

GENÉTICA Y DEPORTE

Carlos Muniesa
Catalina Santiago
Félix Gómez-Gallego
Alejandro Lucía

Carmen Díez
Ana Cristina Lapeña



GENÉTICA Y DEPORTE

PARTE I

DETERMINANTES GENÉTICOS DEL RENDIMIENTO EN DEPORTES DE
RESISTENCIA: REMO, CICLISMO EN CARRETERA Y CARRERA A PIE

Carlos Muniesa Ferrero
Catalina Santiago Dorrego
Félix Gómez-Gallego
Alejandro Lucía Mulas

PARTE II

HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES,
DAÑO OXIDATIVO Y EJERCICIO FÍSICO

Carmen Díez Sánchez
Ana Cristina Lapeña Royo



© CONSEJO SUPERIOR DE DEPORTES
Subdirección General de Deporte y Salud
Servicio de Documentación y Publicaciones
c/Martín Fierro, s/n. 28040 MADRID
www.csd.gob.es

Julio, 2011

Catálogo general de publicaciones oficiales
<http://publicacionesoficiales.boe.es>

Derechos reservados conformes a la ley
Impreso y hecho en España / Printed and made in Spain

Coordinación editorial: Enrique Lizalde

Diseño editorial: Jaime Narváez
Impresión: Imprenta Nacional del BOE

Edición digital:
ISBN: 978-84-694-5454-1
ISSN: 2173-8963
NIPPO: 008-11-019-5

Edición impresa:
ISBN: 978-84-7949-214-4
ISSN: 2172-2161
NIPPO: 008-11-018-X
Depósito Legal: M-35278-1995

CONTENIDO

PRÓLOGO	9
José Luis Terreros Blanco	
PARTE I	
DETERMINANTES GENÉTICOS DEL RENDIMIENTO EN DEPORTES DE RESISTENCIA: REMO, CICLISMO EN CARRETERA Y CARRERA A PIE	13
Carlos Muniesa Ferrero, Catalina Santiago Dorrego, Félix Gómez-Gallego, Alejandro Lucía Mulas	
PARTE II	
HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES, DAÑO OXIDATIVO Y EJERCICIO FÍSICO	121
Carmen Díez Sánchez, Ana Cristina Lapeña Royo	

PRÓLOGO

JOSÉ LUIS TERREROS BLANCO
SUBDIRECTOR GENERAL DE DEPORTE Y SALUD
CONSEJO SUPERIOR DE DEPORTES

La expresión de un determinado fenotipo (conjunto de caracteres de un individuo) va a depender de su genotipo (herencia genética) y de las condiciones ambientales en que este genotipo se expresa.

En el ámbito de la actividad física y el deporte las interacciones ambientales principales son las dadas por el ejercicio físico y el entrenamiento deportivo a que se somete el sujeto. Pero estas interacciones son enormemente complejas y pueden conllevar modificaciones en el estado de salud del deportista, bien porque la expresión directa de un genotipo conlleve un riesgo ante la práctica deportiva o porque la interacción entre genética y el grado de actividad interactúen y afecten a la salud de la persona.

Cada día sabemos un poco más sobre las relaciones entre ejercicio físico y genética y su importancia, no solo en el ámbito del deporte de alto rendimiento, sino especialmente en el de la mejora de la condición física y de la salud.

En la definición del “mapa genético” relacionado con el rendimiento deportivo y la salud contamos en España con grupos de investigación muy relevantes, alguno de los cuales acuden regularmente a las convocatorias de apoyo a la investigación científica que publica el Consejo Superior de Deportes.

Tanto el interés y la actualidad del tema, como la relevancia de los estudios y las publicaciones llevados a cabo, nos han impulsado a que este nuevo número de la colección ICD verse sobre Genética y Deporte, y a contar con la colaboración de dos grupos de investigación con relieve mundial como son el de la Universidad Europea de Madrid y el de la Universidad de Zaragoza.

La primera parte de la publicación es el resultado del trabajo de un grupo de investigación de la Universidad Europea de Madrid, y refleja los hallazgos sobre polimorfismos nucleares y su relación con el fenotipo de un deporte concreto, como es el caso del remo.

La segunda parte de este libro, realizada por investigadoras de la Universidad de Zaragoza, nos muestra los estudios sobre otro grupo de genes mucho menos conocidos, como son los genes mitocondriales, que aunque son solo 37, expresan varias proteínas propias de la cadena respiratoria y por ello pueden tener gran influencia en la producción de energía en la célula.

Somos conscientes de que el avance genético en el deporte está lejos de sus límites y que son necesarios todavía investigaciones de alta calidad y estudios de replicación con grandes muestras de sujetos; y que para ello es imprescindible una colaboración entre laboratorios que estudien la genómica del ejercicio, colaboración nos gustaría potenciar mediante la creación de redes de investigación.

Aquí hemos querido hacer una aportación sobre el estado actual de las investigaciones sobre genética y deporte en nuestro país, con la intención de mejorar y difundir el conocimiento sobre este ámbito.

Animamos al técnico deportivo, al clínico, al investigador, a estudiar detenidamente estas páginas que marcan el futuro de una época que, sin duda, nos va a llegar.

PARTE I

DETERMINANTES GENÉTICOS DEL RENDIMIENTO EN DEPORTES DE
RESISTENCIA: REMO, CICLISMO EN CARRETERA Y CARRERA A PIE

Carlos Muniesa Ferrero⁽¹⁾, **Catalina Santiago Dorrego**⁽²⁾,
Félix Gómez-Gallego⁽²⁾, **Alejandro Lucía Mulas**⁽²⁾

¹ Universidad Europea de Madrid (Fundamentos del deporte)

² Universidad Europea de Madrid (Biomedicina)

CONTENIDO PARTE I

RESUMEN	17
ABSTRACT	19
1. INTRODUCCIÓN	21
1.1 El remo	25
1.1.1 Factores fisiológicos relacionados con el rendimiento en remo	
1.1.2 El remo peso ligero masculino	
1.2 Deportes cíclicos y de resistencia asimilados	40
1.2.1 El ciclismo, ruta masculino	
1.2.2 El atletismo, fondo masculino	
1.3 Genética y deporte	44
1.3.1 Gen ACTN3	
1.3.2 Gen ECA	
1.3.3 Gen PARGC1A	
1.3.4 AMPD1	
1.3.5 CKMM	
1.3.6 GDF8	
1.3.7 Gen HFE	
1.3.8 Gen AGT	
2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	65
2.1 Objetivos generales	65
2.2 Objetivos específicos	65
3. MÉTODOS	67
3.1 Métodos generales para la determinación genética	67
3.1.1 Extracción del DNA	
3.1.2 Ampliación de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	
3.1.3 Técnicas específicas de análisis genético	
3.2 Sujetos	76
3.2.1 Sujetos estudio 1	
3.2.2 Sujetos estudio 2	
3.3 Procedimientos	78
3.3.1 Procedimientos estudio 1	
3.3.2 Procedimientos estudio 2	
3.4 Análisis estadístico	85
3.4.1 Análisis estadístico estudio 1	
3.4.2 Análisis estadístico estudio 2	
3.5 Aspectos éticos y legales	86
4. RESULTADOS	87
4.1 Resultado estudio 1	87
4.2 Resultado estudio 2	92
5. DISCUSIÓN GENERAL	97
6. CONCLUSIONES	103
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

RESUMEN

En qué medida el deportista nace o se hace, cómo puede influir una determinada dotación genética en el rendimiento y qué potenciales aplicaciones podrá tener la aplicación de este conocimiento en el mundo del deporte son interrogantes que se esconden tras este estudio. Se analizaron los siguientes 8 genes candidatos en 39 remeros medallistas en mundiales, 52 corredores de resistencia de clase olímpica, 50 ciclistas profesionales y 123 controles: *ACTN3*, *ECA*, *PPARGC1A*, *AMPD1*, *CKMM*, *GDF8*, *HFE*, *AGT*.

El objetivo general de esta investigación fue determinar si existe un perfil genético ideal en remo y en qué medida se diferencia este perfil de los asociados a otros deportes cíclicos de resistencia.

Sólo se encontró asociación con el rendimiento deportivo en dos genes, *ECA* y *HFE*. No se encontró asociación entre el perfil genotípico teóricamente ‘óptimo’ (o más deseable) para remo y el rendimiento deportivo expresado en medallas en campeonatos del mundo. Tampoco se encontraron diferencias en el perfil genotípico de remeros de nivel mundial o nacional, pero sí una puntuación más favorable en los dos grupos de remeros que en la población general. El rendimiento deportivo está probablemente relacionado con el efecto combinado de cientos de variantes genéticas, y además los aspectos que conformarían el “complejo rasgo fenotípico” que representa ser un deportista de nivel mundial en un deporte dado son múltiples y, probablemente, no puedan reducirse a polimorfismos genéticos específicos.

ABSTRACT

Can genetic endowment influence performance? And what may be the potential applications of the knowledge on genes and performance in the world of sports? These were the questions raised in this study. We analyzed the following 8 candidate genes in 39 world-class rowers, 50 Olympic-class endurance runners, 52 professional cyclists, and 123 controls: *ACTN3*, *ACE*, *PPARGC1A*, *AMPD1*, *CKMM*, *GDF8*, *HFE*, *AGT*.

The overall objective of this thesis was to determine if there is an ‘optimal’ genotype profile for rowing, and if there are genotype differences with other cyclic endurance sports.

We only found an association between world-class performance in rowing and two genes, *ACE* and *HFE*. No association was found between the theoretically optimal genotypic profile for rowing performance, as expressed in medals won in world championships. No difference was found in the genotypic profile between top level rowers and national level rowers, yet the genotype profile of both athletic cohorts differed from that of the general population. Athletic performance is probably related to the combined effect of hundreds of genetic variants. Being an athletic champion is likely a “complex trait”, which cannot be reducible to specific genetic polymorphisms.

Key words: GENETIC, PERFORMANCE, ROWING, CYCLIC SPORTS, ENDURANCE.

1. INTRODUCCIÓN

Hay una cuestión que se viene repitiendo prácticamente desde que se desarrollaron sistemas de entrenamiento para mejorar el rendimiento deportivo: ¿El deportista nace o se hace? La respuesta parece obvia y se asume que, en términos generales, el deportista se puede hacer, pero el campeón debe nacer con la potencialidad necesaria y, por supuesto, tendrá que desarrollarla para expresar todo su verdadero potencial. De esta respuesta nace otra pregunta: ¿Dónde residen estas capacidades que caracterizan al gran campeón y cómo podemos detectarlas? Esta cuestión plantea una interrogante mucho más exigente y, sin duda, resulta mucho más complicado encontrar una solución acertada.

El rendimiento deportivo está condicionado por multitud de factores, tanto internos como externos y ambos pueden llegar a ser muy difíciles de estudiar. La base de los factores internos se encuentra en aquellos aspectos derivados de la heredabilidad de caracteres individuales, que pueden condicionar el rendimiento deportivo. Siempre se ha sospechado que existe una dotación genética en algunos deportistas privilegiados, que predispone a un mayor rendimiento deportivo, este aspecto quizá tenga mucho que ver con lo que tradicionalmente se ha llamado “talento deportivo”.

El talento deportivo no es un rasgo de carácter universal. Es evidente que a un gimnasta de gran talento, posiblemente no se le podría reconocer esa misma proyección en el contexto de un deporte de unas exigencias tan opuestas al suyo como, por ejemplo el baloncesto. Por lo tanto hay que concretar cuáles son las características de cada deporte y cuáles serían las capacidades necesarias para alcanzar el máximo rendimiento en ese deporte en concreto.

Por lo tanto, para dar respuesta a las preguntas planteadas anteriormente sería necesario concretar aspectos como la duración y tipo del esfuerzo del deporte analizado, cualidades físicas implicadas, modelo antropométrico, condicionantes reglamentarios, influencia

del material empleado, etc. Una vez conocidas con exactitud las exigencias del deporte tratado se podría estar en disposición de trazar el perfil teóricamente ideal del campeón de este deporte, pudiendo llegar a concretar las exigencias propias de una modalidad, prueba o incluso, en el caso de los deportes de equipo, puesto específico del deportista.

Algunos de los aspectos asociados al perfil ideal del campeón podría tener su origen en la dotación genética del propio deportista, algo que no puede ser modificado por el entrenamiento, pero que influirá en el rendimiento del deportista, por lo tanto habría que aspirar a que una información tan importante como ésta no fuese pasada por alto.

El mundo del deporte empieza a ser sensible a la importancia que este conocimiento sobre genética aplicada podría tener, no sólo en el rendimiento competitivo final, si no en la rentabilización de los recursos invertidos, en la elaboración de programas de detección de talentos, en el diseño individualizado del entrenamiento, prevención de lesiones, anticipación ante dolencias importantes, etc.

Hace muy poco tiempo que se ha terminado de descifrar el genoma humano y cada día se va sabiendo más sobre las funciones de los distintos genes. El entorno científico del deporte, consciente de la importancia de este conocimiento, se suma a las líneas de investigación sobre genética humana y trabaja en la búsqueda de respuestas y aplicaciones que puedan ayudar a entrenadores y deportistas.

Todo desarrollo tecnológico puede presentar unas potencialidades de uso, que no de desarrollo, poco éticas. Ya se habla de un posible dopaje genético o de la selección de potenciales campeones a edades tempranísimas según su perfil genético, para su posterior explotación deportiva. También es cierto que ya se está trabajando, desde las instituciones competentes, con el objetivo de perseguir estas prácticas potencialmente ilícitas.

Frente al lado negativo que supone la amenaza del dopaje genético, hay otros campos donde la aplicación de estos conocimientos puede llegar a ser altamente positiva.

En el ámbito organizativo puede tener aplicación en la política de orientación deportiva y en la optimización de recursos.

Otro ámbito de aplicación es el preventivo, en el que se ha comenzado a trabajar hace tiempo, a fin de descartar posibles dolencias ocultas que supongan una amenaza para la vida del deportista, como por ejemplo los casos de muerte súbita en el deporte.

También en el ámbito del diseño de entrenamiento puede encontrarse una clara aplicación, al favorecer la personalización de los entrenamientos, sobre todo en aquellos deportes que requieren cualidades físicas combinadas, por ejemplo el caso del remo, en el que el rendimiento en el aspecto físico se expresa como producto de fuerza y resistencia. El conocimiento de las características genéticas del deportista permitiría orientar el tipo de trabajo a realizar en función de sus puntos fuertes, ya que es allí, y no es sus debilidades, donde se encontrarán los mayores márgenes de mejora.

El diseño de una planificación deportiva en sus primeras etapas se orienta hacia contenidos de tipo general, para más tarde dirigirse hacia los contenidos específicos, culminando al final de la carrera, en la fase del máximo rendimiento, con un trabajo de orientación altamente individualizada. Esta individualización, centrada en un entrenamiento personalizado, precisa de información concreta para poder diseñar el trabajo apropiado a cada sujeto. Los pioneros de la planificación del entrenamiento, cuando detectaban una carencia en el deportista, adoptaban la estrategia de trabajar insistentemente sobre ella, abandonando su cualidad dominante. La lógica del entrenamiento dio un giro radical tras verificar los insatisfactorios resultados alcanzados con su primera estrategia, al comprobar que ésta constituía un error de cara al rendimiento y una gran pérdida de tiempo y de esfuerzo, ya que donde progresa con facilidad el deportista es en su cualidad dominante, mientras que en las no dominantes, por mucho que se trabaje, el recorrido de mejora es corto, perdiendo un tiempo y una energía valiosísimos.

La calidad y cantidad de información, directamente relacionada con las necesidades del deporte practicado y con las características de cada deportista, reportaría grandes beneficios a los procesos de diseño del entrenamiento deportivo, al personalizar la asignación de las cargas de trabajo y mejorar el rendimiento a la par que se eliminarían esfuerzos que reportan escaso beneficio.

En teoría, determinar las características genéticas de cada sujeto para su desempeño en cada cualidad podría ser posible con simples

test de rendimiento físico, pero en una carrera deportiva avanzada la acumulación de años de trabajo podría enmascarar estas diferencias individuales, extrayendo conclusiones equivocadas que harían tomar decisiones erróneas en el diseño del entrenamiento.

El objetivo de esta investigación es determinar si existe un perfil genético ideal en remo y en qué medida se diferencia este perfil de los asociados a otros deportes cíclicos de resistencia.

El remo es un deporte que disfruta de un nivel de difusión amplio y lleva muchos años continuados de presencia en el contexto de los deportes más destacados a nivel mundial, lo que supone, entre otras cuestiones, que ha sido profundamente estudiado y ha estado presente en multitud de trabajos de investigación dentro del ámbito de las ciencias asociadas al deporte. Por lo tanto, de cara a realizar estudios sobre el hipotético perfil genético del remero ideal, se partiría de un conocimiento muy definido de sus requerimientos, sobre todo si nos centramos en una categoría tan homogénea como el remo peso ligero masculino, ya que se podría acotar todavía más estos requerimientos.

Con objeto de abordar el estudio del papel de ciertos genes en el rendimiento deportivo en remo, se realizará una descripción de los requisitos técnicos y biomecánicos, para continuar con una revisión de los aspectos fisiológicos vinculados al rendimiento en remo. Por otro lado se revisarán las características y capacidades demandadas por dos deportes cíclicos de resistencia: ciclismo masculino de ruta y atletismo masculino de fondo. Por último se realizará una revisión de la literatura científica sobre genética y rendimiento deportivo.

1.1 El remo

El deporte del remo está reconocido como uno de los más exigentes en cuanto a demandas físicas, pero no es menos exigente a nivel técnico, ya que para la ejecución del gesto técnico se deben superar tres grandes dificultades. En primer lugar, los condicionantes implícitos del trabajo con una máquina, en segundo lugar el trabajo con apoyos acuáticos, que requieren una precisa aplicación de fuerza y de una gran sensibilidad para potenciar el deslizamiento de la embarcación y, por último, al estar la mayoría de los barcos configurados como equipo, se exige un gran esfuerzo de sincronización entre los integrantes de la embarcación si se quiere llegar a alcanzar un alto rendimiento deportivo.

Según Sanderson y Martindale ⁽¹⁾ el rendimiento en remo está condicionado por tres factores, el primero sería la potencia generada por el remero, el segundo la potencia necesaria para mover el bote a una velocidad dada, en este sentido poco se puede hacer dadas las normas reglamentarias definidas por la Federación Internacional de Remo (FISA) y que condicionan el diseño hidrodinámico y de aplicación de palancas en el bote y por último, el rendimiento en remo vendrá condicionado por la eficiencia en la aplicación de la potencia por parte del remero, es decir su nivel técnico.

El consumo de energía en el deporte del remo provendría, principalmente, de las resistencias hidrodinámicas y del viento, aproximadamente un tercio del total, mientras que el resto se produciría como consecuencia de las resistencias internas y por el desplazamiento a proa y popa del remero ⁽²⁾.

Como en todo deporte de resistencia, un aspecto clave en el deporte del remo es la eficiencia técnica, que podría definirse como la diferencia entre la energía mecánica liberada por el remero y la energía perdida en la palada ⁽³⁾.

Esta eficiencia se ve mermada por dos factores, el primero sería la cantidad de energía que se pierde en el momento de búsqueda de apoyo propulsivo de la pala en el agua, esta eficiencia propulsiva estaría cifrada en valores comprendidos entre el 78,5% para el skiff y el 85,3% para el ocho con timonel ⁽⁴⁾, el segundo factor lo constituiría la pérdida de energía por circunstancias relacionadas con el desplazamiento y su fluctuación de velocidad, en este sentido Sanderson y Martindale ⁽¹⁾ cifran esta pérdida de eficiencia entre un 5% y 10%, a ello hay que añadir las resistencias hidrodinámicas, que según Zatsiorsky y Yakunin ⁽⁵⁾ se incrementan según una función cúbica de la velocidad del bote. La pérdida de eficiencia

mecánica en el deporte del remo según Henry *et al.*⁽⁶⁾ oscila en el rango del 16% al 24%.

El diseño del material de remo, como consecuencia de las limitaciones reglamentarias definidas por la FISA, implica una propulsión alternativa y la consecuente alternancia entre aceleraciones y deceleraciones ⁽⁷⁾, produciendo un efecto de cabeceo del bote que incrementa la resistencia hidrodinámica, lo que repercute negativamente en la eficiencia. Esta forma de deslizarse discontinuamente, a golpe de palada, supone una concatenación de sucesivos lanzamientos hacia proa de la masa de la embarcación más la del remero o remeros, durante un tiempo que puede llegar a ser prolongado. A tenor de esta mecánica de desplazamiento se desprende el perfil deportivo del remero, que se podría definir como un deportista paradójico, que combinaría las cualidades de un deportista de fuerza como un lanzador, y las de un deportista de resistencia, ya que su trabajo tendrá una ejecución caracterizada por una reiteración de lanzamientos en un espacio prolongado de tiempo.

El barrido de la pala en el agua es clave para el avance de la embarcación, la parte de mayor efectividad, en la que el 100% de la fuerza aplicada se transforma en fuerza útil, se produce cuando el remo se encuentra perpendicular al casco, perdiendo efectividad en la medida en que se aleja de este punto.

El barrido describe un arco asimétrico, ligeramente más amplio en el ataque que en la salida, ya que es necesario un cierto recorrido del remo para alcanzar un apoyo estable de la pala en el agua, esto posibilitará la adecuada transmisión de fuerza por parte del remero, a fin de que ésta sea transformada en desplazamiento. Este apoyo se logra como consecuencia del rápido movimiento de la pala hacia popa, generando una diferencia de presión entre el haz y el envés de la misma, según el principio de Benuilli. Nolte ⁽⁸⁾ acuñó una expresión para este efecto en el remo, la succión hidrodinámica. En función de la habilidad técnica del remero, éste puede llegar a desaprovechar entre un tercio y un cuarto de la energía aplicada en desplazar agua alrededor de la pala en vez de generar empuje ⁽⁴⁾.

Manteniendo las proporciones de asimetría antes descritas, el recorrido del barrido es ligeramente más amplio en couple que en punta. Este barrido es del orden de -60° hacia proa y 40° hacia popa, considerando como ángulo 0 la perpendicular del remo con el bote.

Como consecuencia de los distintos agarres entre punta y couple se desarrollan distintos recorridos. En couple el ángulo de ataque está entre -60 y -70° y el ángulo alcanzado en la salida está en torno a los +40°. En punta el ángulo de ataque está entre -50 y -60° y el ángulo de salida se sitúa en +30°. La diferencia de ángulo en punta, se ve compensada con una mayor longitud del remo y con una mayor superficie de la cuchara de la pala.

Una vez definidas las exigencias de la palada en remo y con el objeto de concretar el tipo de requerimiento físico en este deporte, sería necesario considerar la distancia y el tiempo de competición. En categoría absoluta la distancia de regata es única, 2000 m en aguas muertas. A pesar de que las competiciones se disputan en campos de regatas exentos de corrientes, las condiciones climatológicas pueden afectar sensiblemente al tiempo de competición. Los mejores tiempos, en la élite masculina, suelen oscilar entre los 6'34" del skiff, y los 5'20" del ocho con timonel. Se pueden presentar como ejemplo los datos de los Juegos Olímpicos de Atenas en los que el ganador del skiff masculino marcó un tiempo de 6'49" mientras que el ocho con masculino acreditó un tiempo de 5'42", la aparente discrepancia con respecto a los tiempos de referencia se justifica por las diferentes condiciones de viento con que se disputaron ambas finales. Como orientación se adjunta tabla de mejores tiempos mundiales de remo en categoría masculina (Tabla 1.1). En este deporte no se utiliza el término récord, dada la gran influencia de las condiciones externas en el tiempo de competición, empleando, en su lugar, el concepto de mejor tiempo.

Tabla 1.1 Mejores tiempos mundiales de remo.(Ranking a final de temporada 2008/9).

Bote	Tiempo	País	Lugar	Año
Skiff	6:33.35	NZL	Poznan	2009
Dos sin timonel	6:14.27	GBR	Sevilla	2002
Dos con timonel	6:42.16	CRO	Indianápolis	1994
Doble Scull	6:03.25	FRA	Poznan	2006
Cuatro sin timonel	5:41.35	GER	Sevilla	2002
Cuatro con timonel	5:58.96	GER	Viena	1991
Cuatro Scull	5:36.20	AUS	Beijing	2008
Ocho con timonel	5:19.85	USA	Atenas	2004
Skiff ligero	6:47.82	GBR	Eton	2006
Dos sin timonel ligero	6:26.21	IRL	París	1994
Doble Scull ligero	6:10.02	DEN	Amsterdam	2007
Cuatro sin timonel ligero	5:45.60	DEN	Lucerna	1999
Cuatro Scull ligero	5:45.18	ITA	Montreal	1992
Ocho con timonel ligero	5:30.24	GER	Montreal	1992

También sería necesario tener en cuenta la distancia promedio de avance por palada, la cual se aproxima a los 10 m, esto supone que en condiciones normales el gesto cíclico se repetirá entre unas 220 y 260 veces por regata. Según los datos de los Juegos Olímpicos de Atenas, el ganador del ocho con timonel masculino desarrolló un avance promedio por palada de 9,15 m, mientras el ganador del skiff masculino desarrolló un avance promedio por palada de 7,86 m, lo que les supuso un total de 218 y 254 paladas, respectivamente, para cubrir los 2000 m de regata. Estas embarcaciones representan los valores extremos en cuanto a avance por palada, el resto de los botes se sitúan entre ambas referencias.

Y por último, es muy importante tener en cuenta un valor como la frecuencia de palada, que en el tramo central de la regata oscila entre las 34-40 paladas/minuto. Utilizando los mismos registros obtenidos en los Juegos Olímpicos de Atenas encontramos que el ganador del skiff masculino se le midió una frecuencia media de 37,3 paladas/minuto, el valor menor se dio en el segundo parcial de 500 m con 35,7 paladas/minuto y el mayor en los últimos 500 m con 39,5 paladas/minuto. En el otro extremo, representado por el ocho con timonel masculino, se registró una frecuencia media de 38,3 paladas/minuto, el parcial remado a menor frecuencia fue el correspondiente a los terceros 500 m cubiertos a 36,7 paladas/minuto y la mayor frecuencia promedio se dio en el primer parcial de 500 m con 41,1 paladas/minuto.

Según Kleshnev ⁽⁹⁾ existe una elevada relación entre la potencia aplicada sobre el remo y la frecuencia de palada ($r=0,72-0,89$), observándose una relación lineal positiva en el caso de la técnica de punta, mientras que en couple se observa una relación curvilínea en la que a medida que se incrementa la frecuencia de palada el aumento de la potencia se hace menor.

Según Secher ⁽²⁾ la resistencia al avance experimentada por un bote de competición progresa al cuadrado del incremento de la velocidad, lo que supone un incremento de 3,2 veces en el gasto de energía, sin embargo el incremento del costo metabólico es tan solo 2,4 veces superior.

1.1.1 Factores fisiológicos relacionados con el rendimiento en remo

Tras la descripción de las características y demandas propias del gesto técnico del remo y de su aplicación en competición, es posible tomar conciencia de la tremenda exigencia física

de este deporte. Por otra parte se empieza a captar la aparente contradicción en las cualidades demandadas al remero para alcanzar el máximo rendimiento deportivo, lo que hace de éste uno de los deportistas más completos del programa olímpico actual.

Mäestu *et al.* ⁽¹⁰⁾ categorizan el remo, desde el punto de vista fisiológico, como un deporte de fuerza resistencia.

En la vertiente resistencia el principal valor fisiológico a tener en cuenta es el consumo máximo de oxígeno. En este deporte tiene gran importancia el consumo máximo de oxígeno en valores absolutos frente a otros deportes como la carrera atlética, donde el consumo máximo de oxígeno en relación al peso es muy importante. Aunque el remero tenga un elevado peso corporal no penaliza tanto su rendimiento como en otros deportes, ya que el deportista no debe soportar su propio peso y su desplazamiento se ve favorecido por el deslizamiento en el medio acuático, coincidiendo con este planteamiento Russo *et al.* ⁽¹¹⁾ encontraron una alta densidad corporal en los remeros. En este deporte se puede tolerar un elevado peso del remero, pero teniendo en cuenta en todo momento la composición corporal, penalizando a los deportistas con mayor proporción de peso graso, frente a los remeros con mayor proporción de peso magro. Normalmente encontraremos aparejado al incremento de estatura un proporcional incremento de peso corporal, algo que beneficiaría a la vertiente de lanzador, que caracteriza al remero, pero que podría perjudicar a la del fondista.

Las demandas, en cuanto a amplitud de movimiento, que exige el correcto gesto técnico de la palada, suponen una clara ventaja para aquellos remeros de mayor estatura, al poder cubrir este recorrido ideal sin necesidad de forzar la flexión articular, lo que les permite una más cómoda y eficiente aplicación de la fuerza, sobre todo en el momento del ataque, a la par que se mantiene el ángulo óptimo de barrido en la palada. Esta situación es más acusada, si cabe, en la modalidad de punta. Hirata ⁽¹²⁾ encontró una diferencia de estatura en los remeros de elite a favor de los especialistas en punta, que presentaban 0,02 m y 3,8 kg más en el caso de los hombres y 0,035 m y 3,5 kg en el caso de las mujeres, esta diferencia de estatura queda plenamente justificada porque en la modalidad de couple resulta más fácil que en la de punta alcanzar el arco óptimo de

palada. En la modalidad de punta resulta necesario forzar más la flexión articular para alcanzar el ángulo de ataque y añadir una importante rotación de tronco, es por esta razón que los remeros más altos resultan beneficiados al poder alcanzar con menor esfuerzo el ángulo óptimo de ataque.

Dado que las embarcaciones de remo son extremadamente estilizadas y consiguen deslizarse por el agua con un mínimo rozamiento, el incremento de peso corporal del remero no perjudica de manera sensible la velocidad del bote, por lo que el prototipo ideal del remero se ajusta al de un deportista de gran tamaño, más de 1,90 m, este modelo antropométrico pone en riesgo de exclusión a la mayor parte de la población, ya que se encuentra por debajo de estos valores. Estas circunstancias motivaron que la Federación Internacional de Remo se plantease una modificación reglamentaria que fomentase la participación de remeros con tipología más diversa. La solución encontrada fue la creación de la categoría de peso ligero.

Independientemente del peso corporal del deportista, el factor fuerza seguirá siendo muy importante, tanto para remeros de la categoría peso ligero como peso pesado. El remero es un deportista capaz de generar inusuales niveles de fuerza a bajas velocidades de contracción ⁽¹³⁾. El tipo de fuerza demandada en el deporte del remo es relativamente lenta (contracciones musculares de 0,3-0,4 seg)², y en consecuencia el remero expresa altos valores de fuerza a baja velocidad de movimiento, implicando un 70-75% de fibras musculares de contracción lenta. Steinacker ⁽¹⁴⁾ ofrece datos similares con presencia de un 70% de fibras lentas, en el mismo sentido se expresan Roth *et al.* ⁽¹⁵⁾, afirmando que las características de las fibras musculares del remero son altamente específicas, pero con una mayor proporción de fibras rápidas en los músculos que intervienen en el ataque.

Por otra parte Steinacker *et al.* ⁽¹⁶⁾ encontraron que en una regata de remo, con duraciones de entre 5,5 y 8 min. se produce un trabajo, tanto estático como dinámico, que llega a involucrar aproximadamente al 70% de la masa muscular corporal, desarrollando un promedio de potencia por palada de 450 a 500 W, datos similares fueron presentados por Dal Monte y Komor ⁽¹⁷⁾. Utilizando un ergómetro Gjessing al que se le aplicó un sistema

de galgas extensiométricas, Hartmann *et al.* ⁽¹⁸⁾ registraron picos de potencia en remeros de nivel mundial de hasta 3230 W en hombres y 1869 W en mujeres en un test de 5-10 paladas.

Ya se ha tratado anteriormente la distancia y tiempos promedios de una regata de remo, pero es preciso definir el tipo de esfuerzo exigido en este modelo competitivo. En la regata de remo se van a demandar grandes cantidades de energía a través de las vías aeróbica y anaeróbica ⁽¹⁹⁾. Vermulst *et al.* ⁽²⁰⁾ cifran en un 70-80% la contribución aeróbica en la competición de remo; Shephard ⁽²¹⁾ afirma que el esfuerzo del deporte del remo en una distancia de 2000 m sería aproximadamente un 70% aeróbico, y el pico de lactato en sangre se cifraría entre 11-19 mmol·l⁻¹, llegando en casos excepcionales hasta 25 mmol·l⁻¹. Estos datos coinciden plenamente con los registrados en los remeros del Equipo Nacional Español, tanto de remeros pesados como ligeros en el Centro Nacional de Medicina Deportiva del Consejo Superior de Deportes (C.S.D). De todos modos, en función del momento de la regata, variarían sensiblemente los requerimientos metabólicos, frente a los datos de predominancia aeróbica en el conjunto de la regata, según Kramer *et al.* ⁽²²⁾ en el primer tramo de la competición cobra gran importancia la componente anaeróbica, al igual que en regatas de menos duración ⁽²³⁾.

Secher ⁽²⁾ en un trabajo sobre aspectos fisiológicos medidos en condiciones de competición, concluyó que el coste metabólico en una regata de 6,5 min, para los pesos pesado masculino, se encontraba en torno a 6,7 l·min⁻¹ con una ventilación de 243 l·min⁻¹, la contribución anaeróbica en regatas de esta duración la estimó en un rango de entre el 21% y 30%. También detectó un incremento de la presión sanguínea en el momento del ataque cercano a los 200 mmHg, de igual manera describe un engrosamiento de las paredes cardíacas de los remeros de competición a la par que un incremento en el volumen de sus cavidades.

Mikulic *et al.* ⁽²⁴⁾ realizaron un estudio con remeros croatas en el que se establecían las diferencias entre sus representantes de alto nivel internacional y aquellos de nivel nacional, encontrando un consumo máximo de oxígeno superior para los del primer grupo con 5,51 ± 0,40 l·min⁻¹, frente a 5,16 ± 0,39 l·min⁻¹ en el caso de los remeros de nivel nacional; mientras que

la potencia desarrollada en el umbral anaeróbico fue de 346 ± 17,9 W en los internacionales, frente a 319,2 ± 20,1 W en los nacionales; en el ámbito antropométrico presentaron mayores dimensiones los remeros internacionales, salvo en dos apartados como el pecho y circunferencia de muslo donde eran superados por los nacionales.

Por otra parte Fiskerstrand y Seiler ⁽²⁵⁾ realizaron un estudio longitudinal, desarrollado entre 1970 y 2001 con remeros noruegos de alto nivel en la categoría peso pesado, en el que se recogían datos sobre consumo máximo de oxígeno, cifrándose entre 5,8 ± 0,2 l·min⁻¹ en la década de los setenta y 6,5 ± 0,4 l·min⁻¹ en el 2000, valores correspondientes a remeros de una gran corpulencia, con una estatura promedio de 1,91 m y un peso promedio de 89,5 kg. Estos datos presentan a un conjunto de remeros con un peso corporal superior en un 23% al del equipo español peso ligero y describen valores de consumo máximo de oxígeno claramente superiores en términos absolutos, pero si comparamos los valores promedios del equipo español, en términos relativos, obtenidos en el Centro Nacional de Medicina del Deporte del C.S.D. (4,9 ± 0,3 l·min⁻¹), se puede observar que las diferencias son mínimas (Tabla 1.2).

Tabla 1.2 Comparativa de VO₂ máx absoluto y relativo medios, de remeros pesados noruegos y ligeros españoles.

	VO ₂ máx Absoluto	VO ₂ máx Relativo
Remeros Noruegos Pesados Década 1970	5,8 ± 0,2 l·min ⁻¹	63,7 ml·kg ⁻¹ ·min ⁻¹
Remeros Noruegos Pesados Año 2000	6,5 ± 0,5 l·min ⁻¹	71,4 ml·kg ⁻¹ ·min ⁻¹
Remeros Españoles Ligeros 1977-2006	4,9 ± 0,3 l·min ⁻¹	70 ml·kg ⁻¹ ·min ⁻¹

Secher ⁽²⁶⁾ registró elevados valores de consumo de oxígeno en remeros pesados de 6,0-6,61 l·min⁻¹, datos igualmente coincidentes con los de los remeros noruegos de la misma época. En 1988 Howald ⁽²⁷⁾ publica datos de remeros ligeros entre los que destaca su consumo de oxígeno relativo de entorno a 75 ml·kg⁻¹·min⁻¹, datos que coinciden con los publicados por Steinacker ⁽¹⁴⁾. El consumo máximo de oxígeno (VO₂ máx) se ve incrementado

como consecuencia de la masa muscular implicada ^(28,29), algo que justificaría las diferencias encontradas entre estos dos grupos de remeros de dos categorías diferentes.

A fin de comparar grupos de remeros más homogéneos, podemos poner en contraste los datos publicados por Ming-Kai *et al.* ⁽³⁰⁾ sobre las características fisiológicas y antropométricas de 9 remeros peso ligero de élite en Hong Kong, con una estatura 175,9 ± 3.0 cm, peso 71,7 ± 2,5 kg y porcentaje de grasa 7,1± 2,5%, para alcanzar un VO₂ máx 4,30 ± 0,3 l·min⁻¹, en el consumo de oxígeno relativo podemos observar unos datos sensiblemente inferiores a los de los remeros españoles, acorde con la diferencia de rendimiento en competiciones de alto nivel, *vg.* Campeonatos del Mundo, algo que no sucedía con los remeros pesados noruegos, que presentan unos resultados del máximo nivel en mundiales, en la línea de los ligeros españoles.

Otro trabajo con remeros peso ligero fue el realizado por Yoshiga e Higuchi ⁽³¹⁾, donde comparaban los resultados obtenidos en test de remo con otro test de carrera. En este estudio se incluían 55 varones, de 23 ± 3 años que remaban regularmente, de 176 ± 5 cm con una masa corporal de 72 ± 6 kg y un porcentaje de grasa del 11 ± 3%, entre otros datos en este estudio se encontraron valores de VO₂ máx de 4,5 ± 0,5 l·min⁻¹ en el test progresivo de remo, dando valores de 0,2 l·min⁻¹ superiores a los alcanzados en el test de carrera, cifrando en un 3% la diferencia a favor del remo, mientras que la frecuencia cardiaca máxima fue de 194 ± 8 pulsaciones en remo y de 198 ± 11 en carrera, por otra parte el pulso de oxígeno (VO₂ máx/HR máx) fue superior en remo y el equivalente ventilatorio de oxígeno (V_E máx / VO₂ máx) fue similar en ambos casos.

El corazón del remero también presenta unas características destacables, con una notable hipertrofia cardiaca que puede ser debida, fundamentalmente, a las maniobras de Valsalva repetidas en cada palada ^(2,32).

Una vez definido el perfil de los remeros en cuanto a valores antropométricos, tipo y demanda de fuerza solicitada y valores fisiológicos de resistencia presentes en la alta competición, se puede avanzar un paso más en cuanto a intentar definir los principales factores predictores del rendimiento en remo.

Cosgrove *et al.*⁽³³⁾ en un estudio sobre una muestra de 13 remeros, encontraron que los mejores predictores de la velocidad obtenida en una prueba de 2000 m sobre remoergómetro fueron el VO_2 máx, ($r=0,85$) y la masa magra ($r=0,85$). La fuerte asociación encontrada por estos autores entre el valor absoluto de VO_2 máx y la velocidad es congruente con lo informado en otros estudios^(14,22,26).

Gayer⁽¹⁹⁾ encontró que en el rendimiento en remo las principales diferencias fisiológicas halladas entre los campeones y los no campeones, radicaban en el pico de potencia, el umbral anaeróbico y la masa corporal magra.

Yoshiga e Higuchi⁽³⁴⁾ realizaron un estudio valorando el rendimiento en remo, tanto en hombres como en mujeres, teniendo en cuenta la estatura, el peso corporal, el peso magro y el consumo máximo de oxígeno. En el estudio participaron 71 mujeres y 120 hombres, con edades entre 18 y 24 años de edad y morfologías diversas, encontrando notables correlaciones entre estatura y rendimiento ($r=-0,81$), peso total y rendimiento ($r=-0,85$), peso magro y rendimiento ($r=-0,91$) y VO_2 máx y rendimiento ($r=-0,90$), expresando el rendimiento en tiempo sobre la distancia de 2000 m en remoergómetro Concept II.

Ingham *et al.*⁽³⁵⁾ a partir de una muestra de 23 hombres (19 remeros pesados y 4 ligeros), y 18 mujeres (13 remeras pesadas y 5 ligeras), realizaron un estudio en el que los sujetos fueron sometidos, por una parte, a un test discontinuo incremental en remoergómetro para determinar el umbral de lactato, VO_2 máx., y potencia desarrollada al VO_2 máx y, por otra, a un test de cinco paladas máximas para determinar la fuerza máxima, el pico máximo de potencia y longitud de la palada. Las variables que presentaron una mayor correlación con el rendimiento operativizado como el tiempo alcanzado en el test fueron: la potencia desarrollada al VO_2 máx ($r=-0,95$), el V_{O_2} máx relativo ($r=-0,88$), el VO_2 máx en el umbral láctico ($r=-0,87$), el peso corporal ($r=-0,82$), y la estatura ($r=-0,70$). En este mismo estudio encontraron que había substanciales diferencias de rendimiento entre pesos y sexos, quedando cifrada la diferencia en ergómetro entre hombre y mujeres, sin importar categoría en un 7,7%, mientras que entre ligeros y pesados la diferencia era del 5,5%. Estas diferencias en el agua, con datos obtenidos en la mejores competiciones internacionales del año 1997 al 2001, fueron del 10,9 y 4% respectivamente.

Barrett y Manning⁽³⁶⁾ confeccionaron un trabajo, realizado con 15 remeros australianos de élite, sobre las relaciones del rendimiento en skiff, en la distancia competitiva de 2000 m, con una serie de factores asociados al rendimiento específico, encontrando unas elevadas correlaciones con el tiempo en test de 2000 m en remoergómetro ($r=-0,90$), masa corporal ($r=-0,87$), altura ($r=-0,86$), y la longitud seleccionada del remo ($r=-0,84$). Concluyendo que el remero tiende a ser cada vez más grande y fuerte, además ese incremento de dimensiones corporales le permite utilizar remos más largos con mayores palancas.

Bourdin *et al.*⁽³⁷⁾ encontraron, en un estudio realizado con 31 remeros pesados y 23 ligeros, que el elemento con mayor capacidad de predicción del rendimiento del remero era el pico máximo de potencia sostenido en un test incremental de ergómetro ($r=-0,92$), seguido del VO_2 máx ($r=-0,84$), la masa corporal -en su estudio valora la masa absoluta, no el peso magro- ($r=-0,65$) y el VO_2 máx al umbral láctico ($r=-0,49$).

Dentro de los remeros peso ligero, que tienen determinado por reglamento el peso de competición, la variable peso corporal puede no ser tenida en cuenta, no obstante hay trabajos que valoran el rendimiento de este grupo de remeros a partir de su composición corporal. Slater *et al.*⁽³⁸⁾ realizaron un estudio con remeros peso ligero australianos, encontrando que los deportistas con mejor rendimiento, en skiff 2000 m, eran aquellos que tenían menor porcentaje graso ($8,4 \text{ seg kg}^{-1}$ $p<0,01$) y mayor porcentaje de masa muscular ($-10,2 \text{ seg kg}^{-1}$ $p<0,01$).

El deporte de alta competición actual se caracteriza por altos niveles de exigencia y rendimiento, en este contexto el remo está reconocido como uno de los de mayores exigencias fisiológicas, para alcanzar estos valores se precisan grandes demandas en los entrenamientos. Steinaker *et al.*⁽¹⁶⁾ registraron datos del entrenamiento realizado por remeros en su preparación previa a los Campeonatos de Mundo, informando sobre volúmenes de $190 \text{ min} \cdot \text{día}^{-1}$ de los cuales del 55 al 65 % se realizaban en el bote y el resto en entrenamiento no específico, el volumen de entrenamiento semanal de remo se situaba entre 120 y 150 km, por otra parte, del total de los kilómetros anuales, sólo se desarrollaban a alta intensidad entre el 4 y el 10%. Este planteamiento es coincidente con el expresado por otros autores⁽²⁵⁾.

El volumen del entrenamiento anual se ha incrementado en las últimas tres décadas en un 20%, fundamentalmente a expensas del trabajo realizado en la fase invernal. En la actualidad los ganadores de medallas mundiales entrenan entre 1100 y 1200 horas al año. La organización del entrenamiento, atendiendo a su intensidad, ha sufrido importantes ajustes en el periodo de trabajo invernal, por una parte se ha restado protagonismo al trabajo a altas intensidades (105-115% del VO_2 máx), a la par que se ha incrementado el volumen de trabajo a intensidades claramente inferiores al umbral láctico (90-95% del VO_2 máx) y se sugiere que el trabajo ideal sería el de un entrenamiento polarizado con el 75% por debajo del umbral láctico ⁽²⁵⁾.

La dedicación al entrenamiento en un remero de alta competición en la actualidad, supone un promedio de 1100 a 1300 horas año, con un total de 600 sesiones, al menos el 75 % dedicadas específicamente al remo, y un volumen anual aproximado de 6500 a 7500 km de remo.

1.1.2 El remo peso ligero masculino

Como se ha comentado en apartados anteriores, la diferencia de tamaño del remero repercute enormemente en el rendimiento final sobre la distancia de 2000 m. El gigantismo hacia el que se dirigía el remo a finales de los años sesenta hizo reflexionar a la Federación Internacional, ya que esta situación amenazaba con cerrar, casi por completo, el camino de los remeros menos grandes a las competiciones de alto nivel. Esta realidad limitaba, además, el objetivo de crecimiento internacional de este deporte, ya que, de partida, muchos países, fundamentalmente orientales, con población de estaturas predominantemente bajas se veían casi excluidos del éxito en las competiciones internacionales de remo. En este sentido Khosla ⁽³⁹⁾ afirma que las exigencias de estatura requeridas para el alto rendimiento en remo limitan enormemente las posibilidades de éxito en la mayoría de las poblaciones de Asia, África y Latinoamérica.

Para ilustrar con datos la gran masa corporal de los remeros campeones, basta con citar un estudio realizado por Secher ⁽²³⁾ para la Federación Internacional de Remo, donde se les comparaba con la población general de Canadá, el trabajo concluía que los remeros pesados campeones del mundo eran

un 10% más altos y un 27,2% más pesados que la media de la población canadiense. Dentro de los propios remeros se pueden apreciar grandes diferencias, por ejemplo Hirata ⁽¹²⁾ encontró que los campeones del mundo en skiff categoría pesado eran 0,12 m más altos y 9,6 kg más pesados que la media de los campeones nacionales del mismo bote.

En otros estudios se comprueba que no existen grandes diferencias en cuanto a características antropométricas entre remeros peso ligero y la población general, pero sí que se observan grandes diferencias fisiológicas, sobre todo a nivel de potencia aeróbica ⁽⁴⁰⁾.

El remo siempre fue un deporte amante de las tradiciones y entrar en cambios radicales, aunque fuese para ampliar su difusión, se hacía verdaderamente difícil. Las alternativas pasaban por modificaciones reglamentarias que afectasen a la distancia de regata o limitar el diseño de los barcos, lo que suponía modificar los campos de regatas o la totalidad de la flota, estas soluciones hubieran representado un costo económico muy elevado. Al final, tras barajar opciones y con la voluntad asumida de abrir las puertas a todo tipo de remeros, se tomó la opción de crear una nueva categoría definida por el peso corporal de los mismos.

La decisión final se concretó en el establecimiento de una limitación de hasta un máximo de 70 kg de peso corporal promedio en la tripulación, no obstante se permite una desviación individual máxima de ± 2.5 kg, manteniendo la media de la tripulación por debajo del límite reglamentario de 70 kg. Se contempla una excepción para la embarcación individual, en la que se le concede al remero un peso corporal máximo de 72,5 kg. Estas limitaciones siguen inalterables hasta el día de hoy.

El hecho de que existan limitaciones de peso no quiere decir que los remeros ligeros sean pequeños, ya que su media de estatura se encuentra en entorno a 1,80 m, pero sus dimensiones corporales distan bastante de las registradas en la categoría absoluta, que en el caso de los hombres alcanzan valores antropométricos medios superiores a 1,90 m de talla, 98 kg de peso y 2,10 m de envergadura. Al no existir limitaciones reglamentarias no son infrecuentes las tripulaciones que

superan el promedio de estatura de los 2 m, este incremento de la envergadura permite, como se vio anteriormente, una amplitud óptima de palada sin necesidad de forzar la posición de ataque.

Secher ⁽²³⁾ realizó en un estudio longitudinal sobre la evolución antropométrica de los remeros, cifrándola en un crecimiento de 0,02 m y 5 kg por década, con estos datos de Secher cabría pensar que las diferencias de rendimiento entre remeros pesados y ligeros irán en aumento, dado que los ligeros siguen en los mismos valores desde 1974 -año de la creación de la categoría-, pero muy al contrario las diferencias de tiempo de regata han disminuido. Esta aparente contradicción puede resolverse atendiendo a varios factores, ya que a pesar de que los pesados han seguido progresando, los ligeros lo han hecho en mayor medida, posiblemente por su entrada en el Programa Olímpico en 1996, también porque se disputan menos embarcaciones, lo que supone concentración de talentos, además de que la igualdad de las regatas es máxima y fuerza al progreso y por último la universalización pretendida por la Federación Internacional ha supuesto que cada día sean más países los que se suman a esta categoría, elevando el nivel de la misma.

Frente a los remeros de categoría peso pesado, que en su programa olímpico disponen de seis embarcaciones, tres de couple y tres de punta, los ligeros concentran sus esfuerzos en dos embarcaciones, una de couple y una de punta, por otro lado la proporción por modalidades queda ligeramente desequilibrada, siendo veintiuno los remeros pesados de punta frente a los cuatro ligeros y siete pesados en couple frente a los dos ligeros de la misma modalidad.

A pesar de que es una categoría relativamente reciente en la dilatada historia del remo, la de peso ligero ya puede presentar una cierta trayectoria histórica, tanto a nivel nacional como internacional. Los primeros Campeonatos del Mundo para peso ligero masculino se disputaron en Lucerna, Suiza, 1974, mientras que los primeros Campeonatos del Mundo para peso ligero femenino se disputaron en Hazewinkel, Bélgica, en 1985.

Aunque el primer Campeonato del Mundo categoría peso ligero, con denominación Campeonato FISA, se celebró en 1974,

España no comenzó su andadura en esta categoría hasta 1977, arrancando con éxito, ya que consiguió una medalla de plata en ocho con timonel. En los 33 años (1977-2009) de participación española continuada en categoría masculina se han obtenido un total de 22 medallas, repartidas en seis oros, cinco platas y once bronce.

La nómina de medallistas españoles llega hasta un total de 39 remeros, con un reparto de medallas conseguidas que oscila entre ocho por parte del más laureado y una por los menos condecorados, con una media de 2,6 medallas por remero.

En los 33 años de competición se han conseguido medallas en 16 de ellos y de forma consecutiva desde 1977 hasta 1986, periodo en el que España se asentó como potencia mundial en este deporte.

1.2 Deportes cíclicos y de resistencia asimilados

Para caracterizar el perfil genético de los remeros peso ligero masculino españoles del máximo nivel internacional se compararán con otros deportistas españoles, igualmente de alto nivel internacional, pertenecientes a otras disciplinas deportivas afines por sus exigencias fisiológicas, propias de los deportes de resistencia, que además responden al patrón de ejecución técnica de los deportes cíclicos. Los deportes seleccionados por su mayor afinidad fueron el ciclismo en su modalidad de ruta y las carreras de fondo en atletismo.

A pesar de las grandes similitudes iniciales en estos tres deportes, existen algunas diferencias, que deben ser tenidas en consideración, para lo que se realizará una breve descripción de las características de estos dos deportes afines al remo.

1.2.1 El ciclismo, ruta masculina

Las características fisiológicas del grupo de los ciclistas vendrán determinadas por las exigencias generadas en su tipo de competición. Los corredores valorados en este estudio pertenecen a la modalidad de ruta y especializados en carreras por etapas, destacando en las grandes vueltas de tres semanas (Vuelta, Giro y Tour).

Las tres vueltas ciclistas del máximo nivel son eventos disputados a lo largo de tres semanas sobre un recorrido total próximo a los 3500 km, con un día de descanso y con una estructura similar. Normalmente, estas pruebas están constituidas por tres etapas contra reloj, de cuatro a seis etapas de montaña y el resto son etapas de perfil más o menos llano. Las etapas contra reloj normalmente son pruebas predominantemente llanas y de carácter individual (excepcionalmente en estas vueltas puede añadirse una cronoescalada o contra reloj por equipos) de aproximadamente 40-50 km (excepto la etapa prólogo de aproximadamente 6-8 km). Las etapas de montaña, de 170 ± 30 km, presentan distintos grados de dureza y pueden llegar a incluir un total de cuatro o cinco puertos de primera categoría o categoría especial, a lo que hay que añadir las duras condiciones climatológicas del mes de julio francés o el final del verano español. El resto de las etapas son de perfil más o menos llano y con distancias en torno a los 200 km.

Normalmente se decide la carrera en las etapas contra reloj y/o en las etapas de montaña, por lo que los aspirantes al triunfo deberán ser grandes especialistas, en al menos, uno de estos tipos de etapa sin desmerecer en exceso en la otra, por lo que las características de los ganadores conjugarán las cualidades de los distintos especialistas. Otros especialistas como los esprinters o rodadores difícilmente llegan a tener opciones de triunfo global en estas grandes vueltas.

Entendiendo que las características del campeón en ciclismo en ruta se ajustarán a las de los contrarrelojistas o escaladores, se hace necesario describir las exigencias propias de estos tipos de corredores.

Los contrarrelojistas tienen que ser capaces de adoptar una posición aerodinámica forzada durante mucho tiempo, algo imprescindible para minimizar la resistencia aerodinámica que se genera al rodar por encima de los 50 km/h, y sin que se resienta su rendimiento, esto puede presentar ciertos problemas en cuanto a la posible oclusión de la arteria iliaca como consecuencia de la acción del psoas iliaco añadido a la acentuada flexión de cadera, que exige el uso del manillar de triatlón en la posición aerodinámica ⁽⁴¹⁾, por otra parte los especialistas en contrarreloj deberán ser capaces de desarrollar, a lo largo de la prueba, potencias promedio por encima de los 400 W, los grandes especialistas llegan a ser capaces de correr más de una hora por encima de los 500 W como Miguel Induráin que llegó a mantener una potencia promedio de 509 W durante los 53,04 km en su récord de la hora ^(42,43). Los contrarrelojistas trabajan durante la prueba por encima del 90 % del $\dot{V}O_2$ máx, cifrándose éste en valores en torno a $70 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, todo ello pedaleando a frecuencias de aproximadamente 100-110 pedaladas por minuto.

Los escaladores son corredores capaces de desarrollar su mejor rendimiento en las etapas de montaña, donde se enfrentan a esfuerzos sostenidos a lo largo de tramos superiores a los 10 km con pendientes promedio del 5% al 10% y rampas superiores al 20%, en etapas de aproximadamente 200 km, lo que supone esfuerzos puntuales de más de 45 minutos desarrollados de manera consecutiva en cada uno de los puertos de montaña, hasta cuatro o cinco, en el contexto de las cinco o seis horas

de duración de la etapa. Son por lo tanto grandes fondistas, que presentan un ratio favorable en las proporciones peso potencia, de entorno a $6 \text{ W} \cdot \text{kg}^{-1}$ o superiores, por lo tanto un corredor de 70 Kg estaría aplicando potencias de referencia en torno a los 420 W. Las velocidades de ascenso son bajas en términos relativos ($\sim 20 \text{ Km/h}$), con lo que el efecto del calor en verano incrementa la sensación de fatiga. Los escaladores en los momentos decisivos de la competición trabajan a altas intensidades ($\geq 90\%$ del VO_2 máx) similares a las de los contrarrelojistas ^(44, 45). La frecuencia de pedaleo es sensiblemente inferior a la utilizada en contra reloj, situándose entre las 60-80 pedaladas por minuto ⁽⁴⁶⁾, aunque excepcionalmente se pueden encontrar corredores, como Pantani o Armstrong, capaces de escalar a frecuencias superiores (100 pedaladas por minuto).

Antropométricamente los corredores de contrarreloj son más grandes (1,80-1,85 m) y pesados (70-75 kg), que los escaladores (1,75-1,80 m y 60-66 kg) ^(45, 47).

Los valores de consumo máximo de oxígeno en los primeros clasificados en las grandes vueltas se encuentran entre los 5,0 y $5.1 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$, los consumos relativos tienden a ser superiores en los escaladores ($70\text{-}80 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) que en los contrarrelojistas ($\sim 70 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), aunque se pueden encontrar valores excepcionales en corredores excepcionales como Miguel Induráin con $6,4 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ y $79 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para sus 81 kg de masa corporal ⁽⁴³⁾.

Dado el tipo de esfuerzo muscular desarrollado las fibras musculares predominantes son del tipo I ⁽⁴⁸⁾.

1.2.2 El atletismo, fondo masculino

Al considerar las características de los corredores del fondo atlético, surgen variables diferentes si lo comparamos con el remo o el ciclismo, deportes con más aspectos en común. Por una parte, en el caso de los estudios relacionados con el atletismo de fondo se encuentran las necesarias referencias en cuanto a morfología o perfiles fisiológicos diferenciando corredores negros y blancos y, quizá más importante, se tienen más en consideración aspectos relacionados con el peso corporal o distribución anatómica del mismo, aspecto igualmente ligado a los orígenes étnicos.

Dada la natural técnica del desplazamiento en la carrera atlética, sin ayuda de un implemento mecánico (embarcación o bicicleta), que soporta en gran medida el peso corporal, la ligereza del corredor cobra especial relevancia de cara a la consecución de elevados valores de eficiencia de carrera.

Respecto al consumo de oxígeno los datos descritos en los estudios realizados con atletas de fondo, a pesar de la gran variedad de distancias, desde los 3000 m hasta los 42.195 km, resultan ser bastante similares a los referidos para remeros y ciclistas. Lucía *et al.* ⁽⁴⁹⁾ recoge valores de $73,8 \pm 5,6 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para corredores eritreos de alto nivel y de $76,8 \pm 6,1 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para sus homólogos españoles, la gran diferencia se encontró en el costo energético de carrera a $21 \text{ km} \cdot \text{h}^{-1}$, que fue menor en los eritreos ($65,9 \pm 6,8 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) que en los españoles ($73,6 \pm 5,7 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Saltin *et al.* ⁽⁵⁰⁾ compara igualmente corredores kenianos con corredores escandinavos informando valores similares a los anteriores ($\sim 80 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ y $79 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ respectivamente), datos también muy próximos a los publicados por Doherty *et al.* ⁽⁵¹⁾ con corredores de elite británicos ($79,1 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Algunos estudios informan de valores más bajos en corredores sudafricanos de color ($71,5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) ^(52, 53).

En el caso del fondo atlético, el rendimiento parece más ligado a la economía en carrera, que puede deberse a varios factores, en primer lugar a la composición de fibras musculares que es marcadamente tendente hacia las de tipo I ⁽⁵⁴⁻⁵⁷⁾, datos similares a los detectados en ciclistas y remeros, otra de las razones que puede abundar en el apartado de la eficiencia en carrera puede ser el índice de masa corporal, ligeramente menor en corredores de color o la masa de las extremidades inferiores, con muslo más ligero y sobre todo pierna más ligera y de menos diámetro en el caso de los corredores africanos, por último, las condiciones de vida y el entrenamiento desarrollados en altura, $\sim 2600 \text{ m}$ en el caso de los eritreos, pueden contribuir a la mayor eficiencia de carrera, aunque existen estudios que muestran que los valores sanguíneos de estos deportistas no difieren excesivamente de los obtenidos en corredores españoles ⁽⁴⁹⁾.

1.3 Genética y deporte

El campo de la genética y el rendimiento deportivo, es un campo relativamente novedoso. Aunque falta mucho trabajo, antes de obtener una comprensión total de los muchos genes que están a la base de los rasgos que influyen en el rendimiento deportivo, los avances proporcionados por las técnicas de genética molecular han facilitado, de forma considerable, la capacidad de los investigadores para identificar factores genéticos relacionados con el rendimiento deportivo.

El impacto del componente genético en el rendimiento deportivo se investiga desde tres grandes perspectivas ^(58,59), los estudios de heredabilidad intentan valorar la contribución genética y ambiental sobre los fenotipos. Un segundo gran método es el *Genome-wide linkage scans*, que consiste en un examen genético de marcadores que se encuentran por todo el genoma humano en un grupo muy grande de individuos para posteriormente realizar asociaciones entre cada marcador y los fenotipos específicos. La tercera gran estrategia, y una de las más utilizadas, consiste en estudios de asociación con gen candidato, en ella se trata de buscar un gen candidato que se cree pueda tener una influencia en la regulación de alguno de los fenotipos de la condición física. Las investigaciones más frecuentes son aquellas en las que se trata de determinar si un gen, o una variación de éste, es más común en atletas de élite que en la población general. Los estudios de asociación con gen candidato son los que se han utilizado para identificar genes asociados a la condición física, sea en la población en general o en atletas de élite.

A pesar de que un número creciente de variantes genéticas son candidatas a influir en rasgos fenotípicos relacionados con el deporte ⁽⁶⁰⁾, los resultados de las investigaciones a menudo son contradictorios y difíciles de extrapolar al rendimiento deportivo.

El número de polimorfismos genéticos asociados a rasgos fenotípicos de uno o más deportes (por ejemplo VO_2 máx, fuerza muscular etc.), se incrementa cada año ⁽⁶¹⁾. A pesar del incremento en el número de genes candidatos a condicionar el rendimiento deportivo, los hallazgos son a menudo difíciles de extrapolar al rendimiento en la competición actual. En primer lugar no es fácil combinar los resultados de los diferentes estudios debido a las diferencias de origen étnico o geográfico de los sujetos, al tipo de medidas del fenotipo utilizadas, al diseño de los estudios (por ejemplo, con frecuencia los deportistas pertenecen a diferentes disciplinas deportivas) o al tamaño de las muestras utilizadas.

Además, la mayoría de los estudios informa al respecto de un solo polimorfismo, y sin embargo es la influencia combinada de distintas variantes genéticas la que probablemente explica las diferencias individuales de rendimiento deportivo. La investigación futura en este campo debería incorporar estudios de perfiles poligénicos. Este modelo de estudio ya ha sido incorporado a la medicina clínica para predecir el riesgo de trastornos cardíacos ⁽⁶²⁾, quienes calcularon un perfil poligénico incluyendo numerosos polimorfismos con demostrada influencia en el nivel de lípidos en sangre.

En este trabajo revisaremos algunos de los principales genes candidatos relacionados con el rendimiento en tres deportes cíclicos de resistencia como el remo peso ligero, el ciclismo de fondo en carretera y el atletismo de larga distancia, todos ellos en categoría masculina, a fin de valorar la posible influencia de sus diversos polimorfismos en el rendimiento deportivo.

El polimorfismo genético hace referencia a la existencia en una población de múltiples alelos de un gen.

En esencia el polimorfismo es una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población. Aquellos polimorfismos que afectan a la secuencia codificante o reguladora y que producen cambios importantes en la estructura de la proteína o en el mecanismo de regulación de la expresión, pueden traducirse en diferentes fenotipos (por ejemplo, el color de los ojos).

El fenotipo es la expresión del genotipo en un determinado ambiente. Los rasgos fenotípicos incluyen rasgos tanto físicos como conductuales. Es importante destacar que el fenotipo no puede definirse como la manifestación visible del genotipo, pues a veces las características que se producen no son visibles en el individuo. Un fenotipo es cualquier característica o rasgo observable de un organismo, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas, fisiología y comportamiento.

El fenotipo está determinado fundamentalmente por el genotipo, o por la identidad de los alelos, que son cada una de las formas alternativas que puede tener un gen, que se diferencian en su secuencia y que se puede manifestar en modificaciones concretas de la función de ese gen.

Los cambios poco frecuentes en la secuencia de bases en el ADN se llaman mutaciones. Para que pueda considerarse un polimorfismo, la

variación debe aparecer al menos en el 1% de la población. En las Tablas 1.3 y 1.4 se adjunta información referida a los genes considerados en este estudio incluidos sus polimorfismos, genotipos y su distribución en las diferentes poblaciones analizadas.

Tabla 1.3 Resumen sobre genes sus efectos y polimorfismos.

Símbolo	Gen	Polimorfismo	Efectos
ACTN3	α-Actinina-3	Arg(R)577Ter(X) (rs1815739)	Implicado en la capacidad de los músculos para producir contracciones rápidas y evitar el daño originado por las contracciones excéntricas del músculo
ECA	Enzima convertidora de angiotensina	287bp Ins(I)/Del(D)	Relacionado con la respuesta muscular al entrenamiento a nivel de eficiencia e hipertrofia
PPARGC1A	Coactivador-1α del receptor γ activado por proliferadores de peroxisomas	Gly(G)482Ser(S) (rs8192678)	Asociado con la biogénesis mitocondrial y la conversión de fibras músculo esqueléticas (I → II)
AMPD1	Adenosin monofosfato Deaminasa	Gln(Q)12Ter(X) (rs17602729)	Implicado en la degradación de nucleótidos de adenina y en la regulación de la glucólisis muscular en ejercicio intenso
CKMM	Creatina Quinasa, musculo	NcoI RFLP 1170bp/985+185bp	Relacionado con el suministro de energía a las fibras músculo esqueléticas y con la tolerancia al daño de las mismas
GDF-8	Miostatina (Factor de crecimiento y diferenciación)	Lys(K)153Arg(R) (rs1805086)	Asociado con el control del crecimiento muscular y la fuerza
HFE	Hemocromatosis Hereditaria	His(H)63Asp(D) (rs1799945)	Relacionado con la capacidad para absorber suplementos de hierro y sin efectos nocivos sobre la salud
AGT	Angiotensinógeno	Met235Thr (rs699)	Influye en la presión arterial diastólica antes y después de la realización del ejercicio y regulación de las respuestas cardiovasculares al entrenamiento

Tabla 1.4 Resumen sobre los genotipos de los genes estudiados y sus ditribuciones en las poblaciones.

Símbolo	Genotipos	Frecuencia en población española (%)	Frecuencia en deportistas españoles de elite en resistencia (%)
ACTN3	RR	28,5	28,3
	RX	53,7	49,6
	XX	17,9	21,9
ECA	DD	34,7	40,4
	DI	46	34,7
	II	19,4	24,8
PPARGC1A	GG	38,2	46,9
	GS	51,2	36,8
	SS	10,6	17
AMPD1	QQ	82,1	88,6
	QX	17,1	10,6
	XX	0,8	0,7
CKMM	1170/1170	12,2	8,5
	1170/985	52,8	46,8
	985/985	35	44,6
GDF-8	KK	90,2	89,3
	Kr	9,8	9,9
	RR	0	0,7
HFE	HH	67,7	5,6
	HD	24,4	36,1
	DD	8,9	58,1
AGT	MM	34,5	29
	MT	59,6	47,5
	TT	16	23,4

1.3.1 Gen ACTN3

El gen ACTN3, se localiza en el brazo largo del cromosoma 11 (11q13). Comprende 16.407 bases de secuencia genómica, y se compone de 21 exones. Contiene una región codificante de 2.858 pb, y la proteína que codifica presenta 901 aminoácidos.

La presencia de un polimorfismo en el exón 16, debido a una mutación puntual en la región codificante 1747C>T (R577X) ⁽⁶³⁾, ha sido ampliamente estudiada en deportistas de élite, por su posible influencia en el rendimiento deportivo ⁽⁶⁴⁾.

La α -actinina-3 es una proteína que tiene un papel decisivo en la contracción muscular. Es una isomorfa de las α -actininas sarcoméricas, importantes componentes de la línea Z, donde actúan como punto de anclaje, conectándose a los filamentos de actina, y manteniendo el ordenamiento de los miofilamentos y la contracción coordinada de los mismos ⁽⁶⁵⁾. La expresión de la α -actinina-3 se limita a las fibras musculares tipo II o de contracción rápida ^(66,67).

La presencia de la mutación puntual 1747C>T en el exón 16, produce un cambio del aminoácido arginina por un triplete de terminación (R577X). El resultado es un déficit de α -actinina-3. Aproximadamente el 18% de la población mundial tiene una deficiencia de α -actinina-3 ⁽⁶³⁾, no asociada a manifestaciones patológicas.

Diferentes estudios han puesto de manifiesto que la variante genética que codifica para la α -actinina-3 funcional (R577X), puede resultar beneficiosa para las modalidades deportivas en las que las fibras musculares tipo II son esenciales (vg. velocistas, saltadores de longitud, etc.). Yang *et al.* ⁽⁶⁸⁾, encontraron que, comparados con la población general, los deportistas de disciplinas que implican velocidad presentaron una mayor frecuencia del genotipo RR, mientras que los deportistas de resistencia presentaron una mayor frecuencia del genotipo XX. Resultados similares han sido obtenidos en otros estudios con deportistas del élite ⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾.

El alelo X, e incluso el genotipo XX, que se ha conservado en la evolución de la especie humana, podría otorgar una ventaja fisiológica a sus portadores para deportes de fondo y gran fondo, en los que la resistencia aeróbica y la eficiencia muscular, es decir la capacidad de consumir la menor cantidad posible de energía para generar una determinada potencia, son más importantes que la velocidad o explosividad ^(72,73). Curiosamente, los fondistas de África del Este (kenianos y etíopes), grandes dominadores de esta disciplina a nivel mundial, no suelen portar el genotipo XX ⁽⁷⁴⁾. El hecho de no ser portadores de este genotipo podría explicar posiblemente su capacidad de correr tan rápido y de incrementar significativamente su ritmo de carrera, hasta en un 20%, en la última parte de la prueba, aunque habría que tener también en cuenta factores antropométricos que

posibilitan un correr altamente eficiente, puesto que sus extremidades inferiores son muy ligeras y finas (sobre todo por debajo de la rodilla), factor determinante del coste energético de la carrera a pie.

En deportes de ultra-resistencia, como en triatlón en distancia Iron Man, (3800 m de natación, 180 km de bicicleta y 42 km de carrera a pie, lo que representa un esfuerzo sostenido de más de 8 horas), pudiera parecer que el alelo X representaría una cierta ventaja, sin embargo la frecuencia de los genotipos XX y RR no fue diferente en estos deportistas de los de la población general ⁽⁷⁵⁾.

Por otro lado, el genotipo XX es prácticamente incompatible con el rendimiento al más alto nivel, mundial u olímpico, en pruebas de velocidad y lanzamientos ^(66,69,76,77), es por esto que al gen ACTN3 se le conoce como el “gen de la velocidad”, si bien es cierto que se han detectado casos de sujetos homocigotos XX con destacados resultados en pruebas de fuerza o velocidad ⁽⁷⁸⁾.

El polimorfismo R577X en ACTN3 no está asociado con diferencias en la generación de potencia, fatigabilidad, o características de fuerza-velocidad en individuos moderadamente entrenados, sin embargo los episodios de ejercicio repetido suponen un aumento del pico de fuerza en sujetos con genotipo RR, pero no en los XX, sugiriendo que el genotipo de ACTN3 puede modular la respuesta al entrenamiento ⁽⁷⁹⁾. Por otro lado, las α -actininas no desempeñan un papel importante en la determinación del tipo de composición de las fibras musculares y la expresión de ACTN2 se ve afectada por el contenido de α -actinina-3, lo que implica que la α -actinina-2 puede compensar la falta de α -actinina-3 y, por tanto, contrarrestar las consecuencias fenotípicas de la deficiencia ⁽⁷⁹⁾.

En relación con el papel de este gen en las adaptaciones producto del entrenamiento, Clarkson *et al.* ⁽⁸⁰⁾ no encontraron asociación entre el genotipo R577X y el fenotipo a nivel muscular en varones, sin embargo las mujeres (caucásicas y asiáticas) homocigóticas XX presentaron un menor nivel inicial de fuerza isométrica en comparación con las heterocigóticas, y por otro lado, las XX obtuvieron mejorías superiores en fuerza máxima (1RM) que las RR tras la realización de un programa de entrenamiento de fuerza.

Por lo tanto la presencia de α -actinina-3, tiene un efecto positivo en la función muscular, permitiendo generar contracciones intensas a alta velocidad, lo que proporciona una ventaja evolutiva, aumentando el rendimiento en pruebas de alta intensidad y velocidad. Además, parece que ACTN3 es uno de los genes que más contribuyen a la variación en el rendimiento muscular como consecuencia del entrenamiento.

1.3.2 Gen ECA

El gen que codifica la enzima convertidora de angiotensina (ECA), se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (17q23). Se compone de 25 exones con 20.546 pb. Contiene una región codificante de 4.195 pb, y la proteína que codifica presenta 1.306 aminoácidos.

La ECA está implicada en el sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAS) que participa en la regulación del volumen sanguíneo, la presión arterial, la función cardíaca y vascular.

La renina se sintetiza y almacena como una forma inactiva, llamada prorenina, en las células yuxtaglomerulares renales. En situaciones de hipotensión o bajo estimulación simpática, la prorenina es activada y se libera a la circulación del organismo como renina ^(81,82). Su función es actuar sobre una proteína plasmática, el angiotensinógeno, liberando un péptido, la angiotensina I, que ejerce función vasoconstrictora débil. La renina permanece en sangre unos 30 minutos, formándose durante ese periodo angiotensina I.

La ECA, presente en el endotelio de los vasos pulmonares, convierte la angiotensina I en angiotensina II ⁽⁸³⁾. La angiotensina II, es un vasoconstrictor muy potente, actúa aumentando la resistencia vascular y la presión arterial. La vasoconstricción es mediada por la misma ECA, que degrada la bradiquinina (vasodilatador) ⁽⁸²⁾.

La angiotensina II regula la presión arterial a largo plazo, mediante la retención de sodio y agua por los riñones y favoreciendo la liberación de aldosterona, que a su vez aumenta la reabsorción de sodio y agua por los riñones.

Los dos alelos de la ECA se diferencian en la presencia (Inserción o alelo I) o ausencia (Delección o alelo D) de un fragmento de 287 pares de bases en el intrón 16 ⁽⁸⁴⁾. La presencia del alelo D, se relaciona con un aumento de la actividad sérica de la ECA, mientras que la presencia del alelo I se relaciona con una disminución ^(85,86).

Este gen fue uno de los primeros en asociarse con el rendimiento deportivo y, desde entonces es, sin duda, uno de los que cuenta con mayor número de estudios en este ámbito.

Dado que el alelo de inserción (I) se asocia con una menor actividad de la enzima y por ello con una menor tasa de síntesis de angiotensina II (un potente agente vasoconstrictor), este alelo se asociaría con un menor nivel de post-carga, facilitando la labor de la bomba cardíaca. Como en deportes de resistencia el rendimiento físico está determinado y limitado fundamentalmente por la capacidad máxima de la bomba cardíaca ⁽⁸⁷⁾, el alelo I tendría un efecto beneficioso. Así, se ha encontrado una mayor frecuencia del alelo I y de genotipo II en escaladores ⁽⁸⁸⁾, en remeros australianos ⁽⁸⁹⁾, en corredores de fondo británicos ⁽⁹⁰⁾, igualmente en corredores de fondo españoles ⁽⁹¹⁾ y fondistas rusos ⁽⁹²⁾, en corredores de fondo y ciclistas españoles ⁽⁹³⁾, en deportistas de fondo italianos ⁽⁹⁴⁾ y en triatletas sudafricanos ⁽⁹⁵⁾. Myerson *et al.* ⁽⁹⁰⁾, en un estudio con corredores de élite británicos, a los que clasificaron según la distancia en la que competían, encontraron que la frecuencia del alelo I se incrementaba al hacerlo la distancia en la que estaban especializados (≤ 200 m, 400 – 3000 m ó ≥ 5000 m). Este resultado es consistente con lo informado por Nazarov *et al.* ⁽⁹²⁾.

Algunos autores proponen que el alelo I incrementa el rendimiento de resistencia a través, probablemente, de una mejora en la eficiencia muscular ^(85,96). El mecanismo fisiológico que podría explicar esta asociación incluiría un incremento en la proporción de fibras de contracción lenta tipo I ⁽⁹⁷⁾ y una mejora en la densidad capilar de los músculos ⁽⁹⁸⁾.

En cambio, el alelo D se asocia con una mayor actividad del enzima ECA y por tanto con mayores niveles de angiotensina II, que además de su potente efecto vasoconstrictor es un factor de crecimiento de los músculos esqueléticos que puede

contribuir al aumento de fuerza muscular con el entrenamiento. Así, el alelo *D* y el genotipo *DD* es especialmente frecuente en deportistas de fuerza o con mucha masa muscular (halterófilos, lanzadores, etc.), pero no en corredores de fondo ^(85,96,99), sugiriendo que la presencia del alelo *D* parece repercutir en la mejora de la capacidad de fuerza/velocidad a través de una mejora de la fuerza, posiblemente debida a la hipertrofia alcanzada como consecuencia de la acción de la angiotensina II. Otros estudios, sin embargo, no han mostrado una asociación entre los genotipos de la *ECA* y el rendimiento en deportes de resistencia ^(60,100,101), posiblemente debido a la utilización de muestras muy heterogéneas de deportistas.

1.3.3 Gen *PPARGC1A*

El gen *PPARGC1A*, que codifica para el coactivador-1 α del receptor- γ activado por proliferadores de peroxisomas, se localiza en el cromosoma 4 (4p15.1). El gen abarca aproximadamente 67 Kb de secuencia genómica, y se compone de 13 exones. Contiene una región codificante de 6.318 pb, y la proteína que codifica presenta 798 aminoácidos.

El gen *PPARGC1A* es un coactivador de un subconjunto de genes que controlan la fosforilación oxidativa (genes *OXPHOS*). El control de la fosforilación oxidativa por los genes *OXPHOS* es realizado a través de la regulación de la biogénesis mitocondrial, transporte y oxidación de glucosa y lípidos y la formación de tipos de fibras musculo esqueléticas ⁽¹⁰²⁻¹⁰⁷⁾. Este gen está relacionado con la transformación de músculos glucolíticos en músculos con fenotipo oxidativo ⁽¹⁰⁸⁾, y se expresa fundamentalmente en músculos con alto contenido en fibras tipo I. Por otra parte, es un coactivador del receptor *PPAR δ* en células musculares, implicado en la regulación del metabolismo lipídico en tejido muscular esquelético, la oxidación de ácidos grasos, en la utilización de triglicéridos en células musculares ⁽¹⁰⁹⁾ y en la formación del tipo de fibras musculares ⁽¹¹⁰⁾.

Considerando la relevancia de este gen en la función mitocondrial ⁽¹¹¹⁾, se ha investigado la relación entre el polimorfismo Gly482Ser (G482S) de este gen y diversos rasgos fenotípicos. Así, por ejemplo, el alelo Ser482 se ha asociado a diabetes Tipo II en población caucásica eslovena, danesa

e inglesa ⁽¹¹²⁾, así como también en sujetos del norte de China ⁽¹¹³⁾, mientras que el alelo Gly482 ha sido asociado a ciertos beneficios sobre la oxidación lipídica y la secreción de insulina ⁽¹¹⁴⁾.

Los niveles de VO_2 máx están directamente relacionados con los de mRNA de los genes *OXPHOS* en el músculo esquelético, y, por otro lado existe evidencia tanto en animales ^(106,115,116), como en humanos ^(107,117-121), de que el ejercicio incrementa los niveles de mRNA del *PPARGC1A*. Por otra parte, una sobre-expresión transgénica de mRNA incrementa la resistencia muscular a la fatiga ⁽¹⁰⁸⁾.

La expresión de este gen se ha asociado con un incremento en la capacidad física tanto con cargas de trabajo a intensidades submáximas, como con incrementos graduales de la carga hasta el agotamiento ⁽¹²²⁾. Sin embargo, en ejercicio de alta intensidad, la sobre-expresión de este gen en tejido muscular puede provocar una reducción de la condición física, probablemente debido a la incapacidad de utilizar el glucógeno muscular almacenado ⁽¹²³⁾.

Algunos estudios han considerado el *PPARGC1A* como gen candidato en el ámbito del rendimiento deportivo. Lucia *et al.* ⁽¹⁰⁴⁾, informan de una menor presencia del alelo Ser482 en deportistas de resistencia de élite caucásicos (ciclistas y corredores olímpicos) en comparación con la población de control. He *et al.* ⁽¹²⁴⁾, por el contrario, con deportistas de resistencia de origen chino, no observaron esta asociación. Eynon *et al.* ⁽¹²⁵⁾, compararon las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo Gly482Ser de atletas de resistencia, velocidad y sujetos sedentarios israelíes. No encontraron ningún atleta de resistencia con el genotipo Ser482Ser, mientras que en los velocistas este genotipo apareció en el 13% de los casos y en los controles en un 18%.

La asociación entre el polimorfismo Gly482Ser del gen *PPARGC1A* y en rendimiento deportivo, en el sentido de una menor frecuencia alélica (Ser482) y genotípica (Ser482Ser) en deportistas de resistencia que en velocistas y en sedentarios indica que este polimorfismo podría ser un importante factor genético para el rendimiento en deportes de resistencia.

1.3.4 Gen AMPD1

El gen *AMPD1*, se localiza en el cromosoma 1 (1p13). El gen comprende aproximadamente 22.455 pb de secuencia genómica, y se compone de 16 exones. Contiene una región codificante de 2.341 pb, y la proteína que codifica presenta 747 aminoácidos.

La mioadenilato desaminasa (*AMPD1*), isoforma específica muscular de la enzima AMP desaminasa, cataliza el proceso de desaminación de la adenosina monofosfato (AMP) en el músculo, dando lugar a la formación de inosina monofosfato (IMP), siendo este paso metabólico una fuente importante de amonio ⁽¹²⁶⁾. El uso de estos sustratos se produce cuando el ejercicio es de corta duración y de alta intensidad y donde la demanda de ATP es rápida. En la fibra muscular se altera la relación ATP/ADP, necesitando adquirir energía desde el propio AMP. La actividad de la *AMPD1* en el músculo esquelético es diez veces mayor que en cualquier otro tejido ⁽¹²⁷⁾, hecho que indica la importancia de esta enzima en el metabolismo energético.

La *AMPD1*, como parte integrante del ciclo de los nucleótidos de purina, interviene en la biosíntesis de fumarato a partir del aminoácido aspartato, alimentando de sustratos al ciclo de Krebs, y por tanto, contribuyendo a la regeneración de ATP. Se han descrito otras posibles funciones para este ciclo metabólico ⁽¹²⁷⁾: regulación de los niveles relativos de nucleótidos púricos, desaminación de aminoácidos, regulación de la ruta glucolítica mediante la formación de amonio y AMP, debido a que el AMP es un activador tanto de la MPL como de la PFK y a que el amonio formado podría tamponar la acidez del lactato acumulado.

La isoforma muscular, codificada por el gen *AMPD1*, se encuentra fundamentalmente en fibras tipo II. La deficiencia de esta isoforma ⁽¹²⁸⁾, es probablemente la causa más habitual de miopatía metabólica en humanos, encontrándose un déficit de *AMPD1* en aproximadamente el 2% de las biopsias musculares que se admiten para examen histológico y, además, se ha observado déficit de *AMPD1* en aproximadamente un 2% de la población sana ⁽¹²⁹⁾.

El déficit enzimático de *AMPD1* fue descrito por primera vez en 1978 por Fishbein et al. ⁽¹²⁸⁾ en pacientes con síntomas

musculares inducidos por el ejercicio. La forma clínica habitual de la deficiencia de este enzima consiste en una miopatía metabólica que incluye síntomas relacionados con intolerancia al ejercicio tales como fatiga prematura, dolor muscular y/o calambres ^(126,130). Alrededor del 90% de los casos citados en la literatura presentan estas características ⁽¹³¹⁾, sin embargo, no representan a todos los pacientes.

Actualmente, las bases metabólicas que causan los síntomas no son del todo comprendidas. En un principio se propuso que el defecto enzimático provocaba un aumento de AMP en los miocitos durante el ejercicio, con la consiguiente desfosforilación de esta molécula a adenosina ⁽¹³²⁾. Dado que la adenosina puede difundir fácilmente a través de las membranas celulares, es de esperar que los pacientes con deficiencia de *AMPD1* tengan una depleción de nucleótidos de adenina. Estudios posteriores han ofrecido resultados contradictorios. Se ha visto que durante el ejercicio, en pacientes con déficit de *AMPD1*, las células musculares no pierden más nucleótidos de adenina que las células musculares de controles sanos ^(133,134). Por otra parte, se ha observado que, como consecuencia de los síntomas, los pacientes tienen que interrumpir el ejercicio antes que los controles, y sin embargo los primeros degradan más creatín-fosfato y más ATP que los últimos. Por tanto, la explicación fisiopatológica más probable de los síntomas es una disminución de la producción de energía que además puede ser, al menos en parte, debida a la falta de síntesis de fumarato durante el ejercicio ⁽¹²⁶⁾.

Se ha descrito una alteración molecular asociada a déficit de *AMPD1*, (cambio nucleotídico C34T) que produce una mutación terminadora, Q12X, en el exón 2 del gen *AMPD1*. No obstante, la mutación está también presente en individuos asintomáticos, por lo que a tenor de esta gran variabilidad clínica algunos investigadores se refieren al déficit de *AMPD1* como una "variante genética inofensiva" ⁽¹³⁵⁾ o como "la pesadilla de la clínica especializada" ⁽¹³⁶⁾.

El alelo mutante Q12X, se ha encontrado en el 12% de la población caucásica y en el 19% de la afroamericana. En población alemana se han obtenido datos similares para la distribución de este alelo mutante tanto en población general como en individuos con síntomas musculares ⁽¹³⁵⁾.

Son numerosos los estudios que han analizado el grado en que la deficiencia en *AMDP1* provoca limitaciones en la capacidad funcional y el mecanismo implicado en esta limitación potencial pero pocas investigaciones se han realizado en deportistas de élite. Aunque se esperaría que la deficiencia en *AMPD1* afectase la ejecución, principalmente a corto plazo, en ejercicios supramáximos ($\geq 100\%$ del VO_2 máx), que inducen a la depleción de la fosfocreatina y a una caída en la cantidad total de nucleótido de adenina, (por ejemplo 400 m. lisos en atletismo o pruebas cortas de ciclismo en pista), algunos estudios han puesto de manifiesto que la acumulación de IMP sucede cuando se alcanza la fatiga durante ejercicios submáximos prolongados (~ 1 hora al $70\text{--}75\%$ del VO_2 máx), particularmente con bajas reservas de glucógeno intramuscular al término del ejercicio ⁽¹³⁷⁻¹³⁹⁾. El consecuente descenso en la provisión de ATP desde las fuentes de carbohidratos, puede conducir a un transitorio incremento en la concentración de ADP, estimulando la reacción de miokinasa ($2\text{ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$). Esta reacción da lugar a la formación de AMP, la cual debe ser rápidamente desaminada en IMP y amonio a partir de la actividad de *AMPD1*. El fenómeno antes referido a nivel muscular probablemente ocurra al final de las competiciones de resistencia de Alto Nivel, como carreras de maratón, o en etapas de una carrera ciclista de tres semanas, cada una de las cuales dura cinco horas o más, pero que puede incluir algunos tramos ($>20\text{--}30$ min) de ejercicio muy intenso ($\geq 90\%$ del VO_2 máx). La misma situación se produce en regatas de remo, otra expresión de deporte cíclico de resistencia que llega a niveles similares de extenuación en períodos más cortos de tiempo. Así la *AMPD1* puede también desarrollar un papel muy importante en la regulación del metabolismo muscular durante eventos de resistencia extenuante.

Rubio *et al.* ⁽¹⁴⁰⁾ encontraron, que aunque la frecuencia del alelo mutante C34T en atletas de resistencia de élite caucásicos (corredores y ciclistas) era inferior a la encontrada en la población general (4.3% vs 8.5%), la presencia de esta mutación no parece reducir el rendimiento en resistencia. En concordancia con este resultado, Lucia *et al.* ⁽¹⁴¹⁾, en un estudio de caso, informan de un valor excepcionalmente alto en VO_2 máx en uno de los mejores corredores del mundo (atleta africano de raza blanca) con una mutación C34T, mientras que sus concentraciones sanguíneas de lactato y amonio

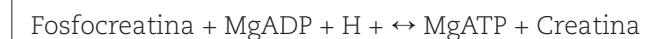
en velocidades elevadas de carrera de carácter submáximo fueron menores que las de otros corredores de elite mundial no portadores de la mutación.

1.3.5 Gen CKMM

En el mapa genético la ubicación del gen CK-MM se corresponde con la región cromosómica q13.2-q13.3 del cromosoma 19 ⁽¹⁴²⁾.

La creatina quinasa (CK) es una enzima dimérica compuesta por dos tipos de subunidades monoméricas, M (muscular) y B (cerebral) que se combinan para formar tres isoenzimas CK: CK-1 (BB), CK-2 (MB) y CK-3 (MM). La isoenzima MM se encuentra exclusivamente en el músculo estriado, la isoenzima BB se encuentra en el músculo liso, el cerebro y los nervios y la MB se encuentra en el corazón humano ⁽¹⁴³⁾. Por otra parte, y sita en un tercer locus, se encuentra la CK-MT que tiene unas propiedades bioquímicas e inmunológicas diferentes de las formas citosólicas de CK y que está restringida a la localización subcelular de la mitocondria ⁽¹⁴⁴⁾. El dímero CK está involucrado en el mantenimiento de los niveles intracelulares de ATP, en particular en los tejidos que tienen alta demanda de energía.

La CK es una enzima llave en el metabolismo energético. Catalizando la siguiente reacción:



Como consecuencia de su función en el metabolismo energético, y atendiendo al papel que los genes pueden tener en el rendimiento físico humano, el gen de la CK-MM podría ser candidato a ayudar a explicar el rendimiento en deportes de resistencia ^(145,146).

El polimorfismo Nco1 RFLP 1170bp/985+158 bp del gen de la CK-MM está relacionado con el suministro de energía a las fibras musculo esqueléticas y con la tolerancia al daño de las mismas ⁽¹⁴⁶⁾. Las fibras musculares lentas o tipo I tienen menor actividad del citado enzima, ésta llega a ser el doble en el caso de las fibras rápidas tipo II ⁽¹⁴⁷⁾, por lo que el alelo 985+158 bp, que se asocia con una menor actividad del enzima, podría relacionarse con una mayor predisposición para rendir adecuadamente en

deportes de resistencia. En efecto, las fibras tipo I, con menor actividad de enzima CK-MM, son más eficientes o económicas que las fibras tipo II al consumir menos oxígeno para una determinada fuerza de contracción ⁽¹⁴⁸⁾, con el consiguiente beneficio para el ejercicio de resistencia, por lo tanto sujetos con una predisposición genética a una baja actividad de CK-MM pueden tener alguna ventaja en los deportes de resistencia ^(145,149).

Si bien se sabe que los diferentes genotipos de este enzima pueden influenciar la respuesta al entrenamiento en individuos sedentarios, por ejemplo, capacidad de mejorar el VO₂ máx, no se han identificado, hasta la fecha, diferencias claras entre deportistas de fondo en general y otros tipos de deportistas y sedentarios en las frecuencias poblacionales de los diferentes polimorfismos de la CK-MM ^(149,150). En un estudio realizado entre corredores de fondo de alto nivel, ciclistas profesionales y sujetos controles, tampoco se encontraron diferencias significativas en cuanto a la distribución de los distintos alelos de CK-MM ⁽⁹³⁾.

1.3.6 Gen GDF8

La miostatina o factor de crecimiento y diferenciación 8 (GDF8) consta de tres exones y dos intrones y se sitúa en la región cromosómica 2q32.2. La miostatina es expresada de manera única en el músculo esquelético humano como un glicoproteína madura 26-kDa y secretada al plasma ^(151,152). La miostatina es miembro del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) superfamilia que actúa como un regulador negativo de la masa muscular esquelética, tanto de las fibras tipo I como de las tipo II. También interviene en la regulación del desarrollo del embrión. Su estructura y función están altamente conservadas durante la evolución en todas las especies ^(152,153).

La deficiencia de miostatina en animales muestra aumentos dramáticos en el crecimiento muscular. Los ratones transgénicos (konck-out) que carecen por completo GDF8 muestran un aumento de masa muscular esquelética dos o tres veces superior al normal, experimentando aumentos tanto en el tamaño de las miofibrillas, hipertrofia, como en el número de las miofibrillas, hiperplasia ⁽¹⁵³⁾. Este fenómeno provoca en el ganado mutado en el gen GDF8 el fenotipo denominado de "doble musculación" ^(152,154). La regulación negativa de la miostatina en el crecimiento

muscular postnatal es confirmada por un estudio en el que un bloqueador de la miostatina, en vivo, incrementó el tamaño y fuerza muscular en ratones con distrofia muscular de Duchenne ⁽¹⁵⁵⁾, además, la administración sistémica de inhibidores de la miostatina en ratones adultos muestra un efecto positivo después del parto tanto en incremento muscular como en pérdida de grasa ⁽¹⁵⁶⁾. Otro aspecto en el que la miostatina podría actuar es el la reparación muscular ⁽¹⁵⁷⁾. Por lo que concierne al papel que esta mutación puede presentar en los tendones musculares, Mendias *et al.* ⁽¹⁵⁸⁾ encontraron que en los ratones sin miostatina los tendones eran menores que en los del tipo salvaje, además en el caso de los primeros se observó un pico de estrés más alto, un pico más bajo de tensión y una rigidez incrementada, de tal manera que la miostatina, además de regular el desarrollo muscular, interviene en la estructura y función de los tendones. Mosher *et al.* ⁽¹⁵⁹⁾ encontraron que una delección de dos pares de bases en el exón 3 del gen de la miostatina canina estaba asociado al incremento de masa muscular en la raza de lebel de carreras Whippet, en el caso de los homocigóticos para esta mutación presentaron el fenotipo de la doble musculatura, los perros heterocigóticos presentaron un fenotipo intermedio, siendo los más rápidos en las competiciones de canódromo. Sin embargo no está claro si la miostatina regula la masa del músculo esquelético en seres humanos de igual manera que en las especies no humanas.

González-Cadavid *et al.* ⁽¹⁵¹⁾ encontraron, a partir de un estudio realizado con enfermos infectados de VIH, que la miostatina se expresa de forma inversa con la masa libre de grasa en seres humanos y que el aumento de la expresión del gen de la miostatina está asociado con la pérdida de peso en sujetos enfermos de sida. En este estudio se observó que las concentraciones a nivel de suero e intramuscular de la proteína de miostatina-inmunoreactiva se encontraban incrementadas en los sujetos infectados, quienes padecían una pérdida de peso frente a los sujetos sanos, correlacionando inversamente con el índice de peso magro.

Ferrell *et al.* ⁽¹⁶⁰⁾ identificaron cinco sustituciones de cambio de sentido en la secuencia codificante de la miostatina en humanos, pero sólo dos de ellas fueron polimórficas (K153R y A55T). En su muestra con sujetos de raza blanca y afro-americanos, no se encontró asociación significativa con la respuesta diferencial de

la masa muscular para el entrenamiento de fuerza. Sin embargo, uno de los alelos (R153) estaba excesivamente representado en el grupo integrado por sujetos que no respondieron al entrenamiento de fuerza, lo que sugiere que este alelo puede desempeñar un papel en otros fenotipos musculares.

De entre las variantes polimórficas de la miostatina, que se han identificado en humanos, la K153R ha recibido una especial atención por su relación con la fuerza muscular ⁽¹⁶⁰⁻¹⁶²⁾. La frecuencia alélica 153R (portadores de los genotipos K/R o R/R) está asociada a menores niveles de fuerza muscular "basal" antes de iniciar un programa de entrenamiento.

Dado que la masa muscular, considerando la sección transversal del músculo y la fuerza muscular son dos características muy afines, más masa muscular implicaría, en parte, más fuerza. De hecho, dos estudios realizados con mujeres, sugieren una asociación entre la fuerza ⁽¹⁶²⁾ o aumento en la fuerza después de un programa de capacitación ⁽¹⁶³⁾ con la variante humana de miostatina K153R.

1.3.7 Gen HFE

El gen *HFE* está situado en el brazo corto del sexto cromosoma, 6p21.3 Este gen fue identificado en 1996 como gen candidato ⁽¹⁶⁴⁾ para la Hemocromatosis Hereditaria (HH), desorden hereditario del metabolismo del hierro ⁽¹⁶⁵⁾.

La HH se caracteriza por una absorción intestinal masiva de hierro procedente de la dieta. El acúmulo de hierro a lo largo de la vida del paciente desemboca en alteraciones de diversos órganos en la quinta década de vida en el caso de los hombres y en la sexta en el caso de las mujeres. Así pues, la HH presenta una etapa inicial asintomática. La HH en fase avanzada cursa con cirrosis hepática, diabetes, pigmentación hipermelanótica de la piel (coloración bronceada), fallo cardíaco, artralgias, hipogonadismo y disminución de la libido ^(166,167). Todos estos síntomas son debidos al acúmulo de hierro en el hígado, páncreas, piel, corazón, articulaciones y glándulas endocrinas, respectivamente. Independiente del momento habitual de aparición de la enfermedad, comentado anteriormente, la enfermedad se suele expresar de forma diferente en hombres

y mujeres, siendo mayor nivel de afectación los hombres que las mujeres, con un ratio 3:1 ⁽¹⁶⁸⁾, sobre todo en el caso de las premenopáusicas, parece ser que el sangrado menstrual actúa como paliativo en esta población, además en el caso de las mujeres la expresión difiere respecto a los hombres, presentando fatiga y pigmentación cutánea frente a la cirrosis y diabetes más frecuente en los hombres.

Dos mutaciones en el gen *HFE* están implicadas en la enfermedad: la mutación C282Y, en homocigosis, responsable de la mayoría de casos de HH y la mutación H63D involucrada en un estado heterocigoto compuesto con la mutación C282Y en un pequeño porcentaje de pacientes ⁽¹⁶⁴⁾.

La mutación C282Y es muy frecuente en poblaciones del norte de Europa y en aquellas de descendencia norte-europea, teniendo una distribución similar a la observada en pacientes con HH ⁽¹⁶⁹⁾. La frecuencia alélica poblacional más elevada publicada de la mutación C282Y ha sido de un 14% ⁽¹⁷⁰⁾ y se ha observado en Irlanda. Frecuencias alélicas de la mutación C282Y del 5 al 10,3% se han observado en Islandia, las Islas Feroés, Noruega, Suecia, norte de Finlandia, Dinamarca, el Reino Unido, Bretaña y Baviera, también en europeos que viven en Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica, y los Estados Unidos (excluyendo los Hispanos) ⁽¹⁷¹⁾. La mutación C282Y parece ser específica de los europeos, ya que muy raramente se ha detectado en africanos, asiáticos, asiáticos australianos o americanos nativos ⁽¹⁶⁹⁾. De todas maneras entre los sujetos caucásicos de Europa se pueden encontrar notables diferencias entre las zonas, por ejemplo la prevalencia en poblaciones mediterráneas es sensiblemente inferior ⁽¹⁷²⁾. En este sentido Milman *et al.* ⁽¹⁷³⁾ encuentran una progresiva dilución de la presencia de la mutación C282Y a medida que se desciende en geografía europea y mientras que en los países nórdicos las frecuencias son del 5,1 al 9,7%, en el centro de Europa las frecuencias son del 3,1% al 4,8% y en las zonas mediterráneas se reduce hasta el 0-3,1%.

La mutación H63D tiene una distribución mucho más amplia que la mutación C282Y, con una alta frecuencia por toda Europa y una frecuencia moderada en el norte y en el Medio Este de África, y en partes de Asia ^(169,174,175). La mayoría de las poblaciones europeas estudiadas tiene una frecuencia alélica de H63D de entre el 10%

y el 20%, y se han observado frecuencias mayores del 20% en Holanda, Bulgaria, España y Portugal ^(169,176,177). La frecuencia alélica H63D más alta reportada es del 30,4% en la población vasca ⁽¹⁶⁹⁾.

Numerosas publicaciones han analizado las mutaciones que afectan a este gen en el ámbito clínico, aunque los estudios existentes en deportistas son escasos. En el ámbito de los deportes de resistencia, el hecho de presentar unos buenos niveles de hierro en sangre facilita el transporte de oxígeno a las fibras musculares, razón por la cual el rendimiento deportivo en este tipo de esfuerzos puede verse optimizado, así que se puede esperar ciertas ventajas en aquellos sujetos que presenten predisposición al almacenamiento de hierro. En población francesa, se ha observado una mayor frecuencia de la mutación H63D en ciclistas de élite que en la población general ⁽¹⁷⁸⁾. También, en ciclistas y corredores de fondo españoles se ha encontrado que la frecuencia de la mutación H63D (44.6%) es mayor que la observada en sujetos sedentarios sanos (28.3%) ⁽¹⁷⁹⁾.

En futbolistas españoles las frecuencias alélicas observadas en las mutaciones C282Y (1.3%) y H63D (24.4%) son similares a las descritas para población española general ⁽¹⁸⁰⁾.

1.3.8 Gen AGT

El gen AGT se encuentra localizado en la región cromosómica 1q42-q43 ⁽¹⁸¹⁾, contiene 5 exones ⁽¹⁸²⁾. Nakajima et al. ⁽¹⁸³⁾ determinaron la secuencia genómica completa del AGT.

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAS) desempeña un papel importante en el equilibrio de la presión sanguínea ⁽¹⁸⁴⁾. El angiotensinógeno es una proteína circulante producida por el hígado, esta molécula es el sustrato de la enzima renina y es clivada, para producir angiotensina I, en ese momento actúa la enzima convertidora de angiotensina (ECA), que la convierte en angiotensina II. La angiotensina II es la molécula más activa del RAS, capaz de aumentar el tono vascular y de promover la retención de sodio ⁽¹⁸⁵⁾.

El genotipo TT de la variación en el gen AGT, que codifica (H235T) una treonina en lugar de una metionina en el codón 235 de la proteína, ha sido asociado con niveles más elevados de AGT

repercutiendo en un incremento del riesgo de sufrir una mayor presión sanguínea en reposo ⁽¹⁸⁶⁻¹⁸⁹⁾, aunque hay estudios que no encuentran esta relación ^(190,191). También se ha descrito que el AGT puede influir en la respuesta al ejercicio dinámico agudo ⁽⁶⁰⁾, en la enfermedad coronaria ^(185,192) y en la hipertrofia ventricular izquierda en atletas de resistencia ⁽¹⁹³⁾.

Lifton et al. ⁽¹⁹⁴⁾ encontraron que el alelo T es más frecuente entre afroamericanos, grupo étnico que presenta una elevada prevalencia de hipertensión. En este estudio los homocigóticos afroamericanos TT se cifraron en un 70%, los heterocigóticos en un 28% y los homocigóticos MM en un 2%, frente a la distribución en caucásicos que fue de un 12%, 46% y 42% respectivamente. Los mismos autores sugieren que la causa de esta distribución tiene su origen en un hecho ancestral, ya que antes de la diáspora africana del ser humano, dada la falta de sal del entorno, era ventajoso el alelo T, pero que al llegar a zonas ricas en sal se fijó el alelo M al suponer una cierta ventaja frente al T.

Aunque existe evidencia de que la variación Met235Thr influye sobre la presión arterial diastólica antes y después de la realización de ejercicio dinámico en no deportistas ⁽⁶⁰⁾, sigue sin determinarse la relación de este polimorfismo con el alto rendimiento deportivo. Este aspecto resulta interesante dada la relación que el AGT tiene con el gen de la ECA, dentro del sistema RAS, cuya influencia en el rendimiento de los deportes de fuerza y resistencia ha sido constatada en diversos estudios ^(85,96,195,196) así como su importancia en la regulación de las respuestas cardiovasculares al entrenamiento ⁽¹⁸⁵⁾.

De los alelos M y T presentes en el polimorfismo Met235Thr, el T podría estar asociado con niveles más altos de angiotensina II ⁽¹⁹⁷⁾ y dado que esta proteína actúa como un factor de crecimiento del músculo esquelético, podría resultar beneficioso en el rendimiento en deportes con exigencias de potencia y fuerza absoluta, así como en los de velocidad ^(85,96,195,198,199).

2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Objetivos generales

El objetivo general de esta investigación fue determinar si existe un perfil genético ideal en remo y en qué medida se diferencia este perfil de los asociados a otros deportes cíclicos de resistencia.

2.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos que se plantearon fueron:

1. Evaluar si la proporción de las variantes genéticas de los genes candidatos *ACTN3*, *ECA*, *AGT*, *PPARGC1A*, *AMPD1*, *CKMM*, *HFE* y *GDF8* son diferentes para controles no deportistas y deportistas de alto nivel de fondo atlético, ciclismo en ruta profesional y remo peso ligero, todos ellos varones de raza caucásica.
2. Determinar si el perfil poligénico obtenido a partir de combinación de siete genes candidatos (*ACTN3*, *ECA*, *PPARGC1A*, *AMPD1*, *CKMM*, *HFE* y *GDF8*) en remeros ligeros de nivel mundial es distinto del perfil de los remeros de nivel nacional.
3. Examinar el impacto de disponer de un ventajoso perfil poligénico (basado en los polimorfismos especificados en el objetivo anterior) en el éxito deportivo en términos de número de medallas ganadas por remeros ligeros en Campeonatos del Mundo y de España.
4. Determinar si el perfil poligénico de remeros internacionales y nacionales es diferente del de la población general española.

3. MÉTODOS

3.1 Métodos generales para la determinación genética

3.1.1 Extracción del ADN

Los estudios genéticos se realizaron a partir de muestras de sangre total extraídas en tubos Vacutainer® con anticoagulante EDTA 3K.

Se purificó ADN a partir de cada una de las muestras mediante un método de extracción con fenol/cloroformo seguido de precipitación alcohólica. Para ello 100 µl de sangre total anticoagulada de cada muestra se incubó con 400 µl de tampón de lisis, 50 µl de SDS 10% y 50 µl de solución de Proteinasa K (20 mg/ml) durante 6 horas a 37 °C. A continuación, se añadió un volumen de Fenol:Cloroformo:Isoamílico (25:24:1), se agitó suavemente por inversión del tubo y se incubaron las muestras en hielo durante 10-15 minutos, mezclando cada 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó durante 15 minutos a 6000 rpm y se extrajo cuidadosamente la fase acuosa superior, depositándola en otro tubo. Se añadió 1/10 de volumen de acetato sódico 3M pH 6.8 y un volumen de isopropanol frío. Después, se agitó y se mantuvo a -20 °C durante 45-60 minutos. Las muestras se centrifugaron de nuevo durante 30 minutos a 10000 rpm. Finalmente, se retiró el sobrenadante y se lavaron los tubos con 50 µl de etanol 80% frío. Tras un pulso de centrífuga se retiró el etanol, se secaron las muestras al vacío y se resuspendió el precipitado en 50 µl de agua destilada.

3.1.2 Amplificación de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR) es un procedimiento para la amplificación in vitro, a partir de mínimas cantidades de ADN molde, de segmentos

específicos de ADN situados entre dos regiones cuyas secuencias son conocidas.

La técnica de la PCR consiste en la utilización de dos oligonucleótidos sintéticos, cuya secuencia reproduce las secuencias localizadas en los extremos 5' del fragmento a amplificar, y que actúan como cebadores de una serie de reacciones, que se repiten encadenadamente, catalizadas por una ADN polimerasa. En una reacción de PCR participan los siguientes elementos:

- ADN bicatenario molde
- Dos oligonucleótidos que flanquean el segmento a amplificar
- ADN polimerasa termoestable
- $MgCl_2$
- Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)
- Tampón con sales

El ADN molde se desnaturaliza por calor a temperaturas de 94-95°C en presencia de los cebadores. Después de esto, se hace descender la temperatura para permitir la hibridación de los cebadores con sus secuencias complementarias.

Los cebadores son los responsables de la especificidad en la reacción. Tienen tamaños muy variables, desde un mínimo de 12-13 a 80 ó más nucleótidos, aunque por lo general su longitud oscila entre los 18 y 24 nucleótidos. En la reacción de PCR, la ADN polimerasa reconoce el extremo 3' libre del cebador que está unido al ADN molde, añadiendo en ese punto los dNTPs complementarios a la hebra molde produciendo la elongación de la cadena y dando lugar a la formación de la hebra complementaria.

La enzima ADN polimerasa utilizada es termoestable para resistir los procesos de incubación a 95°C. De esta forma se evita que resulte inactivada durante las sucesivas etapas de desnaturalización. La ADN polimerasa más utilizada es la Taq Polimerasa, obtenida a partir de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*. La ADN polimerasa incorpora los dNTPs, utilizando la energía de los enlaces trifosfato para catalizar la reacción de síntesis en sentido 5'→3'.

La concentración de iones Mg^{2+} en forma de $MgCl_2$ es fundamental. A concentraciones adecuadas, el Mg^{2+} actúa como cofactor de la ADN polimerasa. En general, se añade a la concentración de 1.5 mM. Variando estas concentraciones, es posible incrementar la cantidad de producto, reducir las amplificaciones no deseadas o aumentar la eficiencia de la reacción (aunque el efecto también puede ser el contrario a concentraciones de Mg^{2+} inadecuadas). En el ciclo de amplificación la reacción de PCR se desarrolla en tres fases: desnaturalización, hibridación y elongación.

En la desnaturalización se separan las dos hebras del ADN molde bicatenario y al tiempo se inhibe la actividad enzimática. La temperatura utilizada generalmente es de 94-95°C durante un tiempo que puede variar entre 30 segundos y 2 minutos.

En la fase de hibridación se descende la temperatura hasta permitir que los cebadores puedan unirse a sus secuencias complementarias en el ADN molde. Esta fase es crítica, ya que hay múltiples factores que pueden interferir en la unión de los cebadores.

En la extensión la Taq ADN polimerasa sintetiza la cadena complementaria a la hebra molde a partir del cebador hibridado con su secuencia diana. La temperatura que se utiliza generalmente es de 72 °C y el tiempo de elongación varía en función de la longitud del fragmento a amplificar: fragmentos de 500 pb es posible elongarlos en 30 segundos, mientras que para segmentos más largos se utilizará un tiempo de 60 segundos.

En la PCR, estas tres fases conforman un ciclo que se repite 25-30 veces. Normalmente antes de iniciar los ciclos, se programa una fase de desnaturalización inicial de 2-5 minutos, con el fin de asegurar una total separación de las hebras de ADN. Al finalizar los ciclos, también es frecuente la programación de una fase de extensión final de 5-10 minutos para terminar todas aquellas extensiones parciales en curso.

3.1.3 Técnicas específicas de análisis genético

La metodología seguida para el análisis de los distintos polimorfismos genéticos considerados en este trabajo, varió en

función de los genes estudiados. Las técnicas utilizadas según los genes fueron:

- Sondas FRET en caso de la *PPARGC1A*
- Single base extensión en el caso de la *HFE* y *GDF8*
- RFLP en el caso de la *ACTN3*, *CKMM* y *AGT*
- Electroforesis en el caso de la *ECA*

a. Estudio de temperatura de *melting* mediante sondas FRET

El objetivo es la amplificación mediante PCR a tiempo real de la región de ADN dentro del gen, para posteriormente identificar mediante el estudio de curvas de *melting* el polimorfismo genético correspondiente.

En los últimos años, el desarrollo de la PCR a tiempo real, ha permitido que los procesos de amplificación y detección se produzcan simultáneamente en el mismo tubo de reacción. Este tipo de PCR, gracias a la utilización de fluorescencia, permite saber la cantidad de ADN que se está amplificando en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia que se produce es directamente proporcional a la cantidad de ADN que se sintetiza. Otra de las aplicaciones que permite el uso de fluorescencia en la PCR a tiempo real es el estudio de mutaciones puntuales o de *single nucleotide polymorphisms* (SNPs).

Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos. En el caso del estudio de SNPs el sistema de detección de interés son las sondas específicas marcadas con fluorocromos.

Una de las sondas más utilizadas para la detección de SNPs son las sondas FRET que se basan en la Transferencia de Energía Fluorescente mediante Resonancia entre dos moléculas, un donador y un aceptor, marcados con dos fluorocromos diferentes

en los extremos 3' y 5', respectivamente. Además, las sondas hibridan en regiones adyacentes del ADN diana, de forma que cuando las dos sondas están unidas los dos fluorocromos están muy próximos.

Así, si durante la fase de *annealing* la sonda donadora es excitada, transferirá su energía a la sonda aceptora que, a su vez, emitirá fluorescencia que el equipo es capaz de detectar. La señal recogida es directamente proporcional a la cantidad de ADN amplificado, ya que la cantidad de sonda hibridada aumenta a medida que aumenta la cantidad de producto de PCR.

Entre los termocicladores para llevar a cabo la PCR a tiempo real cabe destacar el Light Cycler 1.5 de Roche que incorpora un diodo capaz de excitar los fluoróforos amarillos incluyendo la fluoresceína y un lector de fluorescencia diseñado para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. La luz fluorescente emitida es detectada en tres canales: luz verde (530 nm), luz roja (640 nm, LightCycler® Red 640) y cerca del infrarojo (705 nm, LC Red 700).

En el diseño desarrollado por Roche de sondas de oligonucleótidos que pueden hibridar adyacentes en una muestra de ADN, una está marcada con fluoresceína en su extremo 3'terminal (3FL) y la otra marcada en su extremo 'con fluoróforos que emiten a 530, 640 ó 705 nm. El grupo libre 3'-hidroxilo del extremo se bloquea generalmente con un fosfato para evitar su extensión por la polimerasa.

La detección de SNPs con sondas FRET se realiza mediante el estudio de la temperatura de *melting* de las sondas diseñadas. Cada ADN de doble cadena tiene su temperatura de *melting* (T_m) específica, que se define como la temperatura teórica a la cual el 50% del ADN nativo se convierte en ADN de cadena sencilla. Las T_m vienen determinadas básicamente por la longitud del ADN, el porcentaje de contenido en pares GC y el grado de complementariedad entre las cadenas.

El análisis de curvas de *melting* se basa en el diseño específico de sondas complementarias a la región del ADN susceptible de sufrir la mutación. Tras la PCR, el calentamiento lento del heterodúplex formado por la sonda y el amplicón, y la medida simultánea de los cambios en fluorescencia resultantes de la desnaturalización producida, nos proporcionan las curvas de *melting* específicas de cada producto amplificado. Un solo mismatch entre la sonda marcada y el amplicón reduce significativamente la T_m . Así, los heterodúplex que contienen mismatches desnaturalizan a menores temperaturas que sondas unidas de forma completamente homóloga.

Si la sonda marcada está diseñada contra el wild type, es decir contra el genotipo normal, la T_m de éste será mayor que la T_m del genotipo mutante. En el caso de genotipos heterocigotos se obtendrán curvas con las dos T_m .

b. Single Base Extensión

La identificación de mutaciones genéticas mediante la técnica de SBE está basada en la utilización de oligonucleótidos específicos, que añadidos a un producto de PCR previamente amplificado permite identificar el tipo de nucleótido que ocupa una determinada posición.

La particularidad de esta técnica consiste en la naturaleza y composición del oligonucleótido de SBE, cuya última base en el extremo 3' terminal es la complementaria a la anterior que es susceptible de estar mutada.

El desarrollo de la técnica de SBE se llevó a cabo en un secuenciador automático de ADN, ABI 310 Genetic Analyzer mediante la utilización del kit comercial ABI PRISM® SnaP Shot™ Multiplex kit de la casa comercial Applied Biosystems. Dicho kit contiene dideoxinucleótidos marcados con fluoróforos diferentes que impiden la adición de más nucleótidos,

de forma que al realizarse una segunda reacción de amplificación de PCR, la Taq ADN polimerasa en la fase de extensión añadirá únicamente el nucleótido correspondiente, que a su vez se corresponderá con la posición a investigar.

De esta forma, se generarán nuevos fragmentos de PCR de la longitud inicial del oligonucleótido más un nucleótido adicional que ha incorporado la enzima Taq ADN polimerasa con la peculiaridad de que en esta circunstancia el tamaño del fragmento a estudiar es conocido de antemano. Adicionalmente, su último nucleótido aparece marcado con fluorescencia, de forma que al ser sometido a electroforesis en el secuenciador automático se va a poder identificar la posición y la naturaleza del nucleótido de interés.

c. Análisis de restricción de los productos amplificados (RFLP)

Uno de los métodos empleados para la caracterización inicial de fragmentos de ADN amplificados por PCR es la obtención de su mapa de restricción sometiéndolo a digestión con endonucleasas de restricción. De esta forma se localizan la posición de las dianas de reconocimiento específico de una endonucleasa de restricción, tras el análisis de los fragmentos generados en la digestión en geles de agarosa.

Las endonucleasas de restricción son enzimas que poseen la capacidad de reconocer secuencias específicas relativamente cortas de ADN como dianas para esos cortes. Cada enzima de restricción tiene una diana particular de ADN duplex, generalmente una secuencia específica de 4 a 6 pares de bases. De esta forma, la enzima corta el ADN en cada punto en que encuentra su secuencia diana.

Los tamaños de los fragmentos pueden, posteriormente ser determinados mediante electroforesis en geles de agarosa y comparación con un patrón de tamaños conocidos.

d. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Visualizar en un gel de agarosa el ADN extraído o los productos obtenidos en una amplificación por PCR para evaluar su pureza y concentración en una muestra tras el proceso de purificación y/o determinar el tamaño de los fragmentos amplificados.

La electroforesis es un sistema de transporte de moléculas bajo la acción de un campo eléctrico. Cuando se aplica un campo eléctrico a un gel de agarosa, los fragmentos de ADN, cargados negativamente a pH neutro, debido a sus grupos fosfato, migran hacia el polo + (ánodo) con una velocidad de migración inversamente proporcional a su tamaño. De esta forma los fragmentos de ADN contenidos en una muestra se irán separando en su recorrido en función de la masa molecular que posean.

La matriz más utilizada para la electroforesis de ADN es la agarosa, polisacárido extraído de las algas marinas y compuesto por β -D-galactopiranosas y 3,6-anhidro- α -L-galactopiranosas. Un aspecto importante de la agarosa es su estado físico. Normalmente, funden a temperaturas cercanas a los 90 °C y gelifican en torno a los 35 °C. Al gelificar, la agarosa genera una matriz dejando entre sí espacios donde se aloja el líquido y por los que van a migrar las moléculas cargadas. En función de la concentración de agarosa empleada, la densidad de esta matriz será más o menos compacta y por lo tanto el tamaño del poro por el que migrarán las moléculas será más grande o más pequeño.

La electroforesis en geles de agarosa se realiza en un plano horizontal con éstos sumergidos en un tampón. Debido a esto, las muestras de ADN han de tener una elevada densidad para que permanezcan en el interior del pocillo durante el proceso de carga. Por ello, las muestras se mezclan con un tampón de carga, que contiene glicerol (incrementa la densidad) y uno o dos colorantes cargados negativamente (azul

de bromofenol y/o xilen cyanol) que con su migración actúan de indicadores del avance de las muestras.

Para estimar el tamaño y la concentración de los fragmentos de ADN analizados, se incluye en el gel, de forma simultánea, un conjunto de marcadores de tamaño y concentración conocidos. Normalmente, se utilizan fragmentos procedentes de ADN virales o de plásmidos digeridos con alguna enzima de restricción que generan fragmentos de tamaños conocidos.

La visualización del ADN en los geles se hace mediante tinción con el colorante fluorescente bromuro de etidio, que tiene la propiedad de intercalarse entre las bases nitrogenadas del ADN. El bromuro de etidio puede ir incorporado al gel o incorporarse a éste mediante su inmersión en una "solución de teñido". La detección de los fragmentos de ADN se realiza en un transiluminador ultravioleta (UV). La radiación ultravioleta emitida a 254 nm es absorbida por el ADN y transferida al colorante, mientras que las de 302 nm y 366 nm son absorbidas directamente por el bromuro de etidio. En ambos casos, la energía es emitida a 590 nm en la región rojo-naranja del espectro visible. Puesto que la intensidad de fluorescencia del complejo ADN-colorante es mucho mayor que la del colorante no unido, es posible detectar cantidades pequeñas de ADN.

3.2 Sujetos

3.2.1 Sujetos estudio 1

La muestra estuvo compuesta por: 39 remeros, 52 corredores, 50 ciclistas y 123 sujetos sedentarios. El requisito de inclusión para la muestra de remeros (media [ETM] VO_2 máx: 71,4 [0,7] $\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) fue haber obtenido, al menos, una medalla en el Campeonato del Mundo de remo en cualquiera de las modalidades en disputa, couple o punta, desde 1977, año de la primera medalla ganada por el Selección Española hasta el año 2009. Es de destacar el hecho de que todos los sujetos que reunieron estas exigentes condiciones a lo largo de la historia del remo español, sin exclusión alguna, participaron en el presente estudio. Los 52 corredores de clase olímpica eran especialistas en distancias comprendidas entre los 5000 metros y el maratón (42195 metros), entre los que se incluyeron campeones del Mundo y de Europa, junto a medallistas y finalistas en Juegos Olímpicos (VO_2 máx: 73,3[0,8] $\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). Los 50 ciclistas eran profesionales que habían participado y terminado en la competición más importante del mundo, el Tour de Francia, incluyendo varios vencedores de etapa (VO_2 máx: 73,5[0,8] $\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). Por último, los 123 sujetos controles eran sujetos sanos todos ellos sedentarios. Todos los individuos participantes en el estudio eran de raza caucásica, con orígenes españoles en tres o más generaciones.

3.2.2 Sujetos estudio 2

La muestra estuvo constituida por un grupo de remeros de élite peso ligero de nivel mundial y otro de nivel nacional. El grupo de nivel mundial estuvo compuesto por 39 remeros. El requisito de inclusión fue haber obtenido, al menos, una medalla en el Campeonato del Mundo de Remo en cualquiera de las modalidades en disputa, couple o punta, desde 1997, año de la primera medalla ganada por la Selección Española hasta el año 2006. El grupo de remeros de nivel nacional estuvo formado por 15 varones que habían participado en los Campeonatos de España de máximo nivel pero no en Campeonatos del Mundo. La mitad de ellos ($n = 7$) ganaron al menos una medalla de bronce, plata u oro en la categoría peso ligero en las modalidades couple o punta en Campeonatos de España celebrados entre 1997 y 2006. En este estudio también participó un grupo de control, de

123 sujetos sanos, no deportistas (sedentarios). Tanto el grupo de remeros de nivel mundial como el de control participaron como sujetos en el estudio I ⁽²⁰⁰⁾. El grupo de control también participó en el estudio de Chicharro *et al.* ⁽¹⁷⁹⁾. El tamaño de las muestras de remeros es escasa, sin embargo es imposible incrementarla en el caso de los remeros de nivel mundial puesto que fueron incluidos todos los remeros españoles que cumplieron con los requisitos.

3.3 Procedimientos

3.3.1 Procedimientos estudio 1

Durante el invierno y primavera de 2005 (corredores, ciclistas y controles) y primavera-verano de 2007 (remeros) se extrajo DNA genómico a partir de una muestra de sangre periférica colectada en tubos conteniendo un anticoagulante (EDTA), las secuencias de ADN fueron amplificadas por reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los productos de este proceso fueron genotipados en el laboratorio de la Universidad Europea de Madrid (UEM) mediante distintas técnicas (contenidos desarrollados en el punto 3.1 del presente capítulo). A fin de asegurar un minucioso proceso de control interno, para el análisis de cada genotipo, usamos controles positivos y negativos de diferentes alícuotas de ADN, que fueron previamente sometidas al mismo método de genotipado. Siguiendo las recomendaciones recientes para los estudios de asociación de genotipo-fenotipo en humanos, que sugiere que “una submuestra de polimorfismos debe ser evaluada con una segunda tecnología que confirme el mismo resultado con excelente concordancia” ⁽²⁰¹⁾, el genotipado de ACTN3 y ECA fue repetido (primavera de 2008) en otro laboratorio (Progenika, Zamudio, España) usando otra metodología (oligonucleotide-based DNA micorarray attaching oligonucleotide probes for the two genes to an amino-silanized glass using spotting device). Los resultados obtenidos tanto para ACTN3 como para ECA mostraron en ambos laboratorios total concordancia.

Las distribuciones de genotipos se ajustaron al equilibrio de Hardy-Weinberg en las cuatro poblaciones, excepto en el polimorfismo I/D de la ECA en corredores ($X^2_{(6)}=10.93$, $P=0.001$) y en los ciclistas ($X^2_{(6)}=5.80$, $P=0.022$).

Genotipos

Para este estudio se tuvieron en cuenta ocho polimorfismos genéticos asociados con el rendimiento en resistencia cuya influencia sobre rasgos fenotípicos claves para esta capacidad está bien documentada. En concreto:

1. El polimorfismo ARG577Ter (rs1815739) del gen de la α -Actinina-3 (que codifica la síntesis de α -Actinina-3 en las fibras del músculo esquelético) implicado en la capacidad de los músculos para producir contracciones rápidas y evitar el daño originado por las contracciones excéntricas del músculo ^(202,203).
2. El polimorfismo ID (287 bp) del gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), relacionado con la respuesta muscular al entrenamiento a nivel de eficiencia e hipertrofia ^(96,196).
3. El polimorfismo Gly482Ser (rs8192678) del gen coactivador-1 α del receptor γ activado por proliferadores de peroxisomas (PPARGC1A) asociado con la biogénesis mitocondrial y la conversión de fibras músculo esqueléticas (II $\rightarrow$ I) ⁽⁹³⁾.
4. El polimorfismo Gln12Ter (rs17602729) del gen de la adenosín monofosfato desaminasa1 (AMPD1) implicado en la degradación de nucleótidos de adenina y en la regulación de la glucólisis muscular en ejercicio intenso ⁽¹⁴⁰⁾.
5. El polimorfismo Ncol RFLP 1170 bp/985+185bp del gen de la Creatina Quinasa muscular (CKMM) está relacionado con el suministro de energía a las fibras músculo esqueléticas y con la tolerancia al daño de las mismas ⁽¹⁴⁹⁾.
6. El polimorfismo Lys153Arg (rs1805086) del gen de la miostatina (GDF8) asociado con fuerza muscular ⁽¹⁶⁰⁻¹⁶²⁾.
7. El polimorfismo His63Asp (rs1799945) del gen de la Hemocromatosis Hereditaria (HFE) relacionado con la capacidad para absorber suplementos de hierro y sin efectos nocivos sobre la salud ⁽¹⁷⁹⁾.
8. El polimorfismo Met325Thr (rs699) del gen angiotensinógeno (AGT) asociado con mayores niveles de angiotensina II y por tanto con el crecimiento del músculo esquelético ⁽⁹⁶⁾.

El genotipado fue realizado específicamente para la investigación propuesta, con la hipótesis de que los polimorfismos antes citados son candidatos a influir en el rendimiento deportivo. El investigador responsable del genotipado fue totalmente ciego para la identidad concreta de los sujetos analizados, ya que la privacidad en la identidad de las muestras de sangre estuvo garantizada por el uso de códigos de barras.

3.3.2 Procedimientos estudio 2

Durante el invierno y primavera de de 2007 se realizó la toma de muestras de los remeros de nivel mundial, en verano del 2008 se tomaron las muestras de los remeros de nivel nacional. Se extrajo DNA genómico a partir de una muestra de sangre periférica colectada en tubos conteniendo un anticoagulante (EDTA), las secuencias de ADN fueron amplificadas por reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los productos de este proceso fueron genotipados en el laboratorio de la UEM mediante distintas técnicas (contenidos desarrollados en el punto 3.1 del presente capítulo). A fin de asegurar un minucioso proceso de control interno, para el análisis de cada genotipo, usamos controles positivos y negativos de diferentes alícuotas de ADN, que fueron previamente sometidas al mismo método de genotipado.

Genotipos

Para este estudio se tuvieron en cuenta siete polimorfismos genéticos asociados con el rendimiento en resistencia cuya influencia sobre rasgos fenotípicos claves para esta capacidad está bien documentada.

En concreto:

1. El polimorfismo ID (287 bp) del gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)
2. El polimorfismo ARG577Ter (rs1815739) del gen de la α -Actinina-3

3. El polimorfismo Gln12Ter (rs17602729) del gen de la adenosín monofosfato desaminasa1 (AMPD1).
4. El polimorfismo Ncol RFLP 1170 bp/985+185bp del gen de la Creatina Quinasa muscular (CKMM).
5. El polimorfismo His63Asp (rs1799945) del gen de la Hemocromatosis Hereditaria (HFE).
6. El polimorfismo Lys153Arg (rs1805086) del gen de la miostatina (GDF8).
7. El polimorfismo Gly482Ser (rs8192678) del gen coactivador-1 α del receptor γ activado por proliferadores de peroxisomas (PPARGC1A).

El genotipado fue realizado específicamente para la investigación propuesta, con la hipótesis de que los polimorfismos antes citados son candidatos a influir en el rendimiento deportivo. El investigador responsable del genotipado fue totalmente ciego para la identidad concreta de los sujetos analizados, ya que la privacidad en la identidad de las muestras de sangre estuvo garantizada por el uso de códigos de barras.

Williams y Folland ⁽²⁰⁴⁾ han aplicado recientemente un “enfoque poligénico” al rendimiento deportivo. En su estudio trataron de predecir la probabilidad de que existiesen sujetos que tuviesen el perfil poligénico perfecto para la resistencia. Dicho perfil óptimo se obtuvo a partir de la mejor acumulación teórica de la combinación de 23 polimorfismos genéticos que son candidatos a influir en las diferencias individuales en uno o más rasgos fenotípicos de la resistencia. Estas variantes fueron seleccionadas en base a estudios de asociación previos con población caucásica. A la combinación alélica, teóricamente óptima, de un gen se le aplicó un máximo de puntuación de dos, frente al uno o cero para la combinación intermedia y peor respectivamente. Los autores combinaron todas las puntuaciones individuales en una puntuación general “Puntuación Genotípica Total” (PGT), con un

valor máximo posible de 100, que se correspondería al perfil poligénico óptimo para la resistencia. Ellos predijeron también que la distribución de la PGT en el planeta es leptocúrtica, esto es, con la mayor parte de las puntuaciones acumuladas en torno a la media. Esta distribución dificultaría la posibilidad de que exista un ser humano perfecto o casi perfecto en cuanto a su perfil poligénico para la resistencia: la probabilidad de que exista en el planeta un individuo con la PGT óptima para la resistencia sería tan solo del 0,0005% ⁽²⁰⁴⁾.

Puntuación Genotípica Total (PGT)

Se calculó la influencia combinada (perfil poligénico) para los siete polimorfismos estudiados en cada remero siguiendo el procedimiento de Williams y Follands ⁽²⁰⁴⁾:

- (1) Se puntuó cada genotipo dentro de cada polimorfismo (Tabla 3.1). Se asignó una Puntuación Genotípica (PG) de 2 puntos al genotipo óptimo o preferible, 1 para el intermedio y 0 para el genotipo menos “óptimo” o peor, teniendo en cuenta su contribución a la resistencia.
- (2) Se sumó la puntuación obtenida en los 7 genotipos ($PG_{ECA} + PG_{ACTN3} + PG_{AMPD1} + PG_{CKMM} + PG_{HFE} + PG_{GDF8} + PG_{PPARGC1A}$)
- (3) Esta puntuación se transformó a una escala con mínimo 0 y máximo 100 para facilitar la interpretación de las puntuaciones, que se denominó Puntuación Genotípica Total (PGT), de la siguiente forma:

$$PGT = (100/14) \times (PG_{ECA} + PG_{ACTN3} + PG_{AMPD1} + PG_{CKMM} + PG_{HFE} + PG_{GDF8} + PG_{PPARGC1A})$$

Donde 14 es el resultado de multiplicar 7 (número total de polimorfismos estudiados) por 2, que es la puntuación óptima correspondiente al genotipo más apropiado para la resistencia. De esta forma, una PGT de 100 representa el perfil poligénico perfecto para el rendimiento en remo, que se da cuando se obtiene

la puntuación genética (PG) igual a 2 en todos los polimorfismos, por el contrario una PGT de 0 representa la peor de las combinaciones posibles, donde todos las PG son 0.

Tabla 3.1. Puntuación Genotípica asignada a los diferentes polimorfismos estudiados.

Símbolo	Gen	Polimorfismo	Puntuación Genotípica (PG)
ECA	Enzima convertidora de angiotensina	287 bp Ins(I)/Del(D)	0 = II 1 = ID 2 = DD
ACTN3	α-Actinina-3	Arg(R)577Ter(X) (rs1815739)	0 = XX 1 = RX 2 = RR
AMPD1	Adenosin monofosfato Desaminasa1 (isomorfismo M)	Gln(Q)12Ter(X) (rs17602729)	0 = XX 1 = QX 2 = QQ
CKMM	Creatina Quinasa, músculo	NcoI RFLP 1170 bp+185bp	0 = 1170/1170 1 = 985+185/1170 2 = 985+185/985+185
HFE	Hemocromatosis Hereditaria	His(H)63Asp(D) (rs1799945)	0 = HH 1 = HD 2 = DD
GDF-8	Miostatina (factor de crecimiento y diferenciación)	Lys(K)153Arg(R) (rs1805086)	0 = RR 1 = RK 2 = KK
PPARGC1A	Coactivador-1α del receptor y activado por proliferadores de peroxisomas	Gly(G)482Ser(S) (rs8192678)	0 = SS 1 = GS 2 = GG

A fin de comparar el perfil poligénico de los remeros con el de la población general española, creamos una base de datos con 50000 hipotéticos sujetos españoles, para los cuales se generó un perfil poligénico al azar (con los siete genes considerados), basado en la frecuencia de cada genotipo en la población española obtenida en el estudio anterior.

Puntuación en medallas

Se confeccionó un sistema de puntuación en medallas arbitrario, a fin de establecer una clasificación ordinal de los remeros de la siguiente forma: a las medallas de oro, plata y bronce obtenidas en Campeonatos del Mundo se le asignaron 9, 6 y 3 puntos respectivamente, mientras que a las obtenidas en Campeonatos de España se le asignó 3, 2 y 1 punto respectivamente. La puntuación 0 fue asignada a los remeros de nivel nacional que no alcanzaron ninguna medalla en Campeonatos de España ($n = 8$). Como ejemplo, uno de los remeros de nivel mundial obtuvo una puntuación de 42, ya que ganó dos medallas de oro (puntuación = 18), dos medallas de plata (puntuación = 12) y cuatro medallas de bronce (puntuación = 12). La puntuación más alta se asignó al resultado más importante, que es el primer puesto en el Campeonato del Mundo, por el contrario la puntuación más baja (0) se asignó a aquellos que no ganaron ninguna medalla. La gradación en cuanto a la asignación de puntos fue tres veces superior para el Campeonato del Mundo, frente al Campeonato de España, por considerar que aquellos atletas que ganan medalla en Campeonatos del Mundo debían tener mejor nivel que aquellos que lo hacen en Campeonatos de España. Sin embargo se realizaron análisis de sensibilidad con objeto de examinar si los resultados se veían afectados por la forma en la que se operativizó la puntuación en medallas.

3.4 Análisis estadístico

3.4.1 Análisis estadístico estudio 1

Las frecuencias de los genotipos fueron comparadas entre los cuatro grupos usando el test chi-cuadrado de Pearson. Todos los análisis fueron llevados a cabo usando el Statistical Package for Social Sciences (SPSS, v. 16.0 para WINDOWS; SPSS Inc., Chicago, IL) y el nivel de significación (α) fue fijado en 0,05.

3.4.2 Análisis estadístico estudio 2

En primer lugar se compararon las frecuencias genotípicas para cada uno de los siete polimorfismos y la PGT entre los remeros de categoría mundial y los de categoría nacional usando el test chi-cuadrado de Pearson y una prueba t para muestras independientes respectivamente. Se ajustaron las comparaciones múltiples para un nivel de significación global ⁽²⁰⁵⁾.

En segundo lugar, para determinar el impacto de poseer un perfil genético deseable para el éxito deportivo en relación al número de medallas ganadas en Campeonatos Mundiales o Nacionales, se llevó a cabo un análisis de covarianza de un factor, en el que los quintiles donde la Puntuación Genotípica Total fue el factor fijo, la puntuación en medallas la variable dependiente y el grupo de remeros (nacionales e internacionales) la covariable.

Finalmente, se representó gráficamente la distribución de la Puntuación Genotípica Total para los grupos de remeros, así como para la población general española. Todos los análisis fueron llevados a cabo usando el Statistical Package for Social Sciences (SPSS, v. 16.0 para WINDOWS; SPSS Inc., Chicago, IL) y el nivel de significación (α) se fijó en 0,05.

3.5 Aspectos éticos y legales

Esta investigación se ha realizado de acuerdo a las normas de buena práctica clínica con plena aceptación de las normas éticas vigentes (Declaración de Helsinki, revisión de Edimburgo 2000) y respetando todos los aspectos establecidos en la legislación vigente en materia de investigación clínica:

Convenio para la protección de los Derechos Humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina. Convenio relativo a los Derechos Humanos y la Biomedicina (Aprobado por el Comité de Ministros de 19 de noviembre de 1996. Firmado el día 4 de abril de 1997, publicado en el BOE de 20-X-99 y corregido según BOE de 11-XI-99).

- Ley orgánica 15/99 de 13 de diciembre de Protección de Datos de carácter Personal.
- Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica.
- La confidencialidad de los datos se mantuvo a través del uso de código de barras.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados estudio 1

A continuación se presentan los análisis de los resultados en función de los distintos polimorfismos pertenecientes al conjunto de genes analizados y su distribución dentro de las cuatro muestras de sujetos consideradas, pertenecientes a tres deportes caracterizados por su alta exigencia física en el ámbito de la resistencia: Ciclismo (ruta), Atletismo (fondo) y Remo (peso ligero), además de una muestra de controles compuesta por sujetos sanos.

En la *Tabla 4.1* se presenta la distribución de los distintos polimorfismos del gen ACTN3 en función de la práctica deportiva. Un 28,4% de los sujetos presentó el polimorfismo RR, un 51,5% el RX y un 20,1% el XX. Las combinaciones alélicas del gen ACTN3 no se distribuyeron de forma diferente en las 4 poblaciones consideradas ($\chi^2(6) = 3,36$; $P = 0,763$).

Tabla 4.1. Distribución de polimorfismos pertenecientes al gen ACTN3.

GRUPOS	ACTN3		
	RR	RX	XX
Controles (n=123)	28,5%	53,7%	17,9%
Ciclistas (n= 50)	28,0%	46,0%	26,0%
Corredores (n= 52)	25,0%	57,7%	17,3%
Remeros (n= 39)	33,3%	43,6%	23,1%
Total (n=264)	28,4%	51,5%	20,1%

En la *Tabla 4.2* se presenta la distribución de los distintos polimorfismos del gen ECA en función de la práctica deportiva.

Un 37,9 % de los sujetos presentó el polimorfismo DD, un 40,2% el DI y un 22,3 % el II. Las combinaciones alélicas del gen ECA se distribuyeron de

forma diferente en las 4 poblaciones consideradas ($X^2(6) = 19,26$; $P = 0,004$). El análisis de los residuos tipificados corregidos puso de manifiesto que en la población de ciclistas hubo un mayor porcentaje de DD (50%), en la de corredores un menor porcentaje de DI (26.9%) y un mayor porcentaje de II (40.4%), y en la de remeros un menor porcentaje de II (10,3%) de los porcentajes estimados para la población global ($p < 0,05$).

Tabla 4.2. Distribución de polimorfismos pertenecientes al gen ECA.

GRUPOS	ECA		
	DD	DI	II
Controles (n=123)	34,7%	46%	19,4%
Ciclistas (n= 50)	50%	30%	20%
Corredores (n= 52)	32,7%	26,9%	40,4%
Remeros (n= 39)	38,5%	51,3%	10,3%
Total (n=264)	37,9%	40,2%	22,3%

En la Tabla 4.3 se presenta la distribución de los distintos polimorfismos del gen PPARGC1A en función de los grupos considerados.

Un 42,4% de los sujetos presentó el polimorfismo GG, un 43,6% el GS y un 14,0% el SS. Las combinaciones alélicas del gen PGC no se distribuyeron de forma diferente en las 4 poblaciones consideradas ($X^2(6) = 10,21$; $P = 0,116$).

Tabla 4.3. Distribución de polimorfismos pertenecientes al gen PPARGC1A.

GRUPOS	PPARGC1A		
	GG	GS	SS
Controles (n=123)	38,2%	51,2%	10,6%
Ciclistas (n= 50)	56,0%	34,0%	10,0%
Corredores (n= 52)	41,0%	38,5%	20,5%
Remeros (n= 39)	41,0%	38,5%	20,5%
Total (n=264)	42,4%	43,6%	14,0%

En la Tabla 4.4 se presenta la distribución de los distintos polimorfismos del gen AMPD1 en función de la práctica deportiva. Para el análisis de los resultados se agruparon los polimorfismos XX y QX, debido a que sólo un sujeto del grupo control y otro del grupo remeros presentaban el polimorfismo XX.

Un 86,3% de los sujetos presentó el polimorfismo CC y un 13,7% el CT. Las combinaciones alélicas del gen AMPD1 no se distribuyeron de forma diferente en las 4 poblaciones consideradas ($X^2(3) = 8,22$; $P = 0,223$).

Tabla 4.4. Distribución de polimorfismos pertenecientes al gen AMPD1.

GRUPOS	AMPD1		
	QQ	QX	XX
Controles (n=123)	82,1%	17,1%	0,8%
Ciclistas (n= 50)	88%	12,0%	0%
Corredores (n= 52)	94,2%	5,8%	0%
Remeros (n= 39)	82,1%	15,4%	2,6%
Total (n=264)	85,6%	13,6%	0,8%

En la Tabla 4.5 se presenta la distribución de los distintos polimorfismos del gen CKMM en función de su práctica deportiva.

Un 10,2% de los sujetos presentó el polimorfismo 1170/1170, un 49,6% el 1170/985 y un 40,2% el 985/985. Las combinaciones alélicas del gen CKMM no se distribuyeron de forma diferente en las 4 poblaciones consideradas ($X^2(6) = 5,67$; $P = 0,461$).

Tabla 4.5. Distribución de polimorfismos pertenecientes al gen CKMM.

GRUPOS	CKMM		
	1170/1170	1170/985	985/985
Controles (n=123)	12.2%	52.8%	35.0%
Ciclistas (n= 50)	8.0%	46.0%	46.0%
Corredores (n= 52)	3.8%	53.8%	42.3%
Remeros (n= 39)	15.4%	38.5%	46.2%
Total (n=264)	10.2%	49.6%	40.2%

En la *Tabla 4.6* se presenta la distribución de los distintos polimorfismos del gen GDF-8 para los distintos grupos considerados.

Un 89,8% de los sujetos presentó el polimorfismo KK y un 9,8% el KR. Para el análisis de los datos se agruparon los polimorfismos RR y KR dado que sólo un sujeto del grupo de ciclistas presentó el primero. Esta distribución no fue significativamente diferente en las 4 poblaciones consideradas ($X^2(3) = 0,57$; $P = 0,903$).

Tabla 4.6. Distribución de polimorfismos pertenecientes al gen GDF-8.

GRUPOS	KK	GDF-8 KR	RR
Controles (n=123)	90,2%	9,8%	0%
Ciclistas (n= 50)	88%	10%	2%
Corredores (n= 52)	88,5%	11,5%	0%
Remeros (n= 39)	92,3%	7,7%	0%
Total (n=264)	89,8%	9,8%	0,4%

En la *Tabla 4.7* se presenta la distribución de los distintos polimorfismos del gen HFE en función de la práctica deportiva.

Un 62,1% de los sujetos presentaron el polimorfismo HD/HD, un 30,7% el HD/HH y un 7,2% el HH/HH. Las combinaciones alélicas del gen *HFE* se distribuyeron de forma diferente en las 4 poblaciones consideradas ($X^2(6) = 13,69$; $P = 0,03$). El análisis de los residuos tipificados corregidos puso de manifiesto que en la población de corredores hubo un menor porcentaje de HD/HD (50%), mientras que en los remeros hubo un mayor porcentaje para el mismo polimorfismo (76,9%) de los porcentajes estimados para la población global ($p < 0,05$).

Tabla 4.7. Distribución de polimorfismos pertenecientes al gen HFE.

GRUPOS	HH	HFE HD	DD
Controles (n=123)	66,7%	24,4%	8,9%
Ciclistas (n= 50)	52,0%	42,0%	6,0%
Corredores (n= 52)	50%	40,4%	9,6%
Remeros (n= 39)	76,9%	23,1%	0%
Total (n=264)	62,1%	30,7%	7,2%

En la *Tabla 4.8* se presenta la distribución de los distintos polimorfismos del gen AGT para los distintos grupos considerados.

Un 31,5% de los sujetos presentó el polimorfismo MM, un 48,5% el MT y un 20,2% el TT. Las combinaciones alélicas del gen AGT no se distribuyeron de forma diferente en las 4 poblaciones consideradas ($X^2(6) = 3,29$; $P = 0,772$).

Tabla 4.8. Distribución de polimorfismos pertenecientes al gen AGT.

GRUPOS	MM	AGT MT	TT
Controles (n=123)	34,5%	49,6%	16%
Ciclistas (n= 50)	30%	48%	22%
Corredores (n= 52)	30,8%	48,1%	21,2%
Remeros (n= 39)	25,6%	46,2%	28,2%
Total (n=264)	31,5%	48,5%	20,2%

4.2 Resultados estudio 2

A continuación se presentan los análisis de los resultados de los distintos polimorfismos pertenecientes al conjunto de genes candidatos considerados en función de las dos muestras de remeros consideradas.

En la *Tabla 4.9* se presenta la distribución de los distintos polimorfismos del gen ACTN3 para los remeros de nivel mundial y los de nivel nacional. Las combinaciones alélicas del gen ACTN3 no se distribuyeron de forma diferente en estas dos poblaciones ($X^2(2) = 2,31$; $P = 0,315$).

Tabla 4.9. Distribución de polimorfismos pertenecientes al gen ACTN3.

GRUPOS	ACTN3		
	RR	RX	XX
Remeros Nivel Mundial (n=39)	33,3%	43,6%	23,1%
Remeros Nivel Nacional (n= 15)	20%	66,7%	13,3%
Total (n= 54)	29,6%	50%	20,4%

En la *Tabla 4.10* se presenta la distribución de los distintos polimorfismos del gen ECA en función del grupo de remeros. Las combinaciones alélicas del gen ECA no se distribuyeron de forma diferente en las dos poblaciones consideradas ($X^2(2) = 5,41$; $P = 0,067$).

Tabla 4.10. Distribución de polimorfismos pertenecientes al gen ECA.

GRUPOS	ECA		
	DD	DI	II
Remeros Nivel Mundial (n=39)	38,5%	51,3%	10,3%
Remeros Nivel Nacional (n= 15)	6,7%	73,3%	20%
Total (n= 54)	29,6%	57,4%	13%

En la *Tabla 4.11* se presenta la distribución de los distintos polimorfismos del gen PPARGC1A en función de los grupos considerados. Las combinaciones alélicas no se distribuyeron de forma diferente en las dos poblaciones de remeros ($X^2(2) = 0,35$; $P = 0,841$).

Tabla 4.11. Distribución de polimorfismos pertenecientes al gen PPARGC1A.

GRUPOS	PPARGC1A		
	GG	GS	SS
Remeros Nivel Mundial (n=39)	41%	38,5%	20,5%
Remeros Nivel Nacional (n= 15)	33,3%	46,7%	20%
Total (n= 54)	38,9%	40,7%	20,4%

En la *Tabla 4.12* se presenta la distribución de los distintos polimorfismos del gen AMPD1 en función de los grupos de remeros.

Un alto porcentaje de remeros (75.5%) presentó el polimorfismo QQ y un solo dos de ellos (3,8%) el XX. Las combinaciones alélicas del gen AMPD1 no se distribuyeron de forma diferente en las dos poblaciones de remeros ($X^2(2) = 0,48$; $P = 0,786$).

Tabla 4.12. Distribución de polimorfismos pertenecientes al gen AMPD1.

GRUPOS	AMPD1		
	QQ	QX	XX
Remeros Nivel Mundial (n=39)	76,3%	21,1%	2,6%
Remeros Nivel Nacional (n= 15)	73,3%	20%	6,7%
Total (n= 54)	75,5%	20,8%	3,8%

La distribución de los distintos polimorfismos del gen CKMM en función del nivel de los remeros se presenta en la *Tabla 4.13*. Las combinaciones alélicas del gen CKMM no se distribuyeron de forma diferente en ambas poblaciones ($X^2(2) = 0,24$; $P = 0,888$).

Tabla 4.13. Distribución de polimorfismos pertenecientes al gen CKMM.

GRUPOS	CKMM		
	1170/1170	1170/985	985/985
Remeros Nivel Mundial (n=39)	15,4%	38,5%	46,2%
Remeros Nivel Nacional (n= 15)	20%	40%	40%
Total (n= 54)	16,7%	38,9%	44,4%

En la *Tabla 4.14* se presenta la distribución de los distintos polimorfismos del gen *GDF-8* para los dos grupos de remeros. Esta distribución no fue significativamente diferente en las dos poblaciones consideradas ($X^2(1) = 0,02$; $p = 0,897$).

Tabla 4.14. Distribución de polimorfismos pertenecientes al gen *GDF8*.

GRUPOS	KK	<i>GDF8</i> KR	RR
Remeros Nivel Mundial (n=39)	92,3%	7,7%	0%
Remeros Nivel Nacional (n= 15)	93,3%	6,7%	0%
Total (n= 54)	92,6%	7,4%	0%

La distribución de los distintos polimorfismos del gen *HFE* en función de los grupos de remeros considerados se presenta en la *Tabla 4.15*. Las combinaciones alélicas del gen *HFE* no se distribuyeron de forma diferente en las dos poblaciones consideradas ($X^2(2) = 2,81$; $P = 0,245$).

Tabla 4.15. Distribución de polimorfismos pertenecientes al gen *HFE*.

GRUPOS	HH	<i>HFE</i> HD	DD
Remeros Nivel Mundial (n=39)	76,9%	23,1%	0%
Remeros Nivel Nacional (n= 15)	66,7%	26,7%	6,7%
Total (n= 54)	74,1%	24,1%	1,9%

La puntuación en medallas abarcó un rango desde 0 (n=8) hasta 42 (n=1). El rango de las puntuaciones en la PGT varió de 50 a 100 en remeros de categoría mundial y de 35,7 a 85,7 en remeros de categoría nacional. La media de la PGT (*Gráfico 4.1*) de los remeros internacionales ($71,06 \pm 11,92$) y de los remeros nacionales ($64,76 \pm 13,07$) no fue significativamente diferente ($P = 0,096$).

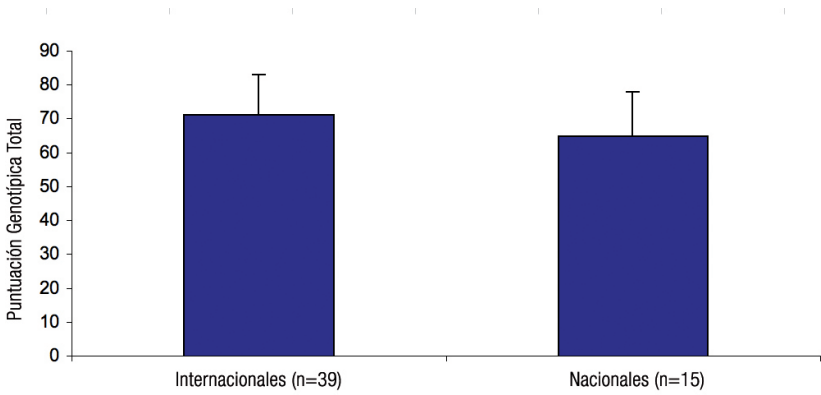


Gráfico 4.1. Puntuación Genotípica Total en remeros de categoría Internacional y Nacional.

La puntuación en medallas por quintiles en la PGT se presenta en el *Gráfico 4.2*. No hubo asociación entre la PGT y la puntuación en medallas ($P=0,649$). Además, la media de la PGT fue similar entre aquellos remeros nacionales con una puntuación de medallas de 0 y los remeros nacionales o internacionales con una puntuación de medallas ≥ 1 ($66,9 \pm 17,0$ vs $69,7 \pm 11,7$, respectivamente). El análisis de los resultados no evidenció cambio alguno cuando la puntuación en medallas se calculó de distintas maneras, por ejemplo, 0,1,2,3,4,5,6; ó 1,2,3,4,5,6,7; ó 0,1,2,3,4,6,8, como correspondientes a ninguna medalla, bronce, plata y oro en campeonatos nacionales y bronce, plata y oro en campeonatos mundiales.

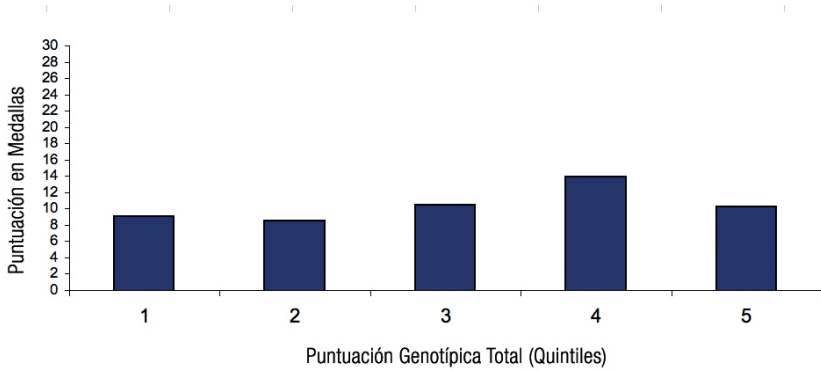


Gráfico 4.2. Puntuación en Medallas en función de los quintiles en la Puntuación Genotípica Total de remeros españoles peso ligero.

La distribución de frecuencias para la PGT de una muestra aleatoria de 50.000 individuos españoles extraídos del modelo generado a partir de las frecuencias de genotipos para dicha población, 39 remeros peso ligero de categoría internacional y 15 de categoría nacional se presenta en el Gráfico 4.3. En la población española la media $\pm$ desviación estándar de la PGT fue $60,8 \pm 12,21$ y la curtosis $\pm$ error estándar fue $-0,167 \pm 0,022$. Las distribuciones de la PGT para los remeros estuvieron ligeramente desplazadas a la derecha. Para los remeros internacionales la media $\pm$ desviación estándar de la PGT fue $71,06 \pm 11,92$ y la curtosis $\pm$ error estándar fue $-0,078 \pm 0,741$ y para los nacionales $64,76 \pm 13,07$ y $-0,721 \pm 1,121$ respectivamente.

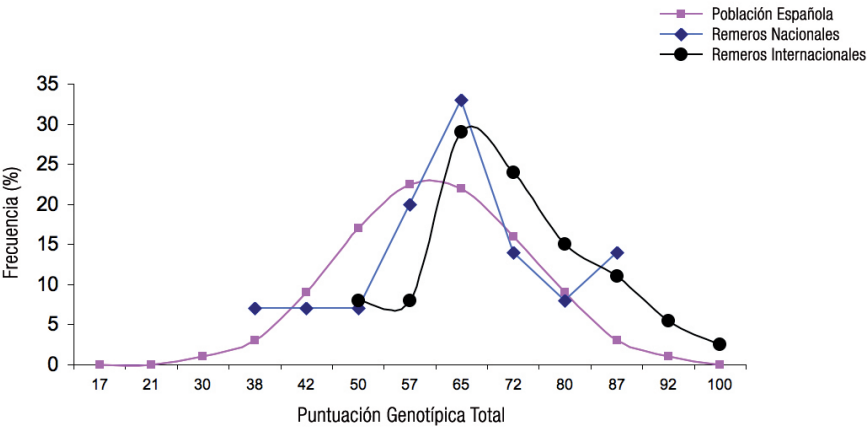


Gráfico 4.3. Distribución de frecuencias para la puntuación genotípica total en población española, remeros ligeros de nivel nacional y remeros ligeros internacionales.

5. DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados del presente estudio indican que, de entre los ocho genes estudiados, sólo los genes *HFE* y *ECA* pueden estar asociados (aunque esta asociación no se debe interpretar necesariamente como una relación causa-efecto) al rendimiento en los remeros peso ligero de nivel competitivo mundial. Otros genes expresados principalmente a nivel muscular y con un papel principalmente enfocado en estos tejidos como *ACTN3*, *PPARGC1A*, *AMPD1*, *CKMM* o miostatina, y el *AGT* relacionado con el desarrollo muscular, muestran una distribución genotípica similar tanto en remeros como en los distintos grupos considerados, incluidos los no deportistas.

La prevalencia de los genotipos HD y DD en el gen *HFE* fue elevada tanto en el grupo de ciclistas (48%) como en el de corredores (50%). Por otro lado, el porcentaje de deportistas de estas dos disciplinas que presentaron el gen *HFE* sin mutaciones (en torno al 50%) fue inferior al encontrado para el grupo control (66.7%). Este resultado es congruente con lo informado por Deugnier et al. ⁽¹⁷⁸⁾ quienes encontraron una mayor prevalencia de la mutación H63D en ciclistas franceses al compararlos con controles sanos. Estos datos indican que los deportistas de fondo y los ciclistas tienen mayor capacidad de absorber hierro para poder realizar esfuerzo prolongado, y por tanto mayor capacidad de síntesis de hemoglobina y hematocrito lo que incrementaría el transporte de oxígeno.

El análisis de los datos puso de manifiesto que la ausencia de mutaciones asociadas al gen *HFE* fue más frecuente en el grupo de remeros (76.9%) que lo estimado para la población global (62.1%).

Por lo que corresponde al gen de la *ECA*, Se observó una proporción significativamente menor de II en remeros (10.3%) que en la población total (23.3%). El genotipo II está asociado a una menor capacidad de hipertrofia muscular ⁽⁹⁶⁾ comparado con la variante DD, pero puede conferir un incremento en la función cardiovascular ⁽⁸⁵⁾ y en la eficiencia muscular ⁽⁹⁶⁾, lo que puede favorecer el rendimiento en deportes de resistencia pura como la carrera de fondo. En contraste, el genotipo II

puede ir en detrimento del rendimiento en el caso de deportes con mayor orientación a la fuerza, como por ejemplo el remo. Una observación interesante fue constatar que no se dio el caso de ningún remero con una combinación genotípica de “extrema resistencia” (menos orientada a la potencia), p.e., *ECA II + ACTN3 XX* (deficiente en α -actinina-3), frente a cuatro ciclistas y cuatro corredores con esta combinación. Esto puede apoyar la idea de que tanto la fuerza como la resistencia son importantes rasgos fenotípicos en remo, y que no es una disciplina de resistencia pura, como el fondo atlético en el cual la eficiencia muscular (economía de carrera), rasgo fenotípico favorecido por el genotipo II ⁽¹⁹⁶⁾, es un determinante clave del rendimiento ⁽²⁰⁶⁾. Por lo tanto, remeros, ciclistas, corredores u otros atletas que se engloban en la familia de deportes de resistencia, no pueden ser agrupados conjuntamente en estudios genéticos de asociación como se ha venido haciendo ⁽⁶⁰⁾, ya que existe variabilidad genética entre las diferentes especialidades.

Una limitación potencial de este estudio es que el tamaño de las muestras de deportistas evaluadas fue relativamente pequeño, lo que, por otra parte, puede ser comprensible si se tiene en cuenta el nivel competitivo de los deportistas. Por otro lado es complicado disponer de un grupo suficientemente numeroso de deportistas de especialidades con orientación hacia la potencia (por ejemplo halterófilos, lanzadores, velocistas, saltadores, etc.) del mismo origen étnico en nuestro país que, además, presenten un nivel de rendimiento comparable al de los sujetos analizados, por lo que no se pudo incluir este tipo de deportistas en nuestro estudio.

El rendimiento deportivo está probablemente relacionado con el efecto combinado de cientos de variantes genéticas, una posibilidad son los polimorfismos *ECA* y *HFE* (al menos en los deportes estudiados aquí), pero otros muchos están por identificar. Además serían otros muchos los aspectos que conformarían el “complejo rasgo” de ser un deportista de nivel mundial en un deporte dado, como la técnica, la motivación o aspectos cinemáticos, entre otros, y probablemente no puedan reducirse a polimorfismos genéticos específicos.

La orientación del segundo estudio constituye el primer intento para determinar si un perfil poligénico concreto está asociado con la consecución del nivel propio de un campeón, usando el ejemplo del remo. Los tres principales resultados de este estudio (en respuesta a los tres objetivos propuestos en la introducción) fueron:

Primero, el perfil poligénico (determinado a partir de la Puntuación Genotípica Total (PGT) obtenida de las combinaciones de genotipo correspondientes a los siete genes candidatos) no presentó diferencias significativas entre remeros peso ligero de nivel nacional y mundial. Este resultado descarta, al menos parcialmente, la noción de que la dotación genética es el principal factor que distingue a los campeones de elite de aquellos deportistas menos exitosos.

Segundo, y apoyando los descubrimientos citados anteriormente, no se encontró una asociación o relación significativa entre la PGT y número de medallas ganadas en Campeonatos Nacionales y del Mundo.

Tercero, se puede apreciar que los remeros de elite (nacionales o internacionales) tienden a presentar un perfil poligénico más “favorable” que el de la población general española. La media de la PGT tiende a incrementarse (desplazarse hacia la derecha) con el incremento del nivel deportivo (por ejemplo, la media de la PGT fue ~60, 65 y 70 para la población general, remeros de nivel nacional y remeros de nivel mundial, respectivamente). Por tanto, no podemos descartar el hecho de que los remeros de élite poseen un perfil poligénico más “favorable” que la población general. De hecho algunos de nuestros remeros destacados presentan un perfil poligénico “perfecto” o “casi perfecto”, al menos para los siete polimorfismos estudiados. Uno de los remeros de nivel mundial presentó una PGT de 100 con una puntuación en medallas de 18, y otros dos remeros del mismo grupo obtuvieron una PGT de 92, 86 con puntuación en medallas de 6 y 15.

Nuestro estudio no carece de limitaciones. En primer lugar el tamaño de la muestra de remeros no es grande, lo que limita las posibilidades de encontrar diferencias en su perfil poligénico. Esto también disminuye la potencia estadística de los análisis. Creemos que esta limitación es comprensible debido al hecho de que se dispuso de todos los remeros ligeros españoles medallistas a nivel mundial. De hecho, cualquier estudio de asociación genotipo-fenotipo sobre atletas de élite se encontrará con la misma limitación ^(71,89,207). El número de este tipo de sujetos está enormemente limitado a nivel mundial y es aun más reducido cuando se trata de seleccionar deportistas con el mismo origen étnico y fenotipos deportivos homogéneos (misma especialidad deportiva, misma masa corporal) como en este caso. En segundo lugar hay más polimorfismos candidatos que no han sido analizados. Sin embargo, creemos que se han estudiado siete de los polimorfismos candidatos más importantes, con una influencia documentada sobre los niveles

"basales" (preentrenamiento) y la entrenabilidad de rasgos fenotípicos clave del deporte, como son, entre otros, la función cardiovascular y la eficiencia muscular (ECA) ^(96,196), masa muscular y fuerza (GDF-8) ⁽¹⁶⁰⁻¹⁶²⁾, metabolismo muscular (AMPD1) ⁽¹⁴⁰⁾, CKMM ⁽¹⁴⁹⁾, PPARGC1A ⁽¹⁰⁴⁾ o capacidad de generación de fuerza muscular (ACTN3) ⁽²⁰²⁾.

Por otra parte, se debería tener en cuenta dos hechos que van en contra de la idea de que los factores genéticos son los principales determinantes del éxito en los deportes de resistencia. En primer lugar sólo una fracción extremadamente pequeña de la población del planeta (independientemente de su dotación genética) participa en el proceso de selección artificial (incluyendo exigentes regímenes de entrenamiento desde la infancia), que termina con el rendimiento del deporte de élite, tanto de nivel nacional como de nivel mundial. Por ejemplo, sólo un remero de élite español con el perfil poligénico perfecto (PGT de 100) participó en el proceso de selección mencionado. En segundo, el hecho de tener la combinación de genotipo más desfavorable para un polimorfismo dado, hace que se reduzca de manera importante la PGT, lo que no limita necesariamente el rendimiento en el deporte al poder ser compensado por otros factores. Por ejemplo, Lucía et al. ⁽²⁰³⁾ presentaron un estudio sobre un saltador de longitud de alto nivel (dos veces olímpico, con una marca personal de 8,26 m.) con un genotipo para ACTN3 XX, es decir, deficiente en α -actinina-3, este sería el genotipo de ACTN3 menos favorable para esta especialidad, dado que la proteína músculo-esquelética α -actinina-3 es necesaria para producir elevados niveles de potencia y alta velocidad de contracción ⁽⁶⁸⁾. Obviamente otros factores, que afectan a la capacidad de salto de longitud (reclutamiento de unidades motoras, factores biomecánicos, etc.), deben haber compensado esta deficiencia en el aspecto genético. En este estudio, un remero de nivel mundial y otro de nivel nacional fueron deficientes en la enzima muscular adenosina monofosfato desaminasa 1 (AMPD1) ya que su genotipo fue XX. Hay numerosos informes sobre casos de sujetos (no deportistas) con deficiencia de AMPD1, que sufren intolerancia al ejercicio, incluyendo fatiga temprana en el ejercicio, contracturas musculares, mialgia y recuperación retardada de la fuerza muscular ^(128, 208, 209). Curiosamente, ninguno de los dos sujetos referidos informó padecer estos problemas durante las competiciones, lo que hace suponer que otros factores (genéticos o no genéticos) compensaron la deficiencia heredada de una importante enzima metabólica a nivel muscular como es la AMPD1.

En resumen, el "perfil poligénico de rendimiento" no es significativamente diferente entre remeros ligeros de nivel nacional o mundial, lo cual

va contra la idea de que es la dotación genética la que distingue a los campeones de élite de los deportistas menos exitosos. No encontramos una asociación significativa entre PGT y número de medallas ganadas en Campeonatos del Mundo o de España. Sin embargo, los remeros de élite (nacionales o mundiales) tienden a tener un perfil poligénico más favorable que la población de no deportistas. Por último, sería necesario realizar estudios con muestras más numerosas.

Perspectivas:

Aunque es posible que aparezcan algunos nuevos polimorfismos candidatos en un futuro, lo que permitiría predicciones más exactas, la frecuencia de deportistas de alto nivel será claramente diferente de la predicción basada en sus posibilidades genéticas. Hay de hecho otros muchos aspectos que contribuyen a definir el "complejo rasgo" de deportista campeón que probablemente no puedan ser reducidos a ciertos polimorfismos genéticos (por ejemplo factores técnicos, cinemáticos, motivación, tolerancia al dolor).

6. CONCLUSIONES

En función de los objetivos inicialmente establecidos, y tras los resultados obtenidos en los dos estudios presentados en este trabajo, se procederá a enumerar las conclusiones finales.

De los genes candidatos considerados en este estudio, sólo se encontró asociación con el rendimiento deportivo en el caso de los polimorfismos ID del gen de la Enzima Conversora de la Angiotensina (ECA) y His63Asp del gen de la Hemocromatosis Hereditaria (HFE).

La distribución de estos polimorfismos no fue la misma para los grupos de ciclistas y remeros. En el caso del polimorfismo del gen *HFE* se observó un menor porcentaje de HH para los atletas y un mayor porcentaje para los remeros. En el caso del polimorfismo del gen *ECA* se observó un mayor porcentaje de DD en los ciclistas, un menor porcentaje de DI para los corredores y un menor porcentaje de II para los remeros.

La combinación de extrema resistencia *ECA* II y *ACTN3* XX, no se observó en ningún remero, pero si en cuatro ciclistas y cuatro corredores.

Por lo tanto es necesario considerar que dentro de la familia de los deportes de resistencia, se presentan diferencias importantes entre los mismos que habría que tener en cuenta en los estudios de genes candidatos.

No se encuentra asociación entre el perfil genotípico más deseable (Puntuación Genotípica Total), considerando los siete genes candidatos estudiados (*ECA*, *ACTN*, *AMPD*, *CKMM*, *HFE*, *GDF-8* y *PPARGC1A*), y la puntuación de medallas.

No se encuentran diferencias en el perfil genotípico (Puntuación Genotípica Total) entre remeros peso ligero de nivel nacional y remeros peso ligero de nivel mundial, aunque ambos presentan una puntuación más favorable que la población general.

El rendimiento deportivo está probablemente relacionado con el efecto combinado de cientos de variantes genéticas y además los aspectos que conformarían el “complejo rasgo” de ser un deportista de nivel mundial en un deporte dado son múltiples, y probablemente no puedan reducirse.

1. Sanderson, B.; Martindale, W. Towards optimizing rowing technique. *Med. Sci. Sports Exerc.* 18: 454-468, 1986.
2. Secher, N. H. Physiological and biomechanical aspects of rowing: Implications for training. *Sports Med.* 15: 24-42, 1993.
3. Ingen Schenau, G. J. Van; Cavanagh, P. R. Power equations in endurance sports. *J. Biomech.* 23: 965-881, 1990.
4. Affeld, K.; Schichl, K.; Ziemann, A. Assessment of rowing efficiency. *Int. J. Sports Med.* (14): 39-41, 1993.
5. Zatsiorsky, V. M.; Yakunin, N. Mechanics and biomechanics of rowing: A review. *International Journal of Sport Biomechanics.* 7 (3): 229-281, 1991.
6. Henry, J. C.; Clark, R. R.; McCabe, R. P.; Vanderby, R. An evaluation of instrumented tank rowing for objective assessment of rowing performance. *J. Sports Sci.* 13: 199-206, 1995.
7. Wagner, J.; Bartmus, U.; Marées, H. Three-axes gyro sistem quantifying the specific balance of rowing. *Int. J. Sports Med.* 14: 35-38, 1993.
8. Nolte, V. The inter-relationship between equipment adjustment and efficient technique. En: Report 15/16: FISA Coaches Conference 1986/1987. Minden: p. 153-175, 1998.
9. Kleshnev, V. Power in Rowing En: *International Research in Sports biomechanics.* Londres: Routledge, 2002.
10. Mäestu, J.; Jürimäe, J.; Jürimäe, T. Monitoring of performance and training in rowing. *Sports Med.* 35: 597-617, 2005.
11. Russo, E. G.; Gruppioni, G.; Guerresi, P.; Belcastro, M. G.; Maechesini, V. Skinfolds and body composition of sports participants. *J. Sports Med. Phys. Fitness.* 32: 303-313, 1992.
12. Hirata, K. I. *Selection of Olympic Champions.* Totota: Chukio University, 1979.
13. Lormes, W.; Debatin, H. J.; Grünert-Fuchs, M.; Müller, T.; Steinacker, M.; Stauch, M. Anaerobic rowing ergometer test: test design, applications and interpretation. En *Advances in Ergometry.* Berlin: Springer-Verlag, 1990.
14. Steinacker, J. M. Physiological aspects of training in rowing. *Int. J. Sports Med.* 14: 3-10, 1993.
15. Roth, W.; Schwanitz, P.; Pas, P.; Bauer, P. Force-time characteristics of the rowing stroke and corresponding physiological muscle adaptations. *Int. J. Sports Med.* 14: 32-34, 1993.
16. Steinacker, J. M.; Lormes, W.; Lehmann, M.; Altenburg, D. Training of rowers before world championships. *Med. Sci. Sports Exerc.* 30: 1158-63, 1998.
17. Dal Monte, A.; Komor, A. Rowing and sculling mechanics. En: *Biomechanics of Sports.* Florida: Vaughan, 1988.
18. Hartmann, U.; Mader, A.; Wasser, K.; Klauer, I. Peak force, velocity, and power during five and ten maximal rowing ergometer strokes by world class female and male rowers. *Int. J. Sports Med.* 14: 42-45, 1993.
19. Gayer, C. Physiological discriminators of rowing performance in male, club rowers. [Tesis doctoral], Washington State University, 1994.

20. Vermulst, L. J. M.; Vervoorn, C.; Boelens-Quist, A. M.; Koppeschaar, K. P.; Erich, W. B. M.; Thijssen, J. H. H.; Vries, W. R. Analyses of seasonal training volume and working capacity in elite female rowing. *Int. J. Sports Med.* 12: 567-572, 1991.
21. Shephard, R. J. Science and medicine of rowing: A review. *J. Sports Sci.* 16: 603-620, 1998.
22. Kramer, J. F.; Leger, A.; Paterson, D. H.; Morrow, A. Rowing performance and selected descriptive, field and laboratory variables. *Can. J. Appl. Physiol.* 19: 174-184, 1994.
23. Secher, N. H. Rowing. En: *Physiology of Sports*. Oxon: E & FN Spon. 1990.
24. Mikulic, P.; Ruzic, L.; Oreb, G. What distinguishes the Olympic level heavyweight rowers from other internationally successful rowers? *Coll. Antropol.* 31 (3): 811-816, 2007.
25. Fiskerstrand, A.; Seiler, K. S. Training and performance characteristics among Norwegian International Rowers 1970-2001. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 14: 303-310, 2004.
26. Secher, N. H. The physiology of rowing. *J. Sports Sci.* 1: 23-53, 1983.
27. Howald, H. Leistungsphysiologische Grundlagen des Ruderns. En *Rudern: Sportmedizinische und sportwissenschaftliche Aspekte*. Berlín, Springer, 1988.
28. Secher, N. H.; Ruberg-Larsen, N.; Binkhorst, R. A.; Bonde-Petersen, F. Máximal oxygen uptake during arm cranking and combined arms plus leg exercise. *J. Appl. Physiol.* 36: 515-518, 1974.
29. Secher, N. H.; Clausen, J. P.; Klausen, K.; Noer, I.; Trap-Jensen, J. Central and regional circulatory effects of adding arm exercise to leg exercise. *Acta Physiol. Scand.* 100: 288-297, 1977.
30. Chin, M. K.; So, C. H.; Perry, C. J.; Wong, S. K. Máximal Aerobic Power of Hong Kong Elite Lightweight Rowers. *J. Strength Cond. Res.* 8(2): 86-90, 1994.
31. Yoshiga, C. C.; Higuchi, M. Oxygen uptake and ventilation during rowing and running in females and males. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 13: 359-363, 2003.
32. Clifford, P. S.; Hanel, B.; Secher, N. H. Arterial blood pressure response to rowing. *Med. Sci. Sports Exerc.* 26: 715-719, 1994.
33. Cosgrove, M. J.; Wilson, J.; Watt, D.; Grant, S. F. The relationship between physiological variables of rowers and rowing performance as determined by a 2000 m ergometer test. *J. Sports Sci.* 17: 845-852, 1999.
34. Yoshiga, C. C.; Higuchi, M. Rowing performance of female and male rowers. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 13: 317-321, 2003.
35. Ingham, S. A.; Whyte, G. P.; Jones, K.; Nevill, A. M. Determinants of 2000 m. rowing ergometer performance in elite rowers. *Eur. J. Appl. Physiol.* 88 (3): 243-246, 2002.
36. Barrett, R. S.; Manning, J. M. Relationships between set-up, anthropometry, physical capacity, rowing kinematics and rowing performance. *Sports Biomech.* 3: 221-235, 2004.;
37. Bourdin, M.; Messonier, L.; Hager, J. P.; Lacour, J. R. Peak Power output predicts rowing ergometer performance in elite male rowers. *Int. J. Sports Med.* 25: 368-373, 2004.
38. Slater, G. J.; Rice, A. J.; Mujika, I.; Hahn, A. G.; Sharpe, K.; Jenkins D. G. Physique traits of lightweight rowers and their relationship to competitive success. *Br. J. Sports Med.* 39 (10): 736-741, 2005.

39. Khosla, T. Sport for tall. *Brit. Med. J.* 287: 736-738, 1983.
40. De Rose, E. H.; Crawford, S. M.; Kerr, D. A.; Ward, R.; Ross, W. D. Physique characteristics of Pan American Games lightweight rowers. *Int. J. Sports Med.* 10: 292-297, 1989.
41. Schep, G.; Bender, M. H. M.; Kaandorp, D.; Hammacher, E.; de Vries, W. R. Flow limitations in the iliac arteries in endurance athletes. Current knowledge and directions for the future. *Int. J. Sports Med.* 20: 421-428, 1999.
42. Padilla, S.; Mujika, I.; Orbañanos, J.; Angulo, F. Exercise intensity Turing competition time trials in professional road cycling. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32: 850-856, 2000.
43. Padilla, S.; Mujika, I.; Angulo, F.; Goiriena, J. J. Scientific approach to the record: a case study. *J. Appl. Physiol.* 89: 1522-1527, 2000.
44. Fernández-García, B.; Pérez-Landaluce, J.; Rodríguez-Alonso, M.; Terrados, N. Intensity of exercise Turing road race pro-cycling competition. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32: 1002-1006, 2000.
45. Padilla, S.; Mujika, I.; Cuesta, G.; Goiriena, J. J. Level Grand and uphill cycling ability in professional road cycling. *Med. Sci. Sports Exerc.* 31: 878-885, 1999.
46. Lucia, A.; Hoyos, J.; Carvajal, A.; Chicharro, J. L. Preferred pedaling cadence in professional cycling. *Med. Sci. Sports Exerc.* 33: 1361-1366, 2001.
47. Lucia, A.; Hoyos, J.; Chicharro, J. Physiological response to professional road cycling: climbers vs. time trialists. *Int. J. Sports Med.* 21: 505-512, 2001.
48. Coyle, E. F.; Sidossis, L. S.; Horowitz, J. F.; Beltz, J. D. Cycling efficiency is related to the percentage of type I muscle fibers. *Med. Sci. Sports Exerc.* 24: 782-788, 1992.
49. Lucia, A.; Esteve-Lanao, J.; Oliván, J.; Gómez-Gallego, F.; San Juan, A. F.; Santiago, C.; Pérez, M.; Chamorro-Viña, C.; Foster, C. Physiological characteristics of the best Eritrean runners-exceptional running economy. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 31 (5): 530-440, 2006.
50. Saltin, B.; Larsen, H.; Terrados, N.; Bangsbo, J.; Bak, T.; Kim, C. K.; Svedenhag, J.; Rolf, C. J. Aerobic exercise capacity at sea level and at altitude in Kenyan boys, junior and senior runners compared with Scandinavian runners. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 5: 209-221, 1995.
51. Doherty, M.; Nobbs, L.; Noakes, T. D. Low frequency of the "plateau phenomenon" during maximal exercise in elite British athletes. *Eur. J. Appl. Physiol.* 89: 619-623, 2003.
52. Coetzer, P.; Noakes, T. D.; Sanders, B.; Lambert, M. I.; Bosh, A. N.; Wiggins, T.; Dennis, S. C. Superior fatigue resistance of elite black South African distance runners. *J. Appl. Physiol.* 75: 1822-1827, 1993.
53. Weston, A. R.; Mbambo, Z.; Myburgh, K. H. Running economy of African and Caucasian distance runners. *Med. Sci. Sports Exerc.* 23: 1130-1134, 2000.
54. Bosco, C.; Montanari, G.; Ribacchi, R.; Giovenali, P.; Latteri, F.; Iachelli, G. et al. Relationship between the efficiency of muscular work during jumping and the energetics of running. *J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 56: 138-143, 1987.
55. Kaneko, M. Mechanics and energetics in running with special reference to efficiency. *J. Biomech.* 23 (1): 57-63, 1990.

56. Saltin, B.; Kim, C. K.; Terrados, N.; Larsen, H.; Svedenhag, J.; Rolf, C. J. Morphology, enzyme activities and buffer capacity in leg muscles of Kenyan and Scandinavian runners. *Scan. J. Med. Sci. Sports*. 5: 222-230, 1995.

57. Williams, K. R.; Cavanagh, P. R. Relationship between distance running mechanics, running economy, and performance. *J. Appl. Physiol.* 63: 1236-1245, 1987.

58. Bouchard, C.; Malina, R. M.; Perusse, L. *Genetics of Fitness and Physical Performance*. Champaign: Human Kinetics Publishers, 1997.

59. Neiderhiser, J. M. Understanding the roles of genome and envirome: methods in genetic epidemiology. *Br. J. Psychiatr.* 178: 12-17, Supplement 2001.

60. Rankinen, T.; Wolfarth, B.; Simoneanu, J. A.; Maier-Lenz, D.; Rauramaa, R.; Rivera, M. A.; Boulay, M. R.; Chagnon, Y. C.; Pérusse, L.; Keul, J.; Bouchard, C. No association between the angiotensin-converting enzyme ID polymorphism and elite endurance athlete status. *J. Appl. Physiol.* 88: 1571-1575, 2000.

61. Bray, M. S.; Hagberg, J. M.; Pérusse, L.; Rankinen, T.; Roth, S. M.; Wolfarth, B.; Bouchard, C. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2006-2007 update. *Med. Sci. Sports Exerc.* 41(1):35-73, 2009.

62. Kathiresan, S.; Melander, O.; Anevski, D.; Giuducci, C.; Burt, N. P.; Roos, C.; Hirschhorn, J. N.; Berglund, G.; Hedblad, B.; Groop, L.; Altshuler, D. M.; Newton-Cheh, C.; Orho-Melander, M. Polymorphisms associated with cholesterol and risk of cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.* 358 (12): 1240-1249, 2008.

63. North, K. N.; Yang, N.; Wattanasirichaigoon, D.; Mills, M.; Eastale, S.; Eastale, S.; Beggs, A. H. A common nonsense mutation results in α -actinin-3 deficiency in the general population. *Nat. Genet.* 21: 353-354, 1999.

64. Rankinen, T.; Bray, M. S.; Hagberg, J. M.; Perusse, L.; Roth, S. M.; Wolfarth, B.; Bouchard, C. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2005 update. *Med. Sci. Sports Exerc.* 38: 1863-1888, 2006.

65. Blanchard, A.; Ohanian, V.; Critchley, D. The structure and function of α -actinin. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 10:280-289, 1989.

66. MacArthur, D. G.; North, K. N. A gene for speed? The evolution and function of α -actinin-3. *BioEssays*. 26: 786-795, 2004.

67. Vincent, B.; De Bock, K.; Ramaekers, M.; Van den Eede, E.; Van Leemputte, M.; Hespel, P. J.; Thomis, M. A. The ACTN3 (R577X) genotype is associated with fiber type distribution. *Physiol. Genom.* 32: 58-63, 2007.

68. Yang, N.; MacArthur, D. G.; Gulbin, J. P.; Hahn, A. G.; Beggs, A. H.; Eastale, S. H.; North, K. ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance. *Am. J. Hum. Genet.* 73: 627-63, 2003.

69. Druzhetskaya, A. M.; Ahmetov, I. I.; Astratenkova, I. V.; Rogozkin, V. A. Association of the ACTN• R577X polymorphism with power athlete status in Russians. *Eur. J. Appl. Physiol.* 103: 631-634, 2008.

70. Lucía, A.; Gómez-Gallego, F.; Santiago, C.; Bandrés, F.; Earnest, C.; Rabadán, M.; Alonso, J. M.; Hoyos, J.; Córdova, A.; Villa, G.; Foster, C. ACTN3 Genotype in Professional Endurance Cyclists. *Int. Sports Med.* 27: 880-884, 2006.

71. Niemi, A. K.; Majamaa, K. Mitochondrial DNA and ACTN3 genotypes in Finnish elite endurance and sprint athletes. *Eur. J. Hum. Genet.* 13 (8): 965-969, 2005.

72. MacArthur, D. G.; Seto, J. T.; Raftery, J. M.; Quinlan, K. G.; Huttley, G. A.; Hook, J. W.; Lemckert, F. A.; Kee, A. J.; Edwards, M. R.; Berman, Y.; Hardeman, E. C.; Gunning, P. W.; Eastale, S.; Yang, N.; North, K. N. Loss of ACTN3 gene function alters mouse muscle metabolism and shows evidence of positive selection in humans. *Nat. Genet.* 39(10): 1261-1265, 2007.

73. North, K. N. Why is alpha-actinin 3 deficiency so common in the general population? The evolution of athletic performance. *Twin. Res. Hum. Genet.* 11(4): 384-394, 2008.

74. Yang, N.; MacArthur, D. G.; Wolde, B.; Onywera, V. O.; Boit, M. K.; Wilson, R. H.; Scott, R. A.; Pitsiladis, Y. P.; North, K. ACNT3 genotype is not associated with elite endurance status in Ethiopians and Kenyans. *Med. Sci. Sports Exerc.* 37: S472, 2005.

75. Saunders, C. J.; September, A. V.; Xenophontos, S. L.; Cariolou, M. A.; Anastassiades, L. C.; Noakes, T. D.; Collins, M. No associations of the ACTN3 gene R577X polymorphism with endurance performance in Ironman Triathlons. *Ann Hum Genet.* 71 (6): 777-781, 2007.

76. MacArthur, D. G.; North, K. N. ACTN3: A genetic influence on muscle function and athletic performance. *Exerc. Sport Sci Rev.* 35(1): 30-34, 2007.

77. Roth, S. M.; Walsh, S.; Liu, D.; Metter, E. J.; Ferrucci, L.; Hurley, B. F. The ACTN3 R577X nonsense allele is under-represented in elite-level strength athletes. *Eur. Hum. Genet.* 16 (3): 391-394, 2008.

78. Lucia, A.; Oliván, J.; Gómez-Gallego, F.; Santiago, C.; Montil, M.; Foster, C. Citius and Longius (faster and Langer) with no alpha-actinin-3 in skeletal muscles?. *Br. J. Sports Med.* 41 (9): 616-617, 2007.

79. Norman, B.; Esbjörnsson, M.; Rundqvist, H.; Osterlund, T.; von Walden, F.; Tesch, P. A. Strength, power, fiber types, and mRNA expression in trained men and women with different ACTN3 R577X genotypes. *J Appl Physiol.* 106 (3):959-65, 2009.

80. Clarkson, P. M.; Devaney, J. M.; Gordish-Dressman, H.; Thompson, P. D.; Hubal, M. J.; Urso, M.; Price, T. B.; Angelopoulos, T. J.; Gordon, P. M.; Moyna, N. M.; Pescatello, L. S.; Visich, P. S.; Zoeller, R. F.; Seip, R. L.; Hoffman, E. P. ACTN3 genotype is associated with increases in muscle strength in response to resistance training in women. *J Appl Physiol.* 99 (1):154-63, 2005.

81. Guyton, A. C. *Tratado de Fisiología médica*. 10ª ed. Madrid: Ed McGraw-Hill Interamericana, 2001.

82. Kem, D. C.; Brown, R. D. Renin from beginning to end. *N Engl J Med.* 323 (16):1136-1137, 1990.

83. Sonna, L. A.; Sharp, M. A.; Knapik, J.; Cullivan, M.; Angel, K. C.; Patton, J. F.; Lilly, C. M. Angiotensin-converting enzyme genotype and physical performance during US Army basic training. *J. Appl. Physiol.* 91 (3): 1355-63, 2001.

84. Rieder, M. J.; Taylor, S. L.; Clark, A. G.; Nickerson, D. A. Sequence variation in the human angiotensin converting enzyme. *Nat. Genet.* 22 (1): 59-62, 1999.

85. Jones, A.; Montgomery, H. E.; Woods, D. R. Human performance: a role for the ACE genotype? *Exerc. Sport Sci. Rev.* 30:184-190, 2002.

86. Tired, L.; Rigat, B.; Visvikis, S.; Breda, C.; Corvol, P.; Cambien, F.; Soubrier, F. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet.* 51 (1): 197-205, 1992.

87. Bassett, D. R.; Howley, E. T. Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. *Med Sci Sports Exerc.* 32: 70-84, 2000.

88. Montgomery, H. E.; Marshall, H.; Myerson, S.; Clarkson, P.; Dollery, C.; Hayeard, M.; Holliman, D. E.; Jubb, M.; World, M.; Thomas, E. L.; Brynes, A. E.; Saeed, N.; Barnard, M.; Bell, J. D.; Prasard, K.; Rayson, M.; Talmud, P. J.; Humphries, S. E. Human gene for physical performance. *Nature*. 393: 221-222, 1998.
89. Gayagay, G.; Yu, B.; Hambly, B.; Boston, T.; Hahn, A.; Celermajer, D. S.; Trent, R. J. Elite endurance athletes and the ACE I allele, the role of genes in athletic performance. *Hum Genet*. 103:48-50, 1998.
90. Myerson, S.; Hemingway, H.; Budget, R.; Martin, J.; Humphries, S.; Montgomery, H. Human angiotensin I-converting enzyme gene and endurance performance. *J Appl Physiol*. 87: 1313-1316, 1999.
91. Alvarez, R.; Terrados, N.; Ortolano, R.; Iglesias-Cubero, G.; Reguero, J. R.; Batalla, A.; Cortina, A.; Fernández-García, B.; Rodríguez, C.; Braga, S.; Alvarez, V.; Coto, E. Genetic variation in the renin-angiotensin system and athletic performance. *Eur.J.Appl.Physiol*. 82: 117-120, 2000.
92. Nazarov, I. B.; Woods, D. R.; Montgomery, H. E.; Shneider, O. V.; Kazakov, V. I.; Tomilin, N. V.; Rogozkin, V. A. The angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in Russian athletes. *Eur. J. Hum. Genet*. 9: 797-801, 2001.
93. Lucía, A.; Gómez-Gallego, F.; Chicharro, J. L.; Hoyos, J.; Celaya, K.; Córdova, A.; Villa, G.; Alonso, J. M.; Barriopedro, M.; Pérez, M.; Earnest, C. Is there an Association between ACE and CKMM Polymorphisms and Cycling Performance Status Turing 3-Week Races? *Int. J. Sports Med*. 26(6): 442-447, 2005.
94. Scanavini, D.; Bernardi, F.; Castoldi, E.; Conconi, F.; Mazzoni, G. Increased frequency of the homozygous II ACE genotype in Italian Olympic endurance athletes. *Eur. J. Hum. Genet*. 10: 576-577, 2002.
95. Collins, M.; Xenophontos, S. L.; Cariolou, M. A.; Mokone, G. G.; Hudson, D. E.; Anastasiades, L.; Noakes, T. D. The ACE Gene and Endurance Performance during the South African Ironman Triathlons. *Med. Sci. Sports Exerc*. 36 (8): 1314-1320, 2004.
96. Jones, A.; Woods, D. R. Skeletal muscle RAS and exercise performance. *Int. J. Biochem. Cell. Biol*. 35: 855-866, 2003.
97. Zhang, B.; Tanaka, H.; Shono, N.; Miura, S.; Kiyonaga, A.; Shindo, M.; Saku, K. The I allele of the angiotensin-converting enzyme gene is associated with an increased percentage of slow twitch type I fibres in human muscle. *Clin. Genet*. 63: 139-144, 2003.
98. Silvestre, J. S.; Bergaya, S.; Tamarat, R.; Duriez, M.; Boulanger, C. M.; Levy, B. I. Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin B(2) receptor pathway. *Circ Res*. 89 (8): 678-83, 2001.
99. Folland, J.; Leach, B.; Little, T.; Hawker, K.; Myerson, S.; Montgomery, H.; Jones, D. Angiotensin-converting enzyme genotype affects the response of human skeletal muscle to functional overload. *Exp Physiol*. 85: 575-579, 2000.
100. Scott, R. A.; Moran, C.; Wilson, R. H.; Onywera, V.; Boit, M. K.; Goodwin, W. H.; Gohlke, P.; Payne, J.; Montgomery, H.; Pitsiladis, Y. P. No association between Angiotensin Converting Enzyme (ACE) gene variation and endurance athlete status in Kenians. *Comp. Biochem. Physiol*. 2005; 141 (2): 169-175.
101. Taylor, R. R.; Mamotte, C. D.; Fallon, K.; van Bockxmeer, F. M. Elite athletes and the gene for angiotensin-converting enzyme. *J. Appl. Physiol*. 87: 1035-1037, 1999.
102. Finck, B. N.; Kelly, D. P. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest*. 116(3): 615-622, 2006.

103. Esterbauer, H.; Oberkofler, H.; Krempler, F.; Patsch, W. Human peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 (PPARGC1) gene: cDNA sequence, genomic organization, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics*. 62(1):98-102, 1999.
104. Lucía, A.; Gómez-Gallego, F.; Barroso, I.; Rabadán, M.; Bandrés, F.; San Juan, A. F.; Chicharro, J. L.; Ekelund, U.; Brage, S.; Earnest, C. P.; Wareham, N. J.; Franks, P. W. PPARGC1A genotype (Gly482Ser) predicts exceptional endurance capacity in European men. *J Appl Physiol*. 99: 344-348, 2005.
105. Puigserver, P.; Spiegelman, B. M. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-[gamma] Coactivator 1[alpha] (PGC-1[alpha]): Transcriptional Coactivator and Metabolic Regulator. *Endocr Rev*. 24: 78-90, 2003.
106. Terada, S.; Tabata, I. Effects of acute bouts of running and swimming exercise on PGC-1alpha protein expression in rat epitrochlearis and soleus muscle. *Am. J. Physiol Endocrinol Metab*. 286: 208-216, 2004.
107. Tunstall, R. J.; Mehan, K. A.; Wadley, G. D.; Collier, G. R.; Bonen, A.; Hargreaves, M.; Cameron-Smith, D. Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol Endocrinol Metab*. 283: 66-72, 2002.
108. Lin, J.; Wu, H.; Tarr, P. T.; Zhang, C. Y.; Wu, Z.; Boss, O.; Michael, L. F.; Puigserver, P.; Isotani, E.; Olson, E. N.; Lowell, B. B.; Bassel-Duby, R.; Spiegelman, B. M. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*. 418: 797-801, 2002.
109. Wang, Y. X.; Lee, C. H.; Tiep, S.; Yu, R. T.; Ham, J.; Kang, H.; Evans, R. M. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*. 113(2): 159-70, 2003.
110. Wang, Y. X.; Zhang, C. L.; Yu, R. T.; Cho, H. K.; Nelson, M. C.; Corinne, R.; Bayuga-Ocampo, C. R.; Ham, J.; Kang, H.; Ronald, M.; Evans, R. M. Regulation of Muscle Fiber Type and Running Endurance by PPARδ. *PLoS Biol*. 2 (10): e 294, 2004.
111. Stefan, N.; Thamer, C.; Staiger, H.; Machicao, F.; Machann, J.; Schick, F.; Venter, C.; Niess, A.; Laakso, M.; Fritsche, A.; Häring, H. U. Genetic variations in PPARG and PPARGC1A determine mitochondrial function and change in aerobic physical fitness and insulin sensitivity during lifestyle intervention. *J. Clin. Endocrinol Metab*. 92 (5): 1827-33, 2007.
112. Kunej, T.; Globocnik Petrovic, M.; Dovc, P.; Peterlin, B.; Petrovic, D. A Gly482Ser polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (PGC-1) gene is associated with type 2 diabetes in Caucasians. *Folia Biol*. 50 (5): 157-158, 2004.
113. Sun, L.; Yang, Z.; Jin, F.; Zhu, X. Q.; Qu, Y. C.; Shi, X. H.; Wang, L. The Gly482Ser variant of the PPARGC1 gene is associated with Type 2 diabetes mellitus in northern Chinese, especially men. *Diabet Med*. 23 (10): 1085-92, 2006.
114. Muller, Y. L.; Bogardus, C.; Pedersen, O.; Baier, L. A. Gly482Ser missense mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 is associated with altered lipid oxidation and early insulin secretion in Pima Indians. *Diabetes*. 52 (3): 895-898, 2003.
115. Baar, K.; Wende, A. R.; Jones, T. E.; Marison, M.; Nolte, L. A.; Chen, M.; Kelly, D. P.; Holloszy, J. O. Adaptations of muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J*. 16 (14): 1879-1886, 2002.
116. Got, M.; Terada, S.; Kato, M.; Katoh, M.; Yokozeki, T.; Tabata, I.; Shimokawa, T.; cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 274 (2): 350-354, 2000.

117. Mathai, A. S.; Bonen, A. ; Benton, C. R. ; Robinson, D. L.; Graham, T. E. Rapid exercise-induced changes in PGC-1alpha mRNA and protein in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 105 (4): 1098-105, 2008.
118. Norrbom, J.; Sundberg, C. J.; Ameln, H.; Kraus, W. E.; Jansson, E.; Gustafsson, T. PGC-1alpha mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 96 (1): 189-94, 2004.
119. Pilegaard, H.; Saltin, B.; Neufer, P. D. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. *J. Physiol.* 546: 851-858, . 2003.
120. Russell, A. P; Feilchenfeldt, J.; Schreiber, S.; Praz, M.; Crettenand, A.; Gobelet, C.; Meier, C. A.; Bell, D. R.; Kralli, A.; Giacobino, J. P.; Dériaz, O. Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes.* 52 (12): 2874-2881, 2003.
121. Short, K. R.; Vittone, J. L.; Bigelow, M. L.; Proctor, D. N.; Rizza, R. A.; Coenen-Schimke, J. M.; Nair, K. S. Impact of aerobic exercise training on age-related changes in insulin sensitivity and muscle oxidative capacity. *Diabetes.* 52: 1888-1896, 2003.
122. Calvo, J. A.; Daniels, T. G.; Wang, X.; Paul, A.; Lin, J.; Spiegelman, B. M.; Stevenson, S. C.; Rangwala, S. M. Muscle-specific expression of PPAR coactivator-1 improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. *J. Appl. Physiol.* 104 (5): 1304-1312, 2008.
123. Wende, A. R.; Schaeffer, P. J.; Parker, G. J.; Zechner, C.; Han, D. H.; Chen, M. M.; Hancock, C. R.; Lehman, J. J.; Huss, J. M.; McClain, D. A.; Holloszy, J. O.; Kelly, D. P. A role for the transcriptional coactivator PGC-1alpha in muscle refueling. *J. Biol. Chem.* 282 (50): 36642-36651, 2007.
124. He, Z.; Hu, Y.; Feng, L.; Bao, D.; Wang, L.; Li, Y.; Wang, J.; Liu, G.; Xi, Y.; Wen, L.; Lucia, A. Is there an association between PPARGC1A genotypes and endurance capacity Chinese men? *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 18 (2): 195-204, 2008.
125. Eynon, N.; Meckel, Y.; Sagiv, M.; Yamin, C.; Amir, R.; Sagiv, M.; Goldhammer, E.; Duarte, J. A.; Oliveira, J. Do PPARGC1A and PPAR alpha polymorphisms influence sprint or endurance phenotypes? *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 20 (1): 145-50, 2010.
126. Gross, M. Clinical Heterogenety and molecular mechanism in inborn muscle AMP deaminase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 20: 186-192, 1997.
127. Lowenstein, J. M. Ammonia production in muscle and other tissues: The purine nucleotide cycle. *Physiol. Rev.* 52:382-413, 1972.
128. Fishbein, W. N.; Armbrustmacher, V. W.; Griffin, J. L. Myoadenylate deaminase deficiency: a new disease of muscle. *Science.* 299: 545-548, 1978.
129. Norman, B.; Glenmarc, B.; Jansson, E. Muscle AMP deaminase deficiency of a healthy population. *Muscle & Nerve.* 18:239-241, 1995.
130. Fishbein, W. N. Lactate transporter defect: a new disease of muscle. *Science,* 234: 1254-1256, 1986.
131. Sabina, R.L.; Swain, J.L.; Holmes, E.W. *Myoadenylate deaminase deficiency.* 6. New York: Beaudet, A.L., Sly, W.S.; Valle, D. eds, 1989.

132. Sabina, R. L.; Morasaki, T.; Clarke, P.; Eddy, R.; Shows, T. B.; Morton, C. C.; Holmes, E. W. Characterization of the human and rat myoadenylate deaminase genes. *J. Biol. Chem.* 265: 9423-9433, 1990.
133. Sabina, R. L.; Swain, J. I.; Holmes, E. W. Functional and biochemical evidence of the importance of the purine nucleotide cycle in muscle. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 20: 414, 1982.
134. Sabina, R. L.; Ogasawara, N.; Holmes, E. W. Expression of three stage-specific transcripts of AMP deaminase during myogenesis. *Molec. Cell. Biol.* 9: 2244-2246, 1984.
135. Verzijl, H. T.; Engelen, B. G van; Luyten, J. A.; Steenbergen, G. C.; Heuvel, L. P. van den; Laak, H. J. Ter; Padberg, G. W.; Wevers, R. A. Genetic characteristics of myoadenylate deaminase deficiency. *Ann. Neurol.* 44:140-143, 1998.
136. Vladutiu, G. D. Complex phenotypes in metabolic muscle diseases. *Muscle & Nerve.* 23:1157-1159, 2000.
137. Broberg, S.; Sahlin, K. Adenine nucleotide degradation in human skeletal muscle during prolonged exercise. *J. Appl. Physiol.* 67: 116-122, 1989.
138. Norman, B.; Sollevi, A.; Kaijser, L.; Jansson, E. ATP breakdown products in human muscle during prolonged exercise to exhaustion, *Clin. Physiol.* 7: 503-509, 1987.
139. Norman, B.; Sollevi, A.; Jansson, E. Increased IMP content in glycogen-depleted muscle fibres during submaximal exercise in man. *Acta Physiol. Scand.* 133: 97-100, 1988.
140. Rubio, J. C.; Martín, M. A.; Rabadán, M. et al. Frequency of the C23T mutation of the AMPD1 gene in world-class endurance athletes: does this mutation impair performance? *J. Appl. Physiol.* 98: 2108-2112, 2005.
141. Lucía, A.; Martín, M. A.; Esteve-Lanao, J.; San Juan, A. F.; Rubio, J. C.; Oliván, J.; Arenas, J. C34T mutation of the AMPD1 gene in an elite runner. *Br. J. Sports Med.* 40 (3):e7, 2006.
142. Nigro, J. M.; Schweinfest, C. W.; Rajkovic, J.; Jamal, S.; Dottin, R. P.; Hart, J. T.; Kamarc, M. E.; Rae, P. M. M.; Carty, M. D.; Martin-De Leon P. C. DNA cloning and mapping of the human creatine kinase M gene to 19q13. *Am. J. Hum. Genet.* 40: 115-125, 1987.
143. Dawson, D. M.; Eppenberger, H. M.; Eggstein, M. Multiple molecular forms of creatine kinases. *Ann NY Acad Sci.* 151: 616-626, 1968.
144. Grace, A. M.; Perryman, M. B.; Roberts, R. Purification and characterization of human mitochondrial creatine kinase. *J. Biol. Chem.* 258: 15346-15354, 1983.
145. Echegaray, M.; Rivera, M. A. Role of creatine kinase isoenzymes on muscular and cardiorespiratory endurance. Genetic and molecular evidence. *Sports Med.* 31: 919-934, 2001.
146. Rivera, M. A.; Dionne, F. T.; Wolfarth, B.; Chagnon, M.; Simoneau, J. A.; Pérusse, L.; Boulay, M. R.; Gagnon, J.; Song, T. M. K.; Keul, J.; Bouchard, C. Muscle-specific creatine kinase gene polymorphisms in elite endurance athletes and sedentary controls. *Med. Sci. Sports Exerc.* 29: 1444-1447, 1997.
147. Yamashita, K.; Yoshioka, T. Profiles of creatine kinase isoenzyme compositions in single muscle fibers of different types. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 12: 37-44, 1991.
148. Crow, M. T.; Kushmerick, M.J. Chemical energetic of slow- and fast-twitch muscles of the mouse. *J. Gen. Physiol.* 79:147-166, 1982.

149. Rivera, M. A.; Dionne, F. T.; Simoneau, J. A.; Perusse, L.; Chagnon, M.; Chagnon, Y.; Gagnon, J.; Leon, A. S.; Rao, D. C.; Skinner, J. S.; Wilmore, J. H.; Bouchard, C. Muscle-specific creatine kinase gene polymorphism and $\text{VO}_2\text{máx}$ in the HERITAGE Family Study. *Med. Sci. Sports Exerc.* 29: 1311-1317, 1997.
150. Rivera, M. A.; Perusee, L.; Simoneau, J. A.; Gagnon, J.; Dionne, F. T.; Leon, A. S.; Skinner, J. S.; Wilmore, J. H.; Province, M.; Rao, D. C.; Bouchard, C. Linkage between a muscle-specific CK gene markers and $\text{VO}_2\text{máx}$ in the HERITAGE Family Study. *Med. Sci. Sports Exerc.* 31: 698-701, 1999.
151. Gonzalez-Cadavid, N. F.; Taylor, W. E.; Yarasheski, K.; Sinha-Hikim, I.; Ma, K.; Ezzat, S.; Shen, R.; Lalani, R.; Asa, S.; Mamita, M.; Nair, G.; Arver, S.; Bhasin, S. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 14938-14943, 1998.
152. McPherron, A. C.; Lee, S. J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:12457-12461, 1997.
153. McPherron, A. C.; Lawler, A. M.; Lee, S. J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature.* 387: 83-90, 1997.
154. Grobet, L.; Martin, L.J.; Poncelet, D.; Brouwers, B.; Riquet, J.; Schoeberlein, A.; Dunner, S.; Ménéssier, F.; Massabanda, J.; Fries, R.; Hanset, R.; Georges, M. A. Deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat. Genet.* 17: 71-74, 1997.
155. Bogdanovich, S.; Krag, T. O.; Barton, E. R.; Morris, L. D.; Whittemore, L. A.; Ahima, R. S.; Khurana, T. S. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature.* 420: 418-421, 2002.
156. Zimmers, T. A.; Davies, M. V.; Koniaris, L. G.; Haynes, P.; Esquela, A. F.; Tomkinson, K. N.; McPherron, A. C.; Wolfman, N. M.; Lee, S. J. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science.* 296: 1486-1488, 2002.
157. Sharma, M.; Langley, B.; Bass, J.; Kambadur, R. Myostatin in muscle growth and repair. *Exerc Sport Sci. Rev.* 29 (4): 155-158, 2001.
158. Mendias, C. L.; Bakhurin, K. I.; Faulkner, J. A. Tendons of myostatin-deficient mice are small, brittle, and hypocellular. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 105: 388-393, 2008.
159. Mosher, D. S.; Quignon, P.; Bustamante, C. D.; Sutter, N. B.; Mellersh, C. S.; Parker, H. G.; Ostrander, E. A. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet.* 3: e79, 2007.
160. Ferrell, R. E.; Conte, V.; Lawrence, E. C.; Roth, S. M.; Hagbeg, J. M.; Hurley, B. F. Frequent sequence variation in the human myostatin (GDF8) gene as a marker for analysis of muscle-related phenotypes. *Genomics.* 62: 203-207, 1999.
161. Huygens, W.; Thomis, M. A.; Peeters, M. W.; Vlietinck, R. F.; Beunen, G. P. Determinants and upper-limit heritabilities of skeletal muscle mass and strength. *Can. J. Appl. Physiol.* 29: 186-200, . 2004.
162. Seibert, M. J.; Xue, Q. L.; Fried, L. P.; Walston, J. D. Polymorphic variation in the human myostatin (GDF-8) gene and association with strength measures in the Women's Health and Aging Study II cohort. *J. Am. Geriatr. Soc.* 49: 1093-1096, 2001.
163. Ivey, F. M.; Roth, S. M.; Ferrell, R. E.; Tracy, B. L.; Lemmer, J. T.; Hurlbut, D. E.; Martel, G. F.; Siegel, E. L.; Fozard, J. L.; Jeffrey, M. E.; Fleg, J. L.; Hurley, B. F. Effects of age, gender, and myostatin genotype on the hypertrophic response to heavy resistance strength training. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 55: M641-M648, 2000.

164. Feder, J. N.; Gnirke, A.; Thomas, W.; Tsuchihashi, Z.; Ruddy, D. A.; Basava, A.; Dormishian, F.; Domingo, R. Jr.; Ellis, M. C.; Fullan, A.; Hinton, L. M.; Jones, N. L.; Kimmel, B. E.; Kronmal, G. S.; Lauer, P.; Lee, V. K.; Loeb, D. B.; Mapa, F. A.; McClelland, E.; Meyer, N. C.; Mintier, G. A.; Moeller, N.; Moore, T.; Morikang, E.; Prass, C. E.; Quintana, L.; Starnes, S. M.; Schatzman, R. C.; Brunke, K. J.; Drayna, D. T.; Risch, N. J.; Bacon, B. R.; Wolff, R. K. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat. Genet.* 13 (4): 399-408, 1996.
165. Bacon, B. R. Hemochromatosis: diagnosis and management. *Gastroenterology.* 120: 718-725, 2001.
166. Bothwell, T. H.; MacPhail, A. P. Hereditary hemochromatosis: etiologic, pathologic, and clinical aspects. *Semin. Hematol.* 1: 55-71, 1998.
167. Powell, L.W.; Isselbacher, K.J. *Hemochromatosis.* 12. New York: Wilson, J.D.; Braunwald, E.; Isselbacher, K.J.; et al. eds, 1991.
168. Moinrad, R.; Adams, P. C.; Bicheler, V.; Brissot, P.; Deugnier, Y. Clinical features of genetics hemochromatosis in women compared with men. *Ann. Intern. Med.* 127: 105-110, 1997.
169. Merryweather-Clarke, A. T.; Pointon, J. J.; Shearman, J. D.; Robson, K. J. H. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J. Med. Genet.* 34: 275-278, 1997.
170. Ryan, E.; O'Keane, C.; Crowe, J. Hemochromatosis in Ireland and HFE. *Blood Cells Molecules Dis.* 24: 428-432, 1998.
171. Merryweather-Clarke, A. T.; Pointon, J. J.; Jouanolle, A. M.; Rochette, J.; Robson, K. J. Geography of HFE C282Y and H63D mutations. *Genet. Test.* 4: 183-98, 2000.
172. Carella, M.; D'Ambrosio, L.; Totaro, A.; Grifa, A.; Valentino, M. A.; Piperno, A.; Girelli, D.; Roetto, A.; Franco, B.; Gasparini, P.; Camaschella, C. Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 828-832, 1997.
173. Milman, N. ; Pedersen, P. Evidence that the cys282-to-tyr mutation of the HFE gene originated from a population in southern Scandinavia and spread with the Vikings. *Clin. Genet.* 64: 36-47, 2003.
174. Rochette, J.; Pointon, J. J.; Fisher, C. A.; Perera, G.; Arambepola, M.; Kodikara, Arichchi, D. S.; De Silva, S.; Vandwalle, J. L.; Monti, J. P.; Old, J. M.; Merryweather-Clarke, A. T.; Weatherall, D. J.; Robson, K. J. H. Multicentric origin of hemochromatosis gene (HFE) mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 1056-1062, 1999.
175. Roth, M. P.; Giraldo, P.; Hariti, G.; Poloni, E. S.; Sanchez-Mazas, A.; De Stefano, G. F.; Dugoujon, J. M.; Coppin, H. Absence of the hemochromatosis gene Cys282Tyr mutation in three ethnic groups from Algeria (Mzab), Ethiopia, and Senegal. *Immunogenetics.* 46: 222-225, 1997.
176. Moreno, L.; Vallcorba, P.; Boixeda, D.; Cabello, P.; Bermejo, F.; San Roman, C. The usefulness of the detection of Cys282Tyr and His63Asp mutations in the diagnosis of hereditary hemochromatosis. *Rev. Clin. Esp.* 199: 632-636, 1999.
177. Porto, G.; Alves, H.; Rodrigues, P.; Cabeda, J. M.; Portal, C.; Ruivo, A.; Justica, B.; Wolff, R.; De Sousa, M. H63D mutation, HLA-A29, and non-classical forms of hemochromatosis. *Immunogenetics.* 47 (5):404-10, 1998.
178. Deugnier, Y.; Loréal, O.; Carré, F.; Duvallet, A.; Zoulim, F.; Vinel, J. P.; Paris, J. C.; Blaison, D.; Moirand, R.; Turlin, B.; Gandon, Y.; David, V.; Mégret, A.; Guinot, M. Increased body iron stores in elite road cyclists. *Med. Sci. Sports Exerc.* 34 (5): 876-880, 2002.

179. Chicharro, J.; Hoyos, J.; Gomez-Gallego, F.; Villa, J.; Bandres, F.; Celaya, P.; Jimenez, F.; Alonso, J.; Cordova, A.; Lucia, A. Mutations in the hereditary haemochromatosis gene HFE in professional endurance athletes. *Br. J. Sports Med.* 38 (4): 418-421, 2004.
180. Úbeda, N.; González-Medina, A.; Palacios, N.; Luis-Celada, O.; González, S.; García-Juan, B.; Iglesias-Gutiérrez, E. Prevalencia de las mutaciones C282Y, H63D, y S65C del gen de la hemocromatosis hereditaria en deportistas de élite. *Archivos de medicina del deporte.* 121: 350-354, 2007.
181. Isa, M. N.; Boyd, E.; Morrison, N.; Theriault, A.; Connor, J. M.; Harrap, S.; Clauser, E. Regional chromosomal localization of the human angiotensinogen gene to 1q4.42-4.43 band. *Am. J. Hum. Genet.* 45: 144, 1989.
182. Gaillard, I.; Clauser, E.; Corvol, P. Structure of human angiotensinogen gene. *DNA.* 8: 87-99, 1989.
183. Nakajima, T.; Jorde, L. B.; Ishigami, T.; Umemura, S.; Emi, M.; Lalouel, J. M.; Inoue, I. Nucleotide diversity and haplotype structure of the human angiotensinogen gene in two populations. *Am J Hum Genet.* 70: 108-123, 2002.
184. Bae, J. S.; Kang, B. Y.; Lee, K. O.; Lee, S. T. Genetic Variation in the Renin-Angiotensin System and Response to Endurance Training. *Med. Princ. Pract.* 16: 142-146, 2007.
185. Zafarmand, M. H.; Schouw, Y. T van der.; Grobbee, D. E.; Leeuw, P. W. de; Bots, M. L. The M235T Polymorphism in the AGT Gene and CHD Risk: Evidence of a Hardy-Weinberg Equilibrium Violation and Publication Bias in a Meta-Analysis. *PLoS ONE.* 3 (6): e2533, 2008.
186. Gu, C. C.; Chang, Y. P. C.; Hunt, S. C.; Schwander, K.; Arnett, D.; Djousse, L.; Heiss, G.; Oberman, A.; Lalouel, J. M.; Province, M.; Chakravarti, A.; Rao, D. C. Haplotype association analysis of AGT variants with hypertension-related traits: the HyperGEN study. *Hum. Hered.* 60: 164-176, 2005.
187. Hata, A.; Namikawa, C.; Sasaki, M.; Sato, K.; Nakamura, T.; Tamura, K.; Lalouel, J. M. Angiotensinogen as a risk factor for essential hypertension in Japan. *J. Clin. Invest.* 93: 1285-1287, 1994.
188. Jeunemaitre, X.; Soubrier, F.; Kotelevtsev, Y. V.; Lifton, R. P.; Williams, C. S.; Charru, A.; Hunt, S. C.; Hopkins, P. N.; Williams, R. R.; Lalouel, J. M.; Corvol, P. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell.* 71: 7-20, 1992.
189. Paillard, F.; Chansel, D.; Brand, E.; Benetos, A.; Thomas, F.; Czekalski, S.; Ardaillou, R.; Soubrier, F. Genotype-phenotype relationships for the rennin-angiotensin-aldosterone system in a normal population. *Hypertension.* 34 (3): 423-429, 1999.
190. Caulfield, M.; Lavender, P.; Farrall, M.; Munroe, P.; Lawson, M.; Turner, P.; Clark, A. J. L. Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension. *New Eng. J. Med.* 330: 1629-1633, 1994.
191. Wang, W. Y. S.; Glenn, C. L.; Zhang, W.; Nyholt, D. R.; Morris, B. J. Exclusion of angiotensinogen locus in molecular basis of human hypertension: Sibpair linkage and association analyses in Australian Anglo-Caucasians. *Am. J. Med. Genet.* 87: 53-60, 1999.
192. Katsuya, T.; Koike, G.; Yee, T. W.; Sharpe, N.; Jackson, R.; Norton, R.; Horiuchi, M.; Pratt, R. E.; Dzau, V. J.; MacMahon, S. Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. *Lancet.* 345: 1600-1603, 1995.
193. Karjalainen, J.; Kujala, U. M.; Stolt, A.; Mäntysaari, M.; Viitasalo, M.; Kainulainen, K.; Kontula, K. Angiotensinogen gene M235T polymorphism predicts left ventricular hypertrophy in endurance athletes. *J. Am. Col. Cardiol.* 34 (2): 494-9, 1999.

194. Lifton, R. P.; Warnock, D.; Acton, R. T.; Harman, L.; Lalouel, J. M. High prevalence of hypertension-associated angiotensinogen variant T235 in African Americans. *Clin. Res.* 260A, 1993.
195. Juffer, P.; Furrer, R.; Gonzalez-Freire, M.; Santiago, C.; Verde, Z.; Serratos, L.; Morate, F. J.; Rubio, J. C.; Martin, M. A.; Ruiz, J. R.; Arenas, J.; Gomez-Gallego, F.; Lucia, A. Genotype distributions in top-level soccer players: a role for ACE?. *Int. J. Sports Med.* 30 (5): 387-92, 2009.
196. Williams, A. G.; Rayson, M. P.; Jubbs, M.; World, M.; Woods, D. R.; Hayward, M.; Martin, J.; Humphries, S. E.; Montgomery, H. E. The ACE gene and muscle performance. *Nature.* 403 (6770): 614, 2000.
197. Kupari, M.; Perola, M.; Koskinen, P.; Virolainen, J.; Karhunen, P. J. Left ventricular size, mass, and function in relation to angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in humans. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 267 (3 Pt 2): 1107-1111, 1994.
198. Gomez-Gallego, F.; Santiago, C.; González-Freire, M.; Yvert, T.; Muniesa, C. A.; Serratos, L.; Altmäe, S.; Ruiz, J. R.; Lucia, A. The C allele of the AGT Met235Thr polymorphism is associated with power sports performance. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 34 (6): 1108-1111, 2009.
199. Jeunemaitre, X.; Lifton, R. P.; Hunt, S. C.; Williams, R. R.; Lalouel, J. M. Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension. *Nat. Genet.* 1 (1): 72-75, 1992.
200. Muniesa, C. A.; Gonzalez-Freire, M.; Santiago, C.; Lao, J. I.; Buxens, A.; Rubio, J. C.; Martin, M. A.; Arenas, J.; Gómez-Gallego, F.; Lucia, A. World-class performance in lightweight rowing: Is it genetically influenced? A comparison with cyclists, runners and non-athletes. *Br. J. Sports. Med.* 44: 898-901, 2010.
201. Chanock, S. J.; Manolio, T.; Boehnke, M.; Boerwinkle, E.; Hunter, D. J.; Thomas, G. et al. NCI-NHGRI Working Group on Replication in Association Studies. Replicating genotype-phenotype associations. *Nature.* 447 (7145): 655-660, 2007.
202. Yang, N.; MacArthur, D. G.; Wolde, B.; Onywere, V. O.; Boit, M. K.; Lau, S. Y.; Wilson, R. H.; Scott, R. A.; Pitsiladis, Y. P.; North, K. The ACTN3 R577X polymorphism in East and West African athletes. *Med. Sci. Sports Exerc.* 39 (11): 1985-1988, 2007.
203. Lucia, A.; Oliván, J.; Bravo, J.; Gonzalez-Freire, M.; Foster, C. The key to top-level endurance running performance: a unique example. *Br. J. Sports Med.* 42: 172-174, 2008.
204. Williams, A. G.; Folland, J. P. Similarity of polygenic profiles limits the potential for elite human physical performance. *J. Physiol.* 586 (1): 113-121, 2008.
205. Holm, S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Statist.* 6: 65-70, 1979.
206. Foster, C.; Lucia, A. Running economy: the forgotten factor in elite performance. *Sports Med.* 37: 3126-319, 2007.
207. Moore, G. E.; Shuldiner, A. R.; Zmuda, J. M.; Ferrell, R. E.; McCole, S. D.; Hagberg, J. M. Obesity gene variant and elite endurance performance. *Metabolism.* 50 (12): 1391-1392, 2001.
208. Sabina, R. L.; Swain, J. L.; Patten, B. M.; Ashizawa, T.; O'Brien, W. E.; Holmes, E. W. Disruption of the purine nucleotide cycle. A potential explanation for muscle dysfunction in myoadenylate deaminase deficiency. *J. Clin. Invest.* 66 (6): 1419-23, 1980.
209. Sinkeler, S. P.; Joosten, E. M.; Wevers, R. A.; Oei, T. L.; Jacobs, A. E.; Veerkamp, J. H.; Hamel, B. C. Myoadenylate deaminase deficiency: a clinical, genetic, and biochemical study in nine families. *Muscle Nerve.* 11 (4): 312-317, 1988.

PARTE II

HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES,
DAÑO OXIDATIVO Y EJERCICIO FÍSICO

Carmen Díez Sánchez⁽¹⁾

Ana Cristina Lapeña Royo⁽²⁾

¹ Grupo de Biogénesis y Patología mitocondrial. Universidad de Zaragoza.

² Departamento de Química Analítica. Universidad de Zaragoza.

Este estudio es el resultado del esfuerzo y colaboración de diferentes personas e instituciones que, a lo largo de varios años, han contribuido a su consecución.

- I- Deportistas de nivel nacional e internacional, así como controles, que generosa y voluntariamente dieron sus muestras biológicas y el consentimiento informado para la realización del trabajo.
- II- En la selección de deportistas y sujetos control, recogida de muestras y realización de pruebas físicas y fisiológicas, han participado:
- José Luis Terreros, Mayte Aragonés, José M^a Echávarri, Juan José Lacleta, Julia Quílez, Fermín Layús. Centro de Medicina del Deporte de Zaragoza. Gobierno de Aragón.
- José Antonio Casajús. Departamento de Fisiatría y Enfermería. Universidad de Zaragoza.
- José Antonio López Calbet. Departamento de Educación Física. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- José González-Alonso. Copenhagen Muscle Research Centre. University of Copenhagen. (Actualmente en el Centre for Sports Medicine and Human Performance. Brunel University West London).
- Ignacio Ara. Grupo de investigación GENUD (Growth, Exercise, Nutrition and Development). Universidad de Castilla-La Mancha.
- Juan Manuel Alonso. Director Médico de la Real Federación Española de Atletismo.
- Manuel Rabadán. Servicio de Fisiología del Consejo Superior de Deportes de Madrid.
- Ángel Enrique Díaz. Laboratorio Clínico del Consejo Superior de Deportes de Madrid.
- Consejo Superior de Deportes del Gobierno de España
- Departamento de Educación, Cultura y Deporte del Gobierno de Aragón

III- El estudio genético ha sido realizado por

- Trabajo de laboratorio (por orden alfabético)
- Ruth Iceta ⁽³⁾
- Ana Cristina Lapeña Royo ⁽²⁾
- Ana Marcuello López ⁽³⁾ (parte del estudio corresponde a su tesis doctoral)
- Diana Martínez Redondo ⁽³⁾ (parte del estudio corresponde a su tesis doctoral)
- Belén Monge Ochoa ⁽³⁾
- Análisis estadístico
- Carmen Díez Sánchez ⁽¹⁾
- Figuras, gráficas y tablas
- Ana Cristina Lapeña Royo ⁽²⁾
- Santiago Morales ⁽³⁾
- Dirección y coordinación del trabajo
- Manuel J. López Pérez ^(1,3)
- Carmen Díez Sánchez ⁽¹⁾
- A todos ellos con agradecimiento

¹ Grupo de Biogénesis y Patología mitocondrial. Universidad de Zaragoza.

² Departamento de Química Analítica. Universidad de Zaragoza.

³ Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza.

CONTENIDO PARTE II

RESUMEN	127
ABSTRACT	129
1. INTRODUCCIÓN	131
1.1 Ejercicio físico y energía, un recordatorio	132
1.2 La mitocondria	134
1.2.1 Estructura de la mitocondria	
1.2.2 Producción de energía (síntesis de ATP) y liberación de calor	
1.2.3 Producción de radicales libres y daño oxidativo	
1.2.4 El genoma mitocondrial	
1.2.5 Mutaciones del genoma mitocondrial	
1.2.6 Variación del mtDNA en Europa: Haplogrupos caucásicos	
1.2.7 Efecto fenotípico de los haplogrupos	
1.3 Mitocondria y ejercicio	146
1.4 Enzimas antioxidantes y ejercicio físico	150
2. MATERIAL Y MÉTODOS	153
2.1 Material	153
2.2 Métodos	153
2.2.1 Medidas antropométricas	
2.2.2 Prueba de esfuerzo para determinar los diferentes parámetros máximos y submáximos de los deportistas	
2.2.3 Estudio de la variación de la dosis genómica mitocondrial en ejercicios de distinta intensidad	
2.2.4 Extracción de las biopsias musculares	
2.2.5 Protocolos de Biología Molecular	
2.2.6 Análisis estadístico	
3. RESULTADOS	169
3.1 Fondo genético y práctica deportiva	169
3.1.1 Distribución de Haplogrupos	
3.1.2 Metabolismo deportivo	
3.1.3 Consumo de oxígeno	
3.1.4 Efecto del fondo genético en la población entrenada	
3.1.5 Daño oxidativo del mtDNA	
3.1.6 Haplogrupos H y J, ¿cómo explicar sus diferencias?	
3.2 Variación de la dosis genómica mitocondrial en ejercicios de distinta intensidad	181
3.2.1 Dosis genómica mitocondrial en sangre	
3.2.2 Dosis genómica mitocondrial en músculo	
3.3 Práctica deportiva y cadena respiratoria	189
3.4 Efecto protector de la actividad antioxidante frente al daño oxidativo	190
3.4.1 Confirmación de resultados previos	
3.4.2 Análisis de la enzima MnSOD	
3.4.3 Análisis de la enzima Paraoxonasa 1	
4. DISCUSIÓN	213
5. CONCLUSIONES	217
6. APLICACIONES	221
7. SUGERENCIAS	223
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	225
ANEXOS (I, II, III)	233

RESUMEN

Los deportistas de élite “nacen”, es decir, su fondo genético determina en parte su talento deportivo.

Existen dos genomas el nuclear y el mitocondrial. Las mitocondrias son orgánulos celulares con genoma propio y transmitidos por línea materna, donde se produce la mayor parte de la energía de la células en forma de Adenosín-Trifosfato (ATP), así como los radicales libres que inducen daño oxidativo en las membranas y en el propio DNA mitocondrial (mtDNA). Este genoma codifica 13 proteínas para la síntesis de ATP y, por ello, el daño oxidativo sobre el mtDNA puede determinar una importante disfuncionalidad celular.

El mtDNA presenta mutaciones patológicas y no patológicas. Estas últimas definen los haplogrupos mitocondriales asociados a distinta producción de ATP, calor y daño oxidativo.

Existen enzimas antioxidantes de origen nuclear como la paraoxonasa 1 y la superóxido-dismutasa que muestran una gran potencia antioxidante.

Hipótesis del estudio: los haplogrupos mitocondriales y las variantes genéticas de la paraoxonasa y superóxido-dismutasa, influyen sobre la actividad física al ser ésta muy demandante de energía, pero también muy sensible al daño oxidativo que puede sufrir la célula.

Resultados: a) los haplogrupos mitocondriales H y J son los que más y menos consumo de oxígeno presentan, respectivamente; b) el haplogrupo H, más productor de energía y de daño oxidativo, se acumula en pruebas anaeróbicas (400m); y c) las variantes más antioxidantes de la PON1 se acumulan en deportistas.

Palabras clave: HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES, PARAOXONASA 1, SUPERÓXIDO-DISMUTASA, DAÑO OXIDATIVO, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, PRODUCCIÓN DE ATP, EJERCICIO AERÓBICO, EJERCICIO ANAERÓBICO.

ABSTRACT

The elite athletes "born that way", i.e. their genetic background determines their sporting talent.

There are two genomes, nuclear and mitochondrial. Mitochondria are organelles with their own genome and transmitted by maternal line, where it is produced most of the cell energy in form of adenosine triphosphate (ATP) and free radicals that induce oxidative damage in membranes and their own mitochondrial DNA (mtDNA). This genome encodes 13 proteins for the synthesis of ATP and, therefore, oxidative damage to mtDNA induces significant cell dysfunction.

The mtDNA presents pathological and non-pathological mutations. The latter define mitochondrial haplogroups, associated with different ATP, heat and oxidative damage.

On the other hand, paraoxonase and superoxide-dismutase, nuclear-origin enzymes, show high antioxidant activity.

Study hypothesis: mitochondrial haplogroups, paraoxonase and superoxide-dismutase genetic variants influence on physical activity since this last is highly energy demanding, but very sensitive to cell oxidative damage as well.

Results: a) mitochondrial haplogroups H and J are the most and the less oxygen consumers, respectively; b) haplogroup H, that produces high level of energy and ROS, accumulated in anaerobic sports (400m) and c) the most antioxidant variants of PON1 accumulated in athletes.

Key words: MITOCHONDRIAL HAPLOGROUPS, PARAOXONASE 1 (PON1), SUPEROXIDE-DISMUTASE, OXIDATIVE DAMAGE, ANTIOXIDANT ACTIVITY, ATP PRODUCTION, AEROBIC EXERCISE, ANAEROBIC EXERCISE.

1. INTRODUCCIÓN

Las observaciones realizadas en el campo del ejercicio físico, han mostrado repetidamente que el deportista de élite presenta una serie de características físicas, fisiológicas y psicológicas que el entrenamiento puede potenciar y favorecer, pero nunca generar si el individuo no ha nacido con ellas. Es decir, el deportista “nace”. La función de los entrenadores parece consistir, por tanto, en planificar el entrenamiento individual de manera que el deportista alcance el máximo rendimiento en función de su potencialidad genética.

Los seres vivos presentan dos genomas, uno, el más conocido o genoma nuclear, se aloja en el núcleo de las células y contiene algo más de 30.000 genes. El otro, notablemente más pequeño pero no por ello menos importante, sólo presenta 37 genes y se localiza en la mitocondria. Ambos genomas, nuclear y mitocondrial, presentan variantes genéticas que están demostrando ser de gran importancia en la práctica del ejercicio físico.

En la última década se ha avanzado mucho en el conocimiento del genoma humano y se han desarrollado técnicas de biología molecular rápidas, económicas y fiables. Estos hechos han propiciado que las características genéticas del deportista de alto rendimiento empiecen poco a poco a desvelarse. En este estudio se han analizado algunas de las variantes genéticas de los genomas mitocondrial y nuclear en un intento de descubrir cómo contribuyen a forjar los grandes talentos deportivos.

1.1 Ejercicio físico y energía, un recordatorio

El adenosín-trifosfato (ATP), molécula de transferencia energética intracelular, es necesario para el proceso de contracción-relajación muscular. Este compuesto, dependiendo de los tipos de fibras musculares y de la actividad que se realice, puede tener dos orígenes metabólicos diferentes, anaeróbico (para actividades físicas de corta duración) y aeróbico (para actividades físicas de mayor duración) (Figura 1).

A. Origen del ATP durante el ejercicio anaeróbico

1. ATP almacenado en la célula
2. Fosfágenos, compuestos como la fosfocreatina (CrP) y fosfoarginina (ArgP), que regeneran el ATP consumido.
3. Glucólisis, vía metabólica que determina la degradación incompleta de la glucosa celular. Proporciona la energía necesaria para mantener la contracción-relajación muscular desde pocos segundos hasta algunos minutos. El aporte de glucosa al músculo durante el ejercicio se realiza desde el glucógeno hepático y muscular. Para mantener funcionando la glucólisis en ausencia de oxígeno se produce lactato, parte del cual pasa a la sangre y de ahí al hígado para ser transformado de nuevo en glucosa (gluconeogénesis = ciclo de Cori). El resto de lactato revierte hacia piruvato y se incorpora al metabolismo aeróbico.

B. Origen del ATP durante el ejercicio aeróbico

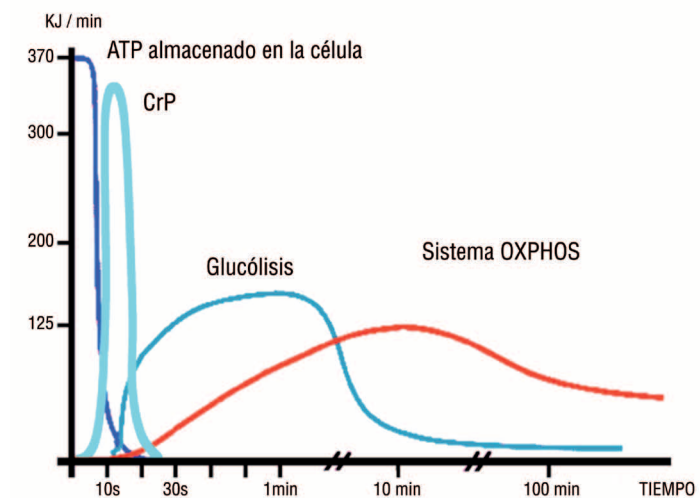
Durante el ejercicio aeróbico, en cambio, el ATP se obtiene, mayoritariamente, de la cadena respiratoria (o sistema de fosforilación oxidativa, OXPHOS) localizada en la mitocondria, pero, a diferencia de la vía anaeróbica que sólo utilizaba como sustrato energético glucosa, en esta vía también se usan las grasas (acilglicéridos) almacenadas en el organismo.

Los ácidos grasos, obtenidos de las grasas, son transportados al interior de la mitocondria por la carnitina, donde se oxidarán

formando acetil-CoA que será degradado en el ciclo de Krebs. Como consecuencia de todas estas reacciones, en la matriz mitocondrial se acumulará NADH (+ H⁺) y FADH₂ que se oxidan (a NAD y FAD, respectivamente) en la cadena respiratoria, dando lugar a la producción de ATP.

La mayor parte del ATP es de origen mitocondrial. Constatar este hecho en el pasado trajo consigo que surgiera un interés especial por las mitocondrias y, en particular, por su genoma, interés que no se ha visto defraudado a juzgar por los resultados obtenidos, tanto en el área de las patologías mitocondriales como en la del ejercicio físico. De todo esto se hará una rápida revisión en los siguientes apartados.

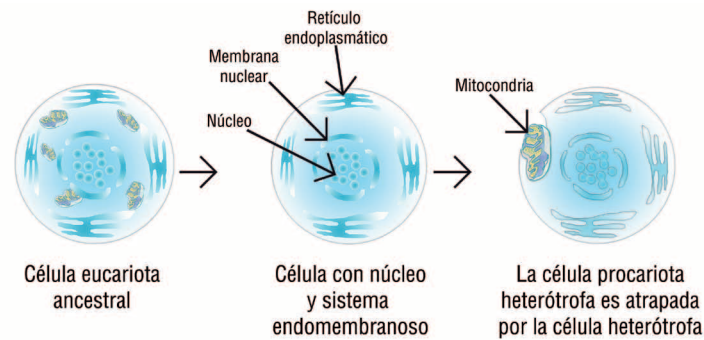
Figura 1. Origen del ATP consumido durante el ejercicio físico a lo largo del tiempo.



1.2 La mitocondria

Las mitocondrias son pequeños orgánulos intracelulares presentes en el citoplasma de las células eucariotas (con la excepción de los eritrocitos maduros y algunos protozoos) que tienen un papel crucial en la generación de energía. Se caracterizan por tener su propio genoma y toda la maquinaria necesaria para la transcripción y traducción de su información genética en proteínas funcionales. Estas características de la mitocondria indujeron a Lynn Margulis a proponer en 1975 la Teoría de la Endosimbiosis Seriada (SET, del inglés Serial Endosymbiosis Theory) ⁽¹⁾ para explicar el origen de estos orgánulos (Figura 2). Según esta investigadora, las mitocondrias descienden de bacterias aeróbicas que se integraron en una célula huésped anaeróbica con núcleo (endosimbiosis), obteniendo un beneficio mutuo. Esta teoría permite explicar la reproducción semiautónoma de las mitocondrias que se adapta a la particular situación metabólica de las células en las que se alojan. Un ejemplo de esta adaptación puede observarse en las fibras musculares donde el número de mitocondrias se incrementa para atender las necesidades energéticas demandadas durante la actividad muscular.

Figura 2. Proceso de endosimbiosis (Teoría de la Endosimbiosis Seriada de Lynn Margulis).

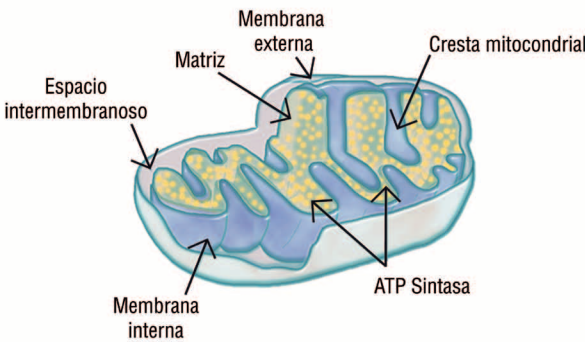


1.2.1 Estructura de la mitocondria

Las mitocondrias están rodeadas por una doble membrana (Figura 3). La membrana externa es permeable a todas las

moléculas de bajo peso molecular porque posee unas proteínas de transporte dependiente de voltaje, las porinas, que forman canales a través de la bicapa lipídica. Esta membrana carece de esteroides, lo que le confiere menos rigidez que la membrana plasmática y mayor plasticidad, justificando los cambios de forma en diferentes tejidos y células.

Figura 3. Estructura de la mitocondria indicando la localización de la ATP sintasa sobre la cara interna de la membrana interna.



La membrana interna, que forma numerosas crestas que se extienden hacia el interior de la mitocondria, contiene un 15% de fosfolípidos de cardiolipina, molécula impermeable a los iones, propiedad que permite la generación de un gradiente de protones¹, fundamental en el proceso de síntesis de ATP.

La matriz, espacio delimitado por la membrana interna, contiene el genoma mitocondrial con 37 genes, los ribosomas mitocondriales, los RNAs de transferencia (tRNA) y todas las enzimas necesarias para la replicación del DNA mitocondrial (mtDNA), y la transcripción y traducción de los 13 péptidos

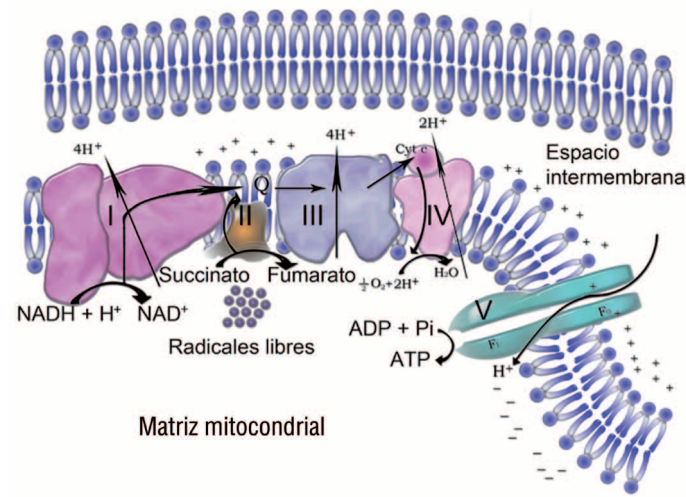
¹ Diferencia de concentración de protones a ambos lados de la membrana interna, es decir, entre matriz y espacio intermembrana.

codificados por este genoma, además de las enzimas responsables de las reacciones centrales del metabolismo oxidativo (Ciclo de Krebs, entre otros).

1.2.2 Producción de energía (síntesis de ATP) y liberación de calor²

El proceso de síntesis del ATP en condiciones aeróbicas se realiza en la cadena respiratoria (Figura 4), formada por una serie de complejos enzimáticos independientes que se encuentran en la membrana interna: el complejo I (NADH-CoQ reductasa); complejo II (succinato-CoQ reductasa); complejo III (CoQH₂-citocromo c reductasa), complejo IV (citocromo c oxidasa) y complejo V (ATP sintasa), cuya actividad guarda relación directa con la producción de ATP. Además se han descrito dos transportadores móviles de electrones, que actúan a modo de lanzadera: la coenzima Q y el citocromo c (Figura 4)⁽²⁾.

Figura 4. Modelo de cadena respiratoria localizada en la membrana interna de la mitocondria.



² Este apartado puede ser un poco complejo para no iniciados en bioquímica. Podría resumirse en que la cadena respiratoria de la mitocondria aprovecha la energía liberada en la degradación de los diferentes nutrientes de la dieta para obtener diferentes cantidades de ATP, ROS y calor.

En el proceso de fosforilación oxidativa los electrones derivados del NADH (+ H⁺) y del FADH₂, procedentes de los distintos procesos metabólicos de la célula, se van transfiriendo de un complejo a otro hasta llegar finalmente al oxígeno molecular y dar agua (Figura 4). La energía liberada en estas reacciones es utilizada, mayoritariamente, por los complejos I, III y IV para bombear protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana, a través de la membrana interna de la mitocondria, lo que genera una diferencia de concentración de H⁺ y de voltaje entre ambos espacios, utilizada por la ATP sintasa o complejo V (Figura 5) para producir ATP⁽³⁾.

No toda la energía procedente del NADH (+ H⁺) y del FADH₂ es recuperada para sintetizar ATP. La parte que no se utiliza con esta finalidad es eliminada en forma de calor, cuestión que será comentada más adelante en otro apartado.

Simplificando, puede decirse que parte de la energía liberada en la oxidación del NADH (+ H⁺) y FADH₂ se almacena en el ATP que al hidrolizarse, libera la energía que será utilizada en las necesidades celulares (Figura 6).

Figura 5. Modelo de la ATP sintasa (modificado de ⁽⁴⁾).

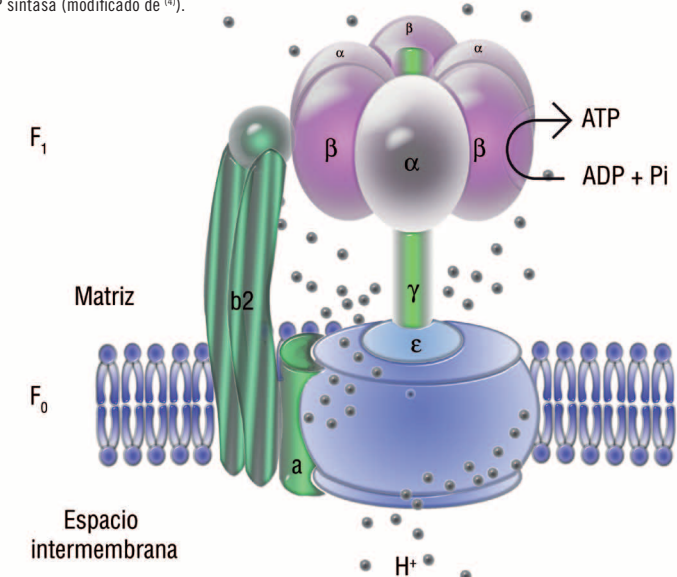


Figura 6. Hidrólisis del ATP. Cuando esta molécula se rompe al incorporar una molécula de agua, libera energía que se utiliza en los diferentes procesos celulares.



1.2.3 Producción de radicales libres y daño oxidativo

Como consecuencia de la actividad de la cadena respiratoria, además de ATP, se generan los radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species) (Figura 4), moléculas inestables que poseen un electrón en exceso (= desapareado) lo que justifica que sean extremadamente reactivas. Aunque su vida media es muy breve (microsegundos) tienen la capacidad de reaccionar con todas las estructuras celulares donde se localizan, generando lo que en conjunto se conoce como daño oxidativo, responsable, entre otros efectos, del envejecimiento celular (Figuras 7 y 8). Los componentes de membrana más atacados por los radicales libres son los lípidos y proteínas de las membranas celulares y el DNA. En particular el mtDNA, que carece de proteínas que lo protejan, muestra los efectos del daño oxidativo con una tasa de mutaciones varias veces más elevada que el genoma nuclear⁽⁵⁻⁷⁾.

Con la edad también aumenta la tasa de mutación del mtDNA, por ello, hoy en día, se empieza a asociar el daño en este genoma con enfermedades neurodegenerativas del tipo Parkinson, Alzheimer, Corea de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y con el envejecimiento (Figura 8) en general.

Figura 7. Efectos del daño oxidativo sobre el DNA y la membrana celular.

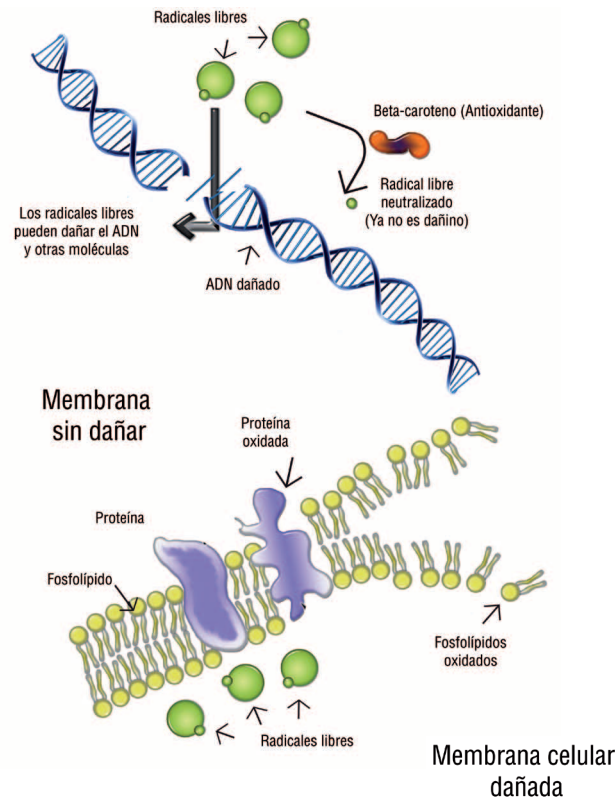
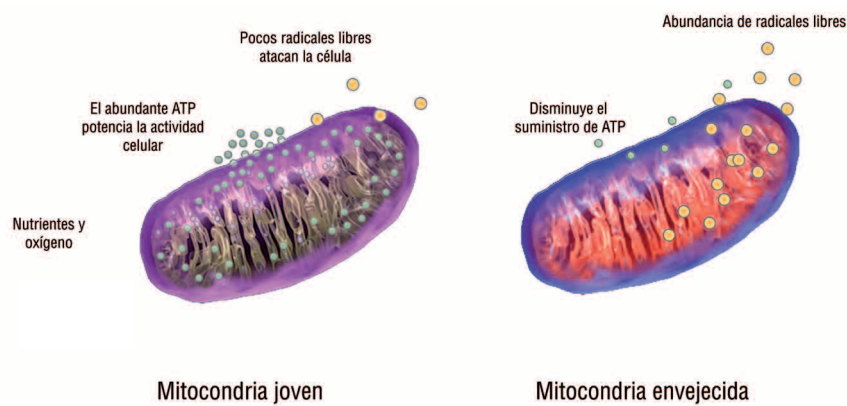


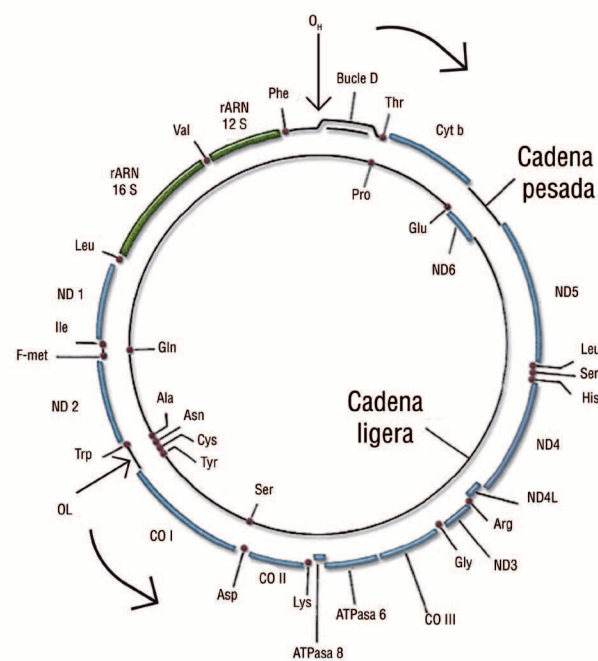
Figura 8. Los radicales libres a lo largo del tiempo dañan las mitocondrias comprometiendo la funcionalidad de las células.



1.2.4 El genoma mitocondrial

En el año 1960 se descubrió que la mitocondria poseía su propio genoma ^(8, 9), cuya secuencia se hizo pública en 1981 ⁽¹⁰⁾. Hoy se sabe que el mtDNA humano es una molécula circular de doble hebra formada por 16.569 pares de nucleótidos, que presenta una organización génica muy compacta, ya que está saturado de genes que carecen de intrones³. Sólo una pequeña zona carece de genes, la región del bucle de desplazamiento o D-loop, que contiene la mayoría de los elementos de control de la replicación y transcripción (Figura 9).

Figura 9. Mapa genético del mtDNA humano. Las circunferencias representan las dos cadenas del DNA mitocondrial con los genes que codifican.



³ Fragmentos de DNA que no portan información genética.

El mtDNA presenta características muy interesantes:

- Su código genético difiere ligeramente del código genético universal ^(11, 12).
- Se trata de un genoma no protegido por proteínas, por tanto, vulnerable frente al daño oxidativo lo que favorece una alta tasa de mutación y mayor velocidad evolutiva.
- Su herencia es por línea materna, por lo que no cumple las leyes mendelianas de transmisión de la herencia ^(13, 14). Este último punto ha sido cuestionado en diferentes ocasiones, habiendo autores que han sugerido la posibilidad de una herencia paterna ⁽¹⁵⁾ pero en la mayoría de los casos se ha llegado a la conclusión de que, aunque en el cigoto hubiera mitocondrias paternas, su proporción sería tan baja que su aportación sería mínima ⁽¹⁶⁾.

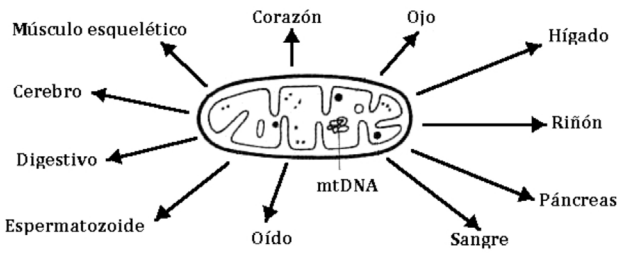
1.2.5 Mutaciones del genoma mitocondrial

Por las razones que se han indicado anteriormente, el mtDNA presenta una elevada tasa de mutación, dando lugar a mutaciones patológicas y no patológicas.

· Mutaciones patológicas

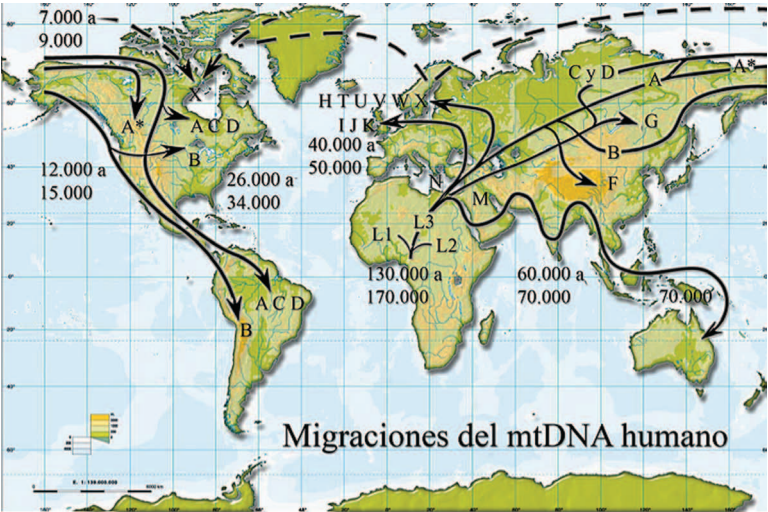
Las patologías mitocondriales (mitopatologías) son enfermedades donde la síntesis aeróbica del ATP está seriamente comprometida al producirse una disfunción de la cadena respiratoria por la alteración estructural de sus complejos. Es normal, por tanto, que aquellos tejidos u órganos que más demanda energética presentan sean los más afectados por las enfermedades mitocondriales (músculo y cerebro, por ejemplo) ⁽¹⁷⁾ (Figura 10). Dada la gravedad de estas enfermedades, en muchos casos incompatible con la vida, es muy improbable que se presenten en deportistas, por lo que no fueron analizadas en este estudio.

Figura 10.



· Mutaciones no patológicas. Los haplogrupos mitocondriales

Debido a la alta tasa de mutación del mtDNA y a que se hereda por línea materna, el número de diferencias en la secuencia entre individuos, se ha utilizado como datador evolutivo. Los linajes individuales de este genoma se han extendido en forma radial mediante migraciones desde África hacia los distintos continentes durante los aproximadamente 150.000 años de la evolución del Homo sapiens. En este tiempo se han acumulado mutaciones en el mtDNA que aparecen con alta frecuencia en la población y se conocen como haplogrupos mitocondriales⁴ (19, 20).



Son varios los estudios que relacionan las variantes del mtDNA y la evolución del hombre, confirmando

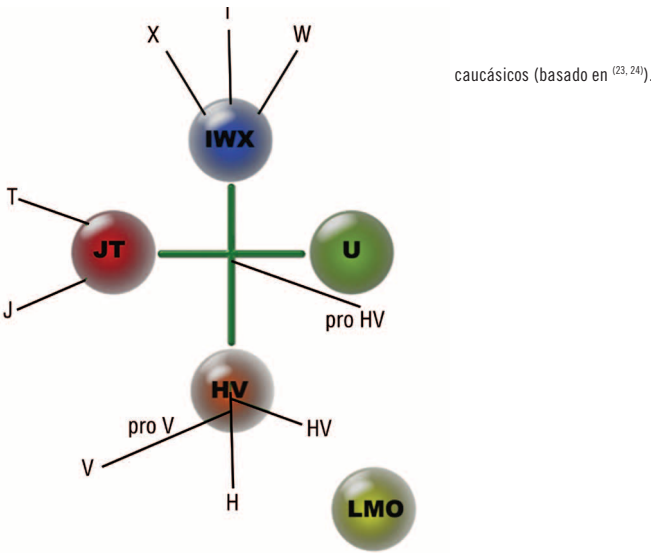
⁴ Secuencias polimórficas del mtDNA específicas de los distintos continentes.

que la especie tiene su origen en África (21). Cuando las mujeres migraron desde África se fueron acumulando mutaciones que resultaron en variaciones específicas de continente, dando lugar a los ya citados haplogrupos mitocondriales (Figura 11). Dentro de cada grupo, además, pueden surgir mutaciones adicionales que dan lugar a las variantes individuales (haplotipos).

1.2.6 Variación del mtDNA en Europa: Haplogrupos caucásicos

Los análisis filogenéticos de las variantes mitocondriales en Europa mostraron que todos los mtDNA de Europa podían organizarse en nueve haplogrupos típicos: H, T, U, V, W, X, I, J y K (19, 20, 22); posteriormente el haplogrupo K fue incluido como una de las grandes ramas del U (Figura 11).

Además de los haplogrupos caucásicos, en Europa se encuentran en un bajo porcentaje, otras variantes genéticas de diferente origen (L, africano; M de Oriente Medio), posiblemente debido a migraciones en algún momento de la historia del continente. Por otro lado, con una frecuencia muy baja también, se observan individuos, que no pueden adscribirse a una variante mitocondrial descrita previamente debido a mutaciones particulares propias, que son incluidos en un grupo especial Otros (O) (Figura 12).



caucásicos (basado en (23, 24)).

El haplogrupo H es el más frecuente en Europa, representa un 40,5% de la población ⁽²⁴⁾ con una antigüedad de 22.000-30.000 años ⁽²⁰⁾ y con origen en Oriente Medio ⁽²⁵⁾. El haplogrupo V se encuentra en un 4,8% de los europeos, tiene una antigüedad de unos 16.000 años y está muy próximo evolutivamente al H, por eso forman parte del mismo clado⁵, junto con HV y preV ⁽²⁴⁾, haplogrupos de distribución minoritaria en la población caucásica.

El haplogrupo U es el segundo más abundante en la población europea, con un 20,5% de la población ⁽²³⁾. Parece tener unos 51.000-67.000 años ⁽²⁰⁾ por lo que puede representar uno de los linajes fundadores de Europa en el Paleolítico Superior temprano. Es el único de los haplogrupos que se comparte con África, lo que hace pensar que su origen está en este continente y después se expandió hacia Oriente Próximo y Europa ⁽¹⁹⁾. Dentro de este haplogrupo existen subhaplogrupos que son específicos de regiones geográficas concretas, como el U5 de Europa, el U6 del Norte de África o el U2i de la India. El subhaplogrupo del U (Uk), antes llamado haplogrupo K, tiene una antigüedad de 16.000 años, muy parecida al clado HV. Estos hechos sugieren una expansión post-glacial similar en ambos casos ^(20, 25-28).

Los haplogrupos J y T tienen una frecuencia de 7,6 y 10,6% respectivamente y ambos son originarios de Oriente Medio ⁽²⁷⁾. Por último, el clado IWX es el menos frecuente, representado por el haplogrupo I en un 3,2%, sobre todo en el noroeste de Europa ⁽²⁷⁾, en un 1,8% por el W y en un 2,5% el X.

1.2.7 Efecto fenotípico de los haplogrupos

A lo largo de la evolución humana, la selección natural ha actuado sobre las mutaciones que aparecían en el mtDNA. Si esas mutaciones comprometían la vida por alterar gravemente la producción de energía, la selección natural tendía

⁵ Un clado comprende varios haplogrupos relacionados evolutivamente entre sí.

irremisiblemente a eliminarlas por ser patológicas. Sin embargo, cuando las mutaciones eran neutras, no fueron eliminadas. Por tanto, debemos concluir que las mutaciones que definen los haplogrupos, dada su amplia representación en los individuos, no pueden ser patológicas ya que han permanecido a lo largo del tiempo.

No obstante lo anterior, no debe creerse que la funcionalidad de todos los haplogrupos mitocondriales sea la misma. Con esta idea, se ha postulado que estas variantes genéticas podrían tener cadenas respiratorias con diferente eficiencia, lo que significaría que los haplogrupos mitocondriales, no sólo pueden generar distinta cantidad de energía (ATP), sino que también generarían distinta cantidad de calor y radicales libres.

Esta hipótesis ha sido confirmada por varios autores con diferentes estudios y poblaciones. Por un lado, estaría la diferente distribución de los haplogrupos caucásicos del norte al sur de Europa. Los llamados haplogrupos poco eficientes, por tanto menos productores de ATP y radicales libres, pero grandes generadores de calor, se acumulan significativamente en las regiones nórdicas lo que se interpreta como un efecto claro de la selección natural para favorecer la supervivencia en regiones frías ^(29, 30). Esta idea ha sido recientemente confirmada al demostrar que la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria era diferente en los distintos haplogrupos ⁽³¹⁾.

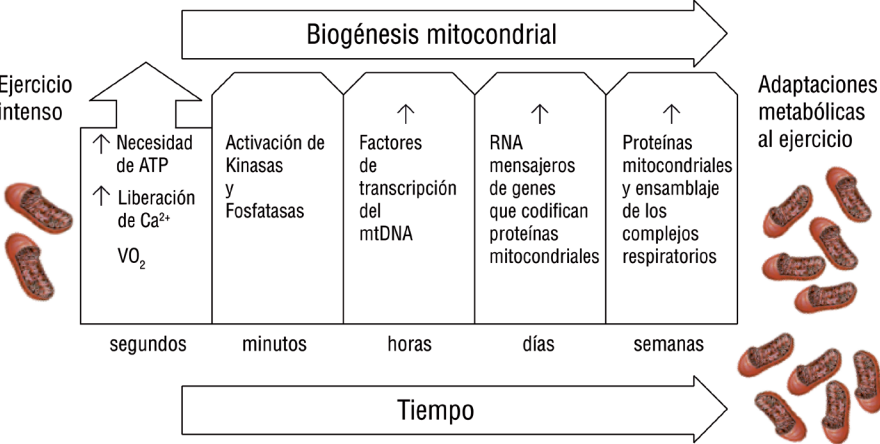
En los últimos años se han publicado también varios trabajos que van en una línea similar a la ya expuesta. El haplogrupo J ^(32, 33) y, en particular el subhaplogrupo J2 ⁽³⁴⁾, se acumula significativamente en poblaciones longevas de Italia y España, respectivamente. La interpretación de estos datos sugiere que ese haplogrupo, poco eficiente en su producción energética y, por ello, generador de pocos radicales libres, induce menos daño oxidativo. En otras palabras, el reloj biológico del envejecimiento se “retrasa” en los individuos pertenecientes al haplogrupo J.

1.3 Mitocondria y ejercicio

Las mitocondrias, como ya se ha comentado anteriormente, son orgánulos de suma importancia en todas aquellas actividades que requieren energía, como lo demuestra el hecho de que los tejidos con gran demanda energética (hígado, músculo) presentan gran número de mitocondrias. Así mismo, se ha probado que la motilidad espermática, que también exige un gran consumo de energía, es dependiente de la actividad de la cadena respiratoria ⁽³⁵⁾ y que los haplogrupos influyen en esa actividad ⁽³⁶⁾.

Considerando que las mitocondrias son las productoras de la mayor parte del ATP generado en las células y las enormes necesidades energéticas del ejercicio físico, no cabe duda de que estos orgánulos tienen que influir en el rendimiento de los deportistas de élite. *La pregunta es cómo influyen y cómo puede demostrarse.*

El hecho de que en el músculo esquelético se hayan descrito dos poblaciones de mitocondrias, unas debajo de la membrana y las otras en el centro de la fibra muscular con diferentes propiedades bioquímicas, morfológicas y funcionales ⁽³⁷⁻³⁹⁾ es una prueba de que estos orgánulos son muy importantes en el ejercicio físico. Cada una de estas poblaciones atiende las necesidades energéticas de diferente región subcelular. Unas suministran ATP a la membrana y el núcleo y las otras aportan energía en el proceso de contracción-relajación de los miofibrillos.



Por otro lado, los efectos del entrenamiento aeróbico sobre las mitocondrias son bien conocidos. Entre ellos hay que destacar el aumento del número de mitocondrias en el músculo ⁽⁴⁰⁻⁴³⁾, el aumento de la expresión de los genes que codifican componentes de la cadena respiratoria ⁽⁴⁴⁾ y de la actividad de las enzimas mitocondriales lo que determina, en todos los casos, mayor producción de energía en la célula ^(45, 46). Como otros autores han demostrado, son las variaciones en la concentración de calcio y de ATP durante la actividad contráctil de las fibras musculares las que activan todos estos cambios ⁽⁴¹⁾ (Figura 13).

Por otro lado, se ha observado que el entrenamiento induce un incremento del número de copias de mtDNA en las fibras musculares ^(44, 47) al acelerar la transcripción y replicación mitocondrial durante el ejercicio físico regular ⁽⁴⁸⁻⁴⁹⁾.

En resumen, que una de las respuestas más importantes al entrenamiento aeróbico es el aumento en el número de mitocondrias y el incremento del número de copias de mtDNA por célula lo que induce una mayor producción de ATP para abastecer las necesidades celulares ⁽⁴⁰⁾, adaptaciones que, sin duda, mejoran la capacidad aeróbica. Sin embargo el entrenamiento de fuerza parece no inducir cambios sustanciales en las mitocondrias ⁽⁵⁰⁾, lo que es coherente, puesto que ese ejercicio usa mayoritariamente ATP no procedente de la cadena respiratoria.

Además de las observaciones anteriores, algunos autores encontraron que determinadas variantes del mtDNA estaban asociadas a un mayor consumo máximo de oxígeno (VO₂ máx) ^(51, 52), parámetro de gran importancia en la actividad física aeróbica, y que ese consumo mostraba un patrón de herencia materna ⁽⁵³⁾ lo que hacía sospechar una influencia del genoma mitocondrial. Por el contrario, otros estudios estaban en desacuerdo con este supuesto a la luz de los resultados que habían obtenido ^(52, 54).

En conclusión, parecía claro que el desarrollo de la actividad física continuada inducía cambios morfológicos y cuantitativos de la mitocondria para responder a las demandas de ATP del músculo, pero no había datos concluyentes respecto a la influencia de las variantes mitocondriales.

· Ejercicio físico, daño oxidativo y sistema antioxidante

El origen del daño oxidativo celular está en la formación de radicales libres en la cadena respiratoria. El 85-90% del oxígeno utilizado por la célula se consume en el sistema de fosforilación oxidativa de la mitocondria ^(55, 56), donde actúa como aceptor final de electrones, produciendo agua. Sin embargo, un 1-3% da lugar a la formación de radicales libres ^(57, 58), que dañan las estructuras celulares, como ya se ha indicado en apartados precedentes ^(57, 59). Existen, además, otros radicales libres dependientes del nitrógeno con acción muy similar (Figura 14). El mecanismo de acción propuesto es que los radicales libres atacan las proteínas y los lípidos mitocondriales, así como el mtDNA, una de sus principales dianas de actuación, provocándoles lo que globalmente se denomina daño oxidativo.

En condiciones normales, el daño oxidativo es contrarrestado por los sistemas antioxidantes de la célula, como por ejemplo las tres enzimas superóxido dismutasa (SOD), la paraoxonasa 1 (PON1), la glutatión peroxidasa o el glutatión, que se encargan de inutilizar los radicales libres (Figura 14). Sin embargo, en situaciones de gran estrés oxidativo (enfermedad o ejercicio físico intenso), existe un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad antioxidante de la célula, por lo que estos acaban provocando daño celular.

Sistema antioxidante	Especies reactivas
MnSOD	O ₂ superóxido
Glutation peroxidasa	H ₂ O ₂ peróxido de hidrógeno
Glutation	OH hidroxilo
PON 1	ONOO peróxido nítrico

A lo largo de la práctica deportiva el consumo de oxígeno aumenta notablemente; sólo en el músculo puede incrementarse hasta 100 veces ⁽⁶⁰⁾ y en el organismo entero unas 20 veces. El hecho de que este aumento se observara en paralelo al incremento de la producción de ATP y ROS durante el ejercicio físico, hizo pensar que todos estos cambios tenían su origen en la cadena de transporte electrónico de la mitocondria.

Las acciones biológicas más dañinas de las ROS durante el ejercicio físico son la peroxidación lipídica y proteica, que ocurre tanto en ejercicios aeróbicos, como en anaeróbicos, y que tienen como consecuencia una pérdida de la fluidez de la membrana y cambios en la permeabilidad de iones, como por ejemplo el calcio, dificultando la contracción muscular. Además también puede dañarse el DNA ⁽⁶¹⁾, especialmente el mtDNA que está desprotegido ^(62, 63) lo que se ha demostrado en estudios sobre el ejercicio físico intenso ⁽⁶⁴⁾.

1.4 Enzimas antioxidantes y ejercicio físico

Diferentes autores habían demostrado la importancia del daño oxidativo en las estructuras celulares ^(57, 59) y, en particular, el efecto de ese daño en las fibras musculares ⁽⁶⁴⁾. Considerando estos trabajos previos, nuestro grupo decidió estudiar el potencial efecto protector que algunas variantes genéticas de dos enzimas, MnSOD y PON1, con demostrado efecto antioxidante, podrían tener en la práctica deportiva.

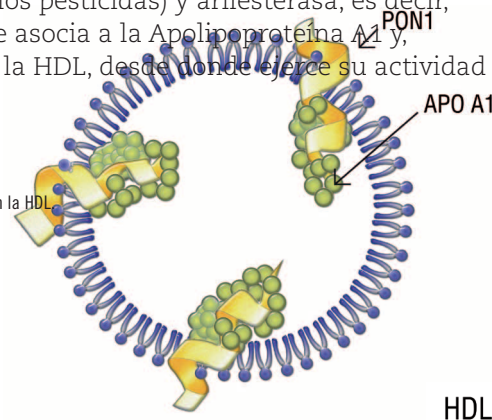
· Superóxido-dismutasa mitocondrial (MnSOD)

Una enzima de gran poder antioxidante es la superóxido dismutasa mitocondrial (llamada MnSOD, porque es dependiente de Mn^{2+}). Se ha encontrado que el polimorfismo rs4880T/C de la secuencia codificante de MnSOD está asociado con su actividad enzimática. Esta mutación estructural cambia el aminoácido de la posición 9 del péptido señal de Valina (GTT) a Alanina (GCT) lo que parece afectar a la localización y transporte de la enzima dentro de la mitocondria, así como a su actividad: la proteína conteniendo Ala presenta un actividad enzimática entre 30-40% mayor que la forma que contiene Val ⁽⁶⁹⁾.

· Paraoxonasa 1 (PON1)

Es una proteína de 354 aminoácidos que presenta una doble actividad enzimática, paraoxonasa (degrada compuestos organofosforados como los pesticidas) y arilesterasa, es decir, antioxidante. La PON1 se asocia a la Apolipoproteína A1 y, ambas ensambladas, en la HDL, desde donde ejerce su actividad enzimática (Figura 15).

Figura 15. PON1 y Apolipoproteína A1 (Apo A1) localizadas en la HDL.



El gen codificante de PON1 se localiza en la región cromosómica 7q21.3-22.1 y presenta algunas variantes genéticas. Los dos polimorfismos principales en la zona codificante del gen PON1 son las variaciones de los aminoácidos encontrados en las posiciones 55 y 192. En el polimorfismo 55 se localizan la leucina o la metionina (Leu55Met, alelos L y M, respectivamente), mientras en la 192 pueden estar la glutamina o la arginina (Gln192Arg, alelos Q y R, respectivamente) ⁽⁶⁵⁾. El polimorfismo L55M modifica la expresión del gen (más o menos cantidad de enzima) ⁽⁶⁶⁾, mientras que del polimorfismo Q192R depende la actividad enzimática ^(67, 68).

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, este trabajo ha pretendido profundizar en un aspecto importante del ejercicio físico como es la necesidad de obtener gran cantidad de energía con el menor daño oxidativo posible. Para ello, se ha analizado

1. La distribución de las variantes genéticas mitocondriales en una población de deportistas y en otra de individuos control, y la influencia que esas variantes pueden tener sobre el VO_2 máx, la producción de ATP y el daño oxidativo generado en los deportistas.
2. La distribución de las variantes genéticas de la PON1 y MnSOD en una población de deportistas y otra de individuos control.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

En esta sección se detallan tanto los materiales como los protocolos de análisis utilizados para realizar el trabajo de investigación.

Se adjuntan dos anexos con explicaciones detalladas para ampliar la información facilitada.

2.1 Material

El material utilizado en todas las determinaciones del estudio es el propio de los laboratorios de fisiología del ejercicio físico, laboratorios de extracción de muestras biológicas, y laboratorios de biología molecular.

Ver materiales detallados en Anexo I.

2.2 Métodos

En primer lugar, se detallan los métodos empleados en las determinaciones de los diferentes parámetros durante el ejercicio físico.

2.2.1 Medidas antropométricas

· Peso corporal

La medida se realizó en una báscula, el sujeto llevaba ropa ligera y estaba sin zapatos, se situó de pie en el centro de la plataforma de la báscula distribuyendo el peso por igual en ambas piernas, sin que el cuerpo estuviera en contacto con nada que hubiera alrededor.

· Estatura

La medida de la talla se llevó a cabo con un tallímetro. El sujeto descalzo se coloca de pie, completamente estirado, con los

talones juntos, la parte alta de la espalda apoyada en la tabla vertical y la cabeza estirada y cuando se encontraba en esta posición se hacía bajar lentamente la plataforma horizontal del tallímetro hasta contactar con la cabeza, ejerciendo una suave presión para minimizar el efecto del pelo.

· Pliegues cutáneos

La medición de los pliegues cutáneos se realizó con un plicómetro manual con un rango de 0-40 mm, además de una presión constante de 10 g/cm².

Los puntos antropométricos donde se midieron los pliegues cutáneos fueron: tricipital (TC), subescapular (SB), suprailíaco (SI), abdominal (A), muslo anterior (MA) y pierna (P).

· Perímetros de brazo y pierna

Se realizó la medida con una cinta antropométrica. Se trataba de medir circunferencias a diferentes niveles corporales. Para ello, se situó la cinta sobre la zona al nivel requerido, sin comprimir los tejidos blandos y de forma perpendicular al eje longitudinal del segmento que se estuviera midiendo.

· Diámetro de fémur, húmero y biestiloide

Esta medida se realizó con un Paquímetro.

2.2.2 Prueba de esfuerzo para determinar los diferentes parámetros máximos y submáximos de los deportistas

Se trata de un procedimiento ampliamente utilizado en medicina deportiva que consiste en la valoración de la respuesta del organismo durante el ejercicio. Es una prueba estandarizada, es decir, que la forma de realización siempre es la misma lo que permite comparar los resultados entre deportistas y la evolución del mismo individuo a lo largo del tiempo.

La prueba de esfuerzo se realizó en el contexto de un reconocimiento médico-deportivo (historia clínica, valoración antropométrica, ECG basal, ecocardiograma-doppler). Los objetivos esenciales de la prueba de esfuerzo fueron la valoración del estado de salud de los deportistas

y por otro lado la valoración funcional que permitiera el apoyo científico-médico al entrenamiento. No se encontró en ninguno de los sujetos patología alguna que contraindicara la práctica deportiva. Tras el procedimiento se obtienen datos que permitieron un asesoramiento médico del entrenamiento, determinando las intensidades de ejercicio recomendables para conseguir una mejora en el rendimiento deportivo. El protocolo de esfuerzo consistió en un test incremental en rampa máximo en tapiz rodante, con intensidad de carga inicial lenta y con incrementos suaves que permitieron una buena adaptación biomecánica para poder valorar los parámetros biológicos en todo el rango de intensidades de esfuerzo.

El protocolo en rampa utilizado fue el siguiente:

Varones:

Calentamiento: 2 minutos a 6 km·h⁻¹ de velocidad y 1% de pendiente.

Test: inicio a 8 km·h⁻¹ de velocidad y una pendiente de 1%.

- Incremento de velocidad de 0,25 km·h⁻¹ cada 15 s.

- Incremento de pendiente: inclinación del tapiz rodante constante hasta el minuto 13 de ejercicio en que se incrementa un 0,25% cada 15 s.

Recuperación: 2 minutos a 3 km·h⁻¹ de velocidad y 1% de pendiente.

Mujeres:

El protocolo de esfuerzo fue similar salvo que la velocidad a cada nivel de ejercicio desde la fase de calentamiento es 2 km·h⁻¹, más lenta.

En algunos casos, según la especialidad deportiva, la prueba de esfuerzo máximo se realizó en una bicicleta ergométrica, con una frecuencia estándar de pedaleo de 60-70 r.p.m. y con un protocolo similar al del tapiz rodante.

Personal médico especializado se encargó de la valoración clínica previa del paciente, y el control clínico y electrocardiográfico del

deportista durante la realización de la prueba. Personal de enfermería se encargó de preparar al sujeto para la prueba, realizar los controles electrocardiográficos y de tensión arterial (TA) necesarios durante la prueba y en el manejo del deportista.

· Preparación del atleta

Los atletas aceptaron la realización de la exploración, tras la correspondiente explicación, mediante la firma del consentimiento informado. Como preparación previa del sujeto se exigió que no hubiera tomado bebidas alcohólicas ni con cafeína hasta tres horas antes de la realización de la prueba, que no hubiera realizado actividad física intensa o ejercicio inhabitual en las doce horas anteriores y que llevara ropa confortable y calzado adecuado.

· Protocolos de esfuerzo

Las pruebas ergométricas se pueden clasificar según la intensidad del esfuerzo en: pruebas máximas (cuando se realizan hasta el agotamiento) o submáximas (cuando finalizan antes del mismo); según la graduación del esfuerzo en: pruebas de carga constante (cuando la carga se mantiene con la misma intensidad durante todo el tiempo de la prueba) o de carga creciente (cuando la carga aumenta con el tiempo); éstas a su vez pueden ser pruebas en rampa (cuando el tiempo en cada estadio es tan corto que no permite el ajuste del organismo a cada incremento de carga); escalonadas continuas (cuando el tiempo de cada estadio de carga permite el ajuste del organismo a cada incremento de carga sin pausas entre los diferentes estadios) y escalonadas discontinuas (cuando la carga impuesta aumenta de forma progresiva, pero con intervalos de descanso o recuperación activa) que presentan el inconveniente de lo prolongado que puede hacerse la prueba de esfuerzo. En este caso el protocolo de elección fue una prueba máxima de carga creciente en rampa.

· Realización de la prueba de esfuerzo

Previamente a la realización de la prueba de esfuerzo se realizó un electrocardiograma en reposo en decúbito supino, en bipedestación y tras una hiperventilación de 10 s.

A continuación se realizó una espirometría basal y la prueba de esfuerzo en tapiz rodante con el protocolo incremental en rampa descrito anteriormente y durante la misma se monitorizó de forma continua el electrocardiograma durante el ejercicio y durante los 5 primeros minutos postesfuerzo durante la recuperación.

Durante toda la prueba de esfuerzo (calentamiento, test y recuperación) se realizó una monitorización electrocardiográfica de 12 derivaciones. Paralelamente, se realizó un registro de la Frecuencia Cardíaca (FC) durante toda la prueba y la tensión arterial (TA), tanto en reposo, como en el máximo esfuerzo y en la recuperación en los minutos 3 y 5 posteriores al esfuerzo.

Durante la prueba de esfuerzo se midió de forma directa la ventilación pulmonar y el intercambio de los gases respiratorios en ejercicio (análisis directo de los gases respiratorios: medición del oxígeno consumido y el dióxido de carbono producido) lo que permitió la determinación exacta del consumo máximo de oxígeno (VO_2 máx) y la detección de los umbrales aeróbico y anaeróbico.

El consumo de oxígeno es la determinación más adecuada para medir la capacidad para realizar ejercicio aeróbico: un consumo de oxígeno mayor es propio de deportistas bien entrenados.

Los umbrales aeróbico y anaeróbico permiten establecer la intensidad ideal de los entrenamientos aeróbicos (rodajes) y anaeróbicos (series), para optimizar el rendimiento, y recomendar ritmos de competición.

· Parámetros determinados durante la prueba de esfuerzo

A. Parámetros mecánicos:

En la prueba de esfuerzo realizada sobre el tapiz rodante el deportista caminaba sobre una cinta movida por un motor cuya velocidad y pendiente eran regulables. Es el tipo de ejercicio más natural y automatizado, en definitiva más fisiológico. El nivel de

esfuerzo más alto que se alcanzaba era indicativo de la capacidad funcional del individuo en cuestión.

- Velocidad máxima (km/h) alcanzada en el tapiz rodante por el deportista
- Pendiente máxima (%) ó inclinación del tapiz a la que puede mantener la velocidad
- Potencia (vatios): trabajo máximo realizado en la prueba de esfuerzo calculado en función del peso corporal, velocidad del tapiz y pendiente alcanzada.

B. Parámetros ergoespirométricos:

Los parámetros ergoespirométricos que valoramos fueron los siguientes:

- Parámetros máximos:

a) VO_2 : expresado en valores absolutos (l/min) o en relación al peso corporal (ml/kg/min), es la cantidad de oxígeno consumido por unidad de tiempo. Indica la máxima capacidad del sistema de transporte de oxígeno por unidad de tiempo, es decir, la capacidad funcional del individuo.

Los criterios de obtención del VO_2 máx fueron los siguientes:

- Meseta del VO_2 , observada en la curva que relaciona VO_2 e intensidad cuando se realiza una prueba de esfuerzo incremental.
- Un valor del cociente respiratorio (CR) mayor a 1,1.
- Concentración de lactato en la sangre igual o superior a 8 mmol/l al final del esfuerzo.
- Alcanzar la FC máx
- El grado de agotamiento del sujeto

b) VCO_2 : expresado en l/min, indica la producción de CO_2 por el sujeto y es medido en el aire espirado.

c) Cociente respiratorio (CR): Es la relación VCO_2/VO_2 y permite conocer las características del esfuerzo que se realiza a nivel metabólico. El CR en reposo se encuentra en torno a 0,80 lo que significa que se está metabolizando sobre todo ácidos grasos libres (metabolismo aeróbico) en lugar de glucosa. A medida que se incrementa la intensidad del esfuerzo este valor va aumentando, llegando a valores por encima de 1, lo que significa que se utiliza sobre todo glucosa y a cierta intensidad de ejercicio por vía anaeróbica (metabolismo anaeróbico láctico) generando lactato.

d) Ventilación pulmonar (Vol_{esp}): es el volumen de aire espirado. En reposo oscila alrededor de 4-8 l/min, mientras que durante períodos de esfuerzo puede llegar hasta 100-150 l/min y incluso en deportistas de alto nivel a valores de 200 l/min.

e) Pulso de O_2 : es el cociente VO_2/FC , por tanto es un índice de eficiencia cardiovascular que representa los ml de O_2 contenidos en la sangre eyectada en cada latido cardíaco y, por tanto, guarda relación con la capacidad aeróbica del deportista.

- Parámetros submáximos:

Umrales ventilatorios, es decir, umbral aeróbico y umbral anaeróbico determinados según los criterios de Davis.

Criterios de Davis de determinación de los umbrales ventilatorios:

Umbral aeróbico, umbral ventilatorio 1 (vt_1):

- Primer incremento no lineal de la ventilación.
- Aumento de la relación V_E/VO_2 sin aumento simultáneo de V_E/VCO_2 .
- Elevación de la PETO_2 sin disminución de la PETCO_2 .

Umbral anaeróbico, umbral ventilatorio 2 (vt_2)

- Segundo incremento no lineal de la ventilación.
- Aumento no lineal de la relación V_E/VO_2 con aumento simultáneo de V_E/VCO_2 .
- Elevación de la $PETO_2$ y disminución de la $PETCO_2$
 - V_E/VO_2 : Equivalente ventilatorio de oxígeno
 - V_E/VCO_2 : Equivalente ventilatorio de dióxido de carbono.
 - $PETO_2$: Presión al final de la espiración de oxígeno.
 - $PETCO_2$: Presión al final de la espiración de dióxido de carbono.

En ambos umbrales se valoró la FC, el VO_2 y su porcentaje con respecto al VO_2 máx, y su relación con el parámetro mecánico, es decir, con la velocidad y la pendiente del tapiz rodante.

Los umbrales son indicadores objetivos de la capacidad funcional. Son parámetros reproducibles e independientes de la motivación del sujeto. Su importancia se deriva de su aplicación en la prescripción de la intensidad de ejercicio, de su utilidad en el ajuste del ritmo de competición en pruebas de larga duración y de ser parámetros que se modifican con el entrenamiento y permiten por lo tanto valorar los cambios fisiológicos que se producen con dicho entrenamiento.

En un test de carga progresiva se producen a nivel submáximo dos fenómenos fisiológicos claramente diferenciados:

a) Umbral aeróbico: es la intensidad de ejercicio en la que se produce un inicio en la acumulación de lactato en sangre por encima de los valores de reposo, a la vez que la ventilación se incrementa de una manera desproporcionada con respecto al oxígeno consumido. Hasta ese nivel de ejercicio los valores de lactato son similares a los basales, y existe una relación lineal entre la ventilación y la carga de trabajo, todo ello indicativo de una

participación predominante de la vía aeróbica en la obtención de energía. También se denomina umbral láctico y el umbral ventilatorio 1 (VT_1).

b) Umbral anaeróbico: es la intensidad de ejercicio que metabólicamente corresponde a un máximo estado estable del lactato en sangre. Refleja el máximo equilibrio entre la producción y aclaramiento del lactato. A ese nivel de ejercicio la ventilación se incrementa nuevamente de forma desproporcionada en relación al oxígeno consumido. También se denomina OBLA y umbral ventilatorio 2 (VT_2).

C. Parámetros cardiovasculares:

- Frecuencia cardíaca: nº de latidos por minuto.

a) FC: en reposo se encuentra entre 40-80 latidos por minuto, aunque puede ser más bajo en deportistas muy entrenados en resistencia aeróbica. Durante esfuerzos máximos puede llegar hasta 200 latidos por minuto.

b) $FCVT_1$: frecuencia cardíaca en VT_1

c) $FCVT_2$: frecuencia cardíaca en VT_2

- Tensión arterial: presión que ejerce la sangre contra las paredes de las arterias.

Tiene dos componentes: tensión arterial sistólica (valor máximo de la tensión arterial en sístole, cuando el corazón se contrae) y diastólica (valor mínimo de la tensión arterial cuando el corazón está en diástole o entre latidos cardíacos).

2.2.3 Estudio de la variación de la dosis genómica mitocondrial en ejercicios de distinta intensidad

Todos los sujetos que se presentaron a realizar las distintas pruebas para la cuantificación de mtDNA en músculo, previamente hicieron una prueba

de esfuerzo máximo, para determinar cual era su capacidad máxima de trabajo y la prueba más adecuada para cada uno.

La prueba de capacidad máxima de trabajo consistió en un protocolo progresivo constante en una bicicleta ergométrica. En un primer momento, pedaleaban durante 5 minutos a una carga inicial de trabajo fija, 150 W para hombres, y 100 W para mujeres. Posteriormente, cada minuto se subía la carga de trabajo 50 W o 30 W según si eran hombres o mujeres y se prolongaba la prueba hasta que el sujeto no podía más. A cada tiempo se anotaba su frecuencia cardíaca, para controlar el esfuerzo físico.

En la *Tabla 1* se resumen las características de los diferentes protocolos de ejercicio que se han realizado.

Tabla 1: Características de los diferentes protocolos de ejercicio. (n – número de sujetos que han participado en la prueba; + → experimenta hipertermia y/o fatiga; - → no experimenta hipertermia y/o fatiga).

Prueba física	n	VO ₂ máx (%)	Potencia trabajo (W)	Duración (min)	T° ambiente (°C)	Hipertermia	Fatiga
Reposo (situación control)	5	-	-	120	20	-	-
Ejercicio de baja intensidad	5	~ 25	64±24	120	20	-	-
Ejercicio fatigante de moderada intensidad	14	~ 60	210±20	120-145	35	+	+
Ejercicio no fatigante de moderada intensidad	10	~ 60	210±20	120-145	35	-	-
Ejercicio repetitivo de gran intensidad	7	~ 110	356±14				
1ª Tanda				5	44	+	+
2ª Tanda				5	14-16	-	-
3ª Tanda				8	14-16	-	+

· Ejercicio prolongado de intensidad moderada, fatigante y no fatigante

En esta prueba a los sujetos se les sometió a un ejercicio de intensidad moderada (~60% VO₂ máx o 210±20 W), en unas condiciones ambientales determinadas (temperatura ambiente

35°C y humedad relativa entre 40-50%), durante un tiempo de 2,0-2,5 h.

En el protocolo fatigante, los individuos apenas bebieron durante la realización de la prueba, experimentando deshidratación (perdida del ~4% de su peso corporal), hipertermia (temperatura corporal 39,5-40,5°C) y fatiga.

Por el contrario, en el protocolo no fatigante, aunque los individuos estaban sometidos a las mismas condiciones al poder ingerir líquidos no sufrieron ni hipertermia, ni fatiga.

Durante estas pruebas se registró el consumo máximo de oxígeno (VO₂ l/min), utilizando un analizador de gases y el contenido de glucógeno y lactato en el músculo usando ensayos fluorométricos ⁽⁷⁰⁾.

Con objeto de estudiar como evolucionaba la dosis genómica mitocondrial tras la realización de una prueba física, tras acabar el ejercicio de intensidad moderada, prolongado y fatigante a los sujetos se les tomó una biopsia a las 2 horas, 6 horas y 24 horas de recuperación.

· Ejercicio corto, repetitivo y de gran intensidad

En esta prueba los sujetos realizan un serie de ejercicios breves (5-8 min), de gran intensidad (~110% VO₂ máx; 356±14 W), bajo diferentes condiciones ambientales, cada tanda de ejercicios está precedida por un calentamiento de 10-15 minutos y 5 minutos de descanso, entre cada ejercicio los sujetos descansaban 1h y durante este tiempo reponían líquidos.

En la primera tanda de ejercicios los sujetos pedalearon hasta agotamiento, en condiciones de estrés térmico (llevaban puesta una chaqueta en cuyo interior circulaba agua a 46°C). En la segunda tanda de ejercicios, los individuos pedalearon el mismo tiempo que en la primera, pero en esta ocasión la temperatura ambiental era de 14-16°C.

Por último, en la tercera tanda los sujetos pedalearon en las mismas condiciones que en la tanda segunda pero hasta el agotamiento.

Durante estas pruebas se registró el consumo máximo de oxígeno (VO_2 l/min), utilizando un analizador de gases, el lactato en sangre utilizando un analizador EML, el contenido de glucógeno, lactato y fosfocreatina en el músculo, usando ensayos fluorométricos, el ATP muscular mediante un método luminométrico ⁽⁷⁰⁾.

· Ejercicio suave y reposo

En este protocolo los sujetos en un primer momento reposaron durante dos horas a temperatura ambiente ($\sim 20^\circ\text{C}$), a continuación se les sometió a un ejercicio prolongado (2 h), de intensidad muy suave ($\sim 25\% \text{VO}_2$ máx o $64 \pm 24 \text{ W}$).

Durante la realización de los distintos protocolos de ejercicio se propuso usar la escala del esfuerzo percibido (Ratio of Perceived Exertion-RPE) para conocer la intensidad del ejercicio. Con este método los individuos van clasificando subjetivamente la intensidad con la que creen que están haciendo ejercicio. Se utilizó la escala de Borg original, en la cual se asocia una clasificación numérica desde 6 hasta 20 para las distintas intensidades relativas percibidas por el sujeto, desde muy, muy leve hasta muy duro.

Este método propuesto por Borg permite un aumento lineal del esfuerzo percibido respecto a la variación de parámetros como la carga de trabajo y la frecuencia cardíaca. Se asume que la percepción entre los diferentes individuos de la intensidad de trabajo es aproximadamente igual en todos.

Así de este modo cada quince minutos de la duración de la prueba además de anotar la frecuencia cardíaca de los individuos determinada con un pulsómetro, se les pedía a los individuos que dijeran su percepción de intensidad de trabajo basándose en la escala Borg.

2.2.4 Extracción de las biopsias musculares

Las biopsias musculares para el estudio de la dosis genómica mitocondrial, fueron obtenidas de la sección media del Vastus lateralis, utilizando la técnica de obtención de biopsias percutáneas con aspiración ⁽⁷¹⁾.

Se depiló y se desinfectó un área de 3 cm^2 de piel cercana a la zona que nos interesaba para tomar la muestra, la cual fue anestesiada por infiltración local de (2ml de lidocaína al 1%). Se realizó una escisión sobre la piel de unos 5 mm de largo, con un bisturí estéril, a través de la cual se introdujo la aguja. Las biopsias fueron extraídas mediante succión. Las muestras tomadas antes y después de la prueba se tomaron del mismo orificio cambiando la inclinación de la aguja. Posteriormente las muestras se limpiaron de los posibles restos de sangre y grasa y una vez limpias se dividieron en varios fragmentos, se añadió un crioprotector del tejido (Tissue-Tek), se congelaron en N_2 líquido y se guardaron a -80°C hasta el momento de su análisis.

2.2.5 Protocolos de Biología Molecular

A continuación se enumeran las técnicas empleadas en el análisis genético realizado a los deportistas y a los controles.

Ver protocolos detallados en Anexo II.

· Extracción y cuantificación de DNA

A partir de las muestras de sangre y biopsias de músculo pertenecientes a los sujetos sometidos a estudio se extrajo el DNA total con el que posteriormente se realizaron los análisis genéticos.

· Análisis genético mitocondrial: Determinación de Haplogrupos y Subhaplogrupos.

La determinación de Haplogrupos y Subhaplogrupos mitocondriales se realizó a partir de DNA total mediante las siguientes técnicas:

- A. Polimorfismos de restricción (RFLPs).
- B. Secuenciación de la región hipervariable I (HVI) del mtDNA.
- C. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.

· Determinación del Daño oxidativo mitocondrial por PCR a tiempo real en sangre

El fundamento del método está basado en el hecho conocido de que un nucleótido o región dañada en el DNA impide

el progreso de la DNA polimerasa durante el proceso de alargamiento, dando lugar a una disminución en la formación del producto de PCR. Mediante el uso de PCR en tiempo real se puede determinar este daño que impide la amplificación, estimando cuantitativamente dos fragmentos de diferente tamaño localizados en la misma secuencia del DNA; cuanto mayor sea el daño mayor será el efecto de disminución de la amplificación en el fragmento mayor respecto del menor.

· Determinación del contenido genómico de mtDNA por PCR a tiempo real en sangre

Se trata de una PCR cuantitativa en tiempo real utilizada para amplificar y, simultáneamente, cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de DNA. Para ello, se compara la amplificación de un fragmento de mtDNA respecto a la amplificación de un gen nuclear de copia única.

· Análisis genético de genes nucleares

Se determinaron el polimorfismo rs4880 C/T de la enzima MnSOD por PCR a tiempo real y los polimorfismos de PON1 en la secuencia codificante (55 y 192) y en el promotor (-108 y -162 mediante RFLPs y secuenciación respectivamente.

· Estudio de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria

Para estudiar los complejos de la cadena respiratoria fue necesario utilizar las siguientes técnicas analíticas (ver protocolos detallados en Anexo III):

- A. Obtención de homogenizados y “aislamiento” de los complejos mitocondriales a partir de biopsias de músculo esquelético.
- B. Medida de la actividad del complejo IV (citocromo c oxidasa, COX) por espectrofotometría.
- C. Determinación de la actividad enzimática de los complejos respiratorios I y V “in gel”.

2.2.6 Análisis estadístico

Los resultados de variables continuas se han expresado como la media $\pm$ desviación estándar (DS) de la media. En los parámetros de valor continuo, antes del correspondiente análisis estadístico, se comprobó la normalidad de la distribución mediante el Test de Kolmogorov-Smirnov (K-S). Si su distribución era normal ($p > 0.05$) se utilizó el Student's T-test (con 2 grupos) o el análisis de varianza (ANOVA test) para > 2 grupos con el subsiguiente test de Fischer; en cambio cuando la $p < 0.05$, la prueba estadística aplicada fue Mann-Whitney U-test. La diferencia significativa se marcó al nivel del 95%, es decir, con $p < 0.05$. El análisis estadístico de variables cualitativas se realizó mediante χ^2 -test de la tabla de contingencia correspondiente. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete estadístico Stat View 5.0 para Macintosh (SAS Institute, Inc.).

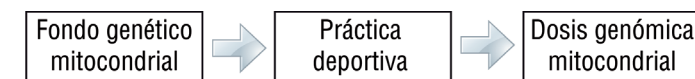
3. RESULTADOS

En este apartado se muestran todos los resultados obtenidos a lo largo de los diferentes estudios realizados.

3.1 Fondo genético y práctica deportiva

Todavía se conoce poco sobre la predisposición genética de los individuos para la práctica deportiva, pero en los últimos años y tras estudiar polimorfismos de genes nucleares y diversos aspectos vinculados al rendimiento deportivo, han aparecido fuertes evidencias que apoyan la dependencia entre deporte y fondo genético ⁽⁷²⁻⁷⁴⁾. Dentro del estudio genético tiene especial interés la genética mitocondrial, ya que es en las mitocondrias donde se produce la mayor parte del ATP consumido durante el ciclo contracción-relajación muscular. Por consiguiente, parece obvio que el genoma mitocondrial debe desempeñar un papel importante en el mantenimiento del requerimiento energético del ejercicio y, por tanto, que su variabilidad genética pueda condicionar la predisposición de los individuos para la práctica deportiva (Figura 16).

Figura 16. Esquema de los objetivos perseguidos por el estudio que realizado.



Por todo ello, en la primera parte del trabajo se valoró la influencia que el fondo genético mitocondrial de un atleta puede ejercer en la práctica deportiva que desarrolla y cómo esta práctica puede determinar cambios genómicos mitocondriales.

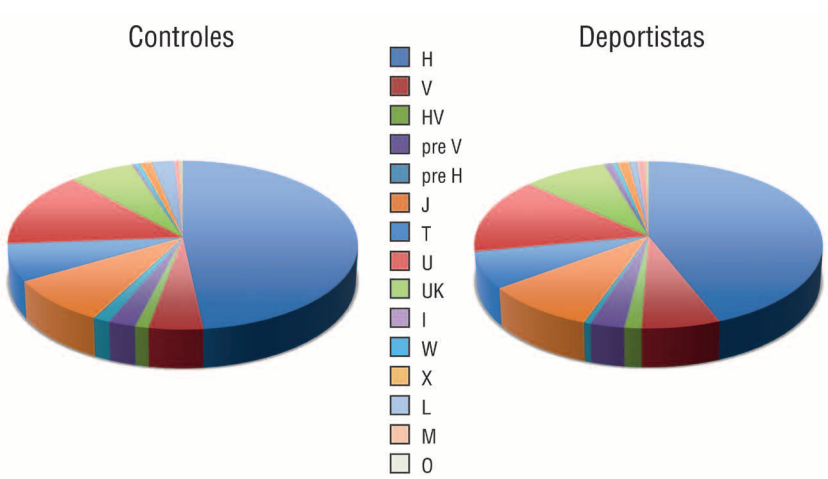
3.1.1 Distribución de Haplogrupos

Se estudió la variabilidad genética mitocondrial (haplogrupos mitocondriales) en una población control y otra de deportistas de nivel nacional e internacional de diferentes disciplinas deportivas.

La población control estaba compuesta por 348 hombres y mujeres sanos que no practicaban deporte de forma habitual.

La población de deportistas profesionales estaba compuesta por 348 sujetos: 290 eran atletas, hombres y mujeres, que practicaban diferentes deportes a nivel nacional o internacional y las 58 restantes eran árbitros de primera y segunda división de la liga de fútbol española.

Analizados los haplogrupos mitocondriales de deportistas y controles se observó que los haplogrupos mitocondriales se distribuían de similar manera en ambas poblaciones (Gráfica 1 y Tabla 2) ($P>0,05$).



Gráfica 1. Distribución de haplogrupos mitocondriales en controles (348) y deportistas (348).

Tabla 2. Distribución de los haplogrupos mitocondriales en deportistas y controles.

HAPLOGRUPOS	TOTAL		CONTROLES		DEPORTISTAS	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
H	321	46	168	48	153	44
V	39	5,6	16	4,6	23	6,6
HV	9	1,3	4	1,1	5	1,4
Pre V	18	2,6	8	2,3	10	2,9
Pre HV	7	1	5	1,4	2	0,5
J	64	9,2	31	8,9	33	9,5
T	50	7,2	25	7,2	25	7,2
U	101	14,5	50	14,4	51	14,7
UK	53	7,6	23	6,6	30	8,6
I	4	0,5	1	0,3	3	0,9
W	4	0,5	2	0,5	2	0,5
X	8	1,1	4	1,1	4	1,1
L	11	1,6	8	2,3	3	0,9
M	5	0,7	2	0,5	3	0,9
O	2	0,3	1	0,3	1	0,3
Total	696	100	348	100	348	100

3.1.2 Metabolismo deportivo

Como globalmente no se observaron diferencias, se analizó la posible asociación de las variantes genéticas mitocondriales con el metabolismo deportivo aeróbico o anaeróbico, tanto en hombres como en mujeres.

En aeróbicos, se engloban a aquellos deportes que debido a su duración, de varios minutos, tienen como principal fuente de energía la mitocondria (sistema OXPHOS). Este grupo comprende: ciclistas, corredores de largas distancias, corredores de maratón, corredores de marcha, duatletas, triatletas, patinadores, remeros, piragüistas y esquiadores, tanto de fondo como de montaña. La práctica de estos deportes exige un régimen de entrenamiento especial denominado entrenamiento de resistencia aeróbica.

En anaeróbicos quedan el resto de deportistas pertenecientes a deportes de equipo y árbitros, corredores de 400 m, velocistas (corredores de 50 y 100 m), saltadores, halterofilia y lanzadores de peso.

Como puede observarse (Tablas 3 y 4) no se encontró que la variabilidad genética mitocondrial influyera en el metabolismo deportivo ($P>0,05$).

Tabla 3. Distribución de haplogrupos y clados (agrupaciones de haplogrupos evolutivamente relacionadas) mitocondriales en atletas con metabolismo aeróbico.

CIADO	HAPLOGRUPOS	TOTAL		HOMBRES		MUJERES	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)
HV	H	58	40,6	53	41,7	5	41,7
	V	11	7,7	10	7,6	1	8,3
	HV	3	2,1	2	1,5	1	8,3
	Pre V	5	3,5	5	3,8	0	0
	Pre HV	0	0	0	0	0	0
JT	J	14	9,8	13	9,9	1	8,3
	T	12	8,4	11	8,4	1	8,3
U	U	25	17,7	23	17,6	2	16,7
	UK	11	7,7	10	7,6	1	8,3
IWX	I	0	0	0	0	0	0
	W	1	0,7	1	0,7	0	0
	X	1	0,7	1	0,7	0	0
LMO	L*	1	0,7	1	0,7	0	0
	M*	0	0	0	0	0	0
	O	1	0,7	1	0,7	0	0
	Total	143	100	131	100	12	100

* Los haplogrupos L y M, que presentan una baja frecuencia en la población española por no pertenecer a la línea caucásica (L africano, M asiático), se agruparon con O para formar un grupo artificial, LMO, únicamente con fines analíticos.

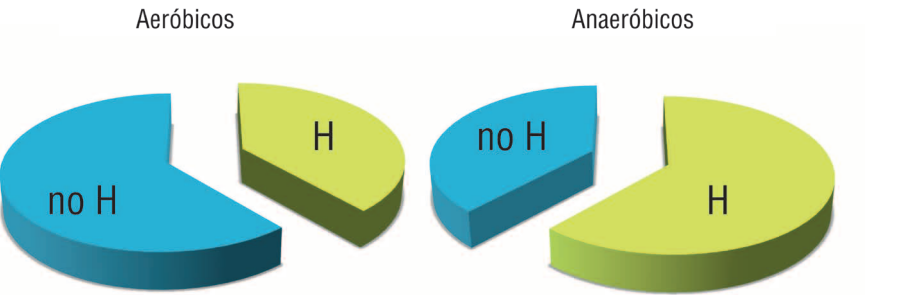
Tabla 4. Distribución de haplogrupos y clados (agrupaciones de haplogrupos evolutivamente relacionadas) mitocondriales en atletas con metabolismo anaeróbico.

CIADO	HAPLOGRUPOS	TOTAL		HOMBRES		MUJERES	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)
HV	H	95	46,3	88	50,9	7	21,9
	V	12	5,8	8	4,6	4	12,5
	HV	2	0,9	2	1,2	0	0
	Pre V	5	2,4	4	2,3	1	3,1
	Pre HV	2	0,9	2	1,2	0	0
JT	J	19	9,3	12	6,9	7	21,9
	T	13	6,3	11	6,3	2	6,2
U	U	26	12,7	24	13,9	2	6,2
	UK	19	9,3	14	8,1	5	15,6
IWX	I	3	1,5	3	1,7	0	0
	W	1	0,5	1	0,6	0	0
	X	3	1,5	2	1,2	1	3,1
LMO	L*	2	0,9	1	0,6	1	3,1
	M*	3	1,5	1	0,6	2	6,2
	O	0	0	0	0	0	0
	Total	205	100	173	100	32	100

* Los haplogrupos L y M, que presentan una baja frecuencia en la población española por no pertenecer a la línea caucásica (L africano, M asiático), se agruparon con O para formar un grupo artificial, LMO, únicamente con fines analíticos.

Sin embargo, cuando se realizó una división más precisa de los atletas considerando a) deportistas aeróbicos (n=101) a atletas de fondo, ciclismo, triatlón y b) deportistas anaeróbicos a los atletas de 100m y 400m (n=34), entonces se apreció una diferencia significativa (P=0,02) para la distribución del haplogrupo H, que se acumulaba en los deportistas anaeróbicos (Gráfica 2).

En la población control el haplogrupo H esta representado en un 43%, mientras que en los deportistas anaeróbicos está en un 62%, y en los aeróbicos en un 39%.



Gráfica 2. Distribución del haplogrupo H frente al resto de haplogrupos mitocondriales en atletas aeróbicos y anaeróbicos.

3.1.3 Consumo de oxígeno

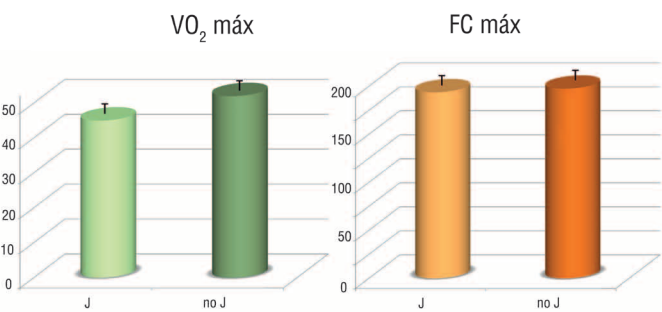
Para determinar la capacidad física de un individuo un parámetro esencial a tener en cuenta es el consumo de oxígeno, el VO₂, que está íntimamente relacionado con el gasto energético. Cuando el consumo de oxígeno alcanza el máximo valor se estabiliza durante casi todo el ejercicio reflejando el balance entre la energía necesaria y la producción de ATP del metabolismo aeróbico. Por ello se utiliza el VO₂ máx, para determinar la capacidad aeróbica de síntesis de ATP de un individuo. Por tanto, cuando se estudiaba la influencia del fondo genético mitocondrial en el ejercicio, se analizaba indirectamente el consumo de oxígeno máximo.

Además de por este parámetro, el ejercicio está limitado por el sistema cardiovascular del individuo, es decir, la capacidad de transportar el oxígeno de los pulmones a los músculos en contracción, por lo que, entre otros parámetros, es importante tener en cuenta la frecuencia cardiaca máxima (FC máx), que está linealmente relacionada con el VO₂ máx.

Estudios previos, ya habían observado una posible influencia de la genética mitocondrial sobre el VO_2 máx, sin embargo ningún estudio había sido concluyente, por lo que el objetivo de esta primera parte del trabajo era demostrar esta influencia.

Con esta finalidad se seleccionó una población homogénea de hombres sanos de entre 20 y 40 años ($n=114$), que llevaban a cabo una vida saludable pero no eran deportistas ya que únicamente realizaban un ejercicio de mantenimiento. Esta población presentaba una distribución de haplogrupos similar a la ya publicada en la población española ⁽³⁶⁾.

Al analizar los principales parámetros cardiorrespiratorios, VO_2 máx y FC máx, entre todos los haplogrupos mitocondriales de la población control analizada no se apreciaron diferencias significativas ($P>0,05$).



Gráfica 3. Consumo de oxígeno y frecuencia cardíaca máximas en el haplogrupo J frente al resto de haplogrupos.

Sin embargo, cuando se asumió que el haplogrupo J es el menos eficiente, como se había sido propuesto ⁽³⁰⁾ y se dividió nuestra población en dos grupos, J vs. noJ, se observó un valor de VO_2 máx significativamente ($P=0,02$) menor en los individuos con el haplogrupo mitocondrial J (Gráfica 3).

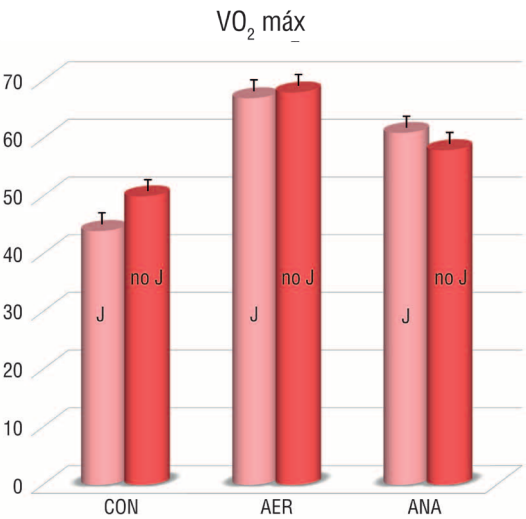
Se sabe que el consumo de oxígeno puede depender, entre otros factores, de la frecuencia cardíaca, por lo que se consideró de interés descartar que ese factor era el responsable de las diferencias observadas entre los haplogrupos mitocondriales. Realizado el análisis, se observó que la FC máx era similar en J y noJ ($P=0,8$), por lo que se concluyó que la diferencia observada en VO_2 máx se debía al fondo genético mitocondrial.

3.1.4 Efecto del fondo genético en la población entrenada

Considerando los resultados obtenidos, se estudió si la influencia del fondo genético sobre el VO_2 máx se mantenía en los atletas de élite sometidos a un entrenamiento continuo, ya que se conoce que el VO_2 máx aumenta con el entrenamiento ⁽⁵²⁾.

Para ello, se seleccionó una población compuesta por un grupo de 101 atletas de nivel internacional con entrenamiento aeróbico y a 34 con entrenamiento anaeróbico. Las diferencias observadas en los principales parámetros antropométricos y fisiológicos eran las esperadas para este tipo de entrenamientos, por lo que se descartó cualquier sesgo en el reclutamiento de la población.

Al analizar el VO_2 máx, se observó que el entrenamiento aumentaba el VO_2 máx, siendo mayor ese incremento en los atletas de entrenamiento aeróbico, como cabía esperar (Gráfica 4).



Gráfica 4. Consumo de oxígeno máximo en el haplogrupo J frente al resto de haplogrupos en controles y deportistas aeróbicos como anaeróbicos.

Cuando se analizó el VO_2 máx entre las variantes mitocondriales J y el resto de haplogrupos (noJ), la diferencia significativa ($P=0,02$) encontrada en la población control había desaparecido, tanto en atletas aeróbicos ($P=0,8$) y anaeróbicos ($P=0,5$).

Este resultado sugería que las adaptaciones del entrenamiento enmascararan las diferencias que el fondo genético mitocondrial puede determinar en el consumo de oxígeno. Sin embargo, se desconocían las condiciones, previas al entrenamiento, de los atletas de elite seleccionados por lo que no se obtuvieron resultados concluyentes.

Profundizando en este resultado, se observó que esta diferencia se debía sobre todo al haplogrupo H. Es decir el haplogrupo H y el haplogrupo J estaban en los extremos de ($P=0,008$) mayor y menor VO_2 máx, respectivamente.

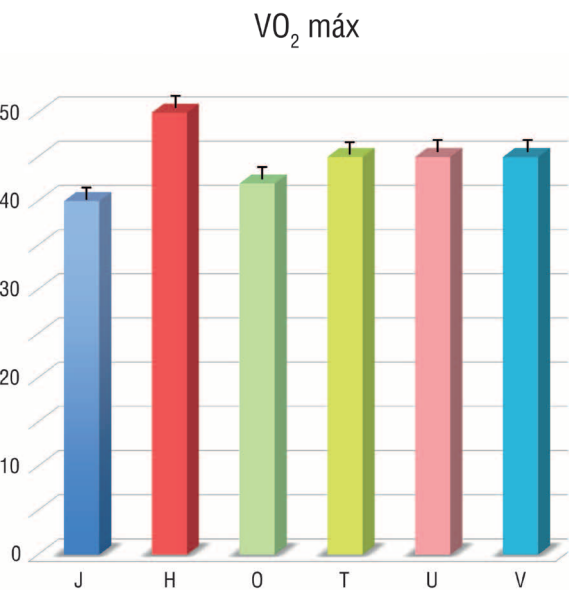


Gráfico 5. Consumo de oxígeno máximo en todos los haplogrupos mitocondriales. J vs. noJ ($P=0,02$); J vs. H ($P=0,008$). (Tesis de Diana Martínez Redondo).

Por otro lado, la población control empleada, se encontraba en un intervalo de edad amplio, de 20-40 años. Se sabe que el VO_2 máx disminuye con la edad, por lo que se decidió verificar los resultados en una población con un intervalo de edad más reducido. Para ello, se reclutó un grupo control de 20-25 sobre el VO_2 máx confirmando la diferencia de VO_2 máx entre las variantes J y noJ, previamente encontrada ($P=0,02$). Tampoco se observó diferencia entre la FC máx, como en el estudio inicial (Gráfico 6).

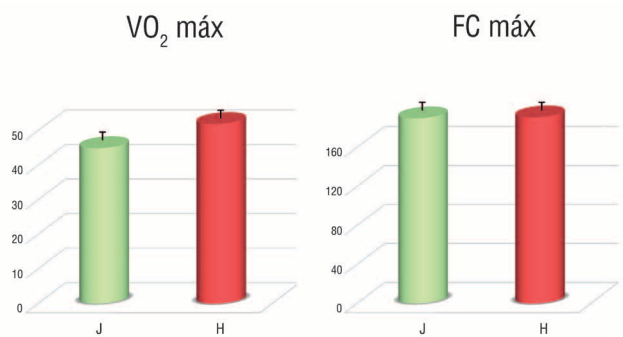
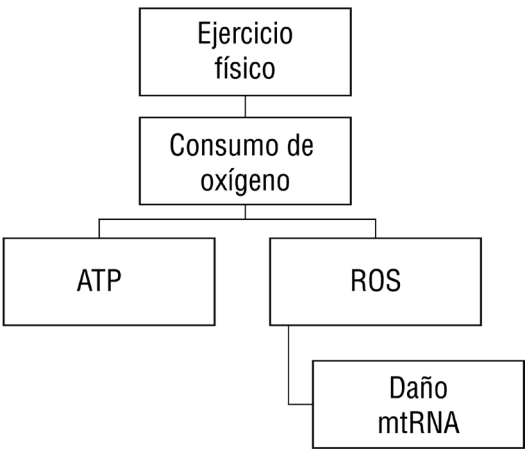


Gráfico 6. Consumo de oxígeno y frecuencia cardíaca máximas en el haplogrupo J frente al H. (Tesis de Diana Martínez Redondo).

3.1.5 Daño oxidativo del mtDNA

Cuando se realiza ejercicio físico, el consumo de oxígeno aumenta porque es necesario generar más energía en los músculos en acción lo que aumenta la producción de ATP y la producción de ROS. Por lo tanto, teniendo en cuenta que el DNA mitocondrial es más susceptible a este daño, es lógico pensar que como consecuencia del ejercicio aumentará el daño sobre el DNA mitocondrial (Figura 7 y 17).

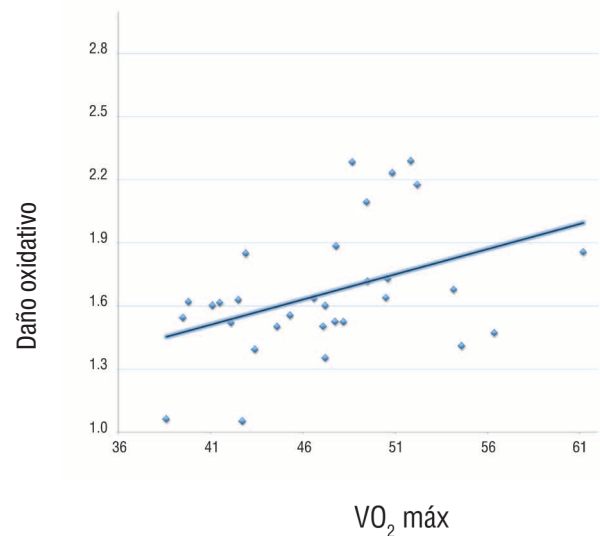
Figura 17. El daño oxidativo en el mtDNA es una consecuencia de la producción de ROS.



Habiendo observado mayor consumo de oxígeno en el haplogrupo mitocondrial H que en el J, se planteó la hipótesis de que el daño oxidativo también sería mayor en H, lo que fue confirmado posteriormente.

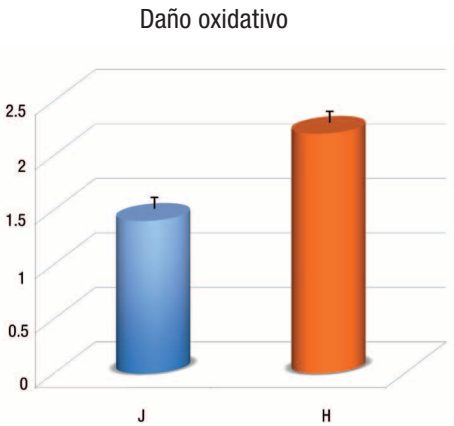
Para ello, se pensó que el tejido más adecuado para ver este efecto tenía que ser el músculo. Pero, puesto que la extracción de biopsias musculares es una técnica muy agresiva se decidió centrar el análisis en los haplogrupos que presentaban diferencias máximas entre sí, el J y el H. Se reclutaron 25 individuos con haplogrupo H y 7 con haplogrupo J. Esta población no presentaba diferencias en los principales parámetros con excepción de la esperada en el consumo de oxígeno, en el que se mantenía que el haplogrupo H presentaba mayor VO_2 máx que el J ($P=0,02$).

Determinado el daño oxidativo en el mtDNA primero se observó que existía una correlación positiva entre éste y el VO_2 máx. En coherencia con el funcionamiento de la mitocondria, al consumir más oxígeno se libera más cantidad de ROS y, por tanto, se produce más daño en el mtDNA (Gráfica 7).



Gráfica 7. Correlación entre el VO_2 máx y el daño oxidativo (Tesis de Diana Martínez Redondo).

En segundo lugar, cuando se comparó el daño en los distintos haplogrupos se apreció que los individuos H presentan mayor daño en el DNA mitocondrial que los individuos J ($P=0,04$), como habíamos hipotetizado.

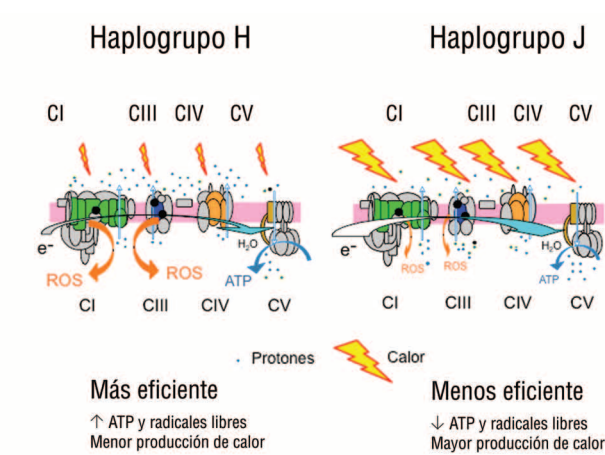


Gráfica 8. Daño oxidativo en el haplogrupo J frente al H. (Tesis de Diana Martínez Redondo).

3.1.6 Haplogrupos H y J, ¿cómo explicar sus diferencias?

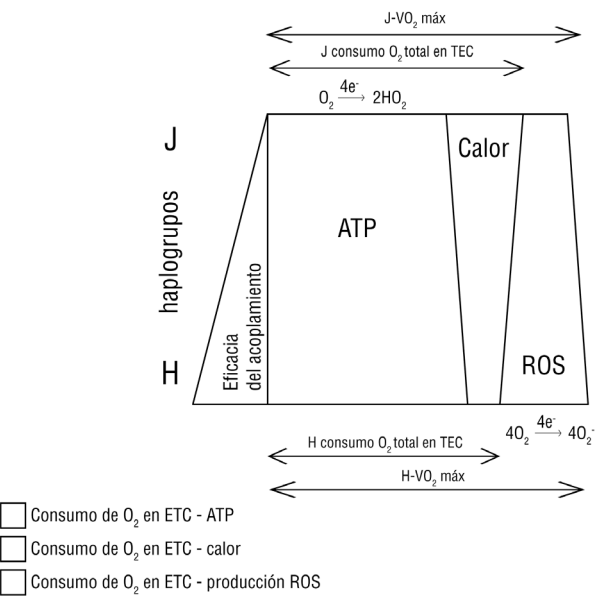
Se ha postulado un distinto acoplamiento y, por tanto, eficiencia de la cadena respiratoria en los haplogrupos mitocondriales H y J esquematizados en la Figura 18 ⁽³⁰⁾ siendo H el más y J el menos acoplado. Veamos esto con más detalle.

Figura 18. Efectos de la diferente eficiencia de los haplogrupos H y J (Tesis de Ana Marcuello López y Diana Martínez Redondo).



El diagrama de la *Figura 19* facilita la comprensión de este proceso. Una parte importante del oxígeno consumido contribuye a la formación de ROS, siendo esta proporción tanto mayor, cuanto más acoplado esté el haplogrupo ⁽⁷⁵⁾. El haplogrupo H ha sido propuesto como el mejor acoplado, más eficiente, por lo que prácticamente toda la energía generada en la cadena se utiliza para la formación de ATP, liberando poco calor, pero con el inconveniente de generar muchos radicales libres. El haplogrupo J, por el contrario, al estar menos acoplado, genera menos ATP y más calor, pero con la ventaja de producir menos radicales libres.

Figura 19. Esquema que representa, no proporcionalmente, el diferente consumo de oxígeno en los haplogrupos H y J. (Tesis de Diana Martínez Redondo).



La cadena respiratoria utiliza 4 electrones para reducir una molécula de oxígeno, mientras que en la producción de ROS esos 4 electrones reducen 4 moléculas de oxígeno, lo que significa que la producción de ROS consume 4 veces más oxígeno que la producción de ATP. Asumida esta propuesta, se entiende que el haplogrupo H presente mayores valores de VO₂ máx que el J, debido a la mayor producción de ROS. Como consecuencia de la mayor producción de ROS en H, también se justifica el mayor daño oxidativo mitocondrial encontrado en este haplogrupo (*Gráfica 8*).

3.2 Variación de la dosis genómica mitocondrial en ejercicios de distinta intensidad

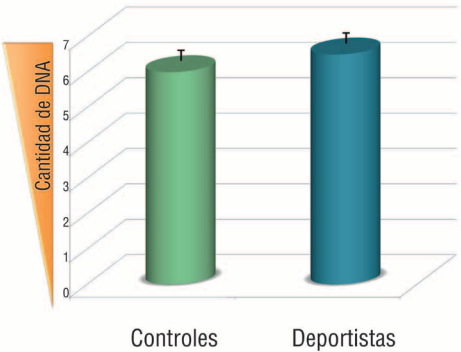
Considerando los resultados obtenidos hasta aquel momento que demostraban la influencia de las variantes genéticas mitocondriales en la práctica deportiva, se decidió analizar el proceso contrario, es decir, cómo el ejercicio físico podía modificar la genómica mitocondrial. El parámetro estudiado fue la dosis genómica mitocondrial o lo que es lo mismo, el número de copias de mtDNA por célula, que guarda una relación inversa con el daño oxidativo: cuanto más daño se genere en la mitocondria, menor número de copias de mtDNA presentará el orgánulo.

En primer lugar se determinó esta dosis genómica en sangre por una razón, su recogida es menos agresiva, aunque tiene el inconveniente de ser un tejido que se renueva constantemente por lo que su incidencia podría ser menos trascendente.

3.2.1 Dosis genómica mitocondrial en sangre

Se inició el estudio reclutando 268 muestras de deportistas de alto nivel y 42 de controles y se determinó su dosis genómica por medio de la técnica de PCR a tiempo real.

Una primera observación mostró que la población de deportistas de alto nivel presentaba una cantidad de mtDNA en sangre significativamente mayor que el grupo control (*Gráfica 9*). Este dato coincidía con lo publicado anteriormente por otros grupos ^(44, 76) donde mostraban que uno de los efectos del entrenamiento físico realizado de forma regular, es un aumento de la biogénesis mitocondrial y de la cantidad de mtDNA.

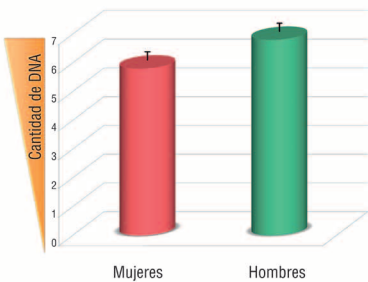


Gráfica 9. Diferencias en la dosis genómica mitocondrial entre controles y deportistas de alto nivel. (Test de la T-Student; p = 0,0020). (Tesis de Ana Marcuello López).

Una vez comprobado que la práctica de ejercicio físico de forma habitual modifica la dosis genómica del mtDNA en sangre, se decidió abordar el estudio del contenido de mtDNA en la población de deportistas.

Los resultados obtenidos, fueron los siguientes:

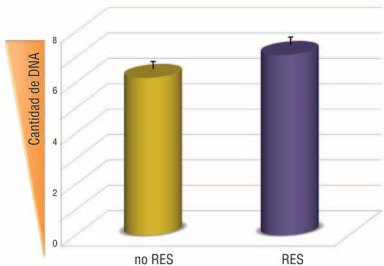
- 1. Aparecieron diferencias en la cantidad de mtDNA según el sexo, siendo las mujeres deportistas las que poseen una cantidad de mtDNA en sangre significativamente menor que los hombres (Gráfica 10), observación que no se encontró en la población control.



Gráfica 10. Diferencias en la dosis genómica mitocondrial entre hombres y mujeres en la población de deportistas de alto nivel. (Test de la T-Student; $p < 0,0001$).

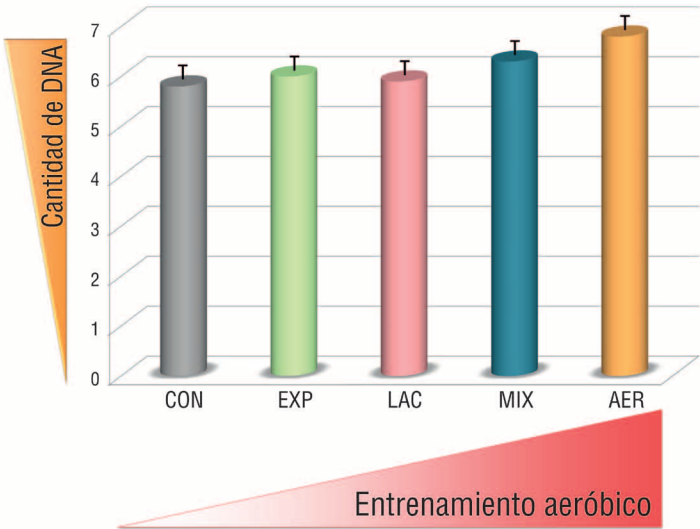
Este resultado se une a las ya citadas diferencias fisiológicas y bioquímicas existentes entre ambos sexos en una población de deportistas.

- 2. Los deportistas con entrenamiento de resistencia aeróbica tienen mayor cantidad de mtDNA que el resto (Gráfica 11).



Gráfica 11. Diferencias en la dosis genómica mitocondrial entre deportistas que realizan entrenamiento de resistencia (RES) y los que no lo realizan (noRES). (Test de la T-Student; $p < 0,0001$). (Tesis de Ana Marcuello López).

- 3. Hay una correlación positiva entre la cantidad de mtDNA y el tipo entrenamiento realizado, así cuanto mayor sea el peso del entrenamiento de resistencia aeróbica, mayor será la dosis genómica mitocondrial (Gráfica 12).



Gráfica 12. Relación entre la dosis genómica mitocondrial y la práctica de entrenamiento de resistencia. (Test ANOVA $p < 0,0001$, Test Fisher AER vs. Control $p < 0,0001$, AER vs. EXP $p = 0,01$, AER vs. LAC $p < 0,0001$, AER vs. MIX $p = 0,0008$, Test Fisher MIX vs. Control $p = 0,002$, MIX vs. EXP $p = 0,05$, MIX vs. LAC $p = 0,0107$). CON = Controles; EXP = deportistas de pruebas explosivas; LAC = deportistas de pruebas lácticas; MIX = deportistas de pruebas mixtas; AER = deportistas de pruebas aeróbicas. (Tesis de Ana Marcuello López).

3.2.2 Dosis genómica mitocondrial en músculo

Los resultados obtenidos en el apartado anterior, que mostraban una asociación entre la cantidad de mtDNA en sangre y el ejercicio físico practicado de forma regular, sugirieron otra cuestión: ¿qué pasaba en el músculo durante los ejercicios de distinta intensidad? Para poder responder a esta pregunta, se obtuvieron, mediante biopsia, muestras del músculo Vastus lateralis en 26 sujetos, sometidos a diferentes protocolos de ejercicio, para determinar el efecto de la duración y la intensidad del ejercicio físico en la dosis genómica mitocondrial.

En un primer momento para validar las técnicas de obtención de las muestras y del método de cuantificación del mtDNA, se tomaron muestras de 10 sujetos, antes y después de dos horas en reposo y se determinó la cantidad de mtDNA por medio de la técnica de hibridación de Southern-Blot.

Figura 20. Efecto del estado de reposo sobre la dosis genómica mitocondrial. (Test ANOVA, análisis por pareados $p = 0,223$). (Tesis de Ana Marcuello López).

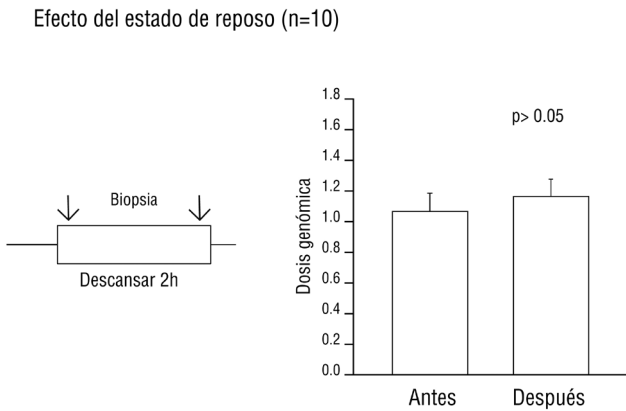
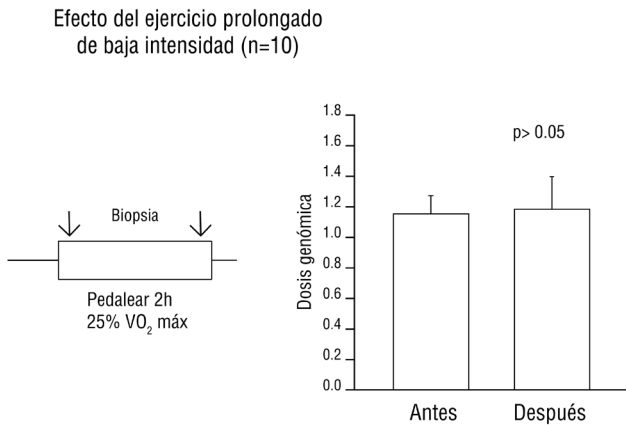


Figura 21. Efecto del ejercicio prolongado de baja intensidad sobre la dosis genómica mitocondrial. (Tesis de Ana Marcuello López).



Como puede observarse en la Figura 20, la cantidad de mtDNA no varía tras dos horas de reposo, lo que puede interpretarse como que la dosis genómica no se modifica mientras no cambie de forma importante la demanda energética o las condiciones ambientales del individuo.

· Ejercicio prolongado y de baja intensidad

Se determinó la cantidad de mtDNA en músculo extraído antes y después de un ejercicio prolongado y de baja intensidad (25% VO_2 máx, 2h), en 10 deportistas “amateurs” (Figura 21). El valor de la frecuencia cardíaca (100 latidos/ minuto) y la percepción subjetiva de cansancio de los sujetos en función de la escala de Borg (10±2 Unidades escala de Borg) indican que se trata de un ejercicio suave, con poco estrés fisiológico.

Los resultados obtenidos en este análisis indicaron que tampoco había variación en la cantidad de mtDNA tras dos horas de ejercicio de intensidad suave (Test ANOVA, análisis por pareados $p = 0,92$).

· Ejercicio prolongado no fatigante de intensidad media

La siguiente prueba determinó la dosis genómica mitocondrial tras la realización de un ejercicio prolongado y de intensidad moderada.

Para ello, 10 deportistas, realizaron una prueba física que consistía en pedalear a una carga de trabajo próxima al 60% del VO_2 máx, en condiciones ambientales de 35°C temperatura ambiental y 40-50% humedad relativa, durante aproximadamente 2 horas, cada cierto tiempo se les hacia beber agua con sales, para evitar la deshidratación y la hipertermia.

El valor de la frecuencia cardíaca (145 latidos/minuto) y el estado de percepción de la intensidad del ejercicio (11-13 Unidades de Borg) informaron de que se trataba de un ejercicio físico suave, sin llegar a ser fatigante.

Figura 22. Efecto del ejercicio prolongado no fatigante de intensidad media sobre la dosis genómica mitocondrial. (Tesis de Ana Marcuello López).

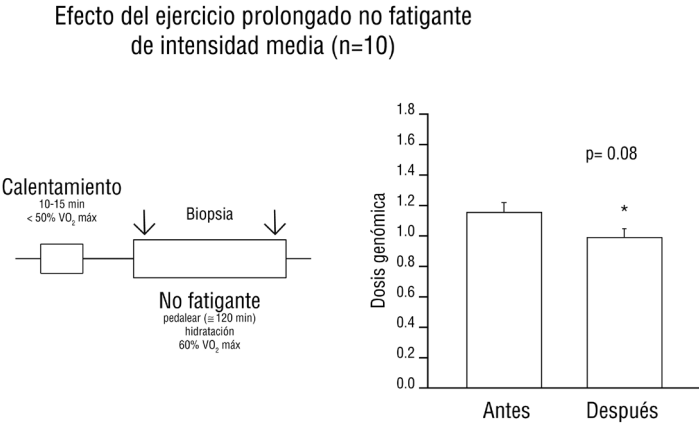
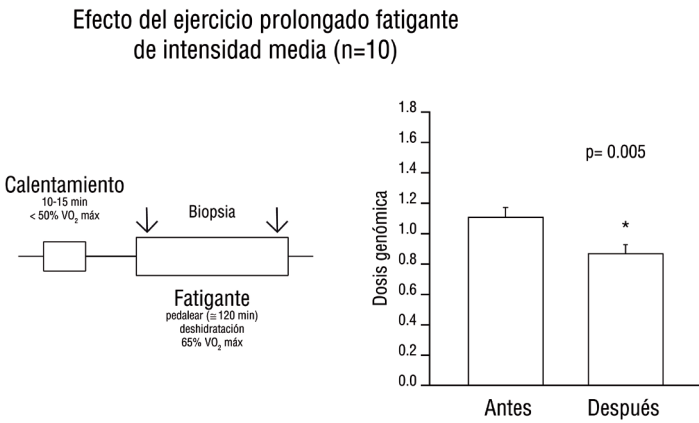


Figura 23. Efecto del ejercicio prolongado fatigante de intensidad media sobre la dosis genómica mitocondrial.



Los resultados obtenidos, como podemos observar en la Figura 22, ponen de manifiesto que hay una tendencia a disminuir la cantidad de mtDNA tras la realización de la prueba, pero, sin llegar a ser significativa (Test ANOVA, análisis por pareados p = 0,08).

Ejercicio prolongado fatigante de intensidad media

Se decidió continuar el estudio con un ejercicio prolongado de mayor intensidad en el que 10 deportistas “amateurs” pedalearon a una carga de trabajo próxima al 60% del VO₂ máx hasta el agotamiento durante 2 h, en unas determinadas condiciones ambientales (35°C temperatura ambiental, 40-50% humedad relativa), sin poder reponer líquidos (Ver Figura 23) Todo ello, hace que sea un ejercicio prolongado, fatigante, con hipertermia (temperatura corporal de 40°C) y con deshidratación (se pierde hasta un 4% del peso corporal).

El valor de la frecuencia cardíaca (175 latidos/ minutos) y la percepción subjetiva de cansancio de los sujetos en función de la escala de Borg (19,4 ± 0,2 Unidades de Borg) confirmaron la dureza de esta prueba que puede clasificarse como extenuante.

Tras el análisis de la variación del mtDNA en músculo esquelético antes y después de la prueba, los resultados obtenidos muestran, un descenso significativo de la dosis genómica mitocondrial (Test ANOVA, análisis por pareados p= 0,005) tras la realización de un ejercicio de estas características, con una caída promedio del 32 ± 5%, hecho que no se había descrito previamente (Figura 23).

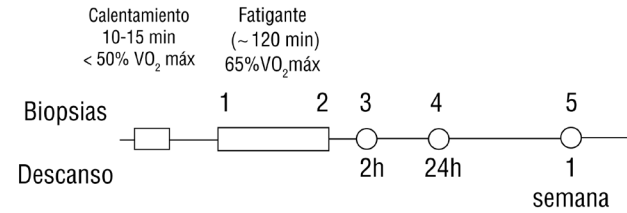
La recuperación de la dosis genómica mitocondrial tras el ejercicio físico

A partir de los resultados anteriores, donde se observó una tendencia a la disminución del mtDNA en el músculo esquelético tras la realización de un ejercicio prolongado de intensidad moderada, siendo tanto mayor la caída cuanto más fatigante es el ejercicio realizado, se planteó estudiar la variación de la dosis genómica mitocondrial a lo largo del proceso de recuperación.

Para ello se obtuvieron biopsias posteriores a la realización de la prueba física a las dos horas, un día y una semana después de haber finalizado el ejercicio (Figura 24).

Figura 24. Protocolo del proceso de recuperación tras la realización de la prueba de ejercicio físico prolongado de intensidad moderada y fatigante. (Tesis de Ana Marcuello López).

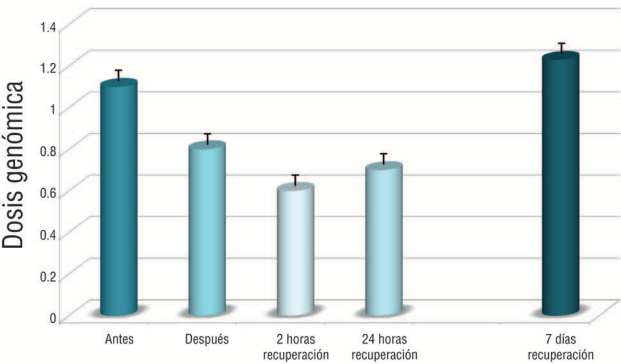
Prueba fatigante y su recuperación



Los resultados de este estudio (Gráfica 13) indican que la cantidad de mtDNA, que disminuye significativamente después del ejercicio fatigante (n=10, Test ANOVA, análisis por pareados p = 0,005) permanece baja a las 2 horas de la realización de la prueba (n=10, Test ANOVA pareados p = 0,043) al igual que al día siguiente (n=10, Test ANOVA pareados p = 0,0945).

Sin embargo, la dosis genómica mitocondrial se restaura hasta niveles basales después de una semana de recuperación (n=10 Test ANOVA pareados p = 0,35).

Probablemente la dosis genómica mitocondrial se restaure a los 3-4 días del ejercicio fatigante, pero dada la agresividad de la técnica de extracción de biopsia muscular, no pudieron extraerse más muestras de músculo a lo largo de la semana posterior.



Gráfica 13. Dosis genómica mitocondrial en el músculo esquelético en el proceso de recuperación tras la realización de la prueba de ejercicio físico prolongado de intensidad moderada y fatigante. (Tesis de Ana Marcuello López).

3.3 Práctica deportiva y cadena respiratoria

El estudio de la actividad de la cadena respiratoria demostró una correlación positiva entre la dosis genómica y la actividad de los complejos de esta cadena, principalmente el I y el IV⁶, lo que demuestra la importancia de que las células mantengan la cantidad de mtDNA para garantizar la funcionalidad celular. (Datos mostrados en el ANEXO III).

⁶Estos resultados son de interpretación compleja por lo que se han incluido en el ANEXO III.

3.4 Efecto protector de la actividad antioxidante frente al daño oxidativo

Como se vio en el apartado anterior, el daño oxidativo se incrementa en proporción directa ala intensidad del ejercicio físico realizado. Por lo tanto, para que los deportistas puedan seguir realizando ejercicios de gran intensidad, su organismo debe ser capaz de contrarrestar eficazmente los radicales libres como lo sugiere el hecho de que en los individuos sometidos a un entrenamiento regular, el nivel de daño es menor que en los no entrenados ^(64, 77). Esta observación supone que las defensas antioxidantes son capaces de adaptarse ante una exposición crónica a agentes oxidantes, mejorando su funcionalidad y, sólo en aquellos casos en que ese mecanismo funcione apropiadamente, el deportista podrá mantener su práctica deportiva sin sufrir grave daño oxidativo.

Corroborando esta hipótesis se había encontrado un aumento en la actividad de la SOD total en algunos estudios ^(78, 79), pero no en otros ^(80, 81) lo que podría explicarse por diferencias en la intensidad del ejercicio ^(82, 83). Así mismo, también se había publicado que la glutation peroxidasa y el contenido total de glutation se modifican con el entrenamiento y muestran diferente respuesta en función de la intensidad y duración del ejercicio ^(82, 83).

En el presente estudio se planteó la necesidad de confirmar esta nueva idea desde la perspectiva genética: se trataba de evaluar si las variantes genéticas de enzimas antioxidantes más efectivas en la protección frente al daño oxidativo estaban incrementadas en deportistas.

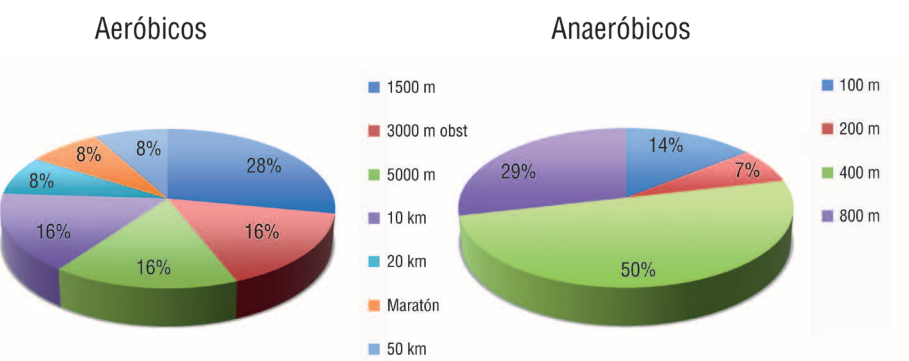
Para ello, se reclutaron 57 deportistas: 39 varones (68,4%) y 18 mujeres (31,6%). Como era de esperar se observaron diferencias significativas (P= 0,0001) en el peso, altura e IMC entre los atletas varones y mujeres, lo que indica que la población estudiada, en estos parámetros, muestra las diferencias normales entre ambos sexos.

3.4.1 Confirmación de resultados previos

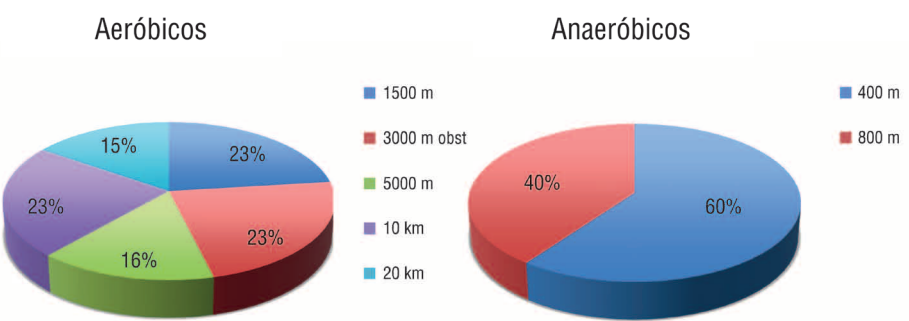
Antes de abordar el estudio del efecto protector de la actividad antioxidante frente al daño oxidativo, se quiso confirmar los resultados que habíamos obtenido previamente durante la primera parte del estudio.

De los 39 atletas masculinos analizados, 24 eran deportistas aeróbicos y 15 anaeróbicos, de los cuales sólo dos eran no lácticos. Mientras que de las 18 atletas femeninas estudiadas, 13 corresponden a deportistas aeróbicas y 5 eran anaeróbicas.

Las distribuciones según las pruebas atléticas que realizaban dichos deportistas aeróbicos y anaeróbicos se muestra en las Gráficas 14 y 15 para hombres y mujeres respectivamente.



Gráfica 14. Distribución de los deportistas masculinos aeróbicos y anaeróbicos en función de las pruebas atléticas que realizaban.



Gráfica 15. Distribución de las deportistas femeninas aeróbicas y anaeróbicas en función de las pruebas atléticas que realizaban.

Cuando se analizaron los parámetros mecánicos en estos deportistas se observó una diferencia significativa en la velocidad máxima alcanzada (p<0,05) entre hombres y mujeres, independientemente de la disciplina practicada, lo que confirma una menor potencia de trabajo físico en las mujeres deportistas, como ocurre en la población normal (Tabla 5).

El tiempo en el que se mantenía la máxima velocidad por hombres y mujeres especializados en diferentes pruebas difería muy poco, lo que parece sugerir que la capacidad para mantener la velocidad máxima propia de cada individuo, es independiente del sexo ($P>0,05$) aunque se ve influenciada por la disciplina practicada (Tabla 6).

Tabla 5. Distribución de la velocidad máxima en hombres y mujeres en función de la prueba atlética (DS = Desviación estándar).

Prueba	HOMBRES			MUJERES		
	n	media	DS	n	media	DS
100 m	2	17,5	0,2			
200 m	1	18				
400 m	7	19,3	0,82	3	17,25	0,66
800 m	4	21,2	0,74	1	19,75	
1500 m	7	22,1	0,49	4	19,25	0,29
3000 m obs	4	22,1	0,85	3	19,92	0,63
5000 m	4	21,9	1,32	2	19,25	0,35
10 km	4	20,1	3,67	2	16,5	4,24
maratón	2	21,7	0,35	1	20	
20 km	2	16	0,71	2	14,25	0
50 km	2	17,6	3			
Total	39			18		

P = 0,0004

P = 0,018

Tabla 6. Distribución del tiempo que se mantiene la velocidad máxima en hombres y mujeres en función de la prueba atlética. (DS = Desviación estándar).

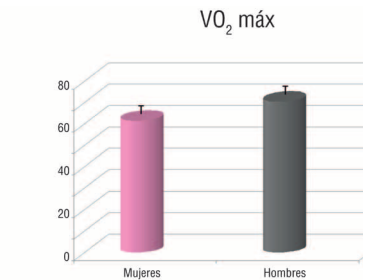
Prueba	HOMBRES			MUJERES		
	n	media	DS	n	media	DS
100 m	2	9,39	0,6			
200 m	1	10,06				
400 m	7	11,21	0,88	3	11,21	0,78
800 m	4	13,15	0,75	1	13,54	
1500 m	7	14,02	0,42	4	13,21	0,16
3000 m obs	4	14,13	0,83	3	13,94	0,61
5000 m	4	13,94	1,29	2	13,19	0,27
10 km	4	13,09	1,41	2	13,22	0,23
maratón	2	13,77	0,52	1	14,09	
20 km	2	14,03	1,43	2	14,45	0,03
50 km	2	12,28	1,15			
Total	39			18		

P < 0,0001

P = 0,0005

· Parámetros ergoespirométricos

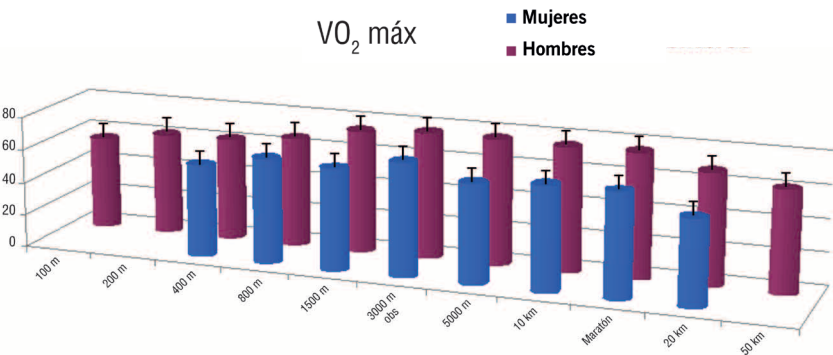
El estudio comparado del consumo máximo de oxígeno (VO_2 máx) entre hombres y mujeres confirmó los resultados esperables (Gráfica 16): hombres y mujeres difieren notablemente ($P< 0.0001$) en su consumo de oxígeno, lo que podría deberse, entre otros factores, a la mayor masa muscular y capacidad pulmonar que presentan los varones.



Gráfica 16. Consumo máximo de oxígeno en función del sexo de los atletas.

El estudio del consumo de oxígeno en hombres según las pruebas atléticas evidenció que el mayor VO_2 máx se consigue en las pruebas que combinan la necesidad de alcanzar mayor velocidad y mantenerla durante un tiempo prolongado (fondo) ($P<0,0001$).

En cambio, en las pruebas anaeróbicas o en las de resistencia aeróbica de larga duración el consumo máximo de oxígeno parece no ser un parámetro determinante de la capacidad real del deportista. (Gráfica 17).



Gráfica 17. Consumo máximo de oxígeno de los deportistas según las pruebas atléticas practicadas.

En las mujeres, se mostró, aunque con niveles menores de consumo de oxígeno, un patrón similar, con menor significación estadística ($P=0,03$) que el observado en varones. En este caso, se evidenció, como en varones, que la prueba que desarrolla al máximo la capacidad aeróbica era la carrera de 3000 m obstáculos.

El estudio comparado del cociente respiratorio (VCO_2/VO_2) entre hombres y mujeres mostró valores muy similares de media (1,15 vs. 1,13 respectivamente). Esto mismo se confirmó al realizar el estudio por pruebas atléticas. En todos los casos, el cociente era mayor de 0,8 por lo que puede afirmarse que tanto en pruebas aeróbicas como anaeróbicas, hay una parte importante de la energía suministrada anaeróbicamente (glucólisis).

El estudio comparado de la ventilación pulmonar entre hombres (163,7) y mujeres (114,3) mostró importantes diferencias ($P<0,0001$) entre ambos sexos, lo que confirma observaciones previas. El estudio por pruebas atléticas, no mostró significación estadística.

El estudio comparado del porcentaje de consumo de oxígeno en los umbrales aeróbico (VT_1) y anaeróbico (VT_2) no mostró significación estadística en ninguno de los casos analizados, siendo similar en las diferentes disciplinas deportivas.

· Parámetros cardiovasculares

El estudio comparado de la frecuencia cardiaca entre hombres y mujeres, no mostró diferencia significativa, en ambos casos estaba entorno a 185 latidos/min.

Sin embargo, cuando el análisis se realizó en hombres por pruebas atléticas se observó una gran diferencia significativa ($P=0,0005$) entre las pruebas de carrera y marcha. (Tabla 7). Este efecto no se constató en las mujeres estudiadas.

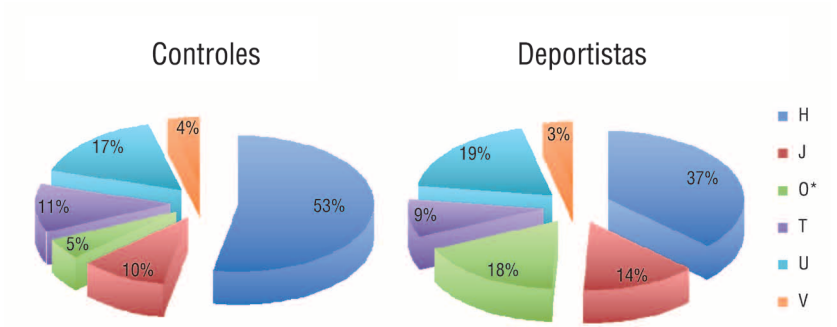
Tabla 7. Distribución de la Frecuencia Cardiaca, la FC en el umbral aeróbico VT_1 y la FC en el umbral anaeróbico VT_2 en los hombres deportistas analizados en función de las pruebas atléticas en las que participan. (DS = Desviación estándar).

Prueba	FC			FC en VT_1			FC en VT_2		
	n	media	DS	n	media	DS	n	media	DS
100 m	2	190	0,7	2	155	9,2	2	170	0,8
200 m	1	205		1	164		1	185	
400 m	7	194,7	3,45	7	159,9	4,74	7	180	6,45
800 m	4	182,5	6,6	4	150,2	9,04	4	164,7	7
1500 m	7	180,8	6,8	7	148,1	7,1	7	169,1	9,6
3000 m obs	4	183,5	13,2	4	150,5	13,5	4	169,7	13,2
5000 m	4	183,5	4,1	4	158	4,8	4	174	1,1
10 km	4	183,5	4,7	4	152	6,5	4	168,5	4,5
maratón	2	191	1,4	2	161,5	9,2	2	176,5	0,7
20 km	2	193	4,2	2	170,5	9,2	2	183	8,5
50 km	2	165,5	9,2	2	135	2,8	2	150,5	2,1

El mismo patrón que se observó en el estudio de la frecuencia cardiaca, se apreció en el umbral aeróbico VT_1 ($P=0,004$) y anaeróbico VT_2 ($P=0,003$), sugiriendo que en varones deportistas, pero no en mujeres, este parámetro es muy dependiente de la disciplina practicada o, lo que es lo mismo, del entrenamiento realizado. (Tabla 7).

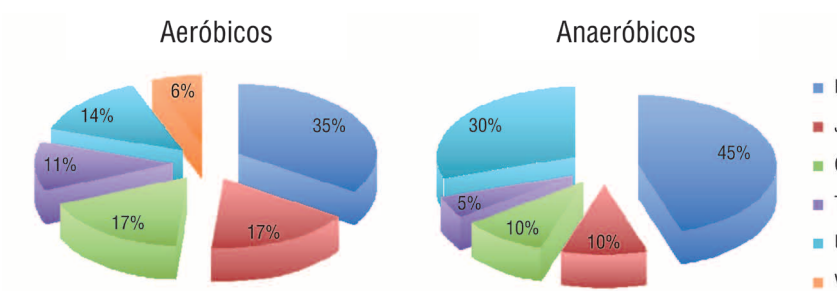
· Genética mitocondrial

El estudio de los haplogrupos exigió la utilización de una población control, previamente analizada y publicada por nuestro grupo ⁽³⁶⁾ para averiguar si la distribución de estas variantes genéticas en la población de deportistas (57) presentaba algún sesgo respecto a la población española (79). Dada la baja frecuencia de los haplogrupos I, W, X y L, en el análisis estadístico, para evitar tener que aplicar la corrección de Yates, se requirió la asociación de estos haplogrupos en uno sólo denominado O*. El resultado mostró que no había diferencia significativa ($P=0,2$) en la distribución de ambas poblaciones (Gráfica 18).



Gráfica 18. Distribución de los haplogrupos mitocondriales en controles y deportistas.

Analizada la distribución de los haplogrupos según el metabolismo de la disciplina practicada por los deportistas no se observaron diferencias significativas ($P=0,4$). Sin embargo, como se observa en la Gráfica 19, los haplogrupos H y U están bastante incrementados en deportistas anaeróbicos lo que parece confirmar que sean haplogrupos bioquímicamente muy acoplados y con mejor rendimiento energético.



Gráfica 19. Distribución de los haplogrupos mitocondriales en los deportistas aeróbicos y anaeróbicos.

Cuando se observó la distribución de los subhaplogrupos en la Tabla 8, se encontró que existía una diferente distribución de subhaplogrupos en controles y deportistas, observándose un incremento de HV*, L3 y T* en estos últimos ($P=0,001$). Esta observación debe ser considerada con cautela, ya que el tamaño de la muestra es demasiado pequeño para ser concluyente.

Tabla 8. Distribución de subhaplogrupos en controles y deportistas.

Subhaplogrupos	CONTROLES	DEPORTISTAS
H*	12	10
H1	16	7
H3	9	4
H5	3	0
HV*	0	4
HV2	3	0
I*	0	1
J*	1	0
J1	4	0
J1*	0	2
J1c	1	4
J2	1	2
J2a	1	0
L0,1,2	0	1
L3	0	4
T*	0	5
U*	0	2
U1811*	0	3
U4	1	0
U5	0	1
U5a	2	4
U5b	1	1
UK	1	0
Uk	5	0
UK1	1	0
UK2	2	0
V*	3	2
Totales	67	57

Realizada la distribución de los subhaplogrupos entre hombres y mujeres, se observa que los subhaplogrupos HV* y L3 están incrementados en mujeres ($P=0,002$). (Tabla 9).

No puede hacerse el estudio de distribución de subhaplogrupos por pruebas deportivas dado el reducido número de atletas reclutados para este trabajo. Pero hay que destacar el hecho de que los sujetos pertenecientes al subhaplogrupo L3 sean todos ellos atletas de fondo. En cambio, el atleta noL3 es velocista.

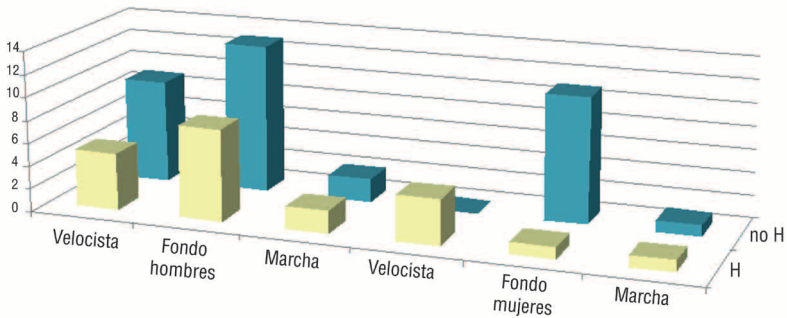
Tabla 9. Distribución de subhaplogrupos mitocondriales en hombres y mujeres deportistas.

Subhaplogrupos	MUJERES	HOMBRES
H*	2	8
H1	4	3
H3	0	4
HV*	4	0
I*	1	0
J1*	0	2
J1c	1	3
J2	0	2
L0,1,2	0	1
L3	3	1
T*	2	3
U*	0	2
U1811*	0	3
U5	1	0
U5a	0	4
U5b	0	1
V*	0	2
Totales	18	39

Se intentó analizar las pruebas atléticas por separado, pero no se encontraron individuos de todos los haplogrupos en las diferentes disciplinas deportivas, por lo que no pudo aplicarse ningún estadístico. A pesar de ello, observada la frecuencia de haplogrupos por prueba atlética (juntos, y hombres y mujeres por separado) no se vieron diferencias destacables.

Agrupando las pruebas atléticas en velocidad, fondo y marcha, con el objetivo de poder alcanzar el mínimo de frecuencia en las celdas para el test de la Chi², se analizó la distribución de las variantes genéticas agrupadas según su mayor (H) o menor (J) eficiencia energética, pero no se observaron diferencias significativas.

Es de destacar que las mujeres que practican pruebas de fondo, pertenecen mayoritariamente a los haplogrupos noH (11/12 = 92%) mientras que en la población española estos haplogrupos representan en torno al 55%, en cambio las velocistas pertenecen mayoritariamente al haplogrupo H (Gráfica 20).

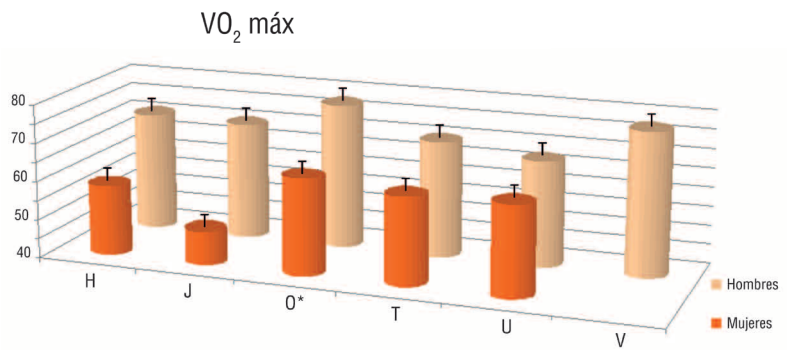


Gráfica 20. Distribución de los haplogrupos mitocondriales H o noH en atletas, según las pruebas deportivas (n=57).

Cuando se analizaron las frecuencias de distribución de los haplogrupos según los parámetros antropométricos, no apreciaron diferencias significativas en ningún caso (edad, peso o altura) (datos no mostrados).

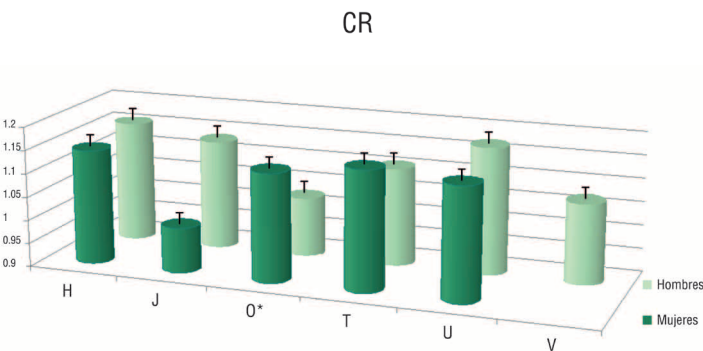
Tampoco se observaron diferencias entre los haplogrupos mitocondriales en los parámetros: velocidad máxima, tiempo, ventilación pulmonar, porcentaje de VO₂ en el umbral aeróbico (VT₁), ni en el anaeróbico (VT₂), frecuencia cardiaca, FC en VT₁, FC en VT₂, velocidad en VT₁ ni en VT₂.

Sin embargo, si se encontró un menor consumo de VO₂ máx asociado al haplogrupo J en mujeres, como ya habíamos demostrado previamente ^(75, 84, 85) en población control. El haplogrupo J mostró significativamente (P=0,04) menor consumo de oxígeno que H, O* y T (Gráfica 21).



Gráfica 21. Distribución de VO₂ máx en función del haplogrupo mitocondrial (n=56, sólo se pudo medir en 38 hombres).

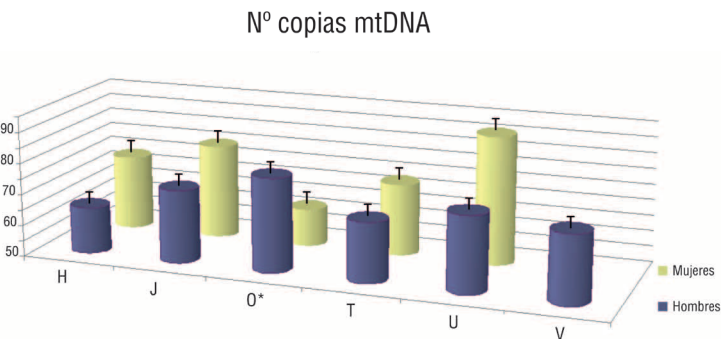
También encontramos diferencias significativas entre haplogrupos (sobre todo respecto a J en mujeres) en el CR. Lo que sugiere que este haplogrupo puede presentar diferente predisposición para las pruebas de metabolismo aeróbico y anaeróbico, sobre todo en mujeres (Gráfica 22).



Gráfica 22. Cociente respiratorio de los atletas según su haplogrupo mitocondrial (n=56, sólo se pudo medir en 38 hombres).

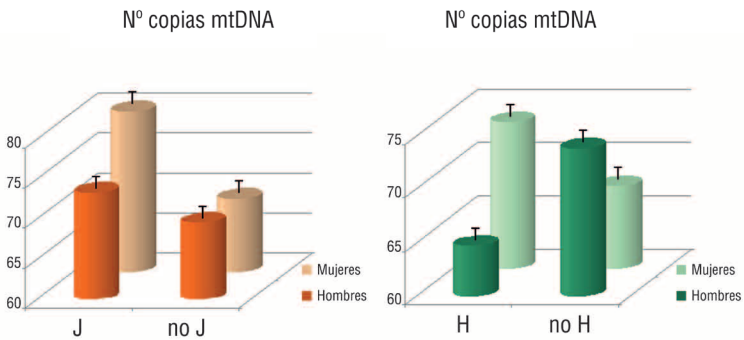
· Genómica mitocondrial

Cuando se analizó el número de copias de mtDNA en los distintos haplogrupos se observó una tendencia, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P > 0,5$) (Gráfica 23).



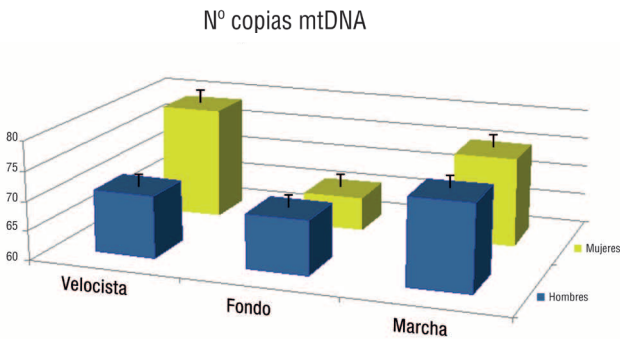
Gráfica 23. Número de copias de mtDNA según el haplogrupo mitocondrial de los deportistas (n=57).

Al separar la población analizada en H y noH ($P=0,1$ en hombres) y J y noJ, se obtuvieron los siguientes resultados (Gráfica 24)



Gráfica 24. Número de copias de mtDNA en el haplogrupo H vs noH y J vs. noJ. (n=57).

El número de copias de mtDNA observado en las pruebas atléticas es el que se muestra en la Gráfica 25.

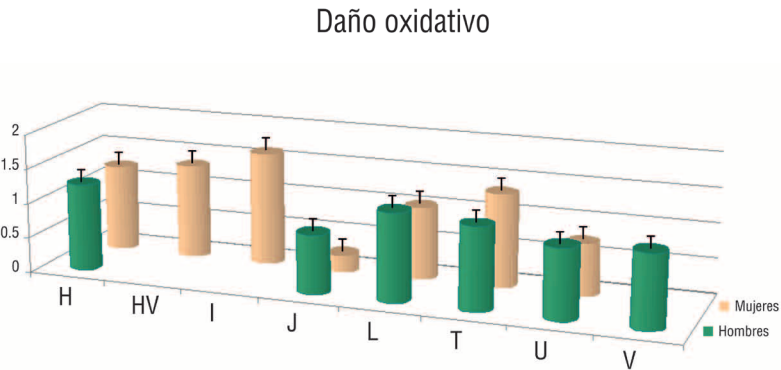


Gráfica 25. Número de copias de mtDNA según la prueba atlética practicada. (n=57).

Cuando se estudió el daño oxidativo mitocondrial en función de los haplogrupos, (Gráfica 26) se apreció que existen diferencias significativas en los siguientes casos:

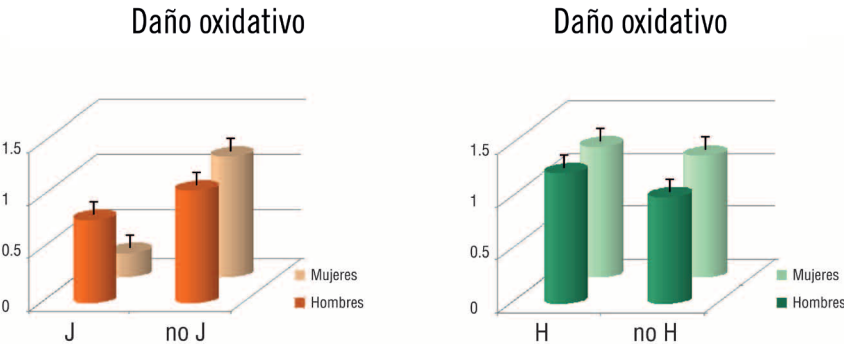
- En hombres: H vs J, ($P=0,04$).
- En mujeres: H vs J ($P=0,04$); HV vs J ($P=0,03$); I vs J ($0,04$).

Estos resultados confirman el menor daño oxidativo generado por el haplogrupo J que nuestro grupo había encontrado previamente (75, 84, 85).



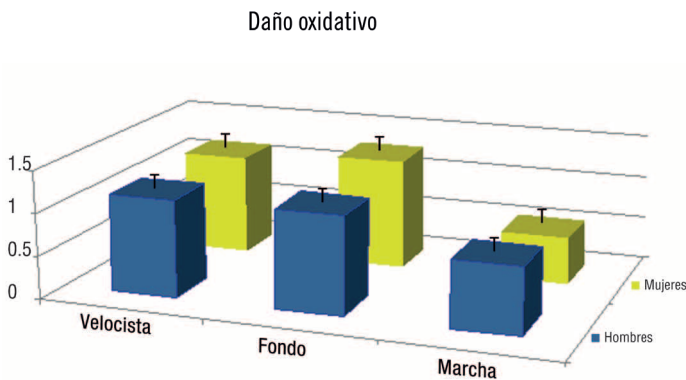
Gráfica 26. Daño oxidativo según el haplogrupo mitocondrial de los deportistas (n=57).

Cuando se agrupó a los deportistas en función de si pertenecían o no a los haplogrupos mitocondriales H o J, se encontró que, como se muestra en la Gráfica 27, tanto en hombres como mujeres, el haplogrupo J muestra menor daño oxidativo, aunque sólo es significativo en mujeres ($P=0,02$).



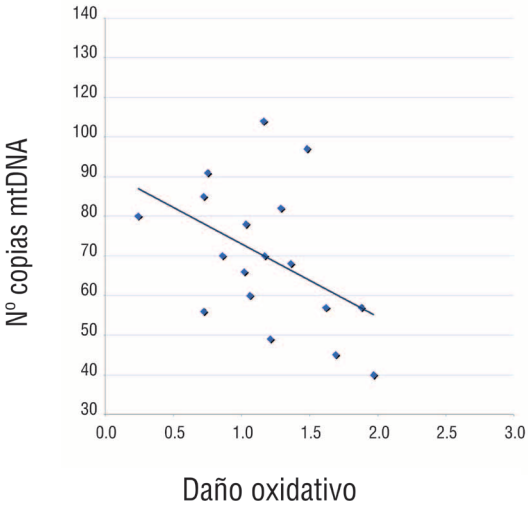
Gráfica 27. Daño oxidativo en los haplogrupos mitocondriales H vs noH y J vs. noJ. (n=57).

Al analizar el daño oxidativo en función del tipo de prueba atlética, se obtuvieron los resultados expuestos en la Gráfica 28: tanto en hombres como en mujeres, la Marcha es una disciplina que induce menor daño oxidativo. El hecho de que además las mujeres presenten menor daño que los hombres (aunque sin diferencia significativa) en esta disciplina deportiva sugiere una potencial contribución de los estrógenos en el proceso de bloqueo de los radicales libres.



Gráfica 28. Distribución del daño oxidativo en función del tipo de prueba atlética (n=57).

Posteriormente se valoró si existía correlación entre el daño oxidativo y el número de copias, los resultados mostraron una correlación negativa, al límite ($P=0,05$), en mujeres pero no en hombres (Gráfica 29). Lo que pone de manifiesto que los radicales libres inducen daño oxidativo, además de en proteínas y lípidos, en el DNA, de forma que en la mitocondria, esto induce una disminución del número de copias de mtDNA.



Gráfica 29. Correlación entre daño oxidativo y número de copias en deportistas femeninas ($y= 91,4 - 18,38x$; $r^2= 0,207$).

· Análisis de la enzima MnSOD

La enzima superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD) se une al anión superóxido, producto de oxidación del sistema OXPHOS, y lo convierte en peróxido de hidrógeno y oxígeno diatómico.

Como ya se ha comentado en un párrafo anterior, el polimorfismo rs4880T/C de la secuencia codificante de la MnSOD está asociado con su actividad enzimática. {Shimoda-Matsubayashi, 1996 #336}. Por ello, se decidió analizar el polimorfismo rs4880T/C del gen de la enzima superóxido dismutasa mitocondrial dependiente de Mn²⁺ (MnSOD).

La frecuencia alélica encontrada que encontramos en deportistas y controles fue la que se muestra en la *Tabla 10*. Realizado el análisis de distribución de frecuencias de los genotipos y de las pruebas atléticas no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de deportistas analizados como se muestra en la *Tabla 11*.

Tabla 10. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs4880T/C de MnSOD en deportistas y controles.

	Alelos	ATLETAS (57)*	CONTROLES (78)*	P
		p=0.46 q=0.54	p=0.55 q=0.45	
CC	C, (p) T, (q)	11	21	0,2
CT		30	44	
TT		16	13	

Tabla 11. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs4880T/C de MnSOD en las diferentes pruebas atléticas.

	HOMBRES				MUJERES			
	VELOCISTA	FONDO	MARCHA	P	VELOCISTA	FONDO	MARCHA	P
CC	2	4	1	0,87	1	3	0	0,7
no CC	12	17	3		3	9	2	
TT	6	5	1	0,47	1	3	0	0,7
no TT	8	16	3		3	9	2	

El análisis del número de copias de mtDNA y el daño oxidativo en los distintos genotipos tampoco mostró diferencias significativas como se aprecia en las *Tablas 12 y 13*, respectivamente.

Tabla 12. Distribución del número de copias de mtDNA en los diferentes genotipos del polimorfismo rs4880T/C de MnSOD. (DS= desviación estándar).

	HOMBRES				MUJERES			
	N	MEDIA	DS	P	N	MEDIA	DS	P
CC	7	77,8	30,372	0,21	4	77,5	24,691	0,34
no CC	32	68,6	12,979		14	67,5	16,023	
TT	12	71,2	15,268	0,81	4	60,2	18,626	0,24
no TT	27	69,8	18,259		14	72,4	17,487	

Tabla 13. Distribución del daño oxidativo en los diferentes genotipos del polimorfismo rs4880T/C de MnSOD. (DS= desviación estándar).

	HOMBRES				MUJERES			
	N	MEDIA	DS	P	N	MEDIA	DS	P
CC	7	0,986	0,196	0,4	4	1,035	0,206	0,48
no CC	32	1,129	0,438		14	1,221	0,49	
TT	12	0,969	0,333	0,17	4	1,117	0,591	0,76
no TT	27	1,163	0,428		14	1,197	0,42	

Al contrario que otros grupo y, posiblemente, por el pequeño número de muestras, en este trabajo no se observó diferencia significativa en la frecuencia alélica de este polimorfismo entre deportistas y controles, ni entre hombres y mujeres.

· Análisis de la enzima Paraoxonasa 1

Puesto que diferentes autores ya habían demostrado la importancia de algunas enzimas y compuestos antioxidantes en la práctica deportiva, nuestro grupo de investigación decidió abordar el efecto de las variantes genéticas de la enzima Paraoxonasa 1 en la protección antioxidante del deportista.

La paraoxonasa 1 (PON1), como ya se comentó en otro apartado, es una enzima con funciones arilesterasa y lactonasa, sintetizada principalmente en el hígado que se localiza en la sangre unida a las HDL a través de la Apolipoproteína A1 (Apo A1). Su función fisiológica es actuar como un antioxidante (actividad arilesterasa) ya que degrada los ésteres de colesterol oxidados.

El gen de la PON1 presenta dos polimorfismos en la región codificante ^(67, 68, 86):

- 1. PON1 Q192R, que determina la sustitución del aminoácido en posición 192 Gln (Q) por Arg (R) e induce la actividad arilesterasa
- 2. PON1 L55M, que determina la sustitución del aminoácido en posición 55 Leu (L) por Met (M) y modifica la expresión del gen

Además de en la región codificante, distintos autores ^(87, 88) han publicado que algunos polimorfismos en las primeras 200 pb del promotor del gen PON1 (PON1-Pr) son responsables de una diferente expresión del gen según los tejidos ⁽⁸⁶⁾.

Las diferencias de expresión del gen de PON1, por tanto, modificarían la concentración de la enzima y podrían determinar diferente capacidad antioxidante en el individuo.

· Polimorfismo PON1_{L55M}

En primer lugar se analizó la frecuencia alélica del polimorfismo L55M en controles y deportistas y los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla 14*.

Se observó una acumulación significativa de individuos con genotipo LL en la población de atletas. Teniendo en cuenta que el genotipo LL determina mayor expresión de la enzima PON1 con actividad antioxidante, este resultado sugiere que los atletas portadores de esta variante genética están más protegidos frente al daño oxidativo generado durante la práctica deportiva.

Tabla 14. Frecuencias alélicas de PON1_{L55M} en atletas y controles.

	Alelos	ATLETAS (56)*	CONTROLES (79)	P
		p=0.68 q=0.32	p=0.62 q=0.38	
LL	L (Leu), (p) M (Met), (q)	30	22	0,002 **
LM		16	55	
MM		10	2	

*Sólo en 56 atletas pudieron determinarse los genotipos.
** LL vs. noLL

Cuando se analizó la distribución de los genotipos en función de las pruebas atléticas, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 15. Distribución de los distintos genotipos del polimorfismo PON1_{L55M} por pruebas atléticas.

	HOMBRES				MUJERES			
	VELOCISTA	FONDO	MARCHA	P	VELOCISTA	FONDO	MARCHA	P
LL	9	11	3	0,71	1	5	1	0,79
no LL	5	9	1		3	7	1	
MM	1	5	1	0,39	1	2	0	0,74
no MM	13	15	3		3	10	2	

Al analizar el número de copias de mtDNA en los diferentes genotipos se observó como puede verse en la *Tabla 16*, un significativo (P=0,02) mayor número de copias en hombres deportistas con genotipo LL, lo que apoyaría la mayor protección de este genotipo frente al daño oxidativo. En mujeres, posiblemente, por el menor número de individuos, se observa la tendencia, pero no se alcanza la significación estadística.

Tabla 16. Distribución del número de copias de mtDNA en los distintos genotipos del polimorfismo PON1_{L55M} (DS= desviación estándar).

	HOMBRES				MUJERES			
	N	MEDIA	DS	P	N	MEDIA	DS	P
LL	23	75,2	18,757	0,02	7	74,3	18,518	0,4
no LL	15	62,1	11,529		11	66,8	17,837	
MM	7	61,7	13,06	0,16	3	70,7	26,006	0,9
no MM	31	71,9	17,846		15	69,5	17,158	

En cuanto al análisis del daño oxidativo en función del genotipo (Tabla 17), se observó un menor daño oxidativo en mujeres deportistas con genotipo LL, en coherencia con lo observado en el apartado anterior respecto al número de copias de mtDNA. Además el hecho de que se observe en mujeres, y no en hombres, sugiere mayor protección de aquellas frente al daño oxidativo, posiblemente por efecto de los estrógenos como protectores adicionales.

Tabla 17. Distribución del daño oxidativo en los distintos genotipos del polimorfismo PON1_{L55M} (DS= desviación estándar).

	HOMBRES				MUJERES			
	N	MEDIA	DS	P	N	MEDIA	DS	P
LL	23	1,138	0,483	0,5	7	0,92	0,385	0,04
no LL	15	1,051	0,279		11	1,345	0,412	
MM	7	1,03	0,399	0,6	3	1,447	0,262	0,27
no MM	31	1,12	0,42		15	1,126	0,46	

· Polimorfismo PON1_{Q192R}

A continuación, se estudió la frecuencia alélica del polimorfismo Q192R en controles y deportistas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Frecuencias alélicas de PON1_{Q192R} en atletas y controles.

	Alelos	ATLETAS (56)*	CONTROLES (79)	P
		p=0.76; q=0.24	p=0.63; q=0.37	
QQ	Q (Gln), (p) R (Arg), (q)	34	33	0,03**
QR		18	34	
RR		4	12	

* Sólo en 56 atletas pudieron determinarse los genotipos.
** QQ vs. noQQ

Se observó una acumulación significativa de individuos con genotipo QQ en la población de atletas. Teniendo en cuenta que el genotipo QQ determina mayor actividad antioxidante de la enzima PON1, este resultado sugiere que los atletas portadores de esta variante genética están más protegidos frente al daño

oxidativo generado durante la práctica deportiva. La distribución de los genotipos en función de las pruebas atléticas (Tabla 19), no mostró ninguna diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 19. Distribución de los distintos genotipos del polimorfismo PON1_{Q192R} por pruebas atléticas.

	HOMBRES				MUJERES			
	VELOCISTA	FONDO	MARCHA	P	VELOCISTA	FONDO	MARCHA	P
QQ	6	16	2	0,18	3	6	1	0,67
no QQ	7	5	2		1	6	1	
RR	1	3	0	0,64	0	0	0	*
no RR	12	18	4		4	12	2	

*No pudo determinarse

Tanto en numero de copias de mtDNA, como en daño oxidativo, las diferencias encontradas en los distintos genotipos no fueron significativas estadísticamente. (Tablas 20 y 21).

Tabla 20. Distribución del número de copias de mtDNA en los distintos genotipos del polimorfismo PON1_{Q192R} (DS= desviación estándar).

	HOMBRES				MUJERES			
	N	MEDIA	DS	P	N	MEDIA	DS	P
QQ	24	71	19,689	0,62	10	67,2	17,731	0,52
no QQ	14	68,1	12,682		8	72,9	18,917	
RR	4	72	2,828	0,8	0			
no RR	34	69,7	18,29		18	70,1	18,324	

Tabla 21. Distribución del daño oxidativo en los distintos genotipos del polimorfismo PON1_{Q192R} (DS= desviación estándar).

	HOMBRES				MUJERES			
	N	MEDIA	DS	P	N	MEDIA	DS	P
QQ	24	1,101	0,44	0,9	10	1,288	0,397	0,25
no QQ	14	1,109	0,376		8	1,044	0,49	
RR	4	1,099	0,432	0,8	0			
no RR	34	1,148	0,209		18	1,179	0,445	

· Polimorfismo (T108C) y G162A del promotor de PON1

Se analizó también el polimorfismo T108C del promotor del gen de la enzima PON1. La distribución de las frecuencias alélicas encontradas se resumen en la *Tabla 22*.

Tabla 22. Frecuencias alélicas del polimorfismo T108C del promotor de PON1.

T-108C	Alelos	ATLETAS (56)*	CONTROLES (79)	P
		p=0.46; q=0.54	p=0.34; q=0.66	
CC	C, (p) T, (q)	14	5	0,002**
CT		24	44	
TT		18	30	

* Sólo en 56 atletas pudieron determinarse los genotipos.
** CC vs. noCC

Como se observa en la tabla anterior, el genotipo CC está notablemente incrementado en atletas. Teniendo en cuenta que CC aumenta x1,9 la expresión de la enzima PON1 ⁽⁸⁶⁾, estos resultados refuerza lo ya encontrado en los polimorfismos de la región codificante: en deportistas se concentran los genotipos que determinan mayor actividad antioxidante y expresión de la PON1.

Al analizar la distribución del genotipo según las pruebas atléticas que desarrollan los deportistas, como vemos en la *Tabla 23*, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 23. Distribución del polimorfismo T108C del promotor de PON1 en función de las pruebas atléticas.

	HOMBRES				MUJERES			
	VELOCISTA	FONDO	MARCHA	P	VELOCISTA	FONDO	MARCHA	P
CC	3	3	2	0,3	1	4	1	0,8
no CC	11	17	2		3	8	1	
TT	4	8	2	0,7	1	3	0	0,7
no TT	10	12	2		3	9	2	

En el estudio del número de copias del mtDNA en función del genotipo, tampoco se encontraron diferencias significativas (*Tabla 24*).

Tabla 24. Distribución del número de copias de mtDNA del polimorfismo T108C del promotor de PON1. (DS= desviación estándar).

	HOMBRES				MUJERES			
	N	MEDIA	DS	P	N	MEDIA	DS	P
CC	8	74,9	19,4	0,4	6	75,3	20,05	0,36
no CC	30	69,3	16,9		12	66,9	17,01	
TT	14	67	17,1	0,36	4	70,2	18,8	0,95
no TT	24	72,4	17,6		14	69,6	18,4	

En coherencia con lo encontrado en apartados anteriores, se observó un menor daño oxidativo en las mujeres deportistas con el genotipo CC (*Tabla 25*). Esta observación podría ser el resultado del efecto del genotipo más la acción antioxidante de los estrógenos.

Tabla 25. Distribución del daño oxidativo en el genotipo T108C del Pr-PON1. (DS= desviación estándar).

	HOMBRES				MUJERES			
	N	MEDIA	DS	P	N	MEDIA	DS	P
CC	8	1,07	0,19	0,8049	6	0,847	0,36	0,02
no CC	30	1,111	0,45		12	1,346	0,39	
TT	14	1,048	0,53	0,5389	4	1,537	0,29	0,06
no TT	24	1,135	0,33		14	1,077	0,43	

· Polimorfismo (G162A) del promotor de PON1

Se estudió el polimorfismo G162A del promotor del gen de la enzima PON1. La distribución de las frecuencias alélicas encontradas en la población control y en los deportistas se resumen en la *Tabla 26*.

Tabla 26. Frecuencias alélicas del polimorfismo G162A del promotor de PON1.

A-162G	Alelos	ATLETAS (55)*	CONTROLES (79)	P
		p=0.15; q=0.85	p=0.24; q=0.76	
AA	A, (p) G, (q)	0	1	0,9**
AG		17	24	
GG		38	54	

*Sólo en 55 atletas pudieron determinarse los genotipos.
** GG vs. noGG

En ninguno de los análisis realizados, distribución por pruebas atléticas, número de copias de mtDNA o daño oxidativo, en relación a este genotipo, se encontraron diferencias significativas estadísticamente, como se muestran en las Tablas 27, 28 y 29. Por lo que se concluye que este polimorfismo parece no influir en la práctica deportiva.

Tabla 27. Distribución del polimorfismo G162A del promotor de PON1 en función de las pruebas atléticas.

	HOMBRES				MUJERES			
	VELOCISTA	FONDO	MARCHA	P	VELOCISTA	FONDO	MARCHA	P
GG	8	17	3	0,31	2	8	0	0,21
no GG	5	3	1		2	4	2	

Tabla 28. Distribución del número de copias de mtDNA del polimorfismo G162A del promotor de PON1. (ND: No determinado por ausencia de individuos AA). (DS= desviación estándar).

	HOMBRES				MUJERES			
	N	MEDIA	DS	P	N	MEDIA	DS	P
GG	28	68,3	15,8	0,36	10	69,9	16,8	0,96
no GG	9	74,4	21,2		8	69,5	20,4	
AA	0			ND	0			ND
no AA	37	71,3	18,5		18	69,7	18,6	

Tabla 29. Distribución del daño oxidativo del polimorfismo G162A del promotor de PON1. (DS= desviación estándar).

	HOMBRES				MUJERES			
	N	MEDIA	DS	P	N	MEDIA	DS	P
GG	28	1,113	0,468	0,7	10	1,265	0,39	0,8
no GG	9	1,048	0,191		8	1,073	0,5	
AA	0			ND				ND
no AA	37	1,0805	0,3295		18	1,169	0,445	

* No determinado por ausencia de individuos AA.

4. DISCUSIÓN

En el presente capítulo, que recopila los trabajos realizados por nuestro grupo en el campo de la variabilidad genética mitocondrial y el ejercicio físico durante los últimos 10 años, se ha confirmado que los haplogrupos mitocondriales, al igual que las variantes de PON1, pero no las de MnSOD, deben ser tenidos en cuenta en el mundo de la práctica deportiva.

Cuando se inició este trabajo se partía de la hipótesis de que los diferentes haplogrupos mitocondriales podían presentar diferente fenotipo externo, es decir, diferencias en el rendimiento energético, producción de radicales libres y calor ya que algunas variantes mitocondriales parecían asociarse con diferente eficiencia de la cadena respiratoria ^(35, 51). Esta idea, que era nuestro punto de partida, se reforzó cuando aparecieron varias publicaciones que proponían similar hipótesis ^(30, 89, 90).

Los resultados que nosotros hemos obtenido en estos años, demuestran que los haplogrupos H y el J presentan una diferencia significativa en el consumo máximo de oxígeno (mayor y menor respectivamente) en individuos que, sin ser deportistas, practican ejercicio de mantenimiento ^(75, 84) lo que sugiere un diferente fenotipo energético de las variantes genéticas mitocondriales. Sin embargo, también se observó que en deportistas de alto nivel, la diferencia observada previamente entre ambos haplogrupos desaparecía ⁽⁸⁵⁾. ¿Cómo interpretar estos resultados?

La capacidad de los seres humanos y animales para adaptarse al ejercicio se ha demostrado en repetidas ocasiones. Los estímulos fisiológicos, en función de su duración, son capaces de inducir diferentes efectos: respuestas al ejercicio agudo (alteraciones sistémicas que se producen durante una sola sesión de ejercicio) y las adaptaciones (cambios en las células, órganos o sistemas que persisten después o como consecuencia del entrenamiento físico constante).

Algunas de estas adaptaciones tienen que ver con cambios estructurales en el músculo esquelético ⁽⁷⁶⁾; otras, sin embargo, se relacionan con

el consumo de oxígeno, parámetro de gran interés en el rendimiento deportivo. Los resultados que resumimos en este trabajo, sugieren que, a pesar de la influencia demostrada de las variantes genéticas mitocondriales en el VO_2 máx^(52, 75, 84), el entrenamiento del individuo, en particular el aeróbico, induce adaptaciones que tienden a igualar el consumo de oxígeno en los haplogrupos⁽⁸⁵⁾. Desde nuestro punto de vista esta es una de las observaciones más interesantes del presente trabajo que debería ser tomada en cuenta por los entrenadores en el momento de diseñar el entrenamiento individual de los deportistas.

Además de las adaptaciones citadas anteriormente durante la práctica deportiva intensa, también se ha determinado un incremento de la producción de radicales libres⁽⁹¹⁻⁹⁵⁾ y, por tanto, cabe esperar, un mayor daño oxidativo. Estas observaciones fueron confirmadas por nuestro grupo cuando se hizo un estudio de la dosis genómica mitocondrial⁵ en músculo. Según nuestro trabajo, el daño oxidativo correlaciona directamente con la intensidad, duración y condiciones estresantes de la práctica deportiva, requiriendo la recuperación en estos casos, más de 48 horas, según se desprende de nuestros resultados⁽⁹⁶⁾.

Que el consumo de oxígeno y los radicales libres aumentaran paralelamente, como se muestra en el apartado Resultados, nos llevó a proponer una explicación molecular que se recoge en⁽⁷⁵⁾. La justificación que se propone en ese artículo (*Figura 19* de este capítulo) es que el consumo de oxígeno depende de dos procesos moleculares: la producción de ATP y la generación de ROS. La mayor eficiencia en la cadena respiratoria determina más producción de ATP, pero también más ROS. Como estas moléculas consumen 4 veces más oxígeno que la síntesis de ATP, podemos decir que los haplogrupos más eficientes en la producción de energía, como el H, también generan más daño oxidativo por lo que se adaptarán mejor a pruebas de corta duración puesto que tienen la ventaja de producir más energía. El mayor daño oxidativo generado durante ellas alargará el tiempo de recuperación, por tanto, el deportista dependerá más de su sistema antioxidante. Apoyando esta hipótesis nuestro estudio mostró una selección positiva del haplogrupo H en los deportistas de velocidad (100 y 400 m).

⁵ Dosis genómica= cantidad de mtDNA/célula que guarda una relación inversa con el daño oxidativo que sufre la célula.

Sin embargo, en pruebas largas, los individuos H, a pesar de la mayor producción de ATP, tendrían la desventaja de generar mucho daño oxidativo que induciría efectos negativos en el deportista ya durante la prueba, al ser esta de mayor duración, por lo que este haplogrupo sería seleccionado negativamente. En este caso, también nuestros resultados apoyan la hipótesis de partida, ya que, en pruebas aeróbicas, los individuos H mostraron una frecuencia menor que en la población normal.

Teniendo presente, por tanto, la importancia del daño oxidativo en la práctica deportiva y los estudios previos realizados en varias enzimas antioxidantes, nuestro grupo decidió abordar la determinación de las variantes genéticas de varias enzimas antioxidantes: MnSOD (de origen mitocondrial) y la PON1, esta última asociada a una importante actividad antioxidante, ya demostrada en el campo de las enfermedades cardiovasculares. Los resultados no mostraron diferencias en MnSOD, pero sí en PON1, confirmando la importancia del sistema antioxidante durante la actividad física: las variantes que determinaban mayor cantidad de enzima y de actividad antioxidante se acumulaban en deportistas. En resumen, nuestro grupo considera que la selección positiva o negativa de los haplogrupos para las diferentes actividades deportivas es más dependiente de la ratio entre el ATP y los radicales libres (y, por tanto, del daño oxidativo consecuente) que de la cantidad de ATP producido. Desde nuestro punto de vista, el sistema antioxidante del individuo, al contrarrestar el daño oxidativo generado durante la práctica deportiva o durante la recuperación posterior, se vislumbra como un factor que, además de los haplogrupos, deberá ser muy tenido en cuenta en el campo de la investigación deportiva y en su aplicación más directa, la selección y entrenamiento de los deportistas.

5. CONCLUSIONES

Respecto a la caracterización antropométrica y fisiológica de la población de deportistas

Este trabajo confirma muchas observaciones ya publicadas por otros autores sobradamente cualificados en el campo de la investigación fisiológica deportiva.

Se hace un pequeño resumen de ellas que puede servir como recordatorio.

- La velocidad máxima alcanzada por las mujeres deportistas es menor que la de los hombres.
- La frecuencia cardiaca en el umbral aeróbico y anaeróbico en hombres, pero no en mujeres, difiere significativamente en función de la disciplina deportiva practicada.
- El tiempo que los deportistas mantienen la velocidad máxima es independiente del sexo, pero se observan diferencias muy significativas según la disciplina deportiva practicada.
- Hombres y mujeres difieren notablemente en su consumo de oxígeno, lo que podría deberse, entre otros factores, a la mayor masa muscular y ventilación pulmonar de presentan los varones.
- El mayor consumo de oxígeno en los deportistas se alcanza en las pruebas que combinan la necesidad de mantener mayor velocidad durante un tiempo prolongado (1500 m, 3000 m obstáculos, 5000 m).
- El cociente respiratorio en hombres y mujeres es $>0,8$ lo que indica que, tanto en pruebas aeróbicas como anaeróbicas, hay una parte importante de la energía suministrada por el metabolismo anaeróbico (glucólisis).

- La ventilación pulmonar difiere significativamente entre ambos sexos, pero no según la disciplina deportiva practicada.
- El consumo de oxígeno en el umbral aeróbico y anaeróbico no difiere entre hombres y mujeres, ni entre disciplinas deportivas practicadas.
- La frecuencia cardiaca en hombres, según la disciplina deportiva practicada, mostró una gran diferencia significativa, sobre todo, entre las pruebas de fondo y marcha.
- La frecuencia cardiaca en VT1 y VT2 difiere notablemente según la disciplina deportiva practicada en hombres, pero no en mujeres.

Respecto a la genética y genómica mitocondrial

- En los deportistas anaeróbicos se acumula el haplogrupo H (62%), mientras que en los aeróbicos este haplogrupo está disminuido (32%) respecto a la población española (45%).
- No se observaron diferencias significativas entre la población española y los deportistas en su conjunto.
- Todos los atletas con haplogrupo L⁸, subhaplogrupo L3 practican carreras de fondo, en cambio, el único deportista con genotipo noL3 es un velocista.
- Las mujeres que practican pruebas de fondo, pertenecen mayoritariamente a los haplogrupos noH (11/12 = 92%) mientras que en la población española estos haplogrupos representan en torno al 55%.
- El haplogrupo H mostró significativamente mayor VO₂ máx que el J.
- Se observan diferencias significativas en el cociente respiratorio entre haplogrupos, sobre todo, entre H y J con el resto.

⁵ Este haplogrupo es de origen africano. En torno al 1-2% de la población española es portadora de esta variante genética.

- El haplogrupo J muestra menor daño oxidativo que el resto de haplogrupos, en particular el H, tanto en hombres como en mujeres.
- La Marcha es la disciplina deportiva que induce menor daño oxidativo. El hecho de que además las mujeres presenten menor daño que los hombres en esta prueba (aunque sin diferencia significativa) sugiere una potencial contribución de los estrógenos en el proceso de bloqueo de los radicales libres inductores del daño oxidativo.
- En las mujeres deportistas, pero no en los hombres, se observó una correlación negativa al límite entre el daño oxidativo y el nº de copias de mtDNA.

Respecto a la genética nuclear

- Según nuestros resultados, el polimorfismo rs4880 de la enzima mitocondrial superóxido dismutasa dependiente de Mn²⁺ (MnSOD) parece no influir en los parámetros determinantes del rendimiento deportivo.
- Las variantes genéticas de PON1 y su promotor que determinan mayor cantidad de enzima y mayor actividad enzimática se acumulan significativamente en deportistas comparados con la población española.

6. APLICACIONES

Los resultados de este trabajo pueden contribuir a la selección-orientación de deportistas para determinadas pruebas deportivas, en función de su fondo genético mitocondrial y del genotipo de algunas enzimas antioxidantes, en particular de PON1.

Conocer el fondo genético de los deportistas y su potencial capacidad de producir daño oxidativo, podría servir para adecuar los tiempos de entrenamiento, recuperación, dieta etc, a sus condiciones particulares.

7. SUGERENCIAS

- Hacer determinación rutinaria del genotipo mitocondrial y de otros genes nucleares relevantes (en particular los genotipos del promotor y de la región codificante de PON1) a los deportistas para que, con un entrenamiento personalizado, se consiga el máximo rendimiento con el mínimo daño oxidativo en la práctica deportiva.
- Localizar potenciales talentos deportivos para determinadas pruebas, como individuos con el haplogrupo L3 para carreras de fondo o H para velocidad.
- Recomendar dieta rica en sustancias antioxidantes a los deportistas.

1. Margulis, L. Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp. Soc. Exp. Bio.* (29): 21-38, 1975
2. Nelson, D. L.; Cox, M. M.; Lehninger, A. L. *Principios de Bioquímica*. 3ª ed. Barcelona: Ediciones Omega S. A, 2001.
3. Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*. 191: 144-8, 1961
4. Boyer, J. L.; Allen, R. M.; Ng, O. C. Biochemical separation of Na⁺,K⁺-ATPase from a "purified" light density, "canalicular"-enriched plasma membrane fraction from rat liver. *Hepatology*. 3 (1): 18-28, 1983.
5. Hanna, M. G.; Nelson, I. P. Genetics and molecular pathogenesis of mitochondrial respiratory chain diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 55 (5): 691-706, 1999.
6. Brown, W. M.; George, M. Jr.; Wilson, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76 (4): 1967-71, 1979.
7. Cantatore, P.; Saccone, C. Organization, structure, and evolution of mammalian mitochondrial genes. *Int. Rev. Cytol.* 108: 149-208, 1987.
8. Nass, M. M.; Nass, S. Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. I. Fixation and Electron Staining Reactions. *J. Cell. Biol.*, 19: 593-611, 1963
9. Nass, S.; Nass, M. M. Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. II. Enzymatic and Other Hydrolytic Treatments. *J. Cell. Biol.* 19: 613-29, 1963.
10. Anderson, S.; Bankier, A.; Barrell, T. B. G., M.H.; Bruijn, M. H. de; A.R. Coulson, A. R.; Drouin, J.; Eperon, I. C.; Nierlich, D. P.; Roe, B. A.; Sanger, F.; Schreier, P. H.; Smith, A. J.; Staden, R.; Young, I. G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 290 (5806): 457-65, 1981.
11. Barrell, B.G.; Anderson, S.; Bankier, A. T.; Bruijn, M. H. de; Chen, E.; Coulson, A. R.; Drouin, J.; Eperon, I. C.; Nierlich, D. P.; Roe, B. A.; Sanger, F.; Schreier, P. H.; Smith, A. J.; Staden, R.; Young, I. G. Different pattern of codon recognition by mammalian mitochondrial tRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77 (6): 3164-6, 1980.
12. Montoya, J.; Attardi, G. ADN mitocondrial humano. *Investigación y Ciencia*, 118: 60-69, 1986.
13. Giles, R. E.; Blanc, H.; Cann, H. M.; Wallace, D. C. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77 (11): 6715-9, 1980.
14. Sutovsky, P.; Moreno, R. D.; Ramalho-Santos, J.; Dominko, T.; Simerly, C.; Schatten, G. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, 402 (6760): 371-2, 1999.
15. Schwartz, M. Vissing, J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N. Engl. J. Med.* 347 (8): 576-80, 2002.
16. Danan, C.; Sternberg, D.; Steirteghem, A. Van; Cazeneuve, C.; Duquesnoy, P.; Besmond, C.; Goossens, M.; Lissens, W.; Amselem, S. Evaluation of parental mitochondrial inheritance in neonates born after intracytoplasmic sperm injection. *Am. J. Hum. Genet.* 65 (2): 463-73, 1999.
17. Chinnery, P. F.; Samuels, D. C.; Elson, J.; Turnbull, D. M. Accumulation of mitochondrial DNA mutations in ageing, cancer, and mitochondrial disease: is there a common mechanism? *Lancet*. 360 (9342): 1323-5, 2002.
18. Johns, D. R. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Mitochondrial DNA and disease. *N. Engl. J. Med.* 333 (10): 638-44, 1995.

19. Torroni, A.; Huoponen, K.; Francalacci, P.; Petrozzi, M.; Morelli, L.; Scozzari, R.; Obinu, D.; Savontaus, M. L.; Wallace, D. C. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics*. 144 (4): 1835-50, 1996.
20. Wallace, D. C.; Brown, M. D.; Lott, M. T. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene*. 238 (1): 211-30, 1999.
21. Vigilant, L.; Stoneking, M.; Harpending, H.; Hawkes, K.; Wilson, A. C. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science*. 253 (5027): p. 1503-7, 1991.
22. Torroni, A.; Lott, M. T.; Cabell, M. F.; Chen, Y. S.; Laverigne, L.; Wallace, D. C. mtDNA and the origin of Caucasians: identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. *Am. J. Hum. Genet.* 55 (4): 760-76, 1994.
23. Herrnstadt, C.; Elson, J. L.; Fahy, E.; Preston, G.; Turnbull, D. M.; Anderson, C.; Ghosh, S. S.; Olefsky, J. M.; Beal, M. F.; Davis, R. E.; Howell, N. Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups. *Am. J. Hum. Genet.* 70 (5): 1152-71, 2002.
24. Torroni, A.; Bandelt, H. J.; Macaulay, V.; Richards, M.; Cruciani, F.; Rengo, C.; Martinez-Cabrera, V.; Villems, R.; Kivisild, T.; Metspalu, E.; Parik, J.; Tolk, H. V.; Tambets, K.; Forster, P.; Karger, B.; Francalacci, P.; Rudan, P.; Janicijevic, B.; Rickards, O.; Savontaus, M. L.; Huoponen, K.; Laitinen, V.; Koivumaki, S.; Sykes, B.; Hickey, E.; Novelletto, A.; Moral, P.; Sellitto, D.; Coppa, A.; Al-Zaheri, N.; Santachiara-Benerecetti, A. S.; Semino, O.; Scozzari, R. A signal, from human mtDNA, of postglacial recolonization in Europe. *Am. J. Hum. Genet.* 69 (4): 844-52, 2001.
25. Richards, M.; Macaulay, V.; Hickey, E.; Vega, E.; Sykes, B.; Guida, V.; Rengo, C.; Sellitto, D.; Cruciani, F.; Kivisild, R.; Villems, R.; Thomas, M.; Rychkov, S.; Rychkov, O.; Golge, M.; Dimitrov, D.; Hill, E.; Bradley, D.; Romano, V.; Cali, F.; Vona, G.; Demaine, A.; Papiha, S.; Triantaphyllidis, C.; Stefanescu, G.; Hatina, J.; Belledi, M.; Di Rienzo, A.; Novelletto, A.; Oppenheim, A.; Norby, S.; Al-Zaheri, N.; Santachiara-Benerecetti, S.; Scozzari, R.; Torroni, A.; Bandelt, H. J. Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *Am. J. Hum. Genet.* 67 (5): 1251-76, 2000.
26. Hofmann, S.; Jaksch, M.; Bezold, R.; Mertens, S.; Aholt, S.; Paprotta, A.; Gerbitz, K. D. Population genetics and disease susceptibility: characterization of central European haplogroups by mtDNA gene mutations, correlation with D loop variants and association with disease. *Hum. Mol. Genet.* 6 (11): 1835-46, 1997.
27. Richards, M. B.; Macaulay, V. A.; Bandelt, H. J.; Sykes, B. C. Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Ann. Hum. Genet.* 62 (Pt 3): 241-60, 1998.
28. Macaulay, V.; Richards, M.; Hickey, E.; Vega, E.; Cruciani, F.; Guida, V.; Scozzari, R.; Bonne-Tamir, B.; Sykes, B.; Torroni, A. The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs. *Am. J. Hum. Genet.* 64 (1): 232-49, 1999.
29. Mishmar, D.; Ruiz-Pesini, E.; Golik, P.; Macaulay, V.; Clark, A. G.; Hosseini, S.; Brandon, M.; Easley, K.; Chen, E.; Brown, M. D.; Sukernik, O.; Olckers, A.; Wallace, D. C. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (1): 171-6, 2003.
30. Ruiz-Pesini, E.; Mishmar, D.; Brandon, M.; Procaccio, V.; Wallace, D. C. Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science*. 303 (5655): 223-6, 2004.
31. Gómez-Durán, A.; Pacheu-Grau, D.; López-Gallardo, E.; Díez-Sánchez, C.; Montoya, J.; López-Pérez, M. J.; Ruiz-Pesini, E. Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum. Mol. Genet.* 19 (17): 3343-53, 2010.

32. Benedictis, G. De; Rose, G.; Carrieri, G.; De Luca, M.; Falcone, E.; Passarino, G.; Bonafe, M.; Monti, D.; Baggio, G.; Bertolini, S.; Mari, D.; Mattace, R.; Franceschi, C. Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *FASEB J.* 13 (12): 1532-6, 1999.
33. Benedictis, G. De; Carrieri, G.; Varcasia, O.; Bonafe, M.; Franceschi, C. Inherited variability of the mitochondrial genome and successful aging in humans. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 908: 208-18, 2002.
34. Domínguez-Garrido, E.; Martínez-Redondo, D.; Martín-Ruiz, C.; Gómez-Durán, A.; Ruiz-Pesini, E.; Madero, P.; Tamparillas, M.; Montoya, J.; von Zglinicki, T.; Díez-Sánchez, C.; López-Pérez, M. J. Association of mitochondrial haplogroup J and mtDNA oxidative damage in two different North Spain elderly populations. *Biogerontology*. 10 (4): 435-42, 2009.
35. Ruiz-Pesini, E.; Lapeña, A. C.; Díez, C.; Álvarez, E.; Enríquez, J. A.; López-Pérez, M. J. Seminal quality correlates with mitochondrial functionality. *Clin. Chim. Acta*. 300 (1-2): 97-105, 2000.
36. Ruiz-Pesini, E.; Lapeña, A. C.; Díez-Sánchez, C.; Pérez-Martos, A.; Montoya, J.; Álvarez, E.; Díaz, M.; Urriés, A.; Montoro, L.; López-Pérez, M. J.; Enríquez, J. A. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am. J. Hum. Genet.* 67 (3): 682-96, 2000.
37. Joffe, M.; Savage, N.; Isaacs, H. Respiratory activities of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondrial populations isolated from denervated and control rat soleus muscles. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 76 (4): 783-7, 1983.
38. Cogswell, A. M.; Stevens, R. J.; Hood, D. A. Properties of skeletal muscle mitochondria isolated from subsarcolemmal and intermyofibrillar regions. *Am. J. Physiol.* 264 (2 Pt 1): C383-9, 1993.
39. Jackman, M. R.; Willis, W. T. Characteristics of mitochondria isolated from type I and type IIb skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 270 (2 Pt 1): p. C673-8, 1996.
40. Hood, D. A. Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 90 (3): 1137-57, 2001.
41. Adhihetty, P. J.; Irrcher, I.; Joseph, A. M.; Ljubicic, V.; Hood, D. A. Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity. *Exp. Physiol.* 88 (1): 99-107, 2003.
42. Gollnick, P. D.; King, D. W. Effect of exercise and training on mitochondria of rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 216 (6): 1502-9, 1969.
43. Hoppeler, H.; Fluck, M. Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 35 (1): 95-104, 2003.
44. Puntchart, A.; Claassen, H.; Jostarndt, K.; Hoppeler, H.; Billeter, R. mRNAs of enzymes involved in energy metabolism and mtDNA are increased in endurance-trained athletes. *Am. J. Physiol.* 269 (3 Pt 1): C619-25, 1995.
45. Holloszy, J. O.; Booth, F. W. Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 38: 273-91, 1976.
46. Holloszy, J. O.; Coyle, E. F. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J. Appl. Physiol.* 56 (4): 831-8, 1984.
47. Hoppeler, H.; Luthi, P.; Claassen, H.; Weibel, E. R.; Howald, H. The ultrastructure of the normal human skeletal muscle. A morphometric analysis on untrained men, women and well-trained orienteers. *Pflügers Arch.* 344 (3): 217-32, 1973.

48. Williams, R. S.; Salmons, S.; Newsholme, E. A.; Kaufman, R. E.; Mellor, J. Regulation of nuclear and mitochondrial gene expression by contractile activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 261 (1): 376-80, 1986.
49. Gordon, J. W.; Rungi, A. A.; Inagaki, H.; Hood, D. A. Effects of contractile activity on mitochondrial transcription factor A expression in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 90 (1): 389-96, 2001.
50. Chilibeck, P.D.; Syrotiuik, D. G.; Bell, G. J. The effect of strength training on estimates of mitochondrial density and distribution throughout muscle fibres. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 80 (6): 604-9, 1999.
51. Dionne, F. T.; Turcotte, L.; Thibault, M. C.; Boulay, M. R.; Skinner, J. S.; Bouchard, C. Mitochondrial DNA sequence polymorphism, VO₂máx, and response to endurance training. *Med. Sci. Sports Exerc.* 23 (2): 177-85, 1991.
52. Murakami, H.; Ota, A.; Simojo, H.; Okada, M.; Ajisaka, R.; Kuno, S. Polymorphisms in control region of mtDNA relates to individual differences in endurance capacity or trainability. *Jpn. J. Physiol.* 52 (3): 247-56, 2002.
53. Lesage, R.; Simoneau, J. A.; Jobin, J.; Leblanc, J.; Bouchard, C. Familial resemblance in maximal heart rate, blood lactate and aerobic power. *Hum. Hered.* 35 (3): 182-9, 1985.
54. Rivera, M. A.; Wolfarth, B.; Dionne, F. T.; Chagnon, M.; Simoneau, J. A.; Boulay, M. R.; Song, T. M.; Perusse, L.; Gagnon, J.; Leon, A. S.; Rao, D. C.; Skinner, J. S.; Wilmore, J. H.; Keul, J.; Bouchard, C. Three mitochondrial DNA restriction polymorphisms in elite endurance athletes and sedentary controls. *Med. Sci. Sports Exerc.* 30 (5): 687-90, 1998.
55. Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59 (3): 527-605, 1979.
56. Shigenaga, M. K.; Hagen, T. M.; Ames, B. N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91 (23): 10771-10778, 1994.
57. Boveris, A.; Chance, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134 (3): 707-716, 1973.
58. Nohl, H.; Hegner, D. Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo?. *Eur J Biochem.* 82 (2): 563-567, 1978.
59. Kirkinezos, I. G.; Moraes, C. T. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 12 (6): 449-457, 2001.
60. Tonkonogi, M.; Sahlin, K. Physical exercise and mitochondrial function in human skeletal muscle. *Exerc Sport Sci. Rev.* 30 (3): 129-137, 2002.
61. Niess, A. M.; Hartmann, A.; Grunert-Fuchs, M.; Poch, B.; Speit, G. DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int. J. Sports Med.* 17 (6): 397-403, 1996.
62. Yakes, F. M.; VanHouten, B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94 (2): 514-519, 1997.
63. Zastawny, T. H.; Dabrowska, M.; Jaskolski, . T.; Klimarczyk, M.; Kulinski, L.; Koszela, A.; Szczesniewicz, M.; Sliwinska, M.; Witkowski, P.; Olinski, R. Comparison of oxidative base damage in mitochondrial and nuclear DNA. *Free Radic Biol Med.* 24 (5): 722-725, 1998.
64. Radak, Z.; Kaneko, T.; Tahara, S.; Nakamoto, H.; Ohno, H.; Sasvari, M.; Nyakas, C.; Goto, S. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1-2): 69-74, 1999.

65. Mackness, B.; Mackness, M. I.; Arrol, S.; Turkie, W.; Durrington, P. N. Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon. *Br J Pharmacol.* 122 (2): 265-268, 1997.
66. La Du, B. N.; Billecke, S.; Hsu, C.; Haley, R.W.; Broomfield, C. A. Serum paraoxonase (PON1) isozymes: the quantitative analysis of isozymes affecting individual sensitivity to environmental chemicals. *Drug Metab Dispos.* 29 (4 pt 2): 566-9, 2001.
67. Brophy, V. H.; Hastings, M. D.; Clendenning, J. B.; Richter, R. J.; Jarvik, G. P.; Furlong, C. E. Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics.* 11(1): 77-84, 2001.
68. Ferré, N.; Tous, M.; Paul, A.; Zamora, A.; Vendrell, J. J.; Bardají, A.; Camps, J.; Richart, C.; Joven, J. Paraoxonase Gln-Arg(192) and Leu-Met(55) gene polymorphisms and enzyme activity in a population with a low rate of coronary heart disease. *Clin. Biochem.* 35 (3): 197-203, 2002.
69. Shimoda-Matsubayashi, S.; Matsumine, H.; Kobayashi, T.; Nakagawa-Hattori, Y.; Shimizu, Y.; Mizuno, Y. 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, 1996.
70. González-Alonso, J.; Calbet, J. A.; Nielsen, B. Metabolic and thermodynamic responses to dehydration-induced reductions in muscle blood flow in exercising humans. *J Physiol.* 520 (2): 577-589, 1999.
71. Bergstrom, J. Percutaneous needle biopsy of skeletal muscle in physiological and clinical research. *Scand J Clin Lab Invest.* 35 (7): 609-616, 1975.
72. Fox, P. W.; Hershberger, S. L.; Bouchard, T. J. Jr. Genetic and environmental contributions to the acquisition of a motor skill. *Nature*, 384 (6607): 356-358, 1996.
73. Montgomery, H. E.; Marshall, R.; Hemingway, H.; Myerson, S.; Clarkson, P.; Dollery, C.; Hayward, M.; Holliman, D. E.; Jubbs, M.; World, M.; Thomas, E. L.; Brynes, A. E.; Saeed, N.; Barnard, M.; Bell, J. D.; Prasad, K. M.; Rayson, K.; Talmud, P. J.; Humphries, S. E. Human gene for physical performance. *Nature.* 393 (6682): 221-222, 1998.
74. Wolfarth, B.; Rivera, M. A.; Oppert, J. M.; Boulay, M. R.; Dionne, F. T.; Chagnon, M.; Gagnon, J.; Chagnon, Y.; Perusse, L.; Keul, J.; Bouchard, C. A polymorphism in the alpha2a-adrenoceptor gene and endurance athlete status. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32 (10): 1709-1712, 2000.
75. Martínez-Redondo, D.; Marcuello, A.; Casajús, J. A.; Ara, I.; Dahmani, Y.; Montoya, J.; Ruiz-Pesini, E.; López-Pérez, M. J.; Díez-Sánchez, C. Human mitochondrial haplogroup H: the highest VO₂máx consumer--is it a paradox? *Mitochondrion.* 10 (2): 102-107, 2010.
76. Irrcher, I.; Adihetty, P. J.; Joseph, A. M.; Ljubicic, V.; Hood, D. A. Regulation of mitochondrial biogenesis in muscle by endurance exercise. *Sports Med.* 33 (11): 783-793, 2003.
77. Pilger, A.; Germadnik, D.; Schaffer, A.; Theiler, A.; Pils, P.; Sluka, F.; Winker, N.; Rudiger, H. W. 8-Hydroxydeoxyguanosine in leukocyte DNA and urine of quartz-exposed workers and patients with silicosis. *Int. Arch. Occup. Environ Health.* 73 (5): 305-310, 2000.
78. Powers, S. K.; Criswell, D.; Lawler, J.; Ji, L. L.; Martin, D.; Herb, R. A.; Dudley, G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 266(2-2): 375-80, 1994.
79. Leeuwenburgh, C.; Hollander, J.; Leichtweis, S.; Griffiths, M.; Gore, V.; Ji, L. L. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am. J. Physiol.* 272 (1-2): 363-9, 1997.

80. Alessio, H. M.; Goldfarb, A. H. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. *J. Appl. Physiol.* 64 (4): 1333-1336, 1988.
81. Ji, L. L.; Stratman, V.; Lardy, H. A. Enzymatic down regulation with exercise in rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys.* 263 (1): 137-149, 1988.
82. Powers, S. K.; Hamilton, K. Antioxidants and exercise. *Clin. Sports Med.* 18 (3): 525-536, 1999.
83. Powers, S. K.; Ji, L. L.; Leeuwenburgh, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc.* 31 (7): 987-997, 1999.
84. Marcuello, A.; Martínez-Redondo, D.; Dahmani, Y.; Casajus, J. A.; Ruiz-Pesini, E.; Montoya, J.; Lopez-Perez, M. J.; Diez-Sanchez, C. Human mitochondrial variants influence on oxygen consumption. *Mitochondrion.* 9 (1): 27-30, 2009.
85. Marcuello, A.; Martinez-Redondo, D.; Dahmani, Y.; Terreros, J. L.; Aragonés, T.; Casajús, J. A.; Echávarri, J. M.; Quílez, J.; Montoya, J.; López-Pérez, M. J.; Díez-Sánchez, C. Steady exercise removes VO₂max difference between mitochondrial genomic variants. *Mitochondrion.* 9 (5): 326-330, 2009.
86. Brophy, V. H.; Jampsa, R. L.; Clendenning, J. B.; McKinstry, L. A.; Jarvik, G. P.; Furlong, C. E. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am. J. Hum. Genet.* 68 (6): 1428-1436, 2001.
87. Leviev, I.; James, R. W. Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (2): 516-521, 2000.
88. Suehiro, T.; Nakamura, T.; Inoue, M.; Shiinoki, T.; Ikeda, Y.; Kumon, Y.; Shindo, M.; Tanaka, H.; Hashimoto, K. A polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression. *Atherosclerosis.* 150 (2): 295-298, 2000.
89. Loeb, L. A.; Wallace D. C.; Martin, G. M. The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102 (52): 18769-70, 2005.
90. Wallace, D. C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* 39: 359-407, 2005.
91. Poulsen, H. E.; Loft, S.; Vistisen, K. Extreme exercise and oxidative DNA modification. *J. Sports. Sci.* 14 (4): 343-346, 1996.
92. Bejma, J.; Ramires, P.; Ji, L. L. Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: differential effects in the myocardium and liver. *Acta Physiol Scand.* 169 (4): 343-351, 2000.
93. Di Meo, S.; Venditti, P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol. Signals. Recept.* 10 (1-2): 125-140, 2001.
94. Cooper, C. E.; Volvaard, N. B.; Choueiri, T.; Wilson, M. T. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2): 280-285, 2002.
95. Navarro, A.; Gómez, C.; López-Cepero, J. M.; Boveris, A. 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): 505-511, 2004.
96. Marcuello, A.; González-Alonso, J.; Calbet, J. A.; Damsgaard, R.; López-Pérez, M. J.; Díez-Sánchez, C. Skeletal muscle mitochondrial DNA content in exercising humans. *J. Appl. Physiol.* 99 (4): 1372-1377, 2005.

ANEXO I

MATERIALES

Contenido extractado del apartado de Material y Métodos de las tesis de la Dra. Ana Marcuello López y de la Dra. Diana Martínez Redondo.

Medidas antropométricas

Para el peso, una báscula con una fiabilidad de ± 100 g de la marca SECA, Hamburg, Germany. Para la altura un tallímetro marca Atlántida. La medida de los pliegues cutáneos se realizó con un plicómetro Holtain. Un paquímetro GPM para la medida de los diámetros de fémur, húmero y biestiloide y una cinta antropométrica Silverflex 385 para los perímetros de brazo y pierna.

Determinación de los parámetros mecánicos de esfuerzo.

Los ergómetros utilizados para las pruebas del esfuerzo fueron una bicicleta ergométrica Monark Ergomedic 828E y un tapiz rodante de la marca Jaeger-HP Cosmos, modelo LE-600 C que permite controlar la velocidad, el porcentaje de la pendiente y la potencia desarrollada.

Determinación de los parámetros ergoespirométricos máximos y submáximos.

La ventilación pulmonar y el intercambio de los gases respiratorios en ejercicio fueron medidos con un analizador de gases respiratorios marca Jaeger, modelo Oxycon Pro, con un sistema de medida respiración a respiración y con un medidor de volumen espiratorio bidireccional triple-V®.

Determinación de los parámetros cardiovasculares

Durante la prueba de esfuerzo se realizó una monitorización electrocardiográfica de 12 derivaciones con un equipo Marquette Electronics modelo Case 8000.

Extracción de la sangre de los deportistas objeto del estudio.

La extracción de los 3 ml de sangre necesarios para la obtención de DNA se realizó por personal sanitario cualificado, mediante vacutainer con Etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) para evitar la coagulación de las muestras.

Extracción y cuantificación del DNA

El agua utilizada se purificó por ósmosis inversa en el sistema de desionización de agua Milli-Ro4 de Millipore. El hielo se obtuvo en una máquina Iberna y fue triturado en una picadora Sartorius.

La esterilización de las soluciones y material de plástico se llevó a cabo en un autoclave marca Selecta (modelo 437-G) a 1 atm. durante 20 min. El material de vidrio se esterilizó en una estufa Selecta a 140°C durante 6h. y las sustancias termolábiles, por filtración con filtros Millipore GS de 0,22 µm de Nalgene.

Las balanzas electrónicas utilizadas eran de las marca Sartorius (modelos 28.42, 1265 MP y AND modelo ER 120 A) y las medidas de pH se realizaron en un pHmetro digital Crison micropH 2000 con electrodo combinado.

Las centrifugaciones de volúmenes grandes se realizaron en una centrífuga refrigerada Kontron (modelo Centrikon H-401 con rotor fijo A 8.24.); mientras que para los pequeños volúmenes se utilizó una microcentrífuga Micro Centaur MSE de Sanyo. El agitador magnético y el vórtex utilizados eran de las marcas P Selecta Agimatic-S y Heidolph REAX 2000.

Las medidas de pH se llevaron a cabo en un pH-metro digital Crison Digit 501, con electrodo estándar.

Se utilizó un concentrador a vacío de la casa Eppendorf modelo 5301, para la preparación de muestras de DNA.

La cuantificación del DNA total se realizó con un Nano-Drop ND-1000 Spectrophotometer.

Para el almacenamiento de soluciones, medios, reactivos y muestras biológicas se utilizaron un frigorífico congelador Corberó (modelo FC 360 E); un arcón congelador (-20°C) marca Veredeca; y un ultracongelador (-70°C) de la marca Koxka.

Análisis genético mitocondrial y nuclear

Las reacciones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación tuvieron lugar en un termociclador Biometra Trio Thermoblock.

La purificación del DNA, cuando era necesaria, se realizó con el kit GenElute PCR Clean-up kit (SIGMA).

Las reacciones de PCR a tiempo real se realizaron en el aparato StepOne Real-Time PCR System de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

Las electroforesis submarinas horizontales se desarrollaron en soportes GNA-100 y GNA-200 de Pharmacia, siendo la fuente de alimentación el modelo de Bio Rad, Power PAC 300.

Las incubaciones con enzimas de restricción a 37°C, 55°C y 45°C de productos de PCR se realizaron en un termoblock marca P-Selecta (modelo Multiplaces) capaz de alcanzar temperaturas de 10 a 205°C.

La agarosa para la formación de los geles de electroforesis se fundió utilizando un horno microondas Solac.

La visualización y fotografía de ácidos nucleicos en geles de agarosa fue realizada con un Bio-Rad Gel-Doc 1000 camera con el software Molecular Analyst version 1.5.

La expedición de pequeños volúmenes se realizó haciendo uso de micropipetas automáticas graduables marca Gilson, modelos P10 (10µl); P20 (20µl); P200 (200µl); y P1.000 (1 ml). Las preparaciones de las mezclas de reacción para PCR se realizaron con una pipeta diferente, Gilson P10 de 0,5 a 10 µl, para evitar contaminaciones por manipulación incorrecta.

Análisis de los complejos de la cadena respiratoria

Las electroforesis verticales se llevaron a cabo con sistemas Mini Protean II Xi Cell de Bio-rad, para proteínas.

El flujo de las disoluciones para hacer los geles de gradiente del Blue Native se reguló mediante bombas peristálticas de Gilson, modelo Minipuls 3.

Las lecturas espectrofotométricas y las medidas de las actividades enzimáticas espectrofotométricamente, se realizaron en un espectrofotómetro UV-Visible UV 500 de Unicam, termostatzado mediante sistema Peltier también de Unicam y el registro de datos y manipulación de los mismos, se realizó en el software Vision 32, versión 1.05 de Unicam.

Para la transferencia del DNA total a la membrana de nylon fue utilizado un aparato de Slot-Blot modelo Minofold II SRC 072/0 de la casa comercial Schleider y Schuell.

Para la fijación de los ácidos nucleicos a las membranas se utilizó un UV crosslinker Hoefe, modelo UVC 500.

El trabajo con isótopos se llevó a cabo en un laboratorio especial, equipado con pantallas de metacrilato de 2 cm de espesor y con un contador de radiactividad tipo Geiger, marca Technical Associates, modelo PUG-1.

Las hibridaciones de los ácidos nucleicos con sondas radiactivas, se realizaron en un horno de hibridación Hybaid con rueda giratoria, en tubos del propio aparato, modelos HB-OV-BS y HB-OV-BL.

La exposición autorradiográfica de geles con ácidos nucleicos y proteínas radiactivas se efectuó en casetes herméticas, y con pantallas amplificadoras cuando fueron necesarias, marca Dupont.

Los análisis densitométricos se llevaron a cabo en un densitómetro láser LKB, modelo UtraScan XL. Los datos se recogieron y evaluaron en un PC con software GelScan XL versión 2.0.

ANEXO II MÉTODOS

Contenido extractado del apartado de Material y Métodos de las tesis de la Dra. Ana Marcuello López y de la Dra. Diana Martínez Redondo.

Extracción de DNA con Fenol y cuantificación del DNA

La extracción del DNA se realizó a partir de muestras de sangre y de biopsias de músculo siguiendo los siguientes protocolos:

· A partir de muestras de sangre:

La muestra de sangre recogida en tubos con EDTA, se transvasó a tubos estériles de 50 ml. Se le añadió tampón de lisis de hematíes (Tris-HCl 2 M pH: 7,5, MgCl₂ 1 M) y se centrifugó a 4°C y 3500 r.p.m. durante 15 min. Este paso se repitió hasta que el sedimento, compuesto principalmente por leucocitos, quedó blanquecino.

El sedimento se trató con tampón de lisis (NaCl 5 M, EDTA 0,25 M, Tris-HCl 2 M), SDS hasta una concentración final de 0,4% y proteinasa K (2 mg/ml). La mezcla se incubó a 37°C durante al menos 12 horas.

· A partir de biopsias de músculo congeladas:

La biopsia muscular congelada ($\approx$ 100 mg) fue pulverizada en un mortero de porcelana con N₂ líquido, en la cámara fría, para evitar que durante este proceso se descongelara la biopsia. El polvo obtenido se transfirió a un tubo eppendorf donde se resuspendió en 0,5 ml del tampón 1xRSB (10 mM TRIS-HCl pH = 7,4, 10 mM NaCl, 25 mM EDTA). Las células se lisaron mediante la adición de SDS hasta una concentración final del 1%. Se añadió proteinasa K (40 µg/ml tampón 1xRBS) y se incubó a 50°C durante 3 horas.

Posteriormente, para la extracción de los ácidos nucleicos se añadió acetato amónico 7,5 M hasta una concentración final de 2 M, para facilitar la precipitación del DNA y 1,5 volúmenes de fenol - IAC. Se agitó y centrifugó a 20°C y 1.000 g durante 5 min. Se recogió la fase acuosa en la que permanecía el DNA, se transfirió a un nuevo tubo y se procedió añadiendo nuevamente 1,5 volúmenes de fenol – IAC. A esta nueva fase acuosa, se le añadieron 1,5 volúmenes de una mezcla Cloroformo – Alcohol Isoamílico (24:1), se agitó y centrifugó a 20°C y 1.000 g durante 5 min, para separar nuevamente las fases.

A la fase acuosa recogida en este último paso se le añadieron dos volúmenes de etanol frío para precipitar los ácidos nucleicos y se dejaron durante 2 h a -80°C, posteriormente se centrifugaron 30 min a 20.000 g se eliminó el etanol y se secó en el concentrador a vacío. Por último, el DNA fue resuspendido en 500 ml de Tris – EDTA (TE).

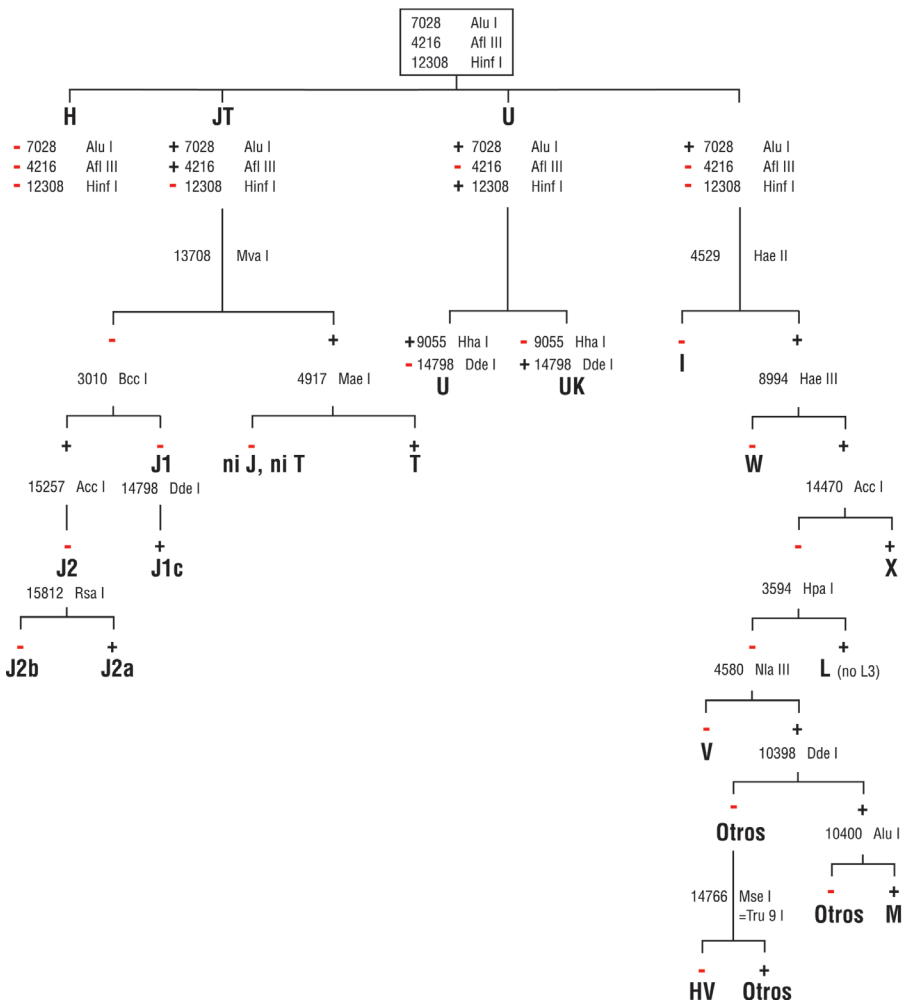
La cuantificación se realizó por espectrofotometría aplicando ley de Lambert-Beer según la cual la absorbancia es proporcional a la concentración según la siguiente ecuación ($A=C\cdot\epsilon\cdot l$) donde: A= absorbancia; C= concentración; ϵ = coeficiente de extinción molar característico del DNA y l= anchura de la cubeta del espectro (1 cm).

Análisis genético mitocondrial:
Determinación de Haplogrupos y Subhaplogrupos

La determinación de Haplogrupos y Subhaplogrupos mitocondriales se realizó a partir de DNA total mediante las siguientes técnicas:

- RFLPs

La estrategia utilizada para determinar los haplogrupos caucásicos consiste en la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de varios fragmentos del genoma mitocondrial y posterior corte del fragmento amplificado con las enzimas de restricción correspondientes. El protocolo jerarquizado sigue el esquema que se adjunta y es el resultado de la síntesis de los trabajos publicados en MITOMAP (<http://www.mitomap.org/MITOMAP>) por reconocidos especialistas del mundo en la materia. (Ver Esquema 1).



Esquema 1. Resumen de la estrategia de haplogrupaje utilizada: los símbolos + y – representan la presencia o ausencia, respectivamente, de los puntos de corte para las enzimas de restricción que se citan en los polimorfismos marcados.

- Secuenciación de la región hipervariable I (HVI) del mtDNA

Todas las reacciones de amplificación previas a la secuenciación se llevaron a cabo en las mismas concentraciones finales de reactivos que para los estudios de PCR/RFLPs. Los productos de PCR que se mandaron a secuenciar, se purificaron siguiendo las instrucciones del kit GenElute PCR Clean-up kit (SIGMA). Para comprobar la eficiencia del proceso y estimar la concentración

del fragmento, se cargó una alícuota del eluido final en un gel de agarosa al 2% con Bromuro de Etidio a 0,5 µg/ml de concentración y se comparó la intensidad de la banda del fragmento purificado, con el marcador “Low DNA Mass™ Ladder” (Invitrogen).

La secuenciación del fragmento de la HVI del mtDNA se realizó como anteriormente se ha descrito. Con ese objetivo se amplificó el fragmento del genoma que va desde la posición 15977 hasta la 16450. Se emplearon los siguientes cebadores: 5'-CCACCATTAGCACCCAAAGC-3' y 5'-CGAGGAGAGTAGCACTCTTG-3'. El programa de amplificación utilizado fue: [95°C 60", (95°C 45", 62°C 45", 72°C 2') x 35 ciclos, 72°C 5'].

El servicio de secuenciación utilizado fue SECUGEN S.L. del Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid. Se enviaron aproximadamente 100 ng de producto de PCR purificado.

Una vez obtenida la secuencia de cada individuo se comparó con la secuencia de referencia correspondiente del mtDNA humano (Secuencia de referencia de Cambridge) mediante el software FinchTV 1.4.0, Geospiza Inc. 2004-2006.

Para determinar las distintas mutaciones y caracterizar los haplogrupos correspondientes se utilizó la información publicada en <http://www.stats.gla.ac.uk/~vincent/founder2000/index.html>.

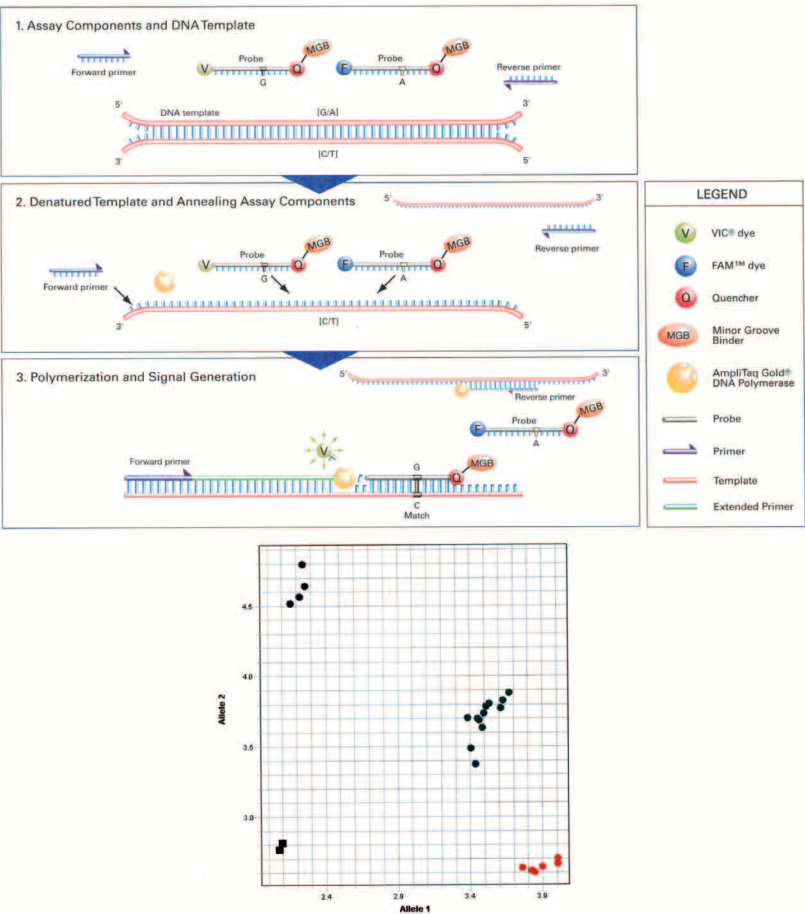
· PCR en tiempo real

Es una técnica que emplea, del mismo modo que la PCR convencional, un molde de DNA, al menos un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, y una DNA polimerasa termoestable. Las condiciones de PCR (tiempos y Tª dependen de cada polimorfismo estudiado). A dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia, tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Dicha medición, se realiza después de cada ciclo de amplificación y es por esto que se le denomina PCR en tiempo real. Puede utilizarse para hacer diversas determinaciones

genéticas, como en este apartado, o genómicas, como en los apartados posteriores.

En el caso de determinación genética cada uno de los dos alelos correspondientes a un polimorfismo mitocondrial (ver estrategia de haplogrupaje anterior) fue marcado con un colorante fluorescente distinto: VIC para el alelo 1 y FAM para el alelo 2. El marcaje lo realizó Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, para cada uno de los polimorfismos estudiados por este método. Por ello la identificación por fluorescencia de los genotipos resultaba muy evidente: rojo (homocigótico para alelo 1), azul (homocigótico para alelo 2) y verde para el genotipo heterocigótico (ver Figura 1).

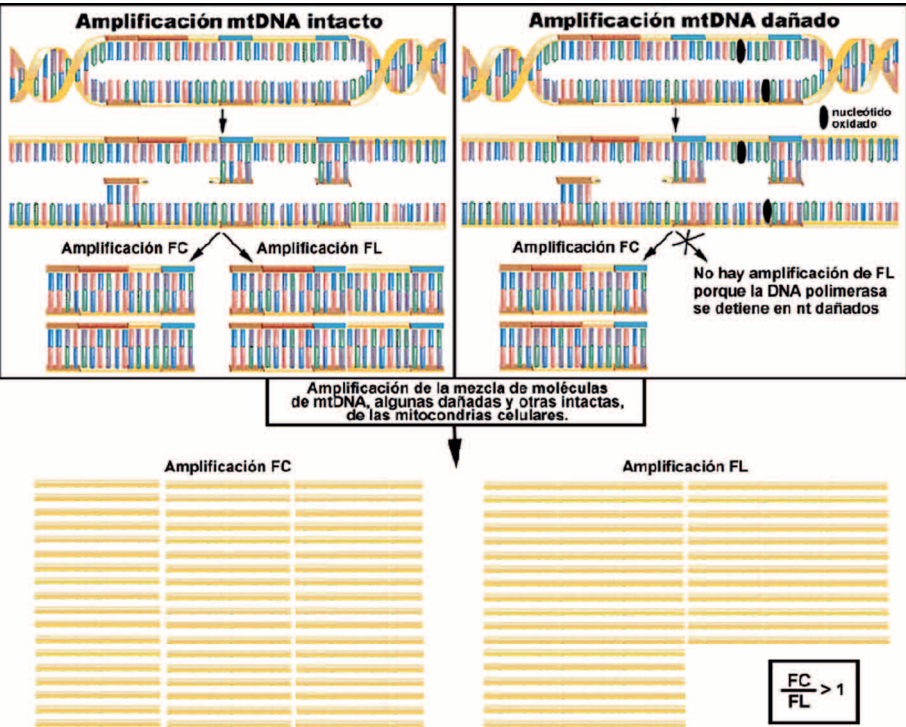
Figura 1. Esquema de PCR en tiempo real.



Determinación del Daño oxidativo mitocondrial por PCR a tiempo real en sangre

El fundamento del método está basado en el hecho conocido de que un nucleótido o región dañada en el DNA impide el progreso de la DNA polimerasa durante el proceso de alargamiento, dando lugar a una disminución en la formación del producto de PCR. Mediante el uso de PCR en tiempo real se puede determinar este daño que impide la amplificación, estimando cuantitativamente dos fragmentos de diferente tamaño localizados en la misma secuencia del DNA; cuanto mayor sea el daño mayor será el efecto de disminución de la amplificación en el fragmento mayor (FL) respecto del menor (FC).

Figura 2. Esquema de la determinación de daño oxidativo por PCR en tiempo real.



Teniendo en cuenta que se realiza la amplificación de dos fragmentos ubicados en la misma secuencia se escogió la técnica de SYBR Green (un intercalante de DNA) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), por

lo que la reacción de amplificación del FC y el FL tiene lugar en pocillos diferentes. En cada placa se prepara la recta estándar para el fragmento corto con sus blancos y muestras y la recta estándar del fragmento largo con sus blancos y muestras.

Para seleccionar la región de amplificación se pensó en una región del mtDNA con mayor variabilidad genética, por lo que se optó por la región D310 de la zona de la hipervariable II que contiene un poliC, para obtener dos fragmentos, uno corto de 80pb y otro largo de 162pb. Los cebadores utilizados fueron:

HVII_260-F (24pb)5'-GCCACTTTCCACACAGACATCATA-3'

HVII_339-R (21pb)5'-TGTTTAAGTGCTGTGGCCAGA-3'

HVII_421-R (24pb)5'-AGTGCATACCGCCAAAAGATAAAA-3'

Las condiciones de amplificación utilizadas para la reacción fueron: 2min-50°C, 10min-95°C, [15s-95°C, 1min-60°C]x 40ciclos, 20min-desde 60°C hasta 95°C (para realizar la curva de disociación).

Para la determinación del daño oxidativo se cuantificó el nº de copias amplificadas en las dos reacciones de amplificación (FC y FL) utilizando el método absoluto. Para ello se utilizó una curva estándar de nº de copias de DNA conocido. Se realizó una única curva estándar por tratarse ambas amplificaciones del mismo fragmento. El fragmento utilizado para la curva estándar fue de 870 pb desde la posición 16346 hasta la 645 del mtDNA, para ello se utilizaron los cebadores:

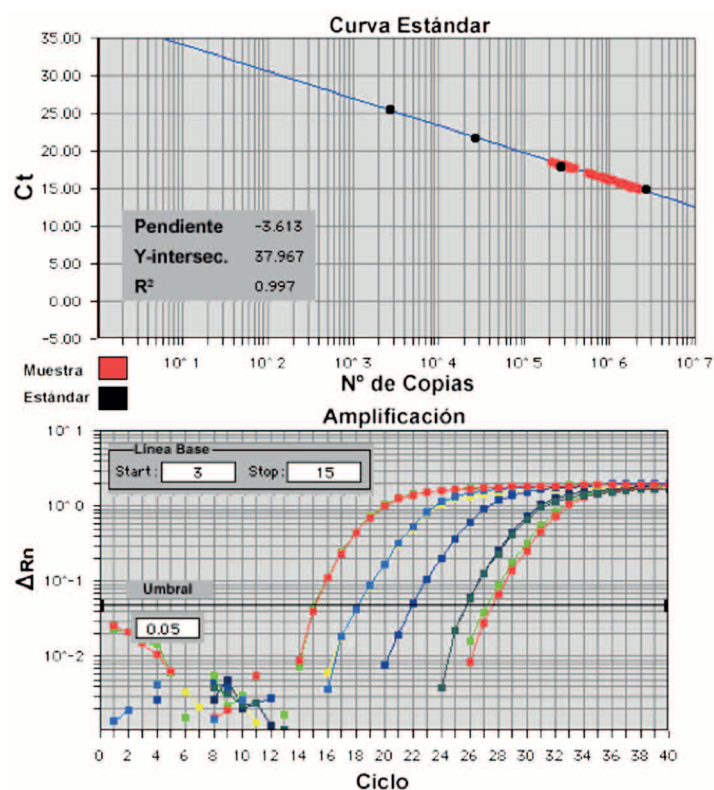
HmtL16365 (20pb)5'-GTCAAATCCCTTCTCGTCCC-3'

HmtH626 (20pb)5'-TTTATGGGGTGATGTGAGCC-3'

Se procedió a su purificación, cuantificación y cálculo de nº de copias al igual que para la cuantificación del nº de copias de mtDNA previamente descrito.

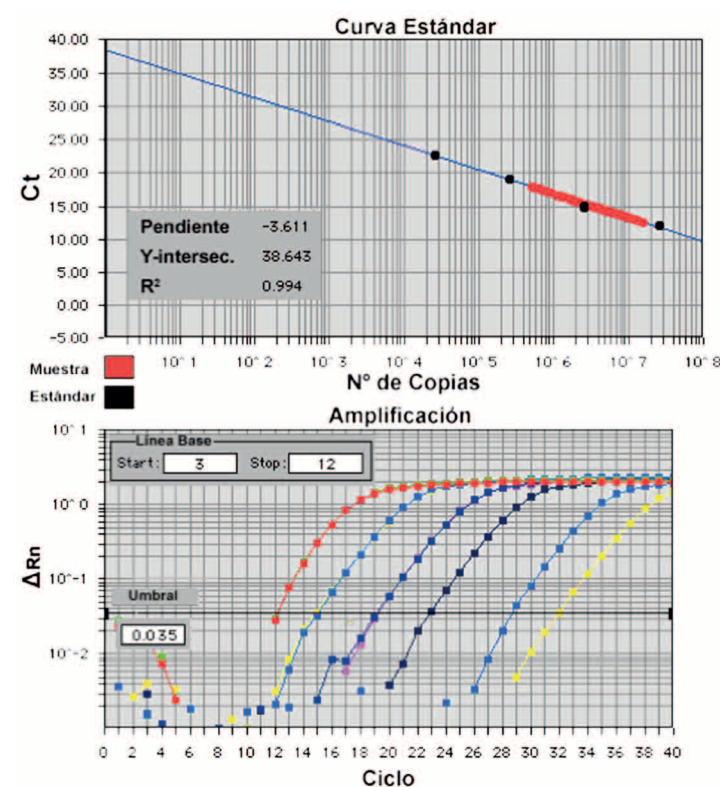
Una vez obtenido el nº de copias de DNA se preparó la curva estándar, en la que el primer punto contenía entorno a 107 nº de copias del fragmento mitocondrial, y 1,3 veces más de DNA total de rata que del fragmento de mtDNA para asemejar en mayor medida la complejidad del DNA total extraído de las muestras a analizar. Se optó por DNA total de rata por no interferir en la amplificación de los fragmentos de la curva estándar.

Figura 3. Representación gráfica de la curva estándar para el FC. Recta logarítmica (con una pendiente=-3,61 y $R^2=0,997$) y resultado de la reacción de amplificación de sus puntos y de los tubos sin DNA (Blancos) por duplicado.



La curva estándar se analizó para asegurar que los cebadores y los fragmentos amplificados utilizados eran cuantitativos. Y como se observa en las siguientes figuras 3 y 4 así es, ya que se obtiene una curva de calibrado con una pendiente entrono al 90% de eficiencia y con un coeficiente de regresión $>0,99$.

Figura 4. Representación gráfica de la curva estándar para el FL. Recta logarítmica (con una pen-diente =-3,61 y $R^2=0,994$) y resultado de la reacción de amplificación de sus puntos y de los NTCs por duplicado.

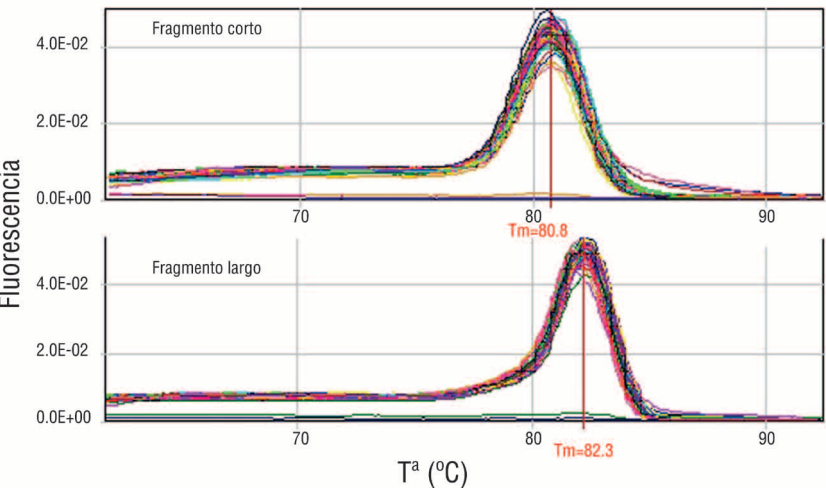


Además, al utilizar como fluoróforo SYBR Green (intercalante del DNA), fue necesario tener en cuenta la curva de disociación de los fragmentos amplificados en cada muestra para asegurar que el fragmento amplificado es el deseado. En ambos casos no aparecen inespecificidades de amplificación ni dímeros, teniendo el fragmento corto una T_m entorno a 80,8°C y el fragmento largo una T_m entorno a 82,3°C, como se observa en la Figura 5.

En cada placa de real-time PCR se pusieron por duplicado 4 diluciones seriadas; 1, 1/10, 1/100 y 1/1000 de la mezcla anteriormente descrita para preparar la curva estándar. Además en cada placa se incluyeron por duplicado dos tipos de blancos, como en el caso anteriormente descrito. Finalmente las muestras a analizar se pusieron por duplicado.

Una vez obtenidos los resultados del PCR en tiempo real e interpolados los Cts (del inglés Cycle Threshold, hace referencia al ciclo en el que la fluorescencia del amplificado sobrepasa el umbral mínimo requerido por la técnica) obtenidos de las muestras a analizar en la curva estándar (nº de copias vs. Ct) se obtuvo la relación: nºcopias FC/nºcopias FL.

Figura 5. Curvas de Disociación del amplificado de los Fragmentos Corto y Largo.



Determinación del contenido genómico de mtDNA por PCR a tiempo real en sangre

Se trata de una PCR cuantitativa, qPCR, Q-PCR (del inglés quantitative polymerase chain reaction) o PCR en tiempo real (del inglés real time PCR) es una variante de la PCR utilizada para amplificar y, simultáneamente, cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de DNA. Para ello se emplea la PCR en tiempo real descrita en apartados anteriores, pero en este caso particular, se compara la amplificación de un fragmento de mtDNA respecto a la amplificación de un gen nuclear de copia única. Se usan dos colorantes fluorescente diferentes: FAM para reconocer un fragmento de la región 12S rRNA del mtDNA (cebadores: 5'-CCACGGGAAACAGCAGTGATT-3'; 5'-CTATTGACTTGGGTAAATCGTGTGA-3' y sonda FAM: 5'-TGCCAGCCACCGCG-3') y VIC para reconocer la PDARs RNaseP del DNA nuclear. En este caso se usa un kit comercial de Applied Biosystems, Foster City, CA, USA. Condiciones de PCR: 2 min-50°C; 10 min-95°C; [15s-95°C, 1min-60°C] x 40 ciclos.

Para cuantificar el contenido de mtDNA se hicieron dos curvas standard, una para mtDNA (1.278 pb) en la región del 12S rRNA (cebadores: 5'-TGTTTAAGACGGGCTCACATC-3' y 5'-CTTTGGCTCTCCTTGCAAAGT-3') y otra para el DNA nuclear (nDNA) en el gen de la RNaseP (430 pb) (cebadores: 5'-GTATGAGACCACTCTTTCCC-3' y 5'-GATTATAGGCGTGAACCACC-3'). Condiciones de amplificación: 10min-95°C, [45s-95°C, 45s-60°C, 2min-72°C] x 35 ciclos, 10min-72°C.

En ambos casos, los productos de PCR, una vez purificados, fueron cuantificados en el nanodrop. El nº de copias de cada fragmento se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{x \text{ ng/}\mu\text{l} \cdot 10^3 \text{ pg/ng}}{660 \text{ pg} / \text{pmol}} \cdot 6,023 \cdot 10^{23} \text{ moléculas} / \text{mol} \cdot 10^{-12} \text{ mol} / \text{pmol} = \text{nº de copias}$$

Después de calcular el nº de copias de ambos fragmentos se hizo la curva standard con diez diluciones seriadas a partir de 10⁷ nº de copias del fragmento mitocondrial, 105 nº de copias del fragmento nuclear y 1,3 x 10⁷ nº de copias de mtDNA de rata (para simular condiciones fisiológicas). Para considerar válidos los experimentos, la pendiente de la curva standard de Cts debe estar entre -3 y -4, con un coeficiente de regresión >0,99. Además la desviación standard de los triplicados debe ser <0,30.

Realizada la curva standard se interpolaron los valores de Cts de las muestras problema para determinar la ratio nº de copias mtDNA/nº de copias nDNA.

Cuantificación de mtDNA mediante Hibridación por Southern Blot

Para cuantificar el DNA y comprobar la validez del método de PCR a tiempo real también se utilizó la siguiente técnica:

- Técnica de Slot-Blot

Se trataron 0,5 µg de cada muestra con NaOH 0,5 M durante toda la noche a 37°C, con el fin de desnaturalizar el DNA y eliminar el RNA.

Al día siguiente, se llevó a cabo la transferencia de las muestras de DNA a una membrana de nitrocelulosa mediante vacío, utilizando un aparato de Slot-Blot.

Las membranas fueron lavadas dos veces con 2 x SSC (Standard Sodium Citrato: NaCl 0,15 M, citratotrisódico 0,015 M). Posteriormente se fijó el DNA sobre la membrana mediante crosslinking con luz UV, aplicando una energía de 2000 x 100 µJ/cm2. Con este proceso se consigue que las moléculas de ácido nucleico y las moléculas de la membrana formen enlaces covalentes.

· Obtención de las sondas

Las sondas para la determinación del DNA nuclear y mitocondrial se obtuvieron amplificando por PCR un fragmento de la zona que interesaba de cada genoma:

- Fragmento nuclear: Tamaño 442 pb del gen nuclear del rRNA 18S.
- Fragmento mitocondrial: Tamaño 274 pb en la posición 1621-1894 del mtDNA.

Los productos de PCR usados como sondas en las hibridaciones de Southern-Blot se purificaron en gel de agarosa de 2% en TAE 1X y se eluyeron según el protocolo del kit “GenElute Agarose Spin Column” (SIGMA).

· Marcaje de las sondas con isótopo radiactivo

El marcaje radiactivo se realizó con el kit comercial High Prime (Roche) basado en el método de marcaje de DNA por “Random Primer”. La disolución del kit contenía todo lo necesario para llevar a cabo la reacción, excepto el fragmento molde de DNA y el desoxinucleótido dCTP marcado con 32P.

· Hibridación y lavado

Las membranas que contenían el DNA transferido y fijado se prehibridaron durante 3-5 h con 20 ml de solución de prehibridación con objeto de bloquear las cargas positivas que podrían interferir con la hibridación.

Después se añadió la sonda radiactiva recién desnaturalizada (hervida durante 10 minutos y colocada rápidamente en hielo).

La hibridación se llevó a cabo durante toda la noche, en el horno con rueda giratoria a 68 °C.

Una vez hibridadas, se procedió a realizar los sucesivos lavados de las membranas con la disolución de lavado (SSC 2x con SDS 0,2%) previamente calentada a 68°C.

· Revelado y medición

Tras los lavados, las membranas se colocaron en una cassette y se expusieron a placas autorradiográficas, a -80° C (con pantalla intensificadora) durante el tiempo necesario hasta que fueron reveladas y posteriormente densitometradas las bandas correspondientes al DNA nuclear y al mitocondrial.

Análisis genético de genes nucleares

A. Polimorfismos de PON1 en secuencia codificante (55 y 192) y en el promotor (-108 y -162).

Las amplificaciones por PCR se realizaron en un volumen final de 50 µl, con 500 ng de DNA y a una concentración de 25 µM de cada oligonucleótido, 10 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl2, 10X de tampón comercial de la Taq polimerasa y 1 U/µl de Taq polimerasa.

Tabla 1. Oligonucleótidos y condiciones de amplificación de las PCRs utilizados para cada alelo del gen PON1. (*Pb: pares de bases).

Nombre	Cebadores	Condiciones de PCR	Pb*
PON_55F	5'-GAAGAGTGTATAGCCCCAG-3'	46 x (1' 94°C – 30" 61°C - 1' 72°C)	170
PON_55R	5'-TTTAATCCAGAGCTAATGAAAGCC-3'		
PON_192F	5'-TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG-3'	46 x (1' 94°C – 30" 61°C - 1' 72°C)	99
PON_192R	5'-CACGCTAAACCCAAATACATCTC-3'		

La digestión enzimática se realizó tomando 8 µl de producto amplificado y añadiendo 1 µl de enzima comercial (5 U/µl) en un volumen final de 10 µl. El tiempo de incubación fue de 10 h. El tampón y la temperatura de incubación fueron las especificadas por el fabricante.

Para la visualización de los fragmentos de restricción de tamaños pequeños, característicos de los polimorfismos de PON1, se utilizaron geles con el 2% de agarosa con una concentración de 0,5 ng/ml de bromuro de etidio (intercalante del DNA). La electroforesis se realizó en tampón TAE 1x (40 mM Tris pH 8, ácido acético glacial (0.11%) y 0.4 mM Na2EDTA) en un campo eléctrico de 100 V durante el tiempo necesario para que las bandas se separasen bien. Como marcador de pesos moleculares se utilizó 5 µl del patrón de 1kb de Ecogen en concentración 0,1 mg/ml. De las muestras también se cargaron 5µl.

Tabla 2. Cortes, en nº de pares de bases, generados por las enzimas de restricción para cada alelo del gen PON1.

Polimorfismo	Enzima de restricción	Corte	Alelo
L55M	NlaIII	170 126 / 44	L M
Q192R	AlwI	99 66 / 33	Q R

Para secuenciar el promotor de PON1 se amplificaron las primeras 209 pares de bases anteriores a la región codificante del gen PON1. El genotipado de los polimorfismos del promotor de PON1 (PON1-PrT-108C and G-162A) fue realizado mediante la amplificación por PCR del fragmento, seguida del análisis de secuencia del producto amplificado.

Los cebadores fueron diseñados usando el gen PON1 humano (Accession nº AF051133): PR-PON1_FOR (20bp) 5'-GTGCTGAGCTCCTGCGGTGG-3' y PR-PON1_REV (20bp) 5'-AGCTTCGCCATGGTCGGGGA-3'.

La reacción se realizó en un volumen total de 50 µl conteniendo: 0.5 µg DNA, 2 µl dNTPs (1 mM), 0.5 µl de cada cebador (25 µM), 1 U Taq polymerasa, 5 µl de 10x Taq tampón, 0.5 µl de 7-deaza (10mM), 2.5 µl DMSO (100%) y H₂O destilada hasta 50 µl. El programa de amplificación utilizado fue 95°C/5 min seguido de 35 cycles 94°C/30s, 65°C/30s, 72°C/30s y finalmente 72°C/5min de extensión.

El servicio de secuenciación utilizado fue SECUGEN S.L. del Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid. Una vez obtenida la secuencia de cada individuo se comparó con la secuencia de referencia correspondiente del genoma humano mediante el software FinchTV 1.4.0, Geospiza Inc. 2004-2006.

B. Polimorfismo rs4880 C/T de la enzima antioxidante superóxido dismutasa tipo2 (MnSOD).

Como la técnica utilizada, PCR a tiempo real, ha sido descrita con detalle en el apartado de análisis genético mitocondrial sólo se describen las condiciones particulares para el estudio de este polimorfismo.

En el caso de esta determinación genética, cada uno de los dos alelos correspondientes a este polimorfismo nuclear se utilizó el kit Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems) que contenía todos los reactivos necesarios para el análisis y los siguientes cebadores adquiridos en Applied Biosystems (UK):

5' - GGCTGTGCTTTCTCGTCTTCA-3' (directo)
5' -TCTGCCTGGAGCCCAGATAC-3' (reverso)

El DNA fue amplificado en un volumen total de 10 µl que contenían 5 µl Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems), 900 nM de cada cebador, 200 nM de cada sonda y 10 ng del DNA patrón. Se utilizaron las condiciones que indicaba la casa comercial. Los resultados de la PCR a tiempo real se analizaron con el Sequence Detector software versión 1.7 (Applied Biosystems).

Estudio de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria

Para estudiar los complejos de la cadena respiratoria fue necesario utilizar las siguientes técnicas analíticas:

- Obtención de homogenizados y “aislamiento” de los complejos mitocondriales a partir de biopsias de músculo esquelético

En la preparación de homogenizados tisulares se pesó la cantidad de tejido de partida y se añadió medio de homogenización (440 mM sacarosa, 20 mM MOPS, 1mM AEBSF,

pH = 7,2) en proporción relativa 12,5 ml/g. La mezcla se trató en un homogeneizador BOSCH hasta lograr su disolución.

El homogenado obtenido se centrifugó para eliminar el sobrenadante y el precipitado fue guardado durante toda la noche a -80°C para favorecer la rotura de las membranas.

Al día siguiente, este precipitado se resuspendió en el medio de lisis (50 mM NaCl, 5 mM ácido 6-aminocaproico, 50 mM imidazol, 1 mM AEBSF) en una proporción de 2 ml/g y se añadió dodecil maltósido (DDM) al 10%, incubándose la mezcla durante 10 minutos en hielo y a continuación se centrifugó a 4°C. El sobrenadante fue recogido y se utilizó posteriormente para la técnica de Blue-Native.

· Determinación de la concentración proteica por Bradford

La cuantificación de las proteínas se llevó a cabo por el método Bradford, con el reactivo comercial de Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay). La curva de calibrado se construyó con 6 estándares que tenían de 1 a 20 µg/ml de seroalbúmina bovina (BSA). Las muestras se midieron por triplicado en tubos individuales. Tanto las muestras, como los controles internos y dos blancos, se llevaron hasta un volumen final de 800 µl. A todos se les añadieron 200 µl del reactivo concentrado. Se dejó desarrollar el color durante un tiempo de 30 minutos y, finalmente, se procedió a la lectura espectrofotométrica con una longitud de onda de 595 nm. Con los controles internos, se obtuvo una recta de calibrado que nos permitiría, por interpolación de los datos de absorbancia obtenidos, calcular la concentración de proteína de las muestras analizadas.

· Medida de la actividad del complejo IV (citocromo c oxidasa, COX) por espectrofotometría

La actividad del complejo IV (COX) se llevó a cabo en el espectrofotómetro termostatzado a 38°C, en cubetas de plástico a una longitud de onda de 550 nm y en un volumen final de 1 ml.

Se midió el descenso de la absorbancia a 550 nm debido a la oxidación del citocromo c por parte del complejo IV. Las

medidas se llevaron a cabo durante 2 minutos y comprobándose que había inhibición total de la reacción al añadir KCN.

En cada medida se añadió a la cubeta de reacción:

- 790 µl de agua destilada
- 100 µl de tampón KP 100 mM (Tampón fosfato potásico 100 mM a pH 7)
- 10 µl de homogenado del músculo esquelético
- 100 µl de citocromo c (al 1% en tampón KP, tampón fosfato potásico, 10 mM a pH 7) reducido con BH₄Na.

· Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida (Blue Native-PAGE)

Este tipo de geles, descrito por primera vez por Schagger y von Jagow en 1991 (Schagger and von Jagow 1991), permite la resolución electroforética de complejos proteicos integrados por más de una proteína en los que éstas permanecen unidas. Esta metodología puesta a punto para los complejos que integran la función OXPHOS (Schagger, Bentlage et al. 1996), resulta de enorme utilidad en el campo de nuestras investigaciones.

Estos geles de poliacrilamida no desnaturalizantes Blue Native deben tener un un gradiente lineal del 5% al 13%, donde se van a resolver las muestras, que debe prepararse con antelación utilizando un formador de gradientes de metacrilato conectado a una bomba peristáltica de una sola vía que bombea la disolución al espacio que queda entre los cristales en el soporte apropiado.

Una vez polimerizado este gel, conservándose a 4°C durante toda la noche, se prepara el gel de apilamiento al 4% y se introduce el peine formador de pocillos, dejándolo polimerizar.

La electroforesis se llevó a cabo en frío, con lo cual se montó el gel y se añadieron los tampones del cátodo A y del ánodo. Se aplicaron cantidades equivalentes de cada muestra preparadas para este tipo de geles (entre 100-180 µg de proteína total).

Terminada la electroforesis, el gel o bien se tiñó para ver los diferentes complejos respiratorios o bien fue utilizado para

la determinación de la actividad de diferentes complejos de la cadena respiratoria.

· Tinción de proteínas en los geles

Dependiendo de la concentración de la proteína en el gel se utiliza una u otra metodología:

- Si la concentración de proteínas es elevada, se tiñe con Azul de Coomassie. Incubándose el gel durante 1 h en EZBlue™ Gel Staining Reagent (SIGMA) y se dejándolo durante toda una noche en agua para potenciar la señal.
- Si la concentración de proteína es demasiado baja, se utiliza la tinción de plata, que es más sensible (ProteoSilver™ Silver Stain Kit d SIGMA).

· Determinación de la actividad enzimática de los complejos respiratorios “in gel”.

Para realizar las medidas de actividad “in situ” o “in gel” fue necesario aplicar las muestras en una electroforesis Blue-Native. Cuando concluyó la electroforesis se recortaron las calles para ensayar sobre ellas las actividades específicas de cada complejo. Se conocen los protocolos para la medida de actividad del complejo I, II, IV y V (Appleby, Porteous et al. 1999; Jung, Higgins et al. 2000; Van Coster, Smet et al. 2001).

- Determinación de la actividad del Complejo I

Las muestras de un mismo individuo se corrieron en un mismo gel, y tras la electroforesis se incubaron en una cubeta con una disolución que contenía los reactivos necesarios para medir el complejo I (NADH 0,1mg/ml y NBT 2,5 mg/ml).

La reacción se llevó a cabo en un balancín y protegida de la luz, ya que el NBT es fotosensible, durante 3-5 horas (al cabo del tiempo se observaba si aparecía señal o no).

Se retiró la disolución y se paró la reacción con metanol/acético, 45/10% en agua destilada. La disolución de parada y fijación se cambió varias veces para arrastrar uniones inespecíficas.

El gel al día siguiente se escaneó y se secó mediante el sistema de “Gel Drying Frames” (Sigma-Aldrich).

Estudios previos pusieron de manifiesto que la señal era proporcional a la cantidad de proteína cargada, resolviendo que la cantidad óptima para detectar el complejo I es de 100 µg de proteína total.

- Determinación de la actividad del Complejo V

Las muestras de un mismo individuo se corrieron en un mismo gel, y tras la electroforesis se incubaron en una cubeta con una disolución que contenía los reactivos necesarios para medir el complejo V (ATP 8 mM y nitrato de plomo al 0,2%).

La reacción se llevó a cabo en un balancín, durante 3-5 horas (al cabo del tiempo se observaba si aparecía señal o no).

Se retiró la disolución y se paró la reacción agua destilada libre de fosfatos. La disolución de parada y fijación se cambió varias veces para arrastrar uniones inespecíficas.

El gel al día siguiente se escaneó y se secó mediante el sistema de “Gel Drying Frames” (Sigma-Aldrich).

Estudios previos pusieron de manifiesto que la señal era proporcional a la cantidad de proteína cargada, resolviendo que la cantidad óptima para detectar el complejo V es de 160-180 µg de proteína total.

ANEXO III RESULTADOS

Contenido extractado del apartado de Resultados de la tesis de la Dra. Ana Marcuello López.

A partir de los resultados obtenidos en el estudio del contenido del mtDNA en músculo esquelético a lo largo de una prueba de ejercicio físico, se planteó estudiar el posible efecto de la práctica deportiva en la actividad y en el ensamblaje de los diferentes complejos de la cadena respiratoria de la mitocondria. En concreto, por motivos de cantidad de muestra del músculo, el estudio se realizó tan solo en el ejercicio, anteriormente descrito, de intensidad moderada, prolongado y fatigante y en el proceso de recuperación de éste.

El estudio se centró en la actividad de los complejos I y IV de la cadena respiratoria, ya que en éstos era donde se había encontrado diferencias entre las distintas variantes genéticas mitocondriales, en trabajos previos realizados por nuestro grupo.

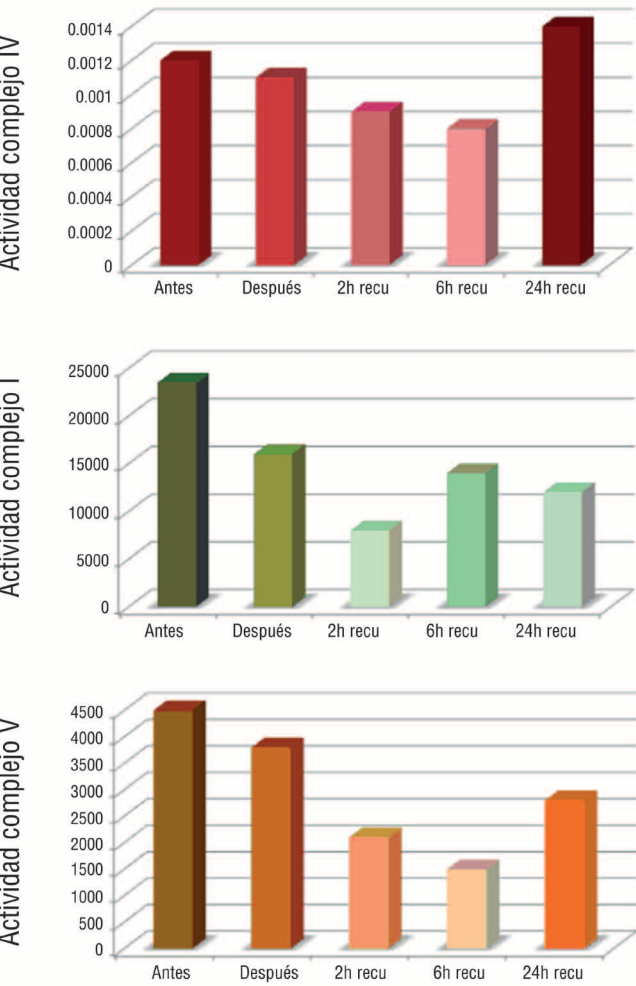
En el caso del complejo IV, se determinó su actividad por espectrofotometría, mientras que en el caso del complejo I debido a la gran cantidad de proteína necesaria para este método y la escasa disponibilidad de muestra, se optó por determinarlo por actividad en gel. Además también se determinó la actividad del complejo V y el ensamblaje de los complejos III y V. Todos ellos relativizados por la cantidad de proteína total.

Actividad de los complejos I, IV y V

Cuando se realizó el estudio de la actividad en gel de los diferentes complejos de la cadena respiratoria a lo largo de la prueba física se obtuvo, que tanto el complejo I como el V, presentaban el mismo perfil, el cual era muy parecido al obtenido por el complejo IV medido espectrofotométricamente (Ver gráfica 1) y similar al encontrado al estudiar la evolución del contenido del mtDNA a lo largo de esta misma prueba (Ver Gráfica 14).

Además, la actividad de los complejos caía al finalizar la prueba y continuaba disminuyendo a lo largo del proceso de recuperación. Sin embargo, a las 24 horas se iniciaba un aumento hacia los niveles iniciales.

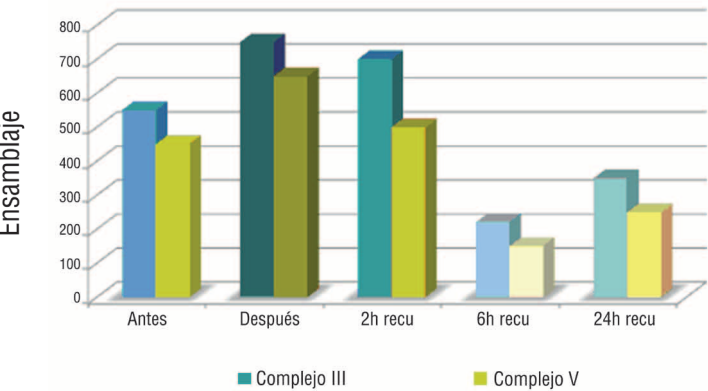
El análisis estadístico mostró que en el caso del complejo I había una caída significativa a las dos horas de haber finalizado la prueba (Test Fisher $p=0,0407$, Test Anova pareados $p=0,0984$), al igual que en el complejo IV (Test Anova pareados $p=0,0261$). En el caso del complejo V también se observó esta caída a las dos horas (Test Fisher $p=0,0323$, Test Anova p pareados $p=0,0647$), pero fue aún mayor a las seis horas de recuperación (Test Fisher $p=0,0116$, Test Anova pareados $p=0,0419$).



Gráfica 1a. Efecto del ejercicio físico prolongado de intensidad moderada y fatigante sobre la actividad de los complejos IV, I y V

Ensamblaje de los complejos III y V

Al analizar el ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria pudimos observar que el comportamiento del ensamblaje de los diferentes complejos es idéntico a lo largo de la prueba del ejercicio físico y en cada estado correlacionan positivamente los ensamblajes de los complejos III y V, poniendo de manifiesto que la cadena respiratoria tiene un comportamiento similar a lo largo de la prueba y del proceso de recuperación. (Ver Gráfica 16).



Gráfica 2a. Efecto del ejercicio físico prolongado de intensidad moderada y fatigante sobre el ensamblaje de los complejos III y V.

Como conclusión, puede afirmarse que tras la realización de una prueba física de intensidad moderada prolongada y fatigante existe una caída de la actividad enzimática de los diferentes complejos de la cadena respiratoria y que continúa a lo largo del proceso de recuperación.

Por otro lado, a consecuencia de la realización del ejercicio existe un aumento coordinado del ensamblaje de los diferentes complejos.

Además hay que destacar que la situación inicial de cada individuo era determinante para la evolución del ensamblaje de los complejos y de su actividad.



PRESIDENCIA
DEL GOBIERNO



Consejo
Superior de
Deportes