



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Efecto de los ácidos grasos omega-3 sobre la situación de estrés oxidativo asociada a la realización de actividad física

Joel Ferrer Hernández

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2013-14

DNI de l'alumne: 48334891T

Treball tutelat per Antoni Pons Biescas
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:

Ácidos grasos omega-3, DHA, estrés oxidativo, ejercicio, actividad física, MFN2, COX4, dinámica mitocondrial,...

INDICE

1	Abstract/Resumen	4
2	Abreviaturas	5
3	Introducción	5
3.1	Motivaciones	5
3.2	DHA y Ácidos grasos Omega 3	6
3.3	Producción de RONS y estrés oxidativo	8
3.4	Ejercicio	8
3.5	Dinamica mitocondrial y estrés oxidativo	9
3.6	Planteamiento teórico y objetivos	11
4	Materiales y métodos	12
4.1	Búsqueda	12
4.2	Diseño experimental	12
4.3	Sujetos de experimentación.	13
4.4	Bebida	13
4.5	Ejercicio	14
4.6	Obtención de muestras, purificación de neutrófilos y extracción de RNA	14
4.7	Cuantificación RNA, transcripción inversa y RT PCR	15
4.8	Análisis de datos y tratamiento estadístico	16
5	Resultados	16
5.1	Niveles mRNA de MFN2	17
5.2	Niveles mRNA de COX4	17
6	Discusión	18
6.1	Suplementación N-3 PUFA	18
6.2	Ejercicio intenso	19
6.3	Interacción de factores	19
6.4	Limitaciones y perspectivas	20
7	Conclusiones	20
8	Bibliografía	21

1 ABSTRACT/RESUMEN

DHA supplementation has been shown as a modulator of MFN2 expression and it has been related to mitochondrial hyperfused state. Moreover, this fatty acid is known for decreasing proinflammatory cytokine protein levels and increasing antioxidant defenses. Chronic exercise induces RONS production which had been pointed out for their critical role in mitochondrial fission process. However, acute exercise induce an acute oxidative stress situation which is related with mitochondrial fusion. COX4 has a particular regulation that allow to modulate CcO (complex IV) activity in order to protect mitochondria from RONS in an oxidative stress or acute exercise situation. Here we investigate the combination between factors with the aim of testing whether nutritional supplementation of DHA can improve cell function and athletic performance. RT-PCR was used to analyze MFN2 and COX4 mRNA expression in human neutrophil. The study subjects were divided into 2 experimental groups (placebo/supplementation) following a double blinded method. These groups were studied in basal conditions and postexercise conditions. Results did not showed any significant ($P>0.05$) differences between groups nor between basal or postexercise situation. However, the study of mRNA expression may not be enough to explain mitochondrial changes against oxidative stress.

La suplementación con DHA ha mostrado modular la expresión de MFN2 y ha sido relacionada con un estado hiperfusionado de las mitocondrias. Además, este ácido graso es conocido por reducir los niveles de citoquinas proinflamatorias y aumentar las defensas antioxidantes. El ejercicio crónico produce RONS que han sido identificados por su papel crítico en el proceso de fisión mitocondrial. Sin embargo, el ejercicio agudo induce una situación de estrés oxidativo que ha sido relacionada con la fusión mitocondrial. La COX4 tiene una particular regulación que le permite modular la actividad de la CcO (complejo IV) para proteger a la mitocondria de RONS en una situación de estrés oxidativo o de ejercicio agudo. En este trabajo investigamos la combinación de los factores con el objetivo de comprobar si la suplementación con DHA puede mejorar la función celular y el rendimiento deportivo. Se utilizó una RT-PCR para analizar la expresión del mRNA de MFN2 y COX4 en neutrófilos humanos. Los sujetos de estudio se dividieron en 2 grupos experimentales (placebo/suplementación) por medio del método de doble ciego. Estos grupos fueron estudiados en condiciones basales y postejercicio. Los resultados no mostraron diferencias significativas ($p>0.05$) entre grupos ni entre las condiciones basales o postejercicio. No obstante, el estudio de la expresión del mRNA puede no ser suficiente para explicar los cambios mitocondriales frente al estrés oxidativo.

2 ABREVIATURAS

AP-1 (proteína activadora 1),	GSH (glutación reducido),	NFκB (Factor nuclear κ B)
CcO (proteína citocromo c oxidasa),	GSSG (disulfuro de glutación, oxidado),	NOS (óxido nítrico sintasa),
CoIV (subunidad 4 de citocromo c oxidasa),	HRE (elemento de respuesta a hipoxia)	Opa1 (proteína atrofia óptica 1)
COX4 (mRNA subunidad 4 de citocromo c oxidasa),	IL-1β (interleuquina 1β)	ORE (elemento de respuesta al oxígeno),
DHA (ácido docosahexanoico)	IL-6 (interleuquina 6)	PGC 1α (coactivador 1α de PPARγ),
Drp-1 (proteína relacionada con la dinamina 1)	IκB (Inhibidor de NFκB)	PPARγ (receptor y de proliferación activada peroxisomal)
EPA (ácido eicosapentanoico)	MAPK (proteína quinasa mitogénica activada),	PUFA (ácido graso poliinsaturado)
ERRα (receptor α relacionado al estrógeno)	MFN2 (mRNA o gen de mitofusina 2),	RONs (especies reactivas de oxígeno y nitrógeno),
Fis1 (proteína de fisión 1)	Mfn2 (proteína mitofusina),	ROS (especies reactivas de oxígeno),
		TNFα (factor de necrosis tumoral α)

3 INTRODUCCIÓN

3.1 MOTIVACIONES

Este trabajo, que tiene por título “Efecto de los ácidos grasos omega 3 sobre la situación de estrés oxidativo asociada a la realización de la actividad física” tiene la pretensión de profundizar en el estudio de los cambios que se suceden en la situación de estrés oxidativo mitocondrial por la combinación de dos factores como el ejercicio y la suplementación con ácidos grasos omega 3. Conocer qué tipo de relación se establece entre estos dos factores, si se establece una relación sinérgica o se producen efectos contrapuestos que tienden a compensarse etc..., es interesante desde el punto de vista deportivo, nutricional y bioquímico.

Como futuro bioquímico me parece de especial interés el entendimiento de la función mitocondrial en tanto que ésta es de importancia central en procesos como la generación de ATP y la senescencia celular; es decir, ¡es clave para vivir y también para no morir! Como deportista creo que el conocimiento y el estudio de los programas nutricionales con el fin de obtener un mayor rendimiento deportivo es cada día una herramienta más interesante y que evoluciona en paralelo al conocimiento que se genera gracias al esfuerzo de multitud de investigadores.

El programa de intervención nutricional en el que está basado este estudio ya ha proporcionado resultados publicados que ayudan a comprender el papel de los n-3 PUFA y el ejercicio en los procesos inflamatorios y en la generación de estrés oxidativo. Espero que esta pequeña aportación sirva para ampliar, por poco que sea, la comprensión sobre el tema.

3.2 DHA Y ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3

El ácido docosahexanoico (DHA, C_{22:6}ω₃) es uno de los PUFA (ácidos grasos poliinsaturados) más abundantes e importantes en el organismo [1]. La ingesta de gran cantidad de ácidos grasos insaturados (altamente oxidables) aumenta su presencia en la sangre y la capacidad oxidativa de los mismos teniendo como consecuencia el aumento de la peroxidación lipídica y la formación de otros productos derivados de la oxidación que tienen un alto potencial para causar daño oxidativo. El DHA, gracias a sus 6 insaturaciones, es el PUFA más oxidable de los que se ingieren en la dieta. Sin embargo, una dieta rica en DHA provoca una disminución de los marcadores de daño oxidativo y una mejora de la capacidad antioxidante del organismo [2].

Estos ácidos grasos omega 3 de cadena larga tienen función y efectos pleiotrópicos; Entre otras cosas, están implicados en la modulación de la respuesta inflamatoria frente a diferentes estreses [3-6] y muestran tener algún efecto sobre el balance oxidativo tras el ejercicio físico, aunque en este aspecto aparecen resultados tanto positivos como nulos [2, 7]. También se han observado efectos en la prevención de la degradación proteica en células musculares [8], en el desarrollo y la funcionalidad del sistema nervioso y del cerebro [9-11], efectos antiinflamatorios en enfermedades inflamatorias crónicas o situaciones fisiológicas especiales [12, 13] y, en general, en la respuesta inmune [14] cuya causa parece ser la interacción con la vía de señalización PPAR/NFκB. Los n-3 PUFA han sido identificados como ligandos y activadores de los PPARγ (receptor γ de proliferación activada peroxisomal). PPARγ activado tiene la capacidad de inducir la expresión de diferentes genes dependiendo del tejido. Así mismo, se ha observado que PPARγ provoca la inhibición de la fosforilación de IκB (inhibidor de NFκB) que es necesaria para la liberación del heterómero que forma con NFκB (factor nuclear κ B) y con otras proteínas y que permite a NFκB internarse en el núcleo y llevar a cabo su función como factor de transcripción. Entre estas funciones se encuentra la expresión de citoquinas inflamatorias como TNFα (factor de necrosis tumoral α), IL-1β (interleuquina 1β) o IL-6 (interleuquina 6). Por otra parte, PPARγ activado tiene la capacidad de interactuar físicamente con NFκB inhibiendo sus efectos y su entrada en el núcleo. Además, estos ácidos grasos omega 3, han sido vinculados a otros muchos procesos en los que tienen un rol importante además de un posible efecto beneficioso[15]. No obstante, cabe destacar que no todos los efectos observados sobre NFκB son dependientes de PPARγ [14, 16].

En la siguiente tabla (Tabla 1) se puede observar un resumen de algunos de los efectos fisiológicos y efectos potencialmente beneficiosos de los n-3 PUFA según una revisión de P.C. Calder [15].

Tabla 1 Resumen del papel fisiológico y de los potenciales efectos beneficiosos de los ácidos grasos polinsaturados omega -3 de cadena larga.

Papel fisiológico de los ácidos grasos omega 3 de cadena larga	Beneficio potencial para la salud	Patología tratable
Regulación de la presión sanguínea	Reduce la presión sanguínea	Hipertensión, CVD
Regulación de la función plaquetaria	Disminuye la probabilidad de trombosis	Trombosis, CVD
Regulación de la coagulación sanguínea	Disminuye la probabilidad de trombosis	Trombosis, CVD
Regulación de las concentraciones plasmáticas de TG	Disminuye de las concentraciones plasmáticas de TG	Hipertrigliceridemia, CVD
Regulación de la función vascular	Mejora la reactividad vascular	CVD
Regulación del ritmo cardiaco	Disminuye las arritmias cardiacas	CVD
Regulación de la frecuencia cardiaca	Mejora la variabilidad de la frecuencia cardiaca	CVD
Regulación de la inflamación	Disminuye la inflamación	Enfermedades inflamatorias (artritis, EII, psoriasis, lupus, asma, fibrosis cística, dermatitis, neurodegeneración, etc.), CVD
Regulación de la función inmune	Mejora la función inmune	Inmunodeficiencias
Regulación del metabolismo de AG y de TG	Síntesis y almacenamiento de TG disminuida	Ganancia de peso, pérdida de peso, obesidad
Regulación del recambio óseo	Mantenimiento de la masa ósea	Osteoporosis
Regulación de la sensibilidad a la insulina	Mejora la sensibilidad a la insulina	DM-2
Regulación del crecimiento celular tumoral	Disminuye el crecimiento celular tumoral y la supervivencia celular	Algunos cánceres
Regulación de la señalización visual vía rodopsina	Señalización visual optimizada	Desarrollo visual deficiente en infantes (especialmente prematuro)
Componente estructural del cerebro y del sistema nervioso	Desarrollo del cerebro optimizado conduciendo a una mejora del aprendizaje y de los procesos cognitivos	Deficiencias en comportamiento, aprendizaje y procesos cognitivos en edad la edad infantil

Nota: Se muestran tabulados los efectos de los ácidos grasos omega 3 de cadena larga, el potencial efecto beneficioso para la salud y las enfermedades en las que podría ser útil. AG (ácidos grasos), CVD (enfermedad cardiovascular), DM-2 (diabetes melitus de tipo 2), EII (enfermedad inflamatoria intestinal), TG (Triglicéridos). Adaptado de [15].

Si bien es cierto que la suplementación de este tipo de ácidos grasos tiene efectos positivos, sobretudo en situaciones inflamatorias, también es cierto que en cierta medida pueden actuar como depresores del sistema inmune, lo que aumenta el riesgo de infecciones y enfermedades derivadas

de esta depresión [14, 17]. Así pues, se cree que la incorporación crónica de estos nutrientes a la dieta puede ser beneficiosa o contraproducente dependiendo del individuo.

3.3 PRODUCCIÓN DE RONS Y ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es una situación que se alcanza cuando el balance de especies reactivas, especialmente las radicalarias de oxígeno y nitrógeno (RONS), supera la capacidad del sistema antioxidante de un organismo. Esta capacidad depende de varios factores como son las defensas antioxidantes endógenas (glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, ácido úrico, etc.), exógenas (carotenoides, tocoferoles, etc. provenientes de la dieta), la edad y el entrenamiento [18]. La formación de RONS se debe principalmente a 1) el consumo de oxígeno y pérdida de electrones en la cadena de transporte mitocondrial y la formación del radical superóxido, 2) el metabolismo prostanoide, 3) la autoxidación de catecolaminas y 4) las actividades enzimáticas oxidasa [19-21].

Los RONS se están produciendo y eliminando de forma constante en el organismo provocando efectos tanto positivos como negativos. Cuando la formación de especies reactivas se incrementa suavemente por encima de las capacidades antioxidantes se altera el balance redox intracelular y se producen una serie de adaptaciones como respuesta al estímulo que generalmente optimizan la función celular y producen cambios fisiológicos que son “beneficiosos” [22]. Algunos de estos cambios que se producen en las células son la regulación transcripcional/postranscripcional de la NOS (óxido nítrico sintasa) por NF- κ B y/o MAPK (proteína quinasa mitogénica activada) mejorando la función vascular, la mejora de la respuesta inmune a través de la activación de la proteína activadora 1 (AP-1) y NF- κ B, la mejora de la función mitocondrial y el aumento de la síntesis de enzimas antioxidantes y GSH (glutatión reducido) para combatir el aumento de RONS [18].

La sobreproducción crónica y excesiva de RONS conduce al agotamiento de las defensas antioxidantes y genera daño en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Además, este cambio en el balance redox provoca la expresión de genes proinflamatorios, la disfunción mitocondrial y promueve la apoptosis [18].

3.4 EJERCICIO

El ejercicio físico, en términos del interés de este trabajo, se puede definir como una actividad planeada que conduce al incremento del gasto energético y el incremento del ritmo cardiaco. Existen diferentes tipos de ejercicio los cuales se pueden clasificar como aeróbicos y anaeróbicos (según la intensidad), excéntricos, concéntricos o isométricos (según la contracción muscular) y crónicos o

agudos (según la frecuencia). Todos ellos conllevan la formación de radicales libres en mayor o menor medida [18, 20].

El ejercicio excéntrico (no el movimiento muscular excéntrico) aeróbico y anaeróbico es aquel que se realiza cuando hay movimientos de contracción y extensión de los músculos durante la producción intencionada de una fuerza submáxima [18]. Este tipo de ejercicio es el que se realiza en actividades como el fútbol en ciertos movimientos o el descenso en trail running y provoca un mayor daño en los tejidos comparado con el ejercicio concéntrico. En esta situación se produce una mayor generación de citoquinas proinflamatorias que provocan la migración de neutrófilos y la liberación de RONS con el fin de hacer frente al daño del tejido muscular [18, 23]. Debido a esto y al incremento de la respiración mitocondrial se produce una situación aguda de estrés oxidativo. Así pues, este tipo de ejercicios son interesantes en el estudio de los cambios fisiológicos y celulares que se producen en situaciones de estrés oxidativo.

El ejercicio produce la migración de neutrófilos al músculo esquelético y en ello juega un papel importante los ROS producidos por la actividad NADPH-oxidasa [23]. Así pues, se sugiere que los ROS producidos por estos neutrófilos contribuyen a la señalización que conduce a las respuestas adaptativas y remodeladoras.

3.5 DINAMICA MITOCONDRIAL Y ESTRÉS OXIDATIVO

Las mitocondrias son orgánulos muy dinámicos que se fusionan y se fragmentan en respuesta a estímulos energéticos y estrés [24]. Las mitofusinas 1 y 2 (Mfn1/2) situadas en la membrana externa de las mitocondrias y la proteína atrofia óptica 1 (OPA1), situada en la membrana interna, se encargan de regular la dinámica mitocondrial a través de la fusión de orgánulos mientras que los procesos de fisión están gobernados principalmente por la proteína relacionada con la dinamina 1 (Drp-1) y la proteína de fisión 1 (Fis1). Estos dos procesos opuestos (fusión/fisión) están continuamente dándose en la célula a través de la hidrólisis de GTP llevada a cabo por estas proteínas y se mantienen en un equilibrio dinámico que es alterado por el ambiente y otros factores [25, 26]. Así pues, es posible hablar de un ratio fusión:fisión. Se sabe que el aumento de este ratio conlleva una mejora de la función mitocondrial, una mejor utilización de ácidos grasos y una menor producción de ROS [27].

Existen evidencias de que la S-glutacionilación de la Mfn2 provoca la fusión de mitocondrias e incluso se establece que esta fusión depende de las variaciones del ratio 2GSH/GSSG (Glutatión reducido/disulfuro de glutatión, oxidado). Es decir, que la propia proteína podría ser un sensor del

estado redox celular. La fusión ocurre principalmente en situaciones de estrés celular agudo como el estrés oxidativo agudo. Por otra parte, se sabe que la fisión de estos orgánulos se produce cuando existe glucolipototoxicidad, altos niveles de glucosa, de ácidos grasos o un estrés oxidativo crónico [28, 29].

La fusión mitocondrial, a parte de su papel en la regulación del metabolismo energético, se describe como un proceso destinado a incrementar la resistencia al estrés celular y a la muerte celular. En este sentido, se sabe que las mitocondrias que se fusionan comparten enzimas antioxidantes y otras moléculas que les pueden servir para hacer frente a estreses agudos y de esta forma proteger sus proteínas, sus lípidos y su DNA. Por tanto, se piensa que es un mecanismo de control de calidad en el cual se comparten proteínas, sustratos metabólicos y DNA [24, 28].

La autofagia es un proceso por el que se eliminan orgánulos subcelulares dañados o ineficientes a través de un sistema de membranas que tiene el papel de asegurar la viabilidad celular y el recambio de macromoléculas y orgánulos. Este proceso afecta selectivamente a las mitocondrias y es conocido como mitofagia. Su relación con los procesos de fusión y fisión es estrecha puesto que se ha observado que un aumento en la fisión mitocondrial permite la mitofagia a través de la ubiquitinización de proteínas. La mitofagia y la fisión mitocondrial parece ser que están precedidas habitualmente por la acumulación de RONS y la pérdida del potencial de membrana de la mitocondria. Esta pérdida de potencial conduce a la ubiquitinización y degradación de Mfn2 y a la estabilización de Drp-1 que provoca una fisión mitocondrial exacerbada [30].

Mantener una población de mitocondrias sanas es tan importante como el establecimiento de nuevas mitocondrias para reducir el exceso de RONS e intermediarios metabólicos. En este ha sugerido que el ejercicio físico induce tanto la biogénesis mitocondrial como la mitofagia para mantener una óptima calidad mitocondrial en el musculo esquelético [31].

La maquinaria mitocondrial principal de la fosforilación oxidativa está formada por los complejos I, II, III y IV, la ATP sintasa (complejo V) y los transportadores de electrones ubiquinona y citocromo c. En la mayoría de los tejidos esta maquinaria produce más del 90% del ATP celular. Sin embargo, este orgánulo también participa en funciones como el mantenimiento de la homeostasis de Ca^{2+} o la muerte celular. La cadena de transporte electrónico mitocondrial es la principal fuente de RONS intracelular y debido a la proximidad, los complejos enzimáticos de esta cadena son a su vez dianas susceptibles de daño oxidativo. Una de las principales fuentes de RONS es la reducción parcial de oxígeno que da como resultado la formación del radical superóxido. Este radical es precursor de

otros radicales reactivos (hidroxil, peroxil, alcoxil...) y otras especies reactivas no radicalarias (oxígeno singlete, peroxinitritos, peróxido de hidrógeno, otros peróxidos orgánicos, etc...) [32, 33].

La citocromo c oxidasa (CcO) es el complejo enzimático (complejo IV) que se encarga de la reducción de O₂ a H₂O y además es uno de los 3 complejos que impulsan protones al espacio intermembrana con el fin de generar el gradiente que acopla la fosforilación de ADP y el transporte electrónico mitocondrial. Este complejo enzimático está formado por 13 subunidades de las cuales 3 (las subunidades catalíticas) están codificadas en la mitocondria [33].

La subunidad 4 de la citocromo c oxidasa (CoIV), codificada en el núcleo, tiene 2 isoformas (COX4 y COX4b) cuya expresión varía en función de los tejidos y factores ambientales. En concreto, la isoforma COX4b dispone de una región cercana al promotor que es un elemento de respuesta al oxígeno (ORE) y otras dos regiones (una en el intrón 1 y otra en la región flanqueante 5') que son elementos de respuesta a hipoxia (HRE). Además, la actividad de la CcO está sujeta a otro tipo de regulación mediada por el ratio ATP/ADP. Se sabe que la CoIV tiene diversos lugares de unión para ATP y ADP y se ha propuesto que un ratio elevado produce la inhibición alostérica de la CcO para mantener un bajo potencial de membrana y reducir la producción de RONS. No obstante, esta regulación está ligada principalmente a la isoforma COX4 y no a la COX4b que podría servir para saltarse esta regulación en situaciones de alta demanda energética [33].

3.6 PLANTEAMIENTO TEÓRICO Y OBJETIVOS

La actividad física es capaz de producir un aumento en la producción de RONS y este aumento es capaz conducir al daño oxidativo. Además existen evidencias de que el ejercicio físico induce la expresión de Mfn2 con el objetivo de mejorar la función mitocondrial y reducir la producción de estas especies oxidantes. En la misma línea, el ejercicio puede aumentar la producción de CoIV para satisfacer las demandas energéticas del tejido o puede inhibirla para reducir la función mitocondrial y así la formación de ROS. Los ácidos grasos omega 3, por su parte, han mostrado tener efecto sobre la expresión de MFN2 mejorando la función mitocondrial y reduciendo los ROS en ciertos tipos celulares. No se han encontrado referencias de lo que ocurre con respecto a COX4.

Puesto que no está clara la relación que establece entre los factores “ejercicio” y “suplementación con n-3 PUFA” en la expresión de estas proteínas mitocondriales, se plantea como objetivo de la parte experimental, determinar la expresión génica de los genes COX4 y MFN2 bajo los efectos del tratamiento con ácidos grasos omega 3 y de la actividad física destinada a generar estrés oxidativo.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 BÚSQUEDA

La búsqueda de información se realizó a través de la base de datos de PubMed utilizando como palabras clave, en los artículos de más relevancia, los términos “docosahexanoic acid”, “DHA supplementation”, “omega-3 fatty acid”, “neutrophil”, “oxidative stress”, “ROS”, “exercise”, “acute exercise”, “MFN2”, “Cytochrome c oxidase IV”. Para la realización de este trabajo se hicieron búsquedas combinando dichos términos o búsquedas más específicas para la obtención de información más detallada.

4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio consistió en la administración de una bebida suplementada con ácidos grasos omega 3 o una bebida placebo a dos grupos de deportistas. Los grupos fueron separados por el método experimental de doble ciego. Este estudio de intervención nutricional se inició con el comienzo de la pretemporada de los deportistas y se prolongó durante 8 semanas tras las que se recogieron muestras de sangre para analizar la expresión de MFN2 y COX4 en neutrófilos en condiciones basales y postejercicio. De este modo se estudió el efecto de la suplementación y del ejercicio en deportistas entrenados.

Todos los sujetos fueron informados del objetivo y las exigencias del estudio antes de dar consentimiento escrito para la participación en el mismo. El protocolo de estudio se ajusta a la Declaración de Helsinki para la investigación con sujetos humanos y fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de las Illes Balears (CEI-IB) N° IB 994/08 PI (Palma de Mallorca, Islas Baleares, España). El proyecto fue registrado en ClinicalTrial.gov (NCT02177383).

Es necesario mencionar que mi aportación particular en el ámbito experimental de este estudio, abarca únicamente el análisis del mRNA ya purificado y el análisis de los datos obtenidos. Más información acerca de la metodología utilizada se puede encontrar en los artículos “*Diet supplementation with DHA-enriched food in football players during training season enhances the mitochondrial antioxidant capabilities in blood mononuclear cells*” [7] y “*Effects of docosahexaenoic acid diet supplementation, training, and acute exercise on oxidative balance in neutrophils*” [2]. No obstante, en este apartado se repiten algunos de los conceptos básicos de la metodología utilizada para facilitar la comprensión del trabajo realizado.

4.3 SUJETOS DE EXPERIMENTACIÓN.

Los sujetos, varones en su totalidad, fueron futbolistas federados y profesionales del segundo equipo del RCD Mallorca en la pretemporada de 2011/2012. Los 15 individuos que se sometieron al estudio se dividieron en “grupo experimental” y “grupo placebo” (9 y 6 individuos respectivamente) seleccionados de forma aleatoria. Los grupos no mostraron diferencias antropométricas significativas (peso, altura, circunferencia de la cintura, circunferencia de la cadera, ratio cintura/cadera ni índice de masa corporal (IMC)) ni diferencias en la edad, en la presión sistólica y diastólica, en el VO₂ max ni en el tiempo de ejercicio que realizaron durante el estudio (Tabla 2). Todos ellos eran individuos “sanos” no fumadores.

Tabla 2 Principales características antropométricas y fisiológicas de los individuos que participaron en el estudio.

	Edad (años)	Peso (kg)	Altura (cm)	IMC (kg/m ²)	Cintura (cm)	Cadera (cm)	WHR
Placebo	19.3±0.4	76.5±1.8	179±2	24.0±0.6	78.2±0.8	97.0±1.0	0.805±0.012
Experimental	20.4±0.5	76.4±3.5	180±3	23.5±0.5	78.5±1.1	96.6±1.4	0.814±0.012

	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	VO ₂ max (mL/kg)	FFM (%)	TEM (min/día)	TEI (min/día)
Placebo	117±8	56.7±5.9	60.4±1.8	92.5±0.2	68.6±17.1	96.4±57.9
Experimental	122±3	66.7±3.5	62.0±0.9	92.8±0.3	63.2±14.6	50.4±13.1

Nota: Ratio Cintura-Cadera (WHR), Presión Arterial Sistólica (PAS), Presión Arterial Diastólica (PAD), Porcentaje de masa magra (FFM), Tiempo Ejercicio Moderado (TEM) y Tiempo Ejercicio Intenso (TEI). Los resultados se expresan como la media ± SEM. *; Diferencias significativas entre placebo y suplementación. Adaptado de [2, 7].

4.4 BEBIDA

Durante 5 días a la semana y en un total de 8 semanas ambos grupos ingirieron 1 litro de una bebida preparada a base de almendra (3%) y sacarosa (0,8%) antes de la realización de la actividad física diaria. Además, la bebida placebo tenía un 0,8% de aceite de oliva refinado y la bebida experimental un 0,6% de este aceite y un 0,2% de DHA-S Market (Market Biosciences Corp., Columbia, EEUU). El grupo experimental, por tanto, recibió una bebida en cuyo contenido lipídico había 3.78 ± 0.15 (%) de C22:5ω3 y 7.62 ± 0.26 (%) de C22:6ω3 y que supuso la ingesta de aproximadamente 1,14g/día de estos n-3 PUFA de forma independiente a la dieta. El grupo placebo ingirió una bebida de aspecto y propiedades organolépticas idénticas en la que no se hallaron los

ácidos grasos mencionados. Ambas contenían además una cantidad de vitamina E equivalente a 0,4mg/mL.

4.5 EJERCICIO

La actividad física durante el tratamiento de 8 semanas fue consultada a los deportistas. Esta consistía en actividad física individual y autónoma y las sesiones de entrenamiento de pretemporada de su equipo; Los datos recopilados indicaron que cada grupo había realizado 96.4 ± 57.9 y 50.4 ± 13.1 min/día de ejercicio intenso y 68.2 ± 17.1 y 63.2 ± 14.6 min/día de ejercicio moderado (placebo y experimental respectivamente). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Los ejercicios realizados a intensidades moderadas y altas durante tiempos cercanos a 60 minutos, se consideraron capaces de inducir un aumento del estrés oxidativo [34].

El día de la prueba para las condiciones postejercicio se realizaron unos ejercicios que consistieron en 15 minutos de calentamiento, un test Leger-Boucher para determinar indirectamente el VO_{2max} , 15 minutos de recuperación con pases de balón, 4 tandas de 5 minutos de ejercicios de posesión de 5 contra 5, 3 tandas de 6 minutos de ejercicios de posesión de 6 contra 6 y un partido de fútbol de 20 minutos de 5 contra 5. El ejercicio se realizó a más de un 70% de VO_{2max} durante aproximadamente 60 minutos.

4.6 OBTENCIÓN DE MUESTRAS, PURIFICACIÓN DE NEUTRÓFILOS Y EXTRACCIÓN DE RNA

Se extrajeron 3 muestras de sangre; la primera antes de empezar el tratamiento, otra en condiciones basales tras 8 semanas de tratamiento y la tercera tras la realización de ejercicio físico a ambos grupos. Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena antecubital tras un periodo de entre 30 y 60 minutos de reposo en posición sedente.

La primera extracción se realizó para analizar el estado de la población a estudiar y valorar la incorporación de estos ácidos grasos elementales en el grupo experimental durante las 8 semanas. La extracción en condiciones basales se hizo tras 12 h de descanso y ayuno mientras que las muestras post-ejercicio se recogieron a las 2 h de haber terminado la actividad física. Se utilizaron vacutainers con EDTA como anticoagulante para preservar la muestra lo más eficientemente posible.

La purificación de neutrófilos se realizó como se muestra en otros trabajos [2, 7] en los que se adapta un método ampliamente utilizado [35] por el cual la muestra de sangre se introduce en Ficoll en una proporción 1,5:1 y se centrifuga a 900g durante 30 minutos a 4°C. El precipitado que contenía

neutrófilos y eritrocitos se hemolizó con cloruro de amonio 0,15M y se centrifugó a 750g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y se realizaron lavados del precipitado con cloruro de amonio y PBS (buffer fosfato salino, pH 7,4). Posteriormente los neutrófilos aislados fueron lisados con agua destilada.

Así mismo, la extracción de RNA fue la misma que la mostrada en los artículos anteriores. El RNA total de los neutrófilos se obtuvo por extracción con Tripure (Roche Diagnostics, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Se ultracongeló el mRNA purificado para evitar su degradación [36].

4.7 CUANTIFICACIÓN RNA, TRANSCRIPCIÓN INVERSA Y RT PCR

El mRNA de los genes MFN2 y COX4 fue cuantificado de forma relativa por PCR a tiempo real (RT-PCR) utilizando el rRNA 18S como normalizador de la expresión de cada muestra [37, 38]. Para ello, se obtuvo 1µg de RNA de cada muestra que fue retrotranscrito a cDNA utilizando 50 U de Expand Reverse Transcriptase (Roche Diagnostics, Alemania) y 20 pmol de oligo (dT) durante 60 minutos a 37°C en un volumen final de 10µL.

La RT-PCR se realizó utilizando 2,5µL del cDNA obtenido y el kit Light Cycler Fast Start DNA Master PLUS SYBR Green kit (Roche Diagnostics, Alemania) en una amplificación de 45 ciclos. Los primers utilizados (0,376µL Fw y 0,376µL Rv) y las condiciones que se establecieron pueden verse en la Tabla 3.

Tabla 3 Primers y condiciones utilizadas en la PCR a tiempo real.

Gen	Primer	Condiciones	
		Temperatura	Tiempo
18S	Fw: 5'- ATGTGAAGTCACTGTGCCAG -3'	95°C	10s
	Rv: 5'- GTGTAATCCGTCTCCACAGA -3'	60°C	10s
		72°C	12s
MFN2	Fw: 5'- ATGCATCCCCACTTAAGCAC -3'	95°C	10s
	Rv: 5'- CCAGAGGGCAGAACTTTGTC -3'	60°C	10s
		72°C	15s
COX4	Fw: 5'- AGAAGCACTATGTGTACGGCCC -3'	95°C	10s
	Rv: 5'- GGTTCACCTTCATGTCCAGCAT -3'	60°C	10s
		72°C	15s

Nota: Se muestra los primers de los genes que se analizaron y las condiciones a las que se sometieron; Temperatura y tiempo de desnaturalización, alineamiento y elongación.

4.8 ANÁLISIS DE DATOS Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos tras la RT-PCR fueron procesados siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [39]. Los resultados se muestran como la *media ± error estándar*. Se consideran estadísticamente significativo un $P < 0,05$. El análisis estadístico de los datos procesados se llevó a cabo utilizando una ANOVA de 2 vías siendo los factores analizados la suplementación y el ejercicio agudo. Para realizar este trabajo se utilizó el programa informático Statistical Package for Social Sciences (versión 21.0 para Windows, SPSS Inc., Chicago, Ill., EEUU).

5 RESULTADOS

Este estudio describe la expresión génica de los genes MFN2 y COX4 en futbolistas sometidos o no a un programa de intervención nutricional con ácidos grasos omega 3 (principalmente DHA) en condiciones basales o postejercicio. La bebida experimental, según resultados publicados anteriormente [4, 7], mostró diferencias significativas en la composición de ácidos grasos respecto a la bebida placebo, en cuyo caso no fueron detectables los ácidos grasos C20:3, C22:0, C22:5, y C22:6 ω 3. Tras las 8 semanas de tratamiento y de pretemporada de los deportistas del grupo sometido a la bebida experimental redujeron significativamente los niveles de ácido eicosatrienoico, araquidónico y aumentaron los niveles de ácido docosahexanoico en la membrana de los eritrocitos. Con respecto al grupo placebo, estos deportistas redujeron los niveles de ácido araquidónico y aumentaron el porcentaje de ácido docosahexanoico en los eritrocitos. Información más detallada se puede encontrar en la Tabla 2 de [7].

Como se puede observar en la Tabla 2, ambos grupos experimentales (placebo y suplementación), presentaron antes del estudio unas características antropométricas y fisiológicas similares y comparables sin que se observara ninguna diferencia significativa entre los grupos.

Es necesario mencionar, que el ejercicio produjo diferencias significativas en los marcadores de estrés oxidativos del grupo placebo en condiciones postejercicio frente a la situación basal. Ejemplo de ello son los niveles de MDA (de $0,26 \pm 0,05 \mu\text{mol}/10^9$ células a $0,58 \pm 0,11 \mu\text{mol}/10^9$ células), de daño en el DNA (intensidad de cola del “comet assay” de $4,17 \pm 0,39$ % a $5,90 \pm 0,64$ %), de algunas actividades enzimáticas y de la expresión de algunos genes que pueden ser consultados en los artículos [4, 7].

5.1 NIVELES MRNA DE MFN2

En este trabajo se determinó la expresión del mRNA de la MFN2 a partir de 1µg de RNA aislado de cada muestra que fue retrotranscrito a cDNA, amplificado y analizado por RT-PCR. El grupo frente al que se determinan los niveles de mRNA es el grupo placebo en condiciones basales (barra negra en Gráfico 1 y 2). A este grupo se le asignó el valor 1 y los grupos restantes están expresados en proporción a la expresión del grupo placebo en condiciones basales. Pese a las diferencias en las medias de los grupos basal suplementación y postejercicio suplementación, no se hallaron diferencias significativas que pudieran hacer afirmar que existe una mayor expresión. Tampoco fue así para el grupo postejercicio placebo cuya media es muy cercana a 1 ($1,089 \pm 0,229$). Del mismo modo, no fueron encontradas diferencias significativas entre ninguno de los 4 grupos comparados entre sí. Analizados los factores a través de una ANOVA, se reflejó que ni el factor de la suplementación, el factor del ejercicio ni su interacción tenían un efecto significativo.

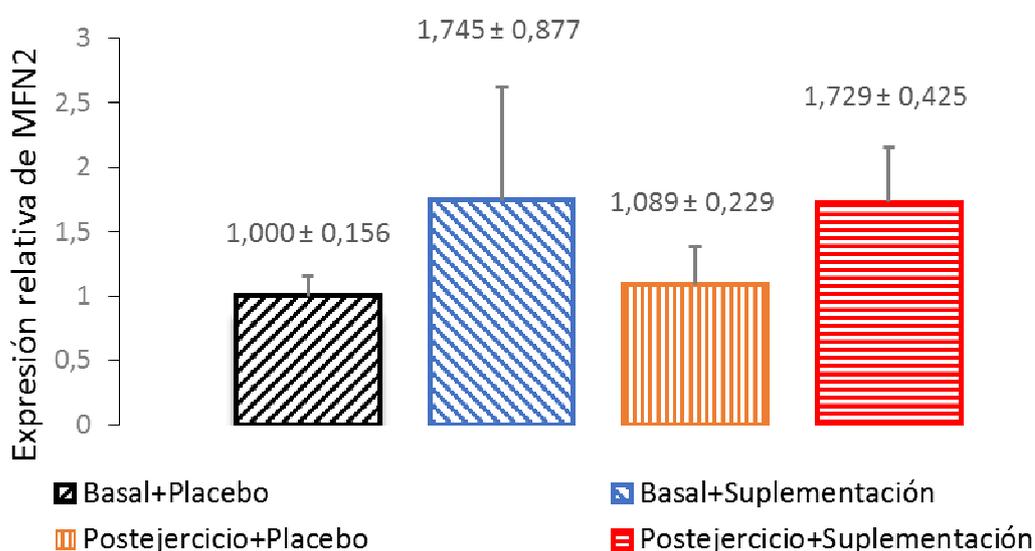


Gráfico 1 Expresión del Mfn2 obtenida del análisis del mRNA en PCR a tiempo real. La cuantificación relativa de los datos se muestra con respecto al grupo placebo en condiciones basales (grupo control, media 1). Se muestran los 4 grupos según la combinación de los factores ejercicio y suplementación. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. *; Diferencias significativas entre placebo y suplementación. #; Diferencias significativas entre condiciones basales y postejercicio.

5.2 NIVELES MRNA DE COX4

La expresión del mRNA de COX4 se presenta en el Gráfico 2 del mismo modo que se ha utilizado para el caso de la MFN2; En azul el grupo placebo en condiciones basales presenta un valor de $1,000 \pm 0,257$, en naranja el grupo suplementado en condiciones basales alcanza niveles de $1,452 \pm 0,435$, en gris el grupo placebo en condiciones postejercicio se mantiene en $0,884 \pm 0,192$

mientras que en amarillo el grupo suplementado en condiciones postejercicio presentó un valor de $1,185 \pm 0,564$.

Análogamente a lo ocurrido en la expresión de MFN2, no se hallaron diferencias significativas entre los grupos de estudio ni entre los factores investigados. Por lo tanto no es posible establecer una relación clara entre la suplementación con DHA, el ejercicio y la expresión de los genes MFN2 y COX4.

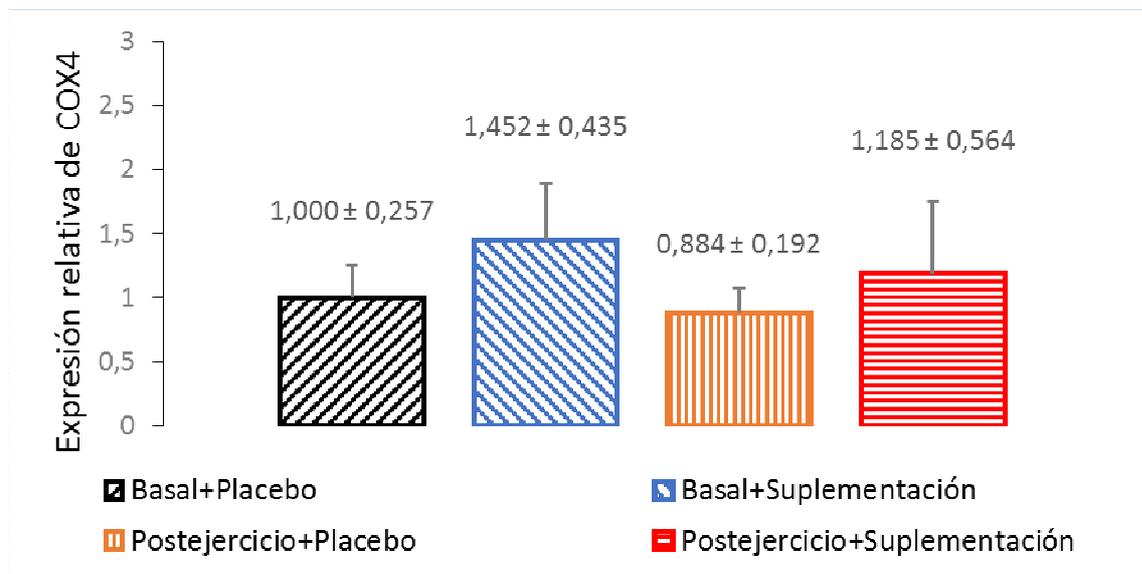


Gráfico 2 Expresión del COX4 obtenida del análisis del mRNA en PCR a tiempo real. La cuantificación relativa de los datos se muestra con respecto al grupo placebo en condiciones basales (grupo control, media 1). Se muestran los 4 grupos según la combinación de los factores ejercicio y suplementación. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. *; Diferencias significativas entre placebo y suplementación. #; Diferencias significativas entre condiciones basales y postejercicio.

6 DISCUSIÓN

6.1 SUPLEMENTACIÓN N-3 PUFA

En este estudio se ha observado que la suplementación durante 8 semanas a deportistas con una bebida enriquecida en ácidos grasos omega 3 no ha supuesto cambios en la expresión de MFN2 y COX4. Estos resultados no se relacionan con los de otro estudio en el que hepatocitos esteatóticos tratados in vitro con DHA y EPA presentan una mayor expresión de MFN2 frente a los no tratados [40]. Sin embargo, esta situación se diferencia mucho de la que se da en individuos sanos. Además, también se ha comprobado que el EPA y el DHA en estas células provocan una mayor producción de ATP y una menor producción de RONS y que este efecto es debido a la optimización de la función

mitocondrial que se genera por medio de MFN2. En nuestro trabajo, las medias concuerdan con estos datos, sin embargo, la amplia variabilidad de los datos no permite afirmar que haya diferencias significativas. Por otra parte, no se ha encontrado bibliografía que describa la expresión de COX4 tras el tratamiento con este tipo de ácidos grasos. Por lo tanto se puede establecer que la administración de DHA no tiene efecto directo sobre la expresión de este gen.

6.2 EJERCICIO INTENSO

El ejercicio intenso no ha mostrado efecto alguno sobre la expresión de MFN2 y COX4. Estos resultados concuerdan con lo observado por Cartoni et al. donde el ejercicio no fue capaz de inducir un aumento en la expresión de estos genes hasta 24h después en el músculo esquelético de ciclistas entrenados [41]. En ambos genes se evidencia este aumento tras 24h por lo que otro diseño experimental podría aportar nuevos datos de interés para este estudio. También se ha demostrado que el aumento en la expresión de MFN2 a las 24h de la realización de la actividad física está inducida por PGC 1 α (coactivador 1 α de PPAR γ) y ERR α (receptor α relacionado al estrógeno [41].

Por otra parte, se ha visto que en individuos en los que se realizó un programa de entrenamiento de siete días, el aumento de COX4 en músculo esquelético no se manifestó hasta 4 h después de la tercera sesión (tercer día) y que estos niveles aumentados se mantuvieron durante los restantes días del estudio por efecto de la “memoria del ejercicio” [42]. Así pues, es muy posible que en el caso de nuestro estudio, los niveles estén aumentados por el bagaje de los deportistas y que la sesión de ejercicio intenso no sea capaz de modificar la expresión de COX4.

Las tandas de ejercicio intenso incrementan la producción de RONS aunque en individuos entrenados el incremento es menor debido a las adaptaciones de sus defensas antioxidantes al estrés oxidativo y a la optimización funcional de sus mitocondrias. Al igual que ocurre en estudios anteriores a este [2], la expresión génica podría no verse afectada y si la actividad de dichas proteínas como ocurre en otros artículos donde la actividad de MFN2 es sensible al estado redox [28]. Así pues la investigación futura acerca de la actividad de estas proteínas con respecto a los factores estudiados podría mostrar unos resultados distintos a los que se muestran aquí.

6.3 INTERACCIÓN DE FACTORES

La interacción de los factores ejercicio físico agudo y tratamiento con DHA no ha conseguido modificar la expresión de MFN2 y COX4. Una de las hipótesis que se manejaban era que el tratamiento con ácidos grasos omega 3 disminuyera la producción de RONS y mejorara su eliminación y que de esta forma se disminuyera la señalización necesaria para el aumento de la

expresión de estas proteínas en condiciones postejercicio. Sin embargo, manejar esta hipótesis sin haber obtenido los resultados esperados de los factores aislados no tiene sentido.

6.4 LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS

La mayoría de estudios realizados sobre la actividad física en relación con las proteínas mitocondriales Mfn2 y CoIV se han llevado a cabo en músculo esquelético. Esto hace difícil la extrapolación de los resultados a lo que ocurre en los neutrófilos. No obstante, el estudio de neutrófilos es mucho menos invasivo que el de células del músculo esquelético por lo que encontrar evidencias de un comportamiento similar entre los dos tipos celulares ayudará a mejorar la relevancia de los resultados.

No se han encontrado evidencias de la existencia de elementos de respuesta de MFN2 y COX4 que puedan verse afectados por los cambios ocasionados por el DHA. No obstante si existen resultados que relacionan el DHA con un aumento de la expresión de MFN2 que en este estudio no se ha producido [40], y resultados que relacionan el ejercicio con cambios en la expresión de MFN2 y COX4 [41]. Por lo tanto debe existir algún mecanismo que los regule. En este sentido, es interesante que PGC 1 α y ERR α se unan específicamente a regiones del promotor de MFN2 en células SAOS2 [41] así como la existencia de elementos de respuesta ORE y HRE en el gen de COX4b [33]. Investigar la relación de estos elementos con el ejercicio y los ácidos grasos omega 3 puede ayudar a comprender la base de las variaciones observadas en otros estudios y que aquí no se han observado.

Por otra parte, sería interesante realizar un estudio sobre cómo estos factores (ejercicio y suplementación con ácidos graso omega 3) pueden afectar a la dinámica mitocondrial sin afectar a la expresión de los genes analizados, es decir, si se observan cambios en la morfología mitocondrial, en la ubiquitinación o glutationización de Mfn2, en la actividad de CcO, etc. debidos a alguna mejora del manejo de los RONS por los neutrófilos.

7 CONCLUSIONES

La interacción de suplementación con ácidos grasos omega 3 y ejercicio agudo en individuos entrenados no produce cambios en la expresión de MFN2 ni COX4 a las 2 h de haber terminado la actividad física. Que tampoco se produzcan cambios en individuos suplementados en situación basal ni en individuos que han recibido la bebida placebo y han realizado una actividad física intensa hace pensar que las capacidades de estos individuos ya están lo bastante alteradas como para que estos factores no supongan un motivo de incremento adicional. Que estos factores no modifiquen la

expresión de estos genes no parece explicar que no se hayan encontrado cambios en su expresión puesto que existe bibliografía que lo ha conseguido. Por lo tanto, un diseño experimental distinto puede aportar podría aportar datos más acordes con la bibliografía citada. No obstante no se ha determinado la expresión de MFN2 ni COX4 en neutrófilos bajo estas condiciones por lo que es necesaria más investigación con el fin de determinar que ocurre en este tipo celular.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Arterburn LM, Hall EB, Oken H (2006) Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr* 83:1467S-1476S
2. Martorell M, Capo X, Sureda A, Tur JA, Pons A (2014) Effects of docosahexaenoic acid diet supplementation, training, and acute exercise on oxidative balance in neutrophils. *Appl Physiol Nutr Metab* 39:446-457
3. Capo X, Martorell M, Llompart I, Sureda A, Tur JA, Pons A (2014) Docosahexanoic acid diet supplementation attenuates the peripheral mononuclear cell inflammatory response to exercise following LPS activation. *Cytokine* 69:155-164
4. Martorell M, Capo X, Sureda A, Batle JM, Llompart I, Argelich E, Tur JA, Pons A (2014) Effect of DHA on plasma fatty acid availability and oxidative stress during training season and football exercise. *Food Funct* 5:1920-1931
5. DiLorenzo FM, Drager CJ, Rankin JW (2014) Docosahexaenoic Acid Affects Markers of Inflammation and Muscle Damage After Eccentric Exercise. *J Strength Cond Res*
6. Williams-Bey Y, Boularan C, Vural A, Huang NN, Hwang IY, Shan-Shi C, Kehrl JH (2014) Omega-3 free fatty acids suppress macrophage inflammasome activation by inhibiting NF-kappaB activation and enhancing autophagy. *PLoS One* 9:e97957
7. Capo X, Martorell M, Sureda A, Llompart I, Tur JA, Pons A (2014) Diet supplementation with DHA-enriched food in football players during training season enhances the mitochondrial antioxidant capabilities in blood mononuclear cells. *Eur J Nutr*
8. Wang Y, Lin QW, Zheng PP, Zhang JS, Huang FR (2013) DHA inhibits protein degradation more efficiently than EPA by regulating the PPARgamma/NFkappaB pathway in C2C12 myotubes. *Biomed Res Int* 2013:318981
9. Bourre JM (2004) Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing. *J Nutr Health Aging* 8:163-174
10. Bourre JM (2005) Dietary omega-3 Fatty acids and psychiatry: mood, behaviour, stress, depression, dementia and aging. *J Nutr Health Aging* 9:31-38
11. Bourre JM (2005) Omega-3 fatty acids in psychiatry. *Med Sci (Paris)* 21:216-221
12. Calder PC (2006) N-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Inflammation, and Inflammatory Diseases. *Am J Clin Nutr* 83:1505S-1519S

13. Frew L, Sugiarto NU, Rajagopal SP, He J, Leask R, Norman JE, Riley SC, Stock SJ (2013) The effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on the inflammatory response of the amnion. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 89:221-225
14. Jaudszus A, Gruen M, Watzl B, Ness C, Roth A, Lochner A, Barz D, Gabriel H, Rothe M, Jahreis G (2013) Evaluation of suppressive and pro-resolving effects of EPA and DHA in human primary monocytes and T-helper cells. *J Lipid Res* 54:923-935
15. Calder PC (2012) Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr* 142:592S-599S
16. Draper E, Reynolds CM, Canavan M, Mills KH, Loscher CE, Roche HM (2011) Omega-3 fatty acids attenuate dendritic cell function via NF-kappaB independent of PPARgamma. *J Nutr Biochem* 22:784-790
17. Schwerbrock NM, Karlsson EA, Shi Q, Sheridan PA, Beck MA (2009) Fish oil-fed mice have impaired resistance to influenza infection. *J Nutr* 139:1588-1594
18. Fisher-Wellman K, Bloomer RJ (2009) Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med* 8:1-5918-8-1
19. Powers SK, Talbert EE, Adihetty PJ (2011) Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *J Physiol* 589:2129-2138
20. Gomes EC, Silva AN, de Oliveira MR (2012) Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxid Med Cell Longev* 2012:756132
21. Urso ML, Clarkson PM (2003) Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189:41-54
22. Radak Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW, Goto S (2008) Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev* 7:34-42
23. Nunes-Silva A, Bernardes PT, Rezende BM, Lopes F, Gomes EC, Marques PE, Lima PM, Coimbra CC, Menezes GB, Teixeira MM, Pinho V (2014) Treadmill exercise induces neutrophil recruitment into muscle tissue in a reactive oxygen species-dependent manner. An intravital microscopy study. *PLoS One* 9:e96464
24. Hahn WS, Kuzmicic J, Burrill JS, Donoghue MA, Foncea R, Jensen MD, Lavandero S, Arriaga EA, Bernlohr DA (2014) Proinflammatory cytokines differentially regulate adipocyte mitochondrial metabolism, oxidative stress, and dynamics. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 306:E1033-45
25. Ishihara N, Eura Y, Mihara K (2004) Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci* 117:6535-6546
26. Kuzmicic J, Del Campo A, Lopez-Crisosto C, Morales PE, Pennanen C, Bravo-Sagua R, Hechenleitner J, Zepeda R, Castro PF, Verdejo HE, Parra V, Chiong M, Lavandero S (2011) Mitochondrial dynamics: a potential new therapeutic target for heart failure. *Rev Esp Cardiol* 64:916-923
27. Nie Q, Wang C, Song G, Ma H, Kong D, Zhang X, Gan K, Tang Y (2014) Mitofusin 2 deficiency leads to oxidative stress that contributes to insulin resistance in rat skeletal muscle cells. *Mol Biol Rep*
28. Mailloux RJ, Jin X, Willmore WG (2013) Redox regulation of mitochondrial function with emphasis on cysteine oxidation reactions. *Redox Biol* 2:123-139

29. Liesa M, Shirihaï OS (2013) Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab* 17:491-506
30. Sanchez AM, Bernardi H, Py G, Candau R (2014) Autophagy is essential to support skeletal muscle plasticity in response to endurance exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*
31. Yan Z, Lira VA, Greene NP (2012) Exercise training-induced regulation of mitochondrial quality. *Exerc Sport Sci Rev* 40:159-164
32. Musatov A, Robinson NC (2012) Susceptibility of mitochondrial electron-transport complexes to oxidative damage. Focus on cytochrome c oxidase. *Free Radic Res* 46:1313-1326
33. Srinivasan S, Avadhani NG (2012) Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 53:1252-1263
34. Sureda A, Ferrer MD, Tauler P, Romaguera D, Drobnic F, Pujol P, Tur JA, Pons A (2009) Effects of exercise intensity on lymphocyte H₂O₂ production and antioxidant defences in soccer players. *Br J Sports Med* 43:186-190
35. BOYUM A (1964) Separation of White Blood Cells. *Nature* 204:793-794
36. Holford NC, Sandhu HS, Thakkar H, Butt AN, Swaminathan R (2008) Stability of beta-actin mRNA in plasma. *Ann N Y Acad Sci* 1137:108-111
37. Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM (1999) Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* 270:41-49
38. Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW (2000) Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem* 285:194-204
39. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 25:402-408
40. Zhang Y, Jiang L, Hu W, Zheng Q, Xiang W (2011) Mitochondrial dysfunction during in vitro hepatocyte steatosis is reversed by omega-3 fatty acid-induced up-regulation of mitofusin 2. *Metabolism* 60:767-775
41. Cartoni R, Leger B, Hock MB, Praz M, Crettenand A, Pich S, Ziltener JL, Luthi F, Deriaz O, Zorzano A, Gobelet C, Kralli A, Russell AP (2005) Mitofusins 1/2 and ERRα expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J Physiol* 567:349-358
42. Perry CG, Lally J, Holloway GP, Heigenhauser GJ, Bonen A, Spriet LL (2010) Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. *J Physiol* 588:4795-4810