Ramensky V, Bork P. **2000**. Towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms. *Trends Genet, 16(5): 198-200.*

Sureda A, Ferrer MD, Tauler P, Tur JA, Pons A. **2008**. Lymphocyte antioxidant response and H2O2 production after a swimming session: gender differences. *Free Radic Res, 42(4): 312-319.*

Sureda A, Tauler P, Aguiló A, Cases N, Fuentespina E, Córdova A, Tur JA, Pons A. **2005**. Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. *Free Radic Res, 39(12): 1317-1324.*

Sutton A, Imbert A, Igoudjil A, Descatoire V, Cazanave S, Pessayre D, Degoul F. **2005**. The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics, 15(5): 311-319.*

Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Cepanec C, Pessayre D, Degoul F. **2003**. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics, 13(3): 145-157.*

Takahashi MA y Asada K. **1983**. Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Arch Biochem Biophys, 226(2): 558-566.*

Taufer M, Peres A, de Andrade VM, de Oliveira G, Sá G, do Canto ME, dos Santos AR, Bauer ME, da Cruz IB. **2005**. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 60(4): 432-438.*

Tauler P, Aguiló A, Fuentespina E, Tur JA, Pons A. **2002**. Diet supplementation with vitamin E, vitamin C and beta-carotene cocktail enhances basal neutrophil antioxidant enzymes in athletes. *Pflugers Arch, 443(5-6): 791-797.*

Tauler P, Sureda A, Cases N, Aguiló A, Rodríguez-Marroyo JA, Villa G, Tur JA, Pons A. **2006**. Increased lymphocyte antioxidant defences in response to exhaustive exercise do not prevent oxidative damage. *J Nutr Biochem, 17(10): 665-671.*

Theodorou AA, Nikolaidis MG, Paschalis V, Sakellariou GK, Fatouros IG, Koutedakis Y, Jamurtas AZ. **2009**. Comparison between G6PD-Deficient and Normal Individuals after Eccentric Exercise. *Med Sci Sports Exerc, dec 9 (en prensa).*

Thomas JA y Mallis RJ. **2001**. Aging and oxidation of reactive protein sulfhydryls. *Exp Gerontol, 36(9): 1519-1526.*

Triantaphylidès C y Havaux M. **2009**. Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends Plant Sci, 14(4): 219-228*.

Toborek M, Wasik T, Drózdz M, Klin M, Magner-Wróbel K, Kopieczna-Grzebieniak E. **1992**. Effect of hemodialysis on lipid peroxidation and antioxidant system in patients with chronic renal failure. *Metabolism 41(11): 1229-1232.*

Tomblyn M, Kasarskis EJ, Xu Y, St Clair DK. **1998**. Distribution of SODMn polymorphisms in sporadic ALS patients. *J Mol Neurosci, 10(1): 65-66*.

Tonkonogi M y Sahlin K. **2002**. Physical exercise and mitochondrial function in human skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev, 30(3): 129-137.*

Urso ML y Clarkson PM. **2003**. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology, 189(1-2): 41-54.*

Van Helvoort HA, Heijdra YF, Thijs HM, Viña J, Wanten GJ, Dekhuijzen PN. **2006**. Exercise-induced systemic effects in muscle-wasted patients with COPD. *Med Sci Sports Exerc, 38(9): 1543-1452.*

Van Remmen H, Williams MD, Guo Z, Estlack L, Yang H, Carlson EJ, Epstein CJ, Huang TT, Richardon A. **2001**. Knockout mice heterozygous for SOD2 show alterations in cardiac mitochondrial function and apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol, 281(3): 1422-1432.*

Vider J, Lehtmaa J, Kullisaar T, Vihalemm T, Zilmer K, Kairane C, Landõr A, Karu T, Zilmer M. **2001**. Acute immune response in respect to exercise-induced oxidative stress. *Pathophysiology, 7(4): 263-270.*

Viña J, Borrás C, Gambini J, Sastre J, Pallardó FV. **2005**. Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. *FEBS Lett, 579(12): 2541-2545.*

Viña J, Gomez-Cabrera MC, Borras C, Froio T, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello VE, Pallardo FV. **2009**. Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. *Adv Drug Deliv Rev, 61(14): 1369-1374.*

Vollaard NB, Shearman JP, Cooper CE. **2005**. Exercise-induced oxidative stress:myths, realities and physiological relevance. *Sports Med, 35(12): 1045-1062.*

Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lipshutz R, Chee M, Lander ES. **1998**. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science, 280(5366): 1077-1082.*

Wang X, Hai CX, Liang X, Yu SX, Zhang W, Li YL. **2010**. The protective effects of Acanthopanax senticosus Harms aqueous extracts against oxidative stress: Role of Nrf2 and antioxidant enzymes. *J Ethnopharmacol, 127(2): 424-32.*

Warner BB, Stuart L, Gebb S, Wispé JR. **1996**. Redox regulation of manganese superoxide dismutase. *Am J Physiol, 271(1 Pt 1): L150-L158.*

Watson TA, Callister R, Taylor RD, Sibbritt DW, MacDonald-Wicks LK, Garg ML. **2005**. Antioxidant restriction and oxidative stress in short-duration exhaustive exercise. *Med Sci Sports Exerc, 37(1): 63-71.*

Wells GD, Selvadurai H, Tein I. **2009**. Bioenergetic provision of energy for muscular activity. *Paediatr Respir Rev, 10(3): 83-90.*

Wen JJ, Yachelini PC, Sembaj A, Manzur RE, Garg NJ. **2006**. Increased oxidative stress is correlated with mitochondrial dysfunction in chagasic patients. *Free Radic Biol Med, 41(2): 270-276.*

Williams AC y Ramsden DB. **2005**. Nicotinamide homeostasis: a xenobiotic pathway that is key to development and degenerative diseases. *Med Hypotheses, 65(2): 353-362.*

Williams MD, Van Remmen H, Conrad CC, Huang TT, Epstein CJ, Richardson A. **1998**. Increased oxidative damage is correlated to altered mitochondrial function in heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mice. *J Biol Chem, 273(43): 28510-28515.*

Wispé JR, Clark JC, Burhans MS, Kropp KE, Korfhagen TR, Whitsett JA. **1989**. Synthesis and processing of the precursor for human mangano-superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta, 994(1): 30-36.*

Wolff SP, Garner A, Dean R. **1986**. Free radicals, lipids and protein degradation. *Trends Biochem Sci, 11(1): 27-31.*

Yamakura F y Kawasaki H. **2009**. Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta, 1804(2010): 318-325.*

Yasaka Y, Yamabe H, Yokoyama M. **1997**. Dependence of peak oxygen uptake on oxygen transport capacity in chronic heart failure: comparison of graded protocol and fixed protocol. *Int J Cardiol, 59(2): 149-156.*

Yen JH, Chen CJ, Tsai WC, Lin CH, Ou TT, Hu CJ, Liu HW. **2003**. Manganese superoxide dismutase and cytochrome P450 1A1 genes polymorphisms in rheumatoid arthritis in Taiwan. Hum Immunol, 64(3): 366-373.

Yen JH, Tsai WC, Chen CJ, Lin CH, Ou TT, Hu CJ, Liu HW. **2003**. Cytochrome p450 and manganese superoxide dismutase genes polymorphisms in systemic lupus erythematosus. *Immunol Lett, 90(1): 19-24.*

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. **2002**. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression.*Free Radic Biol Med, 33(3): 337-349.*

Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR. **2009**. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet, 10: 451-481*.

Zhang HJ, Yan T, Oberley TD, Oberley LW. **1999**. Comparison of effects of two polymorphic variants of manganese superoxide dismutase on human breast MCF-7 cancer cell phenotype. *Cancer Res, 59(24): 6276 – 62.83.*

Zhong W, Oberley LW, Oberley TD, St Clair DK. **1997**. Suppression of the malignant phenotype of human glioma cells by overexpression of manganese superoxide dismutase. *Oncogene, 14(4): 481 – 490.*