

## MITOCONDRIAS, ENVEJECIMIENTO, MÚSCULO Y EJERCICIO

### MITOCHONDRIAS, AGEING, MUSCLE AND EXERCISE

La principal función de las mitocondrias es la de producir energía a través de la formación de la adenosina trifosfato o ATP, con la colaboración del oxígeno. Pero además, también intervienen en la muerte celular programada (apoptosis) y en el envejecimiento. Los últimos se hallan relacionados con la fosforilación oxidativa y por tanto, con el estrés originado por los radicales libres (RL) o especies oxígeno-reativas (EOR). A pesar de que en el proceso respiratorio la producción de RL es escasa, y de que su actividad se ve disminuida por la acción de las enzimas antioxidantes endógenas: la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), no obstante, los RL originan graves alteraciones en los componentes de las células y especialmente en el DNA de la mitocondria y el núcleo. Hace más de 20 años que Miquel y sus colaboradores describieron la acción de los RL sobre la mitocondria para producir el envejecimiento, hecho aceptado por el mundo científico actual.

En este trabajo se realiza un detenido estudio sobre la forma en que actúan los RL en las mitocondrias y la función que el ejercicio realiza en prevenir y atenuar sus efectos en el envejecimiento.

#### 1.- ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LAS MITOCONDRIAS

Las mitocondrias no son otra cosa que unos organelos distribuidos por el citoplasma de las células, de cuyo contenido se aíslan mediante una membrana de dos capas constituidas por lípidos y proteínas. Estas últimas están codificadas por dos tipos distintos de genes: los ubicados en el núcleo de la célula, y los albergados en la propia mitocondria. Aunque las

proteínas derivadas del DNA mitocondrial son mucho menos numerosas que las de procedencia nuclear, sin embargo, su actividad es de gran importancia para la función de la cadena respiratoria.

Entre las funciones de las mitocondrias se encuentran 1º.- La oxidación de los ácidos grasos y el piruvato, hechos que se producen en el interior de la matriz. 2º.- La transferencia de electrones desde los portadores solubles al sistema de la membrana interna. 3º.- El control de la apoptosis o muerte celular programada.

A partir de su localización en la membrana interna los protones abandonan la mitocondria, con el fin de crear el gradiente electroquímico necesario para la síntesis del ATP. Con el objeto de cumplir sus funciones satisfactoriamente la mitocondria posee en su membrana interna la denominada cadena para el transporte de electrones, constituida por 5 complejos de multiproteínas, el coenzima Q y el citocromo c, todos ellos laxamente unidos a la membrana. Los electrones penetran en la cadena desde el NADH (nicotinamida, adenina, dinucleótido reducido) o desde el FADH<sub>2</sub> (flavina, adenina dinucleótido reducido) en la matriz, y de aquí son transferidos al oxígeno molecular para formar agua.

Para desarrollar estas funciones, la mitocondria posee genes específicos en cuyo DNA se halla depositada la información que permite la síntesis de 37 moléculas indispensables para producir la energía que las células del organismo necesitan. En las mitocondrias se produce el 90% de dicha energía <sup>(63)</sup>.

Los genes, en cuyo seno se ubican 16.569 pares de bases en cada lazo del DNA (ácido deoxirribonucleico) se heredan únicamente de la madre, a través

**Dr. J. F. Marcos Becerro** <sup>(1)</sup>

**Prof. Dr. Jaime Miquel** <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Presidente del Instituto Español de Longevidad y Salud.

Vicepresidente de FEMEDE.

<sup>(2)</sup> Vicepresidente del Instituto Español de Longevidad y Salud. Profesor del Departamento de Biotecnología de la Universidad de Alicante.

#### CORRESPONDENCIA:

J.F. Marcos Becerro. Arturo Soria, 262. 28033 Madrid.

Acceptado:  
10.01.02

de las mitocondrias contenidas en el óvulo, ya que los espermatozoides carecen de estos organelos.

Las mitocondrias son los únicos organelos conocidos que poseen genes independientes de los existentes en el núcleo, y por lo tanto, contienen un DNA distinto. El DNA mitocondrial (mtDNA) se encuentra ubicado muy cerca de la membrana interna de la mitocondria, lugar en el que se lleva a cabo la fosforilación oxidativa y donde se originan los radicales libres de oxígeno (RLO)<sup>(57)</sup>. Posee una longitud de 16 kb y contiene unos 16.500 pares de bases, y los genes que codifican 13 subunidades de proteínas involucradas en el funcionamiento de la cadena respiratoria y en la fosforilación oxidativa. Por término medio, en cada mitocondria existen 5 unidades de mtADN<sup>(56)</sup>. Del mismo modo, existen RNAs (ácido ribonucleico) específicos de la mitocondria: 22 RNAs de transferencia y 2 RNAs ribosómicos, cuya misión consiste exclusivamente en sintetizar proteínas mitocondriales<sup>(32)</sup>.

Sin embargo, la mayor parte de las proteínas albergadas en las mitocondrias se sintetizan fuera de ellas, en el citosol, y están codificadas por el DNA del núcleo, aunque posteriormente se incorporan al interior de las mitocondrias donde se ensamblan y ejercen su función. Así pues, el mantenimiento y la función mitocondrial depende de dos genomas distintos, aunque el que ejerce la dirección es el nuclear.

La vida y la función de las proteínas la definen dos acontecimientos: la síntesis y la degradación. De ellos dependen su abundancia y funcionamiento. En el músculo, el predominio de la síntesis sobre la degradación produce hipertrofia muscular, y lo contrario conduce a la atrofia o sarcopenia.

### 1.1.-La respiración celular como proceso exergónico y exotérmico en la producción del ATP. El Ciclo de Krebs.

En la naturaleza existen dos ciclos bioenergéticos: la fotosíntesis en el interior de las células vegetales, y la respiración en las animales. La primera es un proceso endergónico y endotérmico, es decir, necesita consumir energía sin producir calor. La segunda produce energía y calor<sup>(68)</sup>.

El ciclo de Krebs es un proceso metabólico ubicado en las mitocondrias, cuya función consiste en metabolizar, con el concurso del oxígeno, la glucosa (en la segunda etapa de su metabolismo), los ácidos grasos, y en ciertas ocasiones los aminoácidos. El proceso se inicia con la unión de la acetilcoenzima A al ácido oxalacético, para dar lugar a la aparición del ácido cítrico y después, a través de una serie de reacciones en cadena en:

a.cítrico → a.cis-aconítico → a.isocítrico →  
a. Cetoglutarico → a. succínico → a.fumárico →  
a.málico. → a. Oxalacético,

las que se producen 2 moles de ATP, la glucosa se convierte en dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y agua (H<sub>2</sub>O).

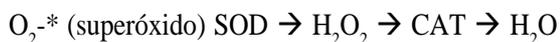
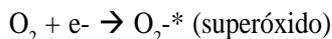
El proceso más importante en la formación de ATP tiene lugar en las mitocondrias, en el que por la oxidación de los ácidos grasos se producen 463 moles de dicho cuerpo.

Otro proceso que interviene en la producción del ATP es la fosforilación oxidativa. En él, la formación del ATP se produce durante la transferencia de electrones desde el NADH, y el FADH<sub>2</sub> al O<sub>2</sub>. En este caso, el O<sub>2</sub> actúa como aceptor de electrones y forma agua con el hidrógeno (H). La fosforilación oxidativa produce 34 moles de ATP.

### 1.2.-Los radicales libres de oxígeno.

Los radicales libres constituyen un grupo de sustancias químicas cuyo hecho diferencial consiste en tener un electrón único en su órbita externa, lo que les confiere gran inestabilidad, además de crear un campo magnético dotado de capacidad para modificar las reacciones en las que intervienen. Su abundancia en la naturaleza es considerable, pero aquí sólo nos interesan los relacionados con el oxígeno (O<sub>2</sub>) y las especies oxígeno reactivas (EOR). Durante el metabolismo de los carbohidratos y las grasas se origina un considerable número de iones de hidrógeno y electrones, los cuales se combinan con el oxígeno, con el fin de producir la energía para sintetizar el ATP. A este proceso se le denomina fosforilación oxidativa y se lleva a cabo a través de la cadena de electrones.

La oxidación se puede realizar por la adición de  $O_2$ , por la eliminación del hidrógeno (H), o por la transferencia de electrones. Este último es el mayor productor de radicales libres. En los procesos en los que interviene el  $O_2$ , el producto final suele ser el agua, pero en el 4 o el 5% de ellos se originan los superóxidos, cuerpos químicos muy agresivos para las estructuras celulares, pero que gracias a la acción de una enzima presente en estas localizaciones, la superóxido dismutasa (SOD), el superóxido se transforma en  $O_2$  y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), cuerpo que finalmente se convierte en agua por intermedio de otra enzima conocida como catalasa (CAT).



Cuando  $H_2O_2$  se une al hierro ( $Fe^{++}$ ), en vez de producir una molécula de agua, origina un hidroxilo (OH), radical dotado de gran capacidad para producir alteraciones tóxicas.

El  $Fe^{++}$ , además de favorecer la aparición de los hidroxilos, suele penetrar en el interior de la membrana celular y neutralizar la vitamina C, lo que puede iniciar la peroxidación <sup>(29)</sup>.

Con el fin de realizar su cometido de la mejor manera, los radicales libres tratan de transformarse en cuerpos más estables, ya sea por la adquisición de un segundo electrón o por la eliminación del solitario. Este proceso solamente se interrumpe por la acción de los antioxidantes, cuerpos capaces de transferir a otras sustancias el hidrógeno que contienen, pero conservando su estabilidad. Las vitaminas C y E, por su contenido en iones SH y OH poseen una intensa propiedad antioxidante.

Además de los antioxidantes mencionados, en el organismo existen otra serie de cuerpos dotados de poder para neutralizar los radicales libres. En la literatura americana se les conoce como "scavengers" o recogedores de basura. Los betacarotenos, los ácidos grasos, los azúcares, algunos aminoácidos, el alfa tocoferol, el ascorbato, el glutatión reducido y la ubiquinona o coenzima Q10, son los mejor conocidos.

La actuación de los radicales libres sobre las células, además de causar la peroxidación de los lípidos contenidos en sus membranas <sup>(17)</sup>, es capaz de alterar la estructura de las proteínas y de originar la excisión del DNA, modificaciones que pueden conducir a graves problemas de salud, como las alteraciones del sistema inmunitario, la aterosclerosis, el cáncer, o acelerar el proceso de envejecimiento <sup>(20)</sup>.

A las acciones originadas por los radicales libres sobre el organismo se las denomina estrés oxidativo, y se reserva el término envejecimiento para los efectos producidos en las células y los sistemas fisiológicos.

## 2.- LAS MITOCONDRIAS Y EL ENVEJECIMIENTO DEL MÚSCULO

Como se ha señalado, la principal función de las mitocondrias es la de producir energía a través de la formación de la adenosina trifosfato o ATP con la colaboración del oxígeno. Pero además, estos organelos participan en dos procesos tan importantes como la muerte celular apoptótica y el envejecimiento, ambos de hallan relacionados con la fosforilación oxidativa y por tanto, con el estrés originado por las especies oxígeno-reativas (EOR), lo que les responsabiliza, al menos en parte, de la aparición de ciertas enfermedades humanas, como son las degenerativas neuromusculares y las producidas por la isquemia-reperusión <sup>(18)</sup>.

El proceso donador de energía es absolutamente indispensable para el mantenimiento de la vida, pero su existencia va unida a la formación de radicales libres de oxígeno, que aunque su producción es escasa y su actividad se ve disminuida por la acción de los antioxidantes endógenos o exógenos, sin embargo, son capaces de producir graves perturbaciones en los materiales que constituyen las células, como los carbohidratos (CH), los lípidos (Li) y las proteínas, y lo que es más importante, en el DNA, tanto en el del núcleo como en el de las mitocondrias, y especialmente en el de estas últimas, ya que por su cercanía al lugar de producción de los RLO y por la carencia de elementos protectores como las histonas, es mucho más susceptible a sufrir delecciones y mutaciones que pueden afectar a la función y a la duración de la vida de las células. A pesar de que se había dicho

que el DNA mitocondrial (mtDNA) no poseía una maquinaria específica (enzimas) para la reparación del daño originado por el estrés oxidativo, los trabajos modernos han desmentido dicha aseveración, aunque en el momento actual desconocemos el grado de efectividad reparadora de las enzimas descubiertas.

Así pues, las alteraciones originadas sobre el DNA mitocondrial dan lugar a mutaciones del mismo, responsables, en última instancia, del descenso en la producción de energía y de la afectación de las funciones celulares causantes del envejecimiento.

Cuando las modificaciones del DNA originadas por las EOR se acompañan de las mutaciones del DNA familiar transmitido por la herencia, el individuo que las sufre padece de forma anticipada los problemas del envejecimiento y los originados por las comorbilidades, o enfermedades acompañantes <sup>(63)</sup>.

A pesar de que todos los órganos del cuerpo utilizan el oxígeno y la energía para su funcionamiento, son, los constituidos por células que carecen de la facultad de dividirse (amitóticas) como el cerebro, los nervios periféricos y el músculo, los más necesitados de ellos, y especialmente el último, ya que el 40% del peso total del cuerpo de un individuo adulto, corresponde al sistema muscular.

Dado que las alteraciones mitocondriales originadas por los radicales libres constituyen un elemento esencial en la patogenia del envejecimiento (teoría mitocondrial del envejecimiento) y como quiera que los órganos más afectados por el estrés oxidativo son los postmitóticos, no puede extrañarnos que, el sistema muscular esté siendo uno de los más estudiados por los investigadores y clínicos.

Como es bien sabido, el envejecimiento se acompaña de alteraciones muy ostentosas en el sistema muscular, una de las cuales, la atrofia o sarcopenia es la responsable de un gran número de problemas que hacen muy difícil la vida de los ancianos, y que en ocasiones termina con ella.

La principal característica de la sarcopenia es la disminución de la masa muscular y la consiguiente pérdida de fuerza, lo que inexorablemente acarrea déficits funcionales, de manera que cada vez las

personas mayores son más reacias a realizar movimientos complejos, desplazamientos de mayor o menor duración y elevación de cargas, aunque éstas no sean excesivamente pesadas. La consecuencia inmediata es el sedentarismo y después la discapacidad. La sarcopenia y el sedentarismo acompañante son dos factores importantes en la disminución del metabolismo basal, y por lo tanto, grandes colaboradores al sobrepeso y a la obesidad, hechos que a su vez influyen negativamente sobre la actividad física, y todos juntos contribuyen al desarrollo de las enfermedades cardiovasculares, al de la atrofia ósea y a las fracturas consecutivas a esta última.

## 2.1.-Radicales libres y envejecimiento.

Ya hace muchos años que Harman <sup>(22)</sup> enunció la teoría de los radicales libres y algunos menos, pero bastantes, que Miquel y sus colaboradores <sup>(40, 41)</sup> describieron la acción de ellos sobre las mitocondrias para producir el envejecimiento. A lo largo del tiempo, cada vez han aumentado más el número de investigadores que han confirmado los hechos descritos por Miquel <sup>(14, 55, 49)</sup>, incluso algún especialista con gran experiencia en este campo como Wei la considera suficientemente madura <sup>(66)</sup>,

Sin embargo, también existen algunos detractores como Rustin y su equipo <sup>(53)</sup>.

Según ellos, sólo en unos pocos casos de los enfermos que padecen una alteración mitocondrial, incluyendo los que tienen altos niveles de mtDNA mutante asociados a profundas alteraciones de la cadena respiratoria, se han podido observar procesos de muerte específicamente activados en las células afectadas por alteraciones respiratorias.

Por otra parte, citan otros trabajos en los que se sugiere que, los daños originados por los radicales libres endógenos generados en las mitocondrias, solamente ocurren en condiciones excepcionales, y que la disfunción de la cadena respiratoria no produce la apertura de la permeabilidad de los poros de transición, lo cual es insuficiente "per se", para producir la muerte masiva de las células, ya sea por necrosis o apoptosis; y por tanto, dicha disfunción no es la responsable de la aceleración del envejecimiento.

Según Allen <sup>(2)</sup> entre las funciones específicas de la mitocondria y la duplicación existe cierta competencia, debido a que, mientras que la respiración es la encargada de sintetizar el ATP, para ser utilizado como donador de energía en las distintas funciones de la célula, la duplicación consume gran cantidad de ella. Ambos procesos dependen de gametos con objetivos distintos, por lo que la puesta en marcha de sus funciones puede dar lugar a un conflicto.

Dado que para la fertilización se requiere una gran movilidad y consumo de ATP. Los gametos masculinos, con el fin de asegurar la transmisión correcta del mtDNA a las generaciones siguientes, emplean la mayor parte de la energía en la reproducción, mientras que los femeninos, los cuales carecen de movilidad, reprimen la fosforilación oxidativa para disminuir la producción de EOR y proteger, de este modo, al mtDNA y a la duplicación de sus efectos negativos. Así pues, para Allen <sup>(2)</sup>, la función mitocondrial es perjudicial para la correcta duplicación, o dicho de otra forma, los gametos masculinos no contribuyen al genoma mitocondrial del cigoto. Esto explica por qué la herencia mitocondrial procede exclusivamente de la madre.

Los estudios más recientes publicados en la literatura científica ratifican que, las mitocondrias desempeñan una función crítica en la longevidad y en el envejecimiento, no sólo porque constituyen el lugar más cercano a la acción de los radicales libres, sino también, porque intervienen en la regulación de la respuesta al estrés y a la apoptosis <sup>(62)</sup>.

En el estrés, una serie de moléculas cambian de lugar, se albergan en las mitocondrias, y probablemente interactúan unas con otras, con el fin de regular la apoptosis a través de un mecanismo capacitado para intervenir en las relaciones mitocondria-núcleo <sup>(54)</sup>.

Según Barja <sup>(5)</sup>, el flujo de los radicales libres durante su ataque al mtDNA es mayor en los animales con una corta duración de la vida, lo que según él, constituye el principal determinante de la acumulación de mutaciones en el mtDNA, y por tanto, es el responsable de la velocidad a la que se produce la senescencia. Esto significa que, el envejecimiento se ha ido produciendo más lentamente durante la evolución, por la acción de mecanismos endógenos que protegen a las células de las alteraciones originadas

por el estrés oxidativo, más que por la neutralización de los agentes productores del daño, o por la reparación de las modificaciones ocasionadas en los tejidos. El primer tipo de mecanismo es más eficiente y menos gravoso, desde el punto de vista energético.

La presencia de una correlación positiva entre la actividad de la SOD en el músculo y la edad de los sujetos, muestra la existencia de una cierta adaptación del músculo envejecido a las EOR <sup>(61)</sup>, lo que confirma lo expuesto en líneas precedentes.

La teoría de los radicales libres del envejecimiento ha obtenido un gran respaldo científico con la aparición de los estudios transgénicos en animales invertebrados, a los que se les ha modificado los genes implicados en la detoxificación de las ROS, tales como los de la superóxido dismutasa (SOD), por lo que gracias a ello, aumentan la duración de la vida. Y lo contrario sucede con los ratones deficientes en esta enzima, los cuales fallecen en la primera semana de la vida por la falta de protección de la SOD. Estos dos tipos de experimentos muestran que, la regulación del metabolismo de los ROS afectan de forma importante a la duración de la vida. Los nocivos efectos de los ROS sobre las mitocondrias pueden ser controlados a través de la acción de los antioxidantes <sup>(38)</sup>.

### **3.-LOS FENÓMENOS CAUSALES DEL ENVEJECIMIENTO MITOCONDRIAL**

#### **3.1.-Mutaciones del DNA mitocondrial.**

Muy pocos autores discuten la importancia del DNA mitocondrial en el envejecimiento. Los datos científicos publicados hasta el momento indican que, en los humanos, las variantes polimórficas de los loci nucleares, así como la variabilidad del genoma mitocondrial pueden afectar a la calidad y al tiempo de aparición del envejecimiento.

Los resultados obtenidos en cribados de halogrupos del mtDNA en cerca de 800 italianos de diferentes edades, incluidos los centenarios, avalan la hipótesis de que la variabilidad heredada del genoma mitocondrial se halla asociada a la longevidad, y a una buena forma de envejecer en los humanos <sup>(15)</sup>.

El hecho de que el mtDNA se halle expuesto de forma continua a la acción de los agentes oxidantes, favore-

ce la aparición de las mutaciones en su seno, situación que se ve agravada con el paso de los años. Las mutaciones del mtDNA dan lugar a la aparición de enzimas respiratorias que contienen en su interior subunidades defectuosas, las cuales, a la vez que deterioran el transporte de los electrones, aumentan el daño oxidativo a la mitocondria y conducen a una serie de mutaciones diferenciadas del mtDNA <sup>(65)</sup>.

Es un hecho descrito en numerosos trabajos que, las alteraciones del mtDNA dan lugar a modificaciones patológicas de gran importancia, por lo que una acción prolongada a lo largo de los años puede influenciar la evolución del envejecimiento. Desde hace mucho tiempo, numerosos autores han venido publicando una serie de trabajos en los que el envejecimiento se acompaña de alteraciones evidentes (mutaciones) del mtDNA, principalmente deleciones y duplicaciones originadas por el estrés oxidativo. Las primeras asientan con mayor frecuencia en las células de los tejidos con mayor actividad metabólica, y con un alto índice de producción de RLO, como son el corazón, el cerebro y los músculos esqueléticos <sup>(69)</sup>. Las segundas se hallan presentes en la doble cadena del mtADN y se han descrito hasta 10 tipos distintos en las células de las personas mayores, pero no en las de los jóvenes <sup>(64)</sup>.

Las mutaciones somáticas del mtDNA producidas por los radicales libres ejercen su acción nociva principalmente sobre el complejo I, lo que origina la disminución de la transferencia de los electrones. En las plaquetas humanas, el envejecimiento aumenta la producción de lactato, debido a las alteraciones sufridas en la cadena respiratoria, hecho que se halla contrarrestado por el único antioxidante producido en la biosíntesis endógena, la coenzima Q. Para ejercer este mismo efecto, la coenzima Q de origen exógeno necesita previamente sufrir la reducción por las reductasas contenidas en las células <sup>(33)</sup>.

Existen algunas discrepancias en relación con el tiempo necesario para que los radicales libres originen el daño del mtDNA y produzcan el envejecimiento, ya que según algunos trabajos, en tanto que la función mitocondrial se ve afectada con cierta rapidez, las alteraciones del mtDNA solamente aparecen entre los 70 y los 80 años. Sin embargo, los trabajos más modernos realizados con la técnica mejorada de la reacción de la cadena de la polimerasa, han permi-

tido conocer mucho mejor los cambios acaecidos en regiones más amplias del genoma. Así, en los cultivos de fibroblastos obtenidos de personas con diferentes edades se ha observado que, en el 50% de los envejecidos existen mutaciones puntuales en la región base-par 1000 al comienzo de la duplicación del lazo D. Esta región del genoma es indispensable para mantener el número necesario de copias del mtDNA <sup>(39)</sup>.

Por otra parte, en los miocitos de los músculos de las piernas de las personas mayores se han observado reorganizaciones del mtDNA de distinto tamaño y localización, así como algunas deleciones <sup>(37)</sup> cuyo momento de aparición varía en cada uno de los individuos.

En los animales, las alteraciones producidas en el mtDNA por el envejecimiento varían según los tejidos. Así, mientras que en el hígado y en el músculo, el número de copias del mtDNA desciende en relación con la capacidad oxidante de cada uno de los tejidos, en el corazón de las ratas viejas, las copias no disminuyen <sup>(4)</sup>.

Para resumir, podríamos tener en cuenta la opinión de Ozawa <sup>(46)</sup> según la cual, las mutaciones somáticas adquiridas y el daño oxidativo del genoma producen la fragmentación del mtDNA, lo que conduce a la crisis energética celular, a la apoptosis, y a la degeneración y atrofia de los tejidos.

### 3.2.-Expresión de los genes mitocondriales.

Está claro que a lo largo de los años se va acumulando el daño sufrido por el mtDNA, lo que no sabemos es si ello produce alteraciones en la función mitocondrial de las células musculares.

Se tenía la sospecha de que las alteraciones originadas en el mtDNA pudieran limitar la expresión de los genes a nivel de la transcripción, pero según el trabajo de Barazzoni y sus colaboradores <sup>(4)</sup>, la disminución del número de copias del mtDNA carece de efectos importantes sobre los niveles de transcripción codificados de las mitocondrias, y de las actividades enzimáticas en varios de los tejidos estudiados. Al contrario, parece ser que, los principales factores que intervienen en la capacidad oxidativa de la mitocondria en las células envejecidas son: el mantenimiento de

los niveles de transcripción mitocondrial involucrados en el metabolismo oxidativo, y la demanda de energía.

Pero lo que sí sabemos es que, en el músculo humano envejecido, los RNA mitocondriales codificados por los genes del núcleo, y los de las mitocondrias, de los que dependen las proteínas mitocondriales, disminuyen su abundancia alrededor de un 20% en los músculos de los senectos, en comparación con los de los jóvenes <sup>(4)</sup>.

Los efectos del envejecimiento sobre la expresión de los genes mitocondriales son específicos de cada tejido. En las ratas viejas, la disminución de los mtRNA no se produce de la misma forma en todos los tejidos, pues mientras que los niveles disminuyen en los músculos gastrocnemios; en el sóleo, en el hígado y en el corazón, permanecen inmodificados <sup>(4)</sup>.

### 3.3.- Alteraciones en la síntesis de las proteínas.

Las alteraciones (mutaciones) del DNA mitocondrial dan lugar a la ausencia de una mayor o menor cantidad de proteínas, o a defectos de las mismas, que después se traducirán en alteraciones de la cadena respiratoria (menor producción de energía) y en enfermedades de las mitocondrias diseminadas por tejidos tan importantes como el corazón, el cerebro o los músculos <sup>(24)</sup>.

En los músculos humanos afectados por el envejecimiento disminuye el promedio de la síntesis de todas las proteínas musculares, de la miosina de cadenas pesadas (ligada a la acción de la enzima adenosin trifosfatasa) y también de las proteínas mitocondriales (lugar donde se origina la adenosina trifosfato o ATP) <sup>(58,52)</sup> al mismo tiempo que lo hacen la actividad de dos enzimas oxidativas clave que participan en el proceso de dicha síntesis: la citrato sintasa y la citocromo c oxidasa.

La síntesis de las proteínas mitocondriales disminuye un 35% en las ratas viejas, hecho que se halla asociado a una reducción del 30-50% de los productos de translación individuales. Al mismo tiempo se observa un descenso en los niveles del estado de equilibrio del mRNA de las subunidades que integran la citocromo c oxidasa codificadas por los genes del núcleo y las mitocondrias <sup>(27)</sup>.

Entre las causas involucradas en la disminución de la síntesis de las proteínas, además del deterioro de la actividad de las enzimas oxidativas ya citado, y del de la formación del ATP, hay que añadir el daño originado en la estructura del DNA, la reducción del número de copias de este ácido nucléico, y el aumento de la pérdida de los protones <sup>(59)</sup>.

Un hecho curioso puesto en evidencia por Rooyackers y cols <sup>(52)</sup> es que la disminución de la síntesis de las proteínas es muy evidente entre los 45 a los 55 años, pero a partir de los 65 cesa por completo. Para Proctor y sus colaboradores <sup>(51)</sup> las alteraciones descritas se instauran en el organismo humano alrededor de los 50 años, y se deben a la disminución de la concentración del IGF-1, a la de la testosterona, y a la del sulfato de dihidroepiandrosterona. Parece ser que, la disponibilidad de los templados es importante en la regulación de la expresión de las proteínas mitocondriales en los músculos humanos envejecidos <sup>(67)</sup>.

### 3.4.- Modificaciones de las enzimas mitocondriales.

Varios autores han observado que, en las personas sedentarias, el envejecimiento se asocia a la disminución en el músculo de la actividad de algunas enzimas oxidativas como la citrato sintasa, la succinato dehidrogenasa y la citocromo c oxidasa <sup>(47, 52, 11)</sup> aunque algún otro no ha sido capaz de comprobar este hecho <sup>(50)</sup>.

En lo referente a la citocromo c oxidasa, su deficiencia se halla acompañada de mutaciones variables en el mtDNA <sup>(11)</sup>.

Es probable que las discrepancias existentes entre los diferentes autores, tengan que ver con la forma en que cada tejido responde al envejecimiento. Así, por ejemplo, Miró y su grupo <sup>(42)</sup> aseguran que, las enzimas de las cadenas respiratorias de las mitocondrias de las células cardíacas no sufren alteración alguna con el envejecimiento

En los animales, algunas enzimas son más proclives a disminuir su actividad con el envejecimiento en ciertos grupos musculares, como en los músculos rojos oxidativos y menos en los blancos glucolíticos <sup>(25)</sup>.

De igual forma parece suceder en los humanos, ya que varios autores han constatado en las personas de edad avanzada una disminución de la actividad de la citrato sintasa en el músculo gastrocnemio, pero no en el vasto lateral.

En los humanos, no parece que existan diferencias entre los dos géneros en el metabolismo del músculo esquelético, en relación con las capacidades glucolítica y respiratoria. En las personas mayores, las modificaciones en el metabolismo de las células musculares difieren según el músculo estudiado, así, mientras que en el recto abdominal se observa una disminución de la actividad de la hexoquinasa y de la dehidrogenasa láctica, en el vasto lateral, el hecho más importante es el descenso de la actividad de la citrato sintasa, y en el glúteo mayor lo son el aumento de la actividad de la piruvato quinasa y una disminución del ATP y del fosfato de creatina (PCr). Esto se observa en las personas sedentarias <sup>(48)</sup>.

Dado que a medida que transcurren los años el tipo de fibras puede cambiar con la edad hacia el lado oxidativo, no sabemos si las alteraciones descritas son consecuencia del envejecimiento o derivadas de la disminución de la actividad física.

### 3.5.- Alteraciones en la producción del ATP.

La última función de las mitocondrias consiste en producir ATP con la ayuda del oxígeno, lo que se lleva a cabo mediante la colaboración de un sistema de proteínas agrupadas en cinco complejos, que por hallarse ubicados en la membrana interna mitocondrial reciben el nombre de complejos mitocondriales. La transformación del ADP en ATP se lleva a cabo a través de la cadena transportadora de electrones.

Según la teoría mitocondrial del envejecimiento, la actividad del Complejo I (NADH Coenzima Q reductasa) debería ser la enzima más afectada de las existentes en las mitocondrias, ya que el mtDNA codifica 7 subunidades de la misma.

Como quiera que, estas subunidades constituyen el lugar de unión del sustrato aceptor (Coenzima Q) y de la mayoría de los inhibidores de la enzima, entra dentro de lo posible que el envejecimiento pudiera producir ligeros cambios en la cinética de la afinidad de la quinona, y en su inhibición, antes de que se perdiera la mayor parte de la actividad de la enzima.

Lenaz y sus colaboradores <sup>(33)</sup> dicen haber observado la disminución global de la actividad del complejo I en varios tejidos de las ratas viejas. En las mitocondrias de las células no sinápticas de estos animales, constatan el descenso en la oxidación del NADH y en la sensibilidad de su rotenona, pero no en las mitocondrias de las células sinápticas de la corteza cerebral.

Según Brand <sup>(9)</sup>, las mitocondrias se encuentran incompletamente acopladas, por lo que en el transcurso de la fosforilación oxidativa una parte de la energía contenida en los sustratos se pierde en forma de calor. El acoplamiento incompleto se debe, fundamentalmente, al escape natural de los protones a través de la membrana interna de la mitocondria.

Se estima que el ciclo de protones mitocondrial es el responsable del 20-25% del metabolismo basal en las ratas. Dicho ciclo funciona de manera similar en los hepatocitos de la mayoría de los mamíferos y de las especies ectotérmicas, de manera que el mismo puede constituir una vía general, ecológicamente significativa, de pérdida de energía en todas las especies aerobias. Al ocurrir en los ectotérmicos, la termogénesis no debe ser la función primaria. Por el contrario, disminuir la producción de superóxidos y otras EOR puede ser un mecanismo atractivo para la función universal y costosa de disipar la energía del ciclo de los protones. Ello podría ayudar a disminuir el daño oxidativo al DNA y a retrasar el envejecimiento <sup>(9)</sup>.

Las mitocondrias constituyen la mayor fuente de EOR celulares, y el aumento de la conductancia de los protones mitocondriales da lugar a la oxidación de la ubiquinona, y a la disminución de la producción de EOR en la mitocondria aislada. Sin embargo, hasta la fecha no existe una evidencia directa, ni en las células, ni en los organismos, de que el ciclo mitocondrial de los protones disminuya la producción de EOR, ni el daño oxidativo, o que aumente la duración de la vida <sup>(9)</sup>.

Los estudios realizados *in vitro* con células humanas han demostrado que, con el paso de los años disminuye la respiración mitocondrial <sup>(47)</sup>, y como quiera que, para la producción del ATP se requiere obligatoriamente la presencia de oxígeno, esto ha hecho pensar a los investigadores que la función mitocondrial

disminuye con la edad, probablemente como consecuencia de la actuación de los RLO <sup>(1)</sup>.

In vivo, la producción de ATP en el cuádriceps humano de las personas mayores (65-80) viene a ser la mitad de la observada en los jóvenes (25-48) y la densidad del volumen mitocondrial es un 19% menor en los primeros <sup>(13)</sup>.

Esto quiere decir que, la menor producción del ATP se debe al descenso del número de mitocondrias y a la pérdida de la función de cada una de ellas. Es posible que estos hechos tengan algo que ver con la disminución de la actividad física propia de la edad, dado que el estudio anterior se llevó a cabo en personas que realizaban actividades recreacionales. Barrientos y sus colaboradores<sup>(6)</sup> no hallaron en el músculo esquelético correlación alguna entre el envejecimiento y las alteraciones de la cadena respiratoria.

En otro trabajo realizado por el mismo grupo algunos años después, en el que estudiaron las biopsias musculares de 201 pacientes con edades comprendidas entre los 0 y los 65 años, observaron en 42 de ellos una deficiencia aislada de los complejos CI, CII, CIII y CIV, mientras que en los otros 159 pacientes no pudieron constatar disfunción alguna en la cadena respiratoria, o evidencia indirecta de alteración mitocondrial <sup>(12)</sup>.

Del mismo parecer son Brierly y sus colaboradores <sup>(10)</sup> después de realizar un estudio en 9 jóvenes y en 12 deportistas mayores a los que también realizaron biopsias musculares. Por ello, la conclusión que obtienen estos autores es que, si las mitocondrias se encuentran involucradas en el envejecimiento, debe ser a través de un mecanismo más sutil que el originado por la disminución global de la actividad de la cadena respiratoria.

Sin embargo, en otro trabajo realizado por Barrientos y su grupo <sup>(6)</sup> con muestras de cerebro humano, a pesar de no haber observado alteraciones estructurales en el mtDNA, describen disminuciones en el nivel del estado de equilibrio y del índice de transcripción mitocondrial (mtRNA/mtDNA) asociadas a la edad, lo que podría desempeñar alguna función en el proceso de envejecimiento de las células cerebrales <sup>(7)</sup>.

Es posible, por tanto, que entre las mitocondrias cerebrales y las musculares exista alguna diferencia en lo que a la forma de envejecer se refiere.

Kent-Braun y Ng <sup>(30)</sup> piensan que los músculos como el cuádriceps y el gastrocnemio pueden ver afectada su capacidad oxidativa a consecuencia de la disminución de la actividad física, ya que ellos no han observado diferencia alguna en el tibial anterior entre jóvenes (27-45) y mayores (69-84).

Del mismo modo, en los trabajos realizados in vitro, los resultados no son unánimes, debido probablemente, a que las mitocondrias ubicadas entre las miofibrillas ven reducida con la edad la actividad de la citocromo c oxidasa, mientras que las albergadas debajo del sarcolema no presentan este hecho, al menos esto es lo que sucede en el músculo cardíaco <sup>(19)</sup>.

Los hechos descritos pueden indicar que no todas las mitocondrias responden de igual forma al envejecimiento.

#### 4.- EJERCICIO Y MITOCONDRIAS

De los trabajos publicados surge la duda de, si la disminución de las funciones mitocondriales observadas en los músculos de los ancianos son la consecuencia del proceso involutivo que acompaña al transcurrir el tiempo, o si por el contrario, gran parte del deterioro de la función mitocondrial no será la consecuencia de la progresiva disminución de la actividad física que acompaña al cumplimiento de los años.

Es posible que, las diferencias de criterio observadas entre los diferentes autores sobre la manera que se produce el envejecimiento muscular tengan algo que ver con el tipo y la localización de los músculos, y también con la forma en que la miosina de cadenas pesadas se expresa en cada uno de ellos. Así, las modificaciones del masetero y del pterigoideo lateral son totalmente opuestas a las existentes en los músculos del tronco y de los miembros, sin embargo, las que asientan en el vientre anterior y posterior del digástrico coinciden con las encontradas en los músculos del tronco y de las extremidades <sup>(43)</sup>.

En las ratas viejas el estrés oxidativo aumenta en el corazón y en el hígado. Con el ejercicio agudo intenso, el miocardio se ve más afectado por dicho estrés que el hígado <sup>(8)</sup>.

No cabe duda alguna de que el envejecimiento modifica negativamente las funciones mitocondriales en todos los órganos y sistemas, tanto en los humanos como en los animales <sup>(8)</sup>, a pesar de que las enzimas antioxidantes se encuentren aumentadas en las personas mayores <sup>(21)</sup>, ya que, incluso en los mejores deportistas de élite, en cuya modalidad predomina el entrenamiento aerobio, con los años se producen también las alteraciones descritas en su sistema muscular.

Pero no es menos cierto que, quienes siguen entrenando con alguna intensidad la capacidad aerobia, poseen una actividad de las enzimas oxidativas y una densidad capilar similar a los más jóvenes bien entrenados, y superior a la de los sedentarios jóvenes o viejos <sup>(50)</sup>.

Incluso, en las personas mayores sin experiencia deportiva, el entrenamiento aerobio realizado durante algunas semanas, aumenta la actividad de las enzimas mitocondriales y la producción de ATP en los miocitos, y a su vez eleva el nivel de la  $VO_2$  max, de igual forma a como acontece en los jóvenes que hacen el mismo tipo de ejercicio <sup>(35)</sup>.

Por otra parte, sabemos que, el ejercicio aerobio y en especial el que se realiza de forma agotadora produce en todas las edades un gran aumento en el consumo de oxígeno, lo que incrementa la formación de las EOR responsables, en mayor o menor cuantía, de las alteraciones intracelulares, y sobre todo de las que afectan a las mitocondrias, entre las que se incluye el funcionamiento de la cadena respiratoria. La acción de los EOR disminuye los sistemas defensivos celulares contra la oxidación, al reducir los depósitos de las vitaminas antioxidantes y del glutatión. No obstante, tanto los antioxidantes enzimáticos como los no enzimáticos, dada su versatilidad, son capaces de adaptarse a los efectos del ejercicio, sea agudo o crónico <sup>(28)</sup>.

En la lucha contra las EOR producidas por el ejercicio, el músculo esquelético posee una serie de recursos muy activos, entre los que se hallan el aumento de la

actividad de las enzimas antioxidantes, y la síntesis de las proteínas del shock térmico. MaArdle y Jakson <sup>(36)</sup> aseguran que, durante un periodo del ejercicio, el aumento de las EOR no produce alteraciones mitocondriales, a lo que le sigue de inmediato un incremento en la expresión de las enzimas antioxidantes y de las proteínas del shock térmico, como un signo de adaptación a las modificaciones sobrevenidas en el estado redox. En las ratas viejas el ejercicio de larga duración incrementa a la vez, la peroxidación lipídica y la actividad de la SOD <sup>(44)</sup>. Esto quiere decir que, la adaptación de las células conseguida a la primera fase del ejercicio, ejerce una acción protectora contra un segundo periodo de actividad física <sup>(36)</sup>.

En el trabajo de Tonkonogi y sus colaboradores <sup>(60)</sup> se describen los resultados del ejercicio intenso sobre la función mitocondrial. Tres tandas de ejercicio realizadas en la bicicleta ergométrica al 130% del pico de la  $VO_2$  en 10 hombres jóvenes, no produjeron en las mitocondrias del vasto lateral ningún tipo de alteración, ni durante el periodo de fatiga, ni 110 minutos después de finalizado el esfuerzo.

En las mitocondrias aisladas no se observó modificación alguna en la respiración máxima, en la producción de ATP, o en el índice del control respiratorio, ni inmediatamente después del ejercicio, ni durante el periodo de recuperación. La producción de ATP en relación con el oxígeno consumido (el cociente P/O), no se modificó durante el periodo de fatiga, pero disminuyó un 4% en el de recuperación. En los haces de fibras permeabilizados con saponina (skinned) la producción máxima de ADP originada por la respiración aumentó un 23% desde el periodo de reposo al de agotamiento, y permaneció elevada hasta el de recuperación, mientras que los índices respiratorios en ausencia de ADP y a 0,1 mM de ADP (respiración submáxima), no se modificaron. Esto significa según los autores que, durante el ejercicio de gran intensidad, el potencial oxidativo de la mitocondria se mantiene, o incluso se mejora, aunque sospechan que, el control de la respiración mitocondrial puede ser alterado durante el esfuerzo de forma reversible.

Por otra parte, estos mismos autores <sup>(61)</sup> aseguran que tras el entrenamiento aerobio, la eficiencia en la transferencia de energía, o lo que es igual, la relación ADP/oxígeno consumido permanece invariable. Esto

significa que, aunque después del ejercicio disminuye la protección antioxidante por cada unidad mitocondrial, sin embargo, el funcionamiento de la cadena respiratoria no suele verse afectado, a pesar de haber aumentado la sensibilidad de la membrana mitocondrial al estrés oxidativo.

Hasta aquí se han expuesto los resultados de los trabajos relacionados con las mitocondrias y el ejercicio aerobio, que aunque su número no es excesivo, aportan los datos suficientes para mejorar nuestros conocimientos sobre la acción de este tipo de ejercicio y la estructura y función de las mitocondrias. En cuanto al entrenamiento de fuerza, sea isométrico o isotónico, los estudios publicados son casi inexistentes.

Según Larson-Meyer y sus colaboradores <sup>(31)</sup>, una tanda de ejercicios isométricos realizada con los músculos flexores plantares, de 90 segundos de duración, y con una intensidad variable entre el 45,70 y 100% de la contracción máxima voluntaria, produce resultados completamente reproducibles sobre la constante del tiempo de recuperación de la fosfocreatina, sobre la del ADP y sobre la del índice del cambio de la fosfocreatina durante los primeros 14 segundos de la recuperación del esfuerzo. Dichos resultados poseen una buena correlación con la  $VO_2$  max y varían según los niveles de fuerza utilizados.

En cuanto al entrenamiento de fuerza isotónico, lo único que conocemos es que, en las personas mayores de 50 años, tanto el realizado durante 2 semanas como el de 12, produce un aumento en la síntesis de la miosina de cadenas pesadas, y una mejoría de la fuerza muscular <sup>(3)</sup>.

#### 4.1.-Ejercicio y biogénesis mitocondrial.

Aunque por desgracia, los trabajos publicados en la literatura científica que tratan de la acción del ejercicio sobre las mitocondrias musculares, y especialmente los dedicados a la biogénesis de estos organelos son muy escasos, no obstante, se ha demostrado que el ejercicio, en dependencia con su intensidad, frecuencia y duración, además de aumentar el número de las mitocondrias musculares, hace lo mismo con su contenido, primero por el incremento de su volumen, y después por el aumento de la actividad de las enzimas, lo que lleva implícito la mejoría de la capacidad para sintetizar ATP por gramo de músculo.

El ensamblado de todos los componentes mitocondriales comienza por una serie de señales inducidas por la contracción muscular, a consecuencia de lo cual se origina la activación trascricional de los genes residentes en el núcleo del miocito. A continuación se altera la estabilidad del RNA mitocondrial (mtRNA) y comienza el aumento de la importación de las proteínas procedentes, tanto de los genes nucleares como de los localizados en la propia mitocondria, a la vez que se incrementa el número de copias del DNA mitocondrial (mtDNA), lo que conduce a un mayor contenido de mitocondrias en el músculo <sup>(26)</sup>.

Todo lo dicho, explica por qué el ejercicio aerobio mejora la resistencia muscular y ejerce un efecto favorable sobre el envejecimiento de este tejido.

Una de las funciones inherentes a la biogénesis mitocondrial, es la de disminuir las alteraciones originadas por el ejercicio cuando su intensidad se eleva progresivamente. Por otra parte, el aumento de la actividad de las enzimas que intervienen en el proceso de la beta-oxidación consecutivo al entrenamiento de resistencia, incrementa la utilización de los ácidos grasos cuando el esfuerzo se realiza a intensidades submáximas. Este hecho produce un ahorro notable del glucógeno muscular, una menor producción de ácido láctico y una más baja concentración de AMP libre, todo lo cual beneficia al rendimiento <sup>(26)</sup>.

Para que la función de las mitocondrias neoformadas por la acción del ejercicio se lleve a cabo de manera perfecta, es necesario que antes de que se produzca la síntesis de las proteínas que componen la cadena respiratoria, lo haga la de los lípidos. Desgraciadamente, a diferencia de lo que sucede con la síntesis de las proteínas, de cuyos mecanismos poseemos gran información, con la de los lípidos nuestra ignorancia es supina.

No se han publicado trabajos sobre la acción del ejercicio aerobio en los procesos de transducción y transcripción del mt DNA en las personas mayores relacionados con la producción de proteínas. Sin embargo, sabemos que en los humanos y en los roedores la contracción muscular activa las quinasas 1 y 2. Entre las señales extracelulares que regulan la

activación de las quinasas se hallan la quinasa ribosómica p90S6 y la quinasa terminal c-Jun NH2 (proteínas quinasas activadas por mitógenos). La cascada de acontecimientos puede iniciarse por la despolarización de la membrana, por las alteraciones en el manejo del Ca<sup>2+</sup>, o por disturbios metabólicos<sup>(23)</sup>.

En cuanto a la transcripción, tenemos conocimiento de que los factores que intervienen en ella, responden a la contracción muscular con un aumento en la regulación del mtRNA y en el de los niveles de proteínas. Entre ellos podemos citar los genes c-fos, c-jun, y egr-1, así como el NRF-1<sup>(45)</sup>.

## B I B L I O G R A F Í A

- 1 **AGARWAL.S. and RS.SOHAL.** Differential oxidative damage to mitochondrial proteins during aging. *Mech.Ageing.Dev.* 1995; 85:55-63.
- 2 **ALLEN JF.** Separate sexes and the mitochondrial theory of ageing. *J Theor Biol.* 1996; 180:135-140.
- 3 **BALAGOPAL.P. SCHIMKE.JC.ADES.P. ET AL.** Age effect on transcrip levels and synthesis rate of MHC and response to resistance exercise. *Am.J.Physiol.* 2001; 280:E203-E208.
- 4 **BARAZZONI.R.SHORT.KR. and KS.NAIR.** Effects of aging on mitochondrial DNA copy number and cytochrome c oxidase gene expression in rat skeletal muscle, liver and heart. *J.Biol.Chem.* 2000; 275: 3342-3347.
- 5 **BARJA G.** The flux of free radical attack through mitochondrial DNA is related to aging rate. *Aging (Milano).* 2000; 12:342-355
- 6 **BARRIENTOS.A.CASADEMONT.J.ROTIJA. et al.** Absence of relationship between the level of electron transport chain activities and aging in human skeletal muscle. *Biochem.Biophys.Res.Commum.* 1996; 229: 536-539.
- 7 **BARRIENTOS A; CASADEMONT J; CARDELLACH F. et al.** Reduced steady-state levels of mitochondrial RNA and increased mitochondrial DNA amount in human brain with aging. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997; 52:284-289.
- 8 **BEJMA J, RAMIRES P, and LL.JI.** Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: differential effects in the myocardium and liver. *Acta Physiol Scand.* 2000; 169:343-351.
- 9 **BRAND MD.** Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp Gerontol.* 2000; 35:811-820
- 10 **BRIERLY EJ; JOHNSON MA; BOWMAN A; et al.** Mitochondrial function in muscle from elderly athletes. *Ann Neurol.* 1997; 41:114-116
- 11 **BRIERLEY EJ; JOHNSON MA; LIGHTOWLERS RN; et al.** Role of mitochondrial DNA mutations in human aging: implications for the central nervous system and muscle. *Ann Neurol.* 1998; 43: 217-223
- 12 **CHRETIEN D; GALLEGO J; BARRIENTOS A; et al.** Biochemical parameters for the diagnosis of mitochondrial respiratory chain deficiency in humans, and their lack of age-related changes. *Biochem J.* 1998; 329: 249-254
- 13 **CONLEY.KE.JUBRIANS.SA. and PC.ESELMAN.** Oxidative capacity and ageing in human muscle. *J.Physiol.* 2000; 526:203-210.
- 14 **COTTRELL DA; BLAKELY EL; BORTHWICK GM; et al.** Role of mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 908:199-207
- 15 **DE BENEDICTIS G; CARRIERI G; VARCASIA O; BONAFE M; and C.FRANCESCHI.** Inherited variability of the mitochondrial genome and successful aging in humans. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 908: 208-218
- 16 **DE BENEDICTIS G; CARRIERI G; VARCASIA O; BONAFE M; and C.FRANCESCHI.** Inherited variability of the mitochondrial genome and successful aging in humans. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 908: 208-218
- 17 **DE GROOT. H NOLL. T and T. TOLLE.** Loss of latent activity of liver microsomal membranes evoked by lipid peroxidation. *Biochem.Biophys.Acta.* 1985; 815: 91-96.
- 18 **EBADI M .** Introduction. Oxidative stress in mitochondria disorders of aging. *Biol Signals Recept.* 2001; 10:5-13
- 19-**FANNIN. SW. LESNEJKY. EJ. SLABE.TJ. et al.** Aging selectively decreases oxidative capacity in rat heart interfibrillar mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999;372: 399-407.
- 20 **FAROOQUI.MYH.DAY.WW. and DM.ZAMORANO.** Glutathione and lipid peroxidation in the aging rat.. *Com.Biochem.Physiol.* 1987; 88B: 177-180.
- 21 **FIELDING RA, and M.MEYDANI.** Exercise, free radical generation, and aging. *Aging (Milano).* 1997; 9:12-18
- 22 **HARMAN D.** Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 1956; 11: 298-300.
- 23 **HAYASHI. T. HIRSHMAN. MF. DUFRESNE. SD. and LJ. GOODYEAR.** Skeletal muscle contractile activity in vitro stimulates mitogen-activated protein kinase signaling. *Am.J.Physiol.* 1999; 277: C701-C707.
- 24 **HEDDI. A. STEPIEN. G. BENKE. PJ. and DC. WALLACE.** Coordinate induction of energy gene expression in tissues of mitochondrial disease patients.*J.Biol.Chem.* 1999; 274: 22968-22976.
- 25 **HOLLOSZY. JO. CHEN. M. CARTEE. GD. and JC. YOUNG.** Skeletal muscle atrophy in old rats: differential changes in the three fiber types. *Mech.Ageing.Dev.* 1991; 60: 199-213.

- 26 **HOOD. DA. TAKAHASHI M. CONNOR. MK. and D. FREYSSENET.** Assembly of the cellular powerhouse: current issues in muscle mitochondrial biogenesis. *Exer.Sports.Sci.Rev.* 2000; 28: 68-73.
- 27 **HUDSON EK; TSUCHIYA N; and RG.HANSFORD.** Age-associated changes in mitochondrial mRNA expression and translation in the Wistar rat heart. *Mech Ageing Dev* 1998. 1998; 103:179-193
- 28 **JL. LL; LEEUWENBURGH C; LEICHTWEIS S; GORE M; et al.** Oxidative stress and aging. Role of exercise and its influences on antioxidant systems. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 854: 102-117
- 29 **KANNER. J. HARREL. S AND B. HAZAN.** Muscle membrane lipid peroxidation by an " iron redox cycle" system: Initiation by oxy radicals and site-specific mechanisms. *J.Agric.Food.Chem.* 1986; 34: 506-510.
- 30 **KENT-BRAUN. JA. AND AV. NG.** Skeletal muscle oxidative capacity in young and older women and men. *J.Appl.Physiol.* 2000; 89:1072-1078.
- 31 **LARSON-MEYER DE; NEWCOMER BR; HUNTER GR; et al.** 31P MRS measurement of mitochondrial function in skeletal muscle: reliability, force-level sensitivity and relation to whole body maximal oxygen uptake. *NMR Biomed.* 2000; 13: 14-27
- 32 **LEE. HC. PANG. CY. HSU. HS and YH. WEI.** Ageing-associated tandem duplications in the D-loop of mitochondrial DNA of human muscle. *FEBS.Lett.* 1994; 354: 79-83.
- 33 **LENAZ G; BOVINA C; CASTELLUCCIO C; et al.** Mitochondrial complex I defects in aging. *Mol Cell Biochem.* 1997; 174: 329-333.
- 34 **LENAZ G; D'AURELIO M; MERLO PICH M; et al.** Mitochondrial bioenergetics in aging. *Biochim Biophys Acta .* 2000; 1459:397-404.
- 35 **LIM S; KIM SK; PARK KS; et al.** Effect of exercise on the mitochondrial DNA content of peripheral blood in healthy women. *Eur J Appl Physiol.* 2000; 82: 407-412
- 36 **MCARDLE A; and MJ.JACKSON.** Exercise, oxidative stress and ageing. *J Anat .* 2000; 197: 539-541
- 37 **MELOV. S. SHOFFNER. JM. KAUFMAN. A. and DC. WALLACE.** Marked increase in the number and variety of mitochondrial DNA rearrangements in aging human skeletal muscle. *Nucl.Acids.Res.* 1995; 23. 4122-4126
- 38 **MELOV S.** Mitochondrial oxidative stress. Physiologic consequences and potential for a role in aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 908:219-225
- 39 **MICHIKAWA. Y. MAZZUCHELLI. F. BRESOLIN. N. ET AL.** Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science.* 1999; 286:774-779.
- 40 **MIQUEL J, ECONOMOS AC, FLEMING J et al.** Mitochondrial role in cell aging. *Exp. Gerontol.* 1980; 15: 575-591.
- 41 **MIQUEL, J.** An update on the mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp. Gerontol.* 1998; 33: 113-126.
- 42 **MIRO O; CASADEMONT J; CASALS E; et al.** Aging is associated with increased lipid peroxidation in human hearts, but not with mitochondrial respiratory chain enzyme defects. *Cardiovasc Res* 2000. 2000; 47: 624-631
- 43 **MONEMI M, KADI F, LIU JX, et al.** Adverse changes in fibre type and myosin heavy chain compositions of human jaw muscle vs. limb muscle during ageing. *Acta.Physiol.Scand.*1999;167:339-345.
- 44 **NAVARRO-AREVALO A, and MJ.SANCHEZ-DEL-PINO.** Age and exercise-related changes in lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in liver and soleus muscle tissues of rats. *Mech Ageing Dev.* 1998; 104: 91-102
- 45 **NEUFER.PD.ORDWAY.GA. and RS.WILLIAMS.** Transient regulation of c-fos,ab-christallin and HDP70i, ab-christallin and HSP70 in muscle during recovery from contractile activity. *Am.J.Physiol.* 1998; 274:C341-C346.
- 46 **OZAWA T.** Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging. *Physiol Rev.* 1997; 77:425-464
- 47 **PAPA. S.** Mitochondrial oxidative phosphorylation changes in the life span: molecular aspects and pathophysiological implications. *Biochim.Biophys.Acta.* 1996; 127: 87-105.
- 48 **PASTORIS O, BOSCHI F, VERRI M, et al.** The effects of aging on enzyme activities and metabolite concentrations in skeletal muscle from sedentary male and female subjects. *Exp Gerontol.* 2000; 35: 95-104
- 49 **POLLACK M y LEEUWENBURGH C.** Apoptosis and aging: role of the mitochondria. *J. Gerontol.* 2001; 56: B475-482.
- 50 **PROCTOR.DN.SINNING.WE. WALRO.JM. et al.** Oxidative capacity of human muscle fiber types: effects of age and training status. *J.Appl. Physiol.* 1995; 78:033-2038.
- 51 **PROCTOR DN, BALAGOPAL P, and KS. NAIR.** Age-related sarcopenia in humans is associated with reduced synthetic rates of specific muscle proteins. *J Nutr.* 1998; 128(2 Suppl):351S-355S
- 52 **ROOYACKERS. OE. ADEY. DB. ADES. PA AND KS. NAIR.** Effect of age on in vivo rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle.*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1996; 93:15364-15369.
- 53 **RUSTIN P; VON KLEIST-RETZOW JC; VAJO Z; et al.** For debate: defective mitochondria, free radicals, cell death, aging-reality or myth-ochondria?. *Mech Ageing Dev.* 2000; 114: 201-206
- 54 **SALVIOLI S; BONAFE M; CAPRI M; MONTI D; and C. FRANCESCHI.** Mitochondria, aging and longevity—a new perspective. *FEBS Lett.* 2001; 9 :9-13
- 55 **SASTRE J, PALLARDÓ FV y VIÑA J.** Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *Life* 2000; 49: 1-9.

- 56 SCHON.EA.** Mitochondrial DNA and the genetics of mitochondrial disease. In: Schapira. AHV and S. Dimauro (Eds): Mitochondrial disorders in neurology. Oxford: Butterworth-Heinemann. 1994
- 57 SHIGENAGA. MK. HAGEN. TM, and BN. AMES.** Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1994; 91:10771-10778.
- 58 SHORT KR; and KS. NAIR.** Mechanisms of sarcopenia of aging. J. Endocrinol. Invest. 1999; 22(5Suppl): 95-105
- 59 SHORT KR; and KS. NAIR.** Does aging adversely affect muscle mitochondrial function? Exerc Sport Sci Rev . 2001; 29:118-123.
- 60 TONKONOGI M; WALSH B; THIVEL T; et al.** Mitochondrial function in human skeletal muscle is not impaired by high intensity exercise. Pflugers Arch. 1999; 437: 562-568
- 61 TONKONOGI M; WALSH B; SVENSSON M; and K. SAHLIN.** Mitochondrial function and antioxidative defence in human muscle: effects of endurance training and oxidative stress. J Physiol 2000; 528:379-388
- 62 VAN REMMEN H; and A. RICHARDSON.** Oxidative damage to mitochondria and aging. Exp Gerontol. 2001; 36: 957-968
- 63 WALLACE. D.C.** Función normal y patológica del ADN mitocondrial. Investigación y Ciencia. Octubre 1997; 12-20
- 64 WEI. YH. PANG. CY, YOU. BJ, and HC. LEE.** Tandem duplications and large-scale deletions of mitochondrial DNA are early molecular events of human aging process. Ann.NY.Acad.Sci. 1996;786: 82-101.
- 65 WEI YH.** Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. Proc Soc Exp Biol Med. 1998; 217: 53-63
- 66 WEI YH; MA YS; LEE HC; et al.** Mitochondrial theory of aging matures—roles of mtDNA mutation and oxidative stress in human aging. Zhonghua Yi Xue Za Zhi (China) 2001; 64: 259-270.
- 67 WELLE. S. BHART. K. and CA. THORNTON.** High-abundance mRNAs in human muscle: comparison between young and old. J. Appl. Physiol. 2000; 89:297-304.
- 68 ZARCO. P.** Isquemia miocárdica y metabolismo de la glucosa. Madrid Médico. 2001; 48: 28-30.
- 69 ZHANG. C, BILLS. M, QUIGLEY. A et al.** Varied prevalence of age-associated mitochondrial DNA deletions in different species of tissues: A comparison between human and rat. Biochem.Biophys..Res.Commuun 1997; 230: 630-635.