

**Universidad de Granada**

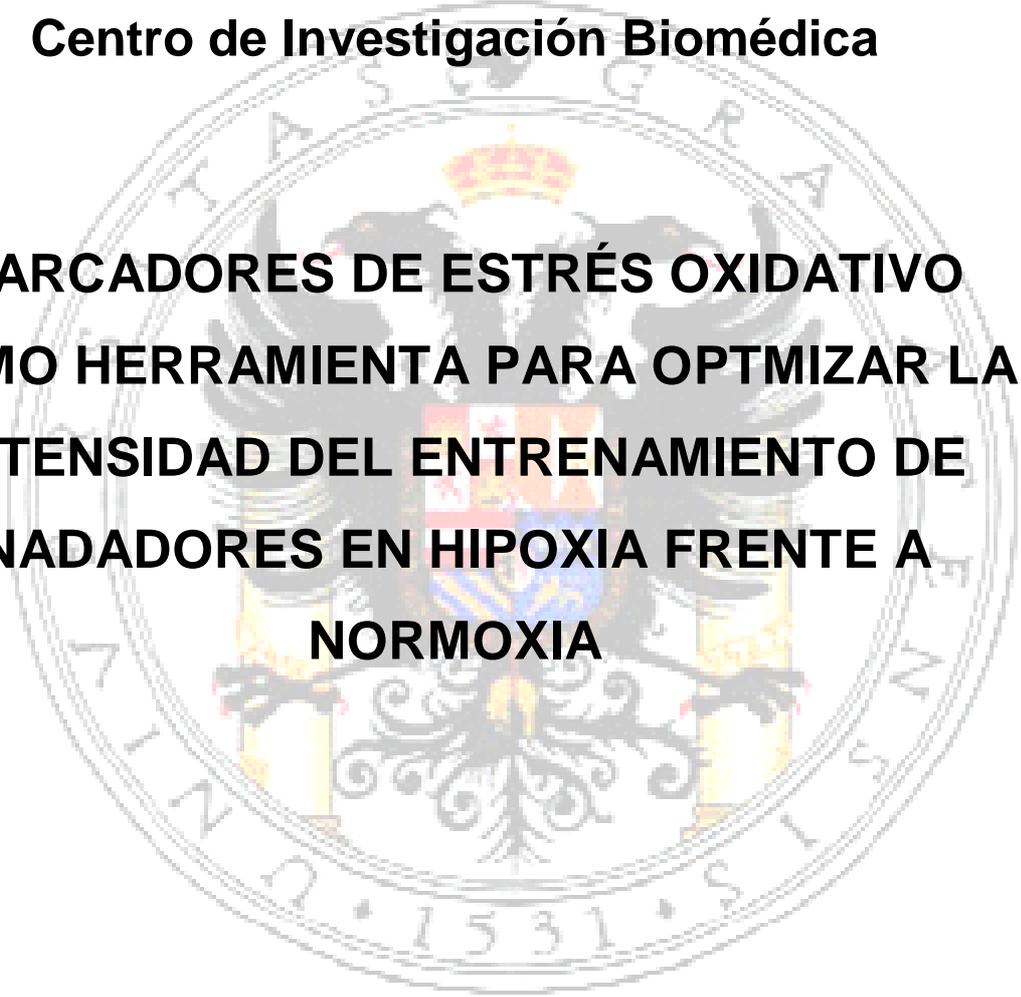
**Departamento de Fisiología**

**Departamento de Educación Física y Deportiva**

**Instituto de Nutrición y Tecnología de los**

**Alimentos “José Mataix Verdú”**

**Centro de Investigación Biomédica**

The seal of the University of Granada is a circular emblem. It features a central figure, likely a lion or a similar heraldic animal, standing on a base. The figure is surrounded by a decorative border containing the university's name in Latin: 'UNIVERSITAS GRANATAE' at the top and '1531' at the bottom. The seal is rendered in a light, semi-transparent grey color, serving as a background for the title text.

**MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO  
COMO HERRAMIENTA PARA OPTIMIZAR LA  
INTENSIDAD DEL ENTRENAMIENTO DE  
NADADORES EN HIPOXIA FRENTE A  
NORMOXIA**

**Silvana Nóbrega Gomes  
Granada, 2012**

**Marcadores de estrés oxidativo como  
herramienta para optimizar la intensidad del  
entrenamiento de nadadores en hipoxia frente a  
normoxia**

**Memoria que presenta la Lda. Dña. Silvana Nóbrega Gomes  
para aspirar al grado de Doctora en Actividad Física y Deporte**



**Dña. Silvana Nóbrega Gomes  
aspirante al grado de  
Doctora en Actividad Física y Deporte**

**Esta Tesis Doctoral ha sido realizada bajo las direcciones de:**

**Dra. Dña. Gracia  
López Contreras**

**Dr. D. Jesús Francisco  
Rodríguez Huertas**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Silvana Nóbrega Gomes  
D.L.: GR 3114-2012  
ISBN: 978-84-9028-241-0

**D. Jesús Rodríguez Huertas, Profesor Titular del Departamento Fisiología de la Universidad de Granada.**

**Dña. Gracia López Contreras, Profesora contratada del Departamento de Educación Física y Deportiva de la Universidad de Granada.**

**Certifican que Dña. Silvana Nóbrega Gomes, Licenciada en Educación Física, ha realizado bajo nuestra dirección y en el Departamento de Fisiología (Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos) y del Departamento de Educación Física y Deportiva de la Universidad de Granada el presente trabajo de investigación, titulado: “Marcadores de estrés oxidativo como herramienta para optimizar la intensidad del entrenamiento de nadadores en hipoxia frente a normoxia” que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctora.**

**Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente en Granada, a de Junio de 2012.**

**El director,**

**El director,**

**Fdo. Dña. Gracia  
López Contreras**

**Fdo. D. Jesús Francisco  
Rodríguez Huertas**

## Agradecimientos

### Agradezco:

Primeramente a Dios, que verdaderamente me ha dado permiso y condiciones de estar en España. A Jesús Cristo, por darme su precioso nombre, el cual me ha sacado de muchas dificultad y me ha garantizado victoria, a mi gran amigo y orientador Espíritu Santo, mi ayudador de todas las cosas y de todas las horas. Sin los tres en mi vida seguramente no existiría esta tesis.

### Familia:

A mis padres (Mezinho y Nininha) esencia de mi vida, los cuales me han enseñado a respetar y vivir los verdaderos valores de la vida, a esforzarme y a no desistir. Gracias por siempre creyeren y incentivarme a llegar hasta donde estaban mis sueños y realizarlos.

A mi marido João Carlos Gomes, por ser la persona que siempre ha creído, motivado y investido en mi carrera profesional, privándose de mi presencia por largos períodos, amándome con una intensidad y de una forma que me llenaba de tranquilidad y equilibrio para seguir adelante en los momentos difíciles. Además y por encima de todo lo agradezco, por aceptar la dura misión de llevar en sus espalda el ser padre y madre de dos niñas adolescentes prácticamente solo.

A mis hijas Géssyca y Uilly, mis preciosos tesoros, les agradezco por entendieren y apoyaren esta fase de mi vida, privándose de mi presencia, del conforto, de muchas cosas en sus vidas, adaptándose a una realidad diferente que las obligaron a madurar y crecer en todos los sentidos, las quiero mucho.

### Orientadores:

A Jesús Rodríguez Huertas, por la paciencia y tiempo dedicado a mi aprendizaje, por darme la oportunidad de aprender y formarme. Muchas gracias por todo.

A Gracia López Contreras, una gran profesora y amiga. Su incentivo, animándome y creyendo en mi potencial me hacía minimizar mis limitaciones y avanzar. Una mujer con su vida muy llena de actividades,

profesional, familiar y social y con éxito en todo, me ha hecho desear tenerla como referencia, trabajaré mucho para en el futuro ser como ella.

A Yahira Barranco, un ángel de Dios en determinado momento de mi vida (laboratorio), mucho me ha ayudado y enseñado. Juntas lloramos y sonreímos los fracasos y éxito de los experimentos y de nuestro crecimiento como investigadoras. Puedo llamarla de mi tercer orientadora, como no se puede ser formal, lo es en mi corazón.

A los colaboradores de la tesis:

A Silvia, Cristina y Jerónimo, gracias por el tiempo invertido en mi trabajo en la colecta de datos y en el laboratorio.

A los nadadores (Equipo de natación de la Universidad de Granada) y a su entrenador (Jordy), por la disponibilidad y contribución en el avance del conocimiento y de investigación en el tema de la fisiología de la natación.

A todos los funcionarios del IUEF, secretaria, biblioteca, portería, cafetería...a todos, que afortunadamente para nosotros, hacen su trabajo con amor, tratando a los extranjeros con mucho cariño y respeto.

Amigos personales:

A familia Cortez, la cual creo que ha sido un regalo de Dios para ser soporte en mi vida en España, especialmente a Lúcia, una gran amiga y hermana de todas las horas. Gracias por sus oraciones, palabras de ánimo, por escucharme, por todo, nada ha sido en vano.

A Teresa Mazzueco, una amiga muy especial que también ha colaborado en mucho en la conclusión de esta tesis, alegrando mis días con su alma generosa, muchas gracias por todo.

A todos los brasileños que viven o vivieron en España, durante estos tres años y medio y que de una forma o de otra han sido mi familia. (Como son muchos, no los nombraré para que no se me olvide ninguno).

A Rosângela y Marcos por su preciosa ayuda en el final de la tesis, gracias.

Dedico esta tesis a mi gran amigo **Gilson Lima**, hombre de Dios, que ha muerto año pasado y el dolor que me ha causado lo transformé en homenaje, yo tengo mucho a agradecerlo y la conclusión de esta tesis también tiene su colaboración, lo que he aprendido con este hombre ha sido guardado en mi corazón. Su vida, mismo después de muerto, sigue teniendo una voz alta y fuerte, su ejemplo enseña, exhorta y anima.

“¡Puede llover cuchillo, pues mi paraguas es de acero!” Gilson Lima

Gracias por todo mi amigo!

## ABREVIATURAS

<b>ADN:</b> Ácido desoxirribonucleico	<b>NACL:</b> (Cloruro sódico)
<b>ADNmt:</b> Ácido desoxirribonucleico mitocondrial	<b>NADH:</b> nicotinamida adenina dinucleótido
<b>ATP:</b> Adenosín Trifosfato	<b>NAOH:</b> hidróxido de sodio
<b>CAT:</b> catalasa	<b>NO:</b> óxido nítrico
<b>CoQ:</b> coenzima Q	<b>O<sub>2</sub>:</b> Oxígeno
<b>COX:</b> citocromo oxidado	<b>O<sub>2</sub><sup>•</sup>:</b> radical superóxido
<b>CTE:</b> cadena de transporte de electrones	<b>OH<sup>-</sup>:</b> radical hidroxilo
<b>DAPI</b> (4',6-diamidino-2-phenylindole)	<b>OMS:</b> Organización Mundial de la Salud
<b>DMSO:</b> Dimethyl Sulfoxide	<b>OXPHOS:</b> fosforilación oxidativa
<b>ERON:</b> especies reactivas del oxígeno y nitrógeno	<b>PAD:</b> presión arterial diastólica
<b>EROs:</b> Especies Reactivas del Oxígeno	<b>PAS:</b> Presión arterial sistólica
<b>FC:</b> frecuencia cardiaca	<b>PBS:</b> (tampón fosfato salino)
<b>Fe:</b> hierro	<b>Pi:</b> Fósforo
<b>GPX:</b> glutatión peroxidasa	<b>PUFAs:</b> ácidos grasos polinsaturados
<b>GR:</b> glutatión reductasa	<b>ROS:</b> radical Oxygen Species
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b> hidroperóxidos	<b>RPM:</b> revoluciones por minuto
<b>Hb:</b> hemoglobina	<b>S:</b> azufre
<b>Hc:</b> Hematocrito	<b>SBF:</b> Fetal Bovine Serum
<b>HCL 37%:</b> (ácido clorhídrico)	<b>SOD:</b> superóxido dismutasa
<b>HMP:</b> High melting Point	<b>TBARS:</b> sustancias reactivas del ácido Tiobarbitúrico
<b>HO<sub>2</sub><sup>•</sup>:</b> radical hidroperóxilo	<b>TCA:</b> ácido tricarbóxico
<b>IMC:</b> índice de masa corporal	<b>VO<sub>2</sub>max:</b> consumo de O <sub>2</sub> máximo del oxígeno
<b>La:</b> Lactato	
<b>LHTL:</b> vivir en altitud y entrenar a nivel del mar	
<b>LMP:</b> Low Melting Point	
<b>MAD:</b> malondialdehido	

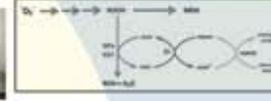
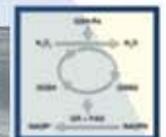
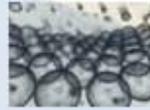
## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I Justificación y Objetivos .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Justificación.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Objetivo general.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 Objetivos específicos.....</b>	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO II Antecedentes Bibliográficos .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Radicales Libres .....</b>	<b>18</b>
2.1.1 Teoría de los Radicales Libres .....	18
2.1.2 Clasificación de los Radicales Libres.....	19
2.1.2.1 Anión Superóxido ( $O_2^-$ ).....	20
2.1.2.2 Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).....	21
2.1.2.3 Radical Hidróxilo ( $OH^\bullet$ ).....	22
2.1.2.4 Oxígeno Singlete.....	22
2.1.2.5 Especies radicalarias secundarias.....	22
2.1.3 Generación del Radical Libre .....	24
2.1.3.1 Cadena de transporte de electrón.....	25
2.1.3.2 Metabolismo de los ácidos grasos peroxisomal .....	28
2.1.3.3 Reacción citocromo P450.....	29
2.1.3.4 Fagocitosis celular.....	29
2.1.3.5 Xantina Oxidasa (XO).....	30
2.1.3.6 Fosfolipasa $A_2$ (PLA2) muscular.....	30
<b>2.2 Sistema de Defensas Antioxidantes .....</b>	<b>31</b>
2.2.1 Definiciones .....	31
2.2.1.1 Clasificación de los antioxidantes .....	32
2.2.2 Antioxidantes Enzimáticos .....	32
2.2.2.1 SOD - Superóxido Dismutasa.....	33
2.2.2.2 CAT - Catalasa.....	34
2.2.2.3 GPX - Glutation Peroxidasa.....	34
2.2.2.4 GR - Glutation Reductasa.....	35
2.2.3 Antioxidantes No Enzimáticos .....	36
2.2.3.1 GSH - Glutation.....	36
2.2.3.2 Vitamina E (Alfa Tocoferol).....	37
2.2.3.3 Vitamina A (Retinol).....	38
2.2.3.4 Carotenos.....	38

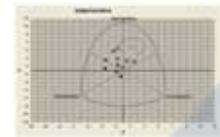
2.2.3.5 Vitamina C o Acido Ascórbico .....	39
2.2.3.6 Coenzima Q <sub>10</sub> (Ubiquinol).....	40
2.2.3.7 Otros Antioxidantes .....	41
<b>2.3 Estrés Oxidativo.....</b>	<b>42</b>
2.3.1 Definición .....	42
2.3.2 Daños oxidativos a las estructuras celulares .....	43
2.3.2.1 Oxidación de los Lípidos.....	43
2.3.2.2 Oxidación de Proteínas.....	44
2.3.2.3 Oxidación del ADN .....	45
2.3.3 Estrés oxidativo y el ejercicio.....	45
2.3.3.1 Efectos de EROs en los sistemas biológicos tras ejercicio físico.....	45
2.3.3.2 Puntos positivos y negativos de formación de radical libre.....	49
2.3.3.3 Estrés oxidativo y el ejercicio en diferentes situaciones.....	51
2.3.3.4 Estrés oxidativo y ejercicio ocasional .....	52
2.3.3.5 Estrés oxidativo y ejercicios aeróbicos.....	52
2.3.3.6 Estrés oxidativo y ejercicios anaeróbicos.....	53
2.3.3.7 Estrés oxidativo y diferencias de género.....	54
<b>2.4 Estrés Oxidativo e Hipoxia.....</b>	<b>58</b>
2.4.1 Rendimiento deportivo e hipoxia .....	58
2.4.1.1 El tiempo y duración de exposición a altitud.....	59
2.4.1.2 Periodización e intensidad del entrenamiento .....	59
2.4.1.3 Variabilidad individual.....	60
2.4.1.4 Altitud adecuada .....	60
2.4.1.5 Favorecimiento genético.....	61
2.4.2 Alteraciones fisiológicas del entrenamiento en hipoxia.....	65
2.4.3 Estrés oxidativo inducido por el ejercicio e hipoxia .....	66
<b>2.5 Natación y Estrés Oxidativo .....</b>	<b>68</b>
2.5.1 Natación Deportiva .....	68
2.5.2 Herramientas de control de intensidades.....	69
2.5.2.1 Frecuencia Cardíaca (FC).....	69
2.5.2.2- Concentraciones de lactato.....	70
2.5.3 Estrés Oxidativo y Natación.....	71
<b>CAPÍTULO III Material y Método .....</b>	<b>74</b>
<b>3.1 Sujetos del Estudio .....</b>	<b>75</b>
3.1.2 Registro nutricional .....	75
3.1.3 Análisis Corporal.....	76

3.1.3.1	Valoración Antropométrica.....	76
3.1.3.2	Índice de Masa Corporal.....	77
3.1.3.3	Cuatro Compartimentos Corporales.....	78
3.1.3.4	Somatotipo .....	78
3.1.3.5	Somatocarta.....	79
<b>3.2</b>	<b>Diseño Experimental.....</b>	<b>79</b>
<b>3.3</b>	<b>Instalaciones usadas en el estudio.....</b>	<b>81</b>
<b>3.4</b>	<b>Recogida de datos (extracción de sangre, medición de PA, FC y lactato).....</b>	<b>81</b>
3.4.1	Fase I - Antes del esfuerzo .....	81
3.4.2	Fase II - Esfuerzo.....	82
3.4.2.1	Protocolo del entrenamiento.....	83
3.4.3	Fase III - Pos esfuerzo y recuperación.....	85
<b>3.5</b>	<b>Parámetros obtenidos en cada sesión de esfuerzo y en las muestras sanguíneas .....</b>	<b>85</b>
3.5.1	Determinación del daño oxidativo al ADN de linfocitos.....	86
3.5.1.1	Fase I - Aislamiento de linfocitos.....	86
3.5.1.2	Fase II - Ensayo Cometa (Comet Assay Technique).....	87
3.5.1.3	Fase III - Parámetros obtenidos mediante la técnica Comet Assay.....	89
3.5.2	Determinación de Peroxidación Lipídica en sustancias Reactivas del Ácido Tiobarbitúrico e hidroperóxido en plasma. ....	90
3.5.2.1	TBARS.....	90
3.5.2.2	Hidroperóxidos (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	91
<b>3.6</b>	<b>Extracción y Determinación de Ubiquinonas y Vitamina E.....</b>	<b>92</b>
<b>3.7</b>	<b>Determinaciones de Antioxidantes Enzimáticos .....</b>	<b>93</b>
3.7.1	SOD - Superóxido Dismutasa.....	93
3.7.2	CAT - Catalasa.....	94
3.7.3	Glutación Peroxidasa (GPX).....	95
3.7.4	Glutathion Reductasa .....	96
<b>3.8</b>	<b>Tratamiento Estadístico de los Resultados .....</b>	<b>97</b>
<b>CAPÍTULO IV</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>99</b>
<b>4.1</b>	<b>Composición corporal y somatocarta.....</b>	<b>100</b>
<b>4.2</b>	<b>Registro nutricional de los nadadores.....</b>	<b>101</b>
<b>4.3</b>	<b>Resultados estadísticos.....</b>	<b>103</b>
4.3.1	Presión Arterial Sistólica (PaS) y Diastólica (PaD) .....	104
4.3.2	Frecuencia Cardíaca (FC).....	105

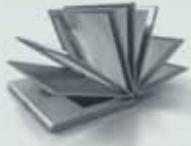
4.3.3 Velocidad (m/s) .....	106
4.3.4 Lactecimia.....	107
4.3.5 Hemoglobina (g/ml) .....	108
4.3.6 Hematocrito (%) .....	109
<b>4.4 Resultado de los marcadores de estrés oxidativo.....</b>	<b>110</b>
4.4.1 TBARs (nmol/ml).....	110
4.4.2 Hidroperóxidos (nmol/ml).....	111
<b>4.5 Resultados de Daños al ADN (COMET).....</b>	<b>112</b>
<b>4.6 Resultados Antioxidantes Endógenos.....</b>	<b>114</b>
4.6.1 Superoxido Dismutasa .....	114
4.6.2 Catalasa (seg <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ) .....	114
4.6.3 Glutación Peroxidasa (GPX).....	115
4.6.4 Glutathion Reductasa (GRX) .....	116
<b>4.7 Resultados de los antioxidantes no enzimáticos .....</b>	<b>117</b>
4.7.1- Tocoferol.....	117
4.7.2 Retinol.....	117
4.7.3 Coenzima Q <sub>10</sub> .....	118
<b>CAPÍTULO V Discusión y Conclusiones .....</b>	<b>120</b>
<b>5.1 Introducción.....</b>	<b>121</b>
5.1.1 Definición y Caracterización de la Natación.....	121
<b>5.2 Porque entrenamiento en Hipoxia? .....</b>	<b>122</b>
<b>5.3 Características antropométricas de los nadadores estudiados .....</b>	<b>123</b>
<b>5.4 Parámetros fisiológicos de las sesiones de entrenamiento (Ht, Hb, PaS, PaD, lactato).....</b>	<b>125</b>
<b>5.5 Parámetros de Estrés Oxidativo .....</b>	<b>135</b>
5.5.1 TBARS e Hidroperóxidos (Normoxia) .....	135
5.5.2 TBARS e Hidroperóxidos (Hipoxia).....	137
<b>5.6 Marcador de daño al ADN celular (COMET ASSAY).....</b>	<b>140</b>
<b>5.7 Antioxidantes.....</b>	<b>141</b>
<b>5.8 Conclusiones.....</b>	<b>143</b>
<b>CAPÍTULO VI Bibliografía.....</b>	<b>145</b>



# CAPÍTULO I Justificación y Objetivos



	11/11/2010	12/11/2010	13/11/2010	14/11/2010
Mean Price	10.77 (1.23)	11.24 (1.41)	11.61 (1.59)	11.98 (1.76)
Mean Production	10.77 (1.23)	11.24 (1.41)	11.61 (1.59)	11.98 (1.76)
Mean Profit	10.77 (1.23)	11.24 (1.41)	11.61 (1.59)	11.98 (1.76)
Mean Risk	10.77 (1.23)	11.24 (1.41)	11.61 (1.59)	11.98 (1.76)



## **1.1 Justificación**

La búsqueda de la perfección y alcanzar los mejores resultados posibles es una constante en el ámbito del deporte de rendimiento. Los entrenadores e investigadores utilizan los últimos conocimientos multidisciplinares que les permitan maximizar el rendimiento de una forma saludable. Para alcanzar estos objetivos, integran técnicas innovadoras como son: tecnología de nuevos materiales, conocimientos fisiológicos y biomecánicos y métodos de entrenamiento contrastados, entre los que destacan el entrenamiento en hipoxia.

La Universidad de Granada (UGR) es un Centro referente en la realización de investigaciones relacionadas con la altitud. Ello se debe a que la ciudad está ubicada a los pies de Sierra Nevada, en donde se localiza el Centro de Alto Rendimiento Deportivo (CARD). Este es un Centro de entrenamiento ubicado a 2320m de altitud sobre el nivel del mar, reconocido internacionalmente, y en donde equipos de élite de diferentes especialidades deportivas y países vienen con el objetivo de mejorar su preparación e incrementar su rendimiento a nivel del mar. El CARD ofrece modernas instalaciones y laboratorios bien equipados. La existencia de convenios de colaboración entre ambas instituciones facilita y favorece la realización de trabajos y proyectos de gran interés en el ámbito del rendimiento deportivo. Esta razón, unida al interés que actualmente despierta el estudio del entrenamiento en altitud, ha promovido la realización del presente estudio.

Actualmente son numerosos los investigadores que analizan la eficacia de los métodos de entrenamiento en altitud. Tienen claro los objetivos concretos requeridos por los entrenadores cuando someten sus atletas de alto rendimiento a uno de esos métodos: mejorar la capacidad de transporte de oxígeno e incrementar el rendimiento a nivel del mar (Charles y cols., 2008; Pialoux, 2006; Meeuwsen y cols., 2001). Sin embargo los resultados logrados a posteriori, a nivel del mar y tras utilizar de este método, siguen siendo controvertidos sobre todo por los posibles efectos negativos que podrían derivar a los deportistas.

Gran parte de los equipos de diversas disciplinas, planifican su estancia en altitud incluyendo una fase de aclimatación, pero es frecuente observar como algunos de ellos lo hacen por corto periodo de tiempo e incluso con subidas súbitas para entrenar y volver a nivel del mar. En estos casos no solo no se tiene en cuenta la fase de aclimatación sino que tampoco se ajustan las cargas de intensidad para este periodo específico. Según Schmitt y cols. (2006), la planificación del entrenamiento en altitud sigue siendo muy específico y cualquier error en volumen y/o intensidad puede causar fatiga a largo plazo e incluso retrasar o eliminar los efectos positivos de la exposición a altitud. A ello hay que sumar que aun hay pocos estudios que integren el impacto de la hipoxia sobre marcadores de daño celular como consecuencia del triple estrés al que los atletas son sometidos: estrés ambiental, estrés físico por la práctica deportiva y estrés oxidativo.

## 1.2 Objetivo general

Nuestro estudio pretende profundizar en estas situaciones, cada vez más frecuentes y consistentes en la realización de sesiones puntuales de entrenamiento en altitud e integrando marcadores fisiológicos de esfuerzo con marcadores de estrés oxidativo.

Partimos de la hipótesis de que una actividad física en ambientes hipóxicos moderados, a una carga dada, requiere mayor trabajo metabólico y mecánico, a lo que habría que sumar por la presión parcial de oxígeno y los condicionantes físicos, un estrés oxidativo añadido.

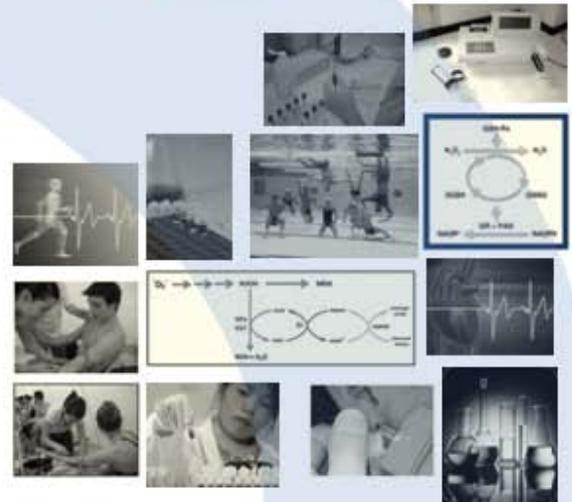
El objetivo general de este estudio es contrastar la hipótesis de partida, integrando parámetros fisiológicos de rendimiento con marcadores de estrés oxidativo.

Para ello hemos diseñado un protocolo experimental consistente en la realización de tres sesiones de entrenamiento de 90 minutos, de intensidades baja, intermedia y elevada, a las dos altitudes sobre el nivel del mar utilizadas por muchos atletas que visitan Sierra Nevada:

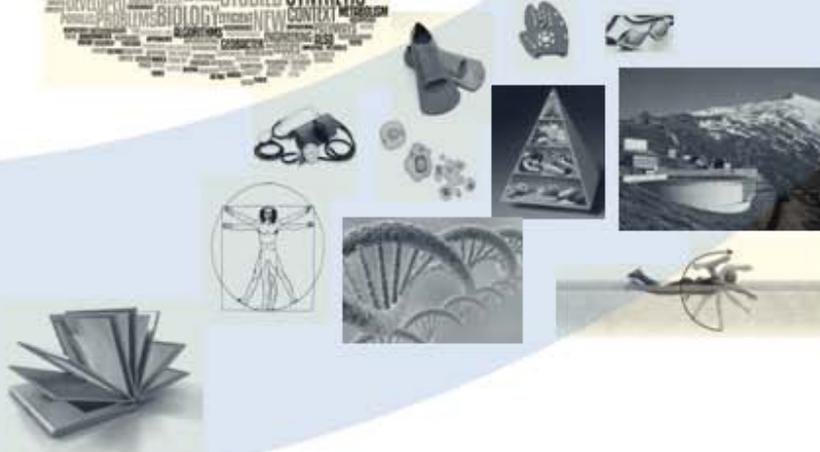
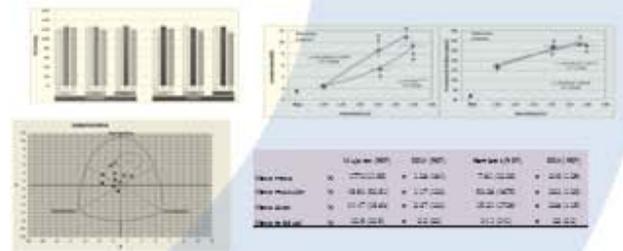
- Piscina de las instalaciones deportivas de la Universidad de Granada (630m – Normoxia),
- Piscina de las instalaciones del CARD de Sierra Nevada (hipoxia moderada – 2320m).

### **1.3 Objetivos específicos**

1. Constatar si la misma carga/intensidad de entrenamiento, los atletas requieren más trabajo metabólico y mecánico en altitud moderada;
2. En caso de que se cumpla el supuesto anterior, diseñar un sencillo método, basado en la dinámica de la frecuencia cardiaca y lactato en sangre, que nos permitan ajustar las intensidades de entreno en hipoxia moderada.
3. Mediante el análisis de marcadores de estrés oxidativo en sangre, comprobar si la actividad física en hipoxia aguda moderada supone un estrés añadido que pudiera estar relacionado con el primer objetivo. Asimismo de su posible relación con la instauración de mecanismos adaptativos genéricos relacionados con la altitud.



## CAPÍTULO II Antecedentes Bibliográficos



## 2.1 Radicales Libres

### 2.1.1 Teoría de los Radicales Libres

Los Radicales Libres son moléculas/átomos que contienen uno o más electrones desapareados y pueden existir de forma independiente. Los átomos en general poseen electrones asociados en pares, cada par se mueve en un espacio alrededor de su núcleo definido como orbita atómico/molecular. Los electrones de cada par tienen espines de números cuánticos, uno  $^{+1/2}$  y otro  $^{-1/2}$ . Cuando los electrones se encuentran en espines opuestos, su estado electrónico se llama singlete o estado fundamental, cuando se encuentran en mismo espín su estado es triplete, pero si moléculas singlete absorben energía sin cambio de espín, su estado molecular es un “estado singlete excitado”. Los Radicales Libres pueden ser generados como producto de reacciones homolíticas, heterolíticas o redox. Especies Reactivas derivadas del Oxígeno (EROs), es un término general que no se refiere solo al oxígeno, sino también a derivados que no son radicales en sentido estricto, pero que se originan de radicales o bien dan lugar a ellos (ej., peróxido de hidrógeno), (Powers & Jackson 2008).

La teoría de los radicales libres fue sugerida por Denham Harman en 1956, y establecía que la producción de radicales libres durante la respiración aerobia causaba acumulo de daños oxidativos provocando el envejecimiento y muerte. Esta teoría fue reforzada 1969 con la identificación de la enzima

superóxido dismutasa (SOD) como indicador de la generación de iones superóxido y actuando como antioxidante (Beckman y Ames 1998).

La formación de los radicales libres está directamente relacionada con los fenómenos de óxido-reducción. El Oxígeno ( $O_2$ ) es esencial para la vida de los organismos aerobios, paradójicamente también es una constante amenaza, por ser una molécula receptora de electrones durante la oxidación de sustratos energéticos. Los mecanismos de formación de los radicales libres parten de la adición o la pérdida de un electrón de la última capa de la molécula, a partir de la ruptura de una molécula estable formada por dos fragmentos en forma equilibrada, provocada por la oxidación de sustratos energéticos, por organismos aerobios así como por diferentes reacciones enzimáticas (Finaud y cols., 2006; Beckman y Ames, 1998).

Los radicales libres y sustancias relacionadas son responsables de la acción nefasta sobre la integridad y funcionalidad de la célula. Por otro lado, a bajas concentraciones, juegan un importante papel en mecanismos fisiológicos como: señalización celular; mediación de reacción inflamatoria; regulación de expresión de algunos genes y potenciación de los mecanismos de defensas orgánicas, ya que son parte del arsenal de armas letales leucocitarias y de la modulación en la producción de fuerza músculo esquelética, (Ferreira y cols., 2007; Powers & Jackson, 2008).

### 2.1.2 Clasificación de los Radicales Libres

Los radicales libres son producidos por transferencia de electrones que requieren alta aportación de energía y tienen una vida media de corta duración.

Cuando reaccionan con otros radicales o moléculas pueden formar un nuevo radical. En la tabla 1, se muestra la clasificación y efectos de los radicales libres.

**Clasificación de los Radicales Libres**

Abreviaturas	Radical Libre	Clasificación	Principales Efectos	
$^1\text{O}_2$	Oxígeno singlete	Especie Reactiva del Oxígeno	Oxidación lipídica y peroxidación	
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Ión superóxido		Oxidación proteica	
$\text{OH}\cdot$	Radical hidróxilo		Daño al ADN	
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrógeno			
$\text{RO}\cdot$ y $\text{ROO}\cdot$	Radicales alcoxi y peroxi			
$\text{ROOH}\cdot$	Radical hidroperóxilo			
$\text{HOCl}$	Ácido hipocloroso			
$\text{NO}\cdot$	Óxido nítrico	Especie Reactiva del Nitrógeno	Peroxidación lipídica, Oxidación proteica	Daño al ADN
$\text{NO}_2$	Dióxido nítrico			
$\text{ONOO}^{\cdot-}$	Peróxido nítrico			
$\text{RS}\cdot$	Radicales tiol	Especie Reactiva del Azufre	Oxidación proteica,	Daño al ADN Producción de EROs

Tabla. 1-Clasificación de los Radicales Libres (modificada de Finaud y cols., 2006)

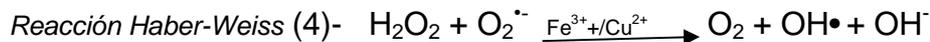
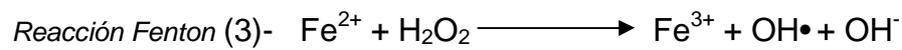
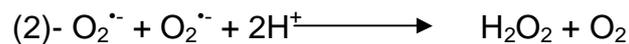
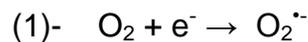
### 2.1.2.1 Anión Superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )

Radical primario, altamente reactivo, que es creado por la adición de un electrón a la molécula de oxígeno (reacción 1). Puede reaccionar rápidamente con otros radicales como: óxido nítrico (NO) y con hierro (Fe)-azufre (S) de proteínas.

Actualmente se debate la posibilidad de que la protonación del radical superóxido para formar radical hidroperóxilo ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ), a pH fisiológico, facilita la transferencia de este radical a través de membranas. Como especie activa redox, los superóxidos pueden reducir algunas moléculas biológicas (ej. citocromo c) y oxidar a otros como el ascorbato. La dismutación del radical superóxido, tanto de forma espontánea como catalizada por la SOD, son

importantes fuentes de peróxido de hidrogeno en las células (reacción 2), (Powers y Jackson, 2008).

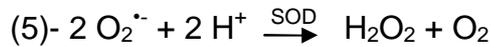
En presencia de hierro (reacción Fenton-3), se puede generar radical hidroxilo, caracterizado por su elevada reactividad. Cuando no son neutralizados por las enzimas antioxidantes, dañan la membrana de la mitocondria y retarda el proceso oxidativo de respiración mitocondrial. Ambos fenómenos ocasionan el envejecimiento mitocondrial. El  $Fe^{3+}$  puede ser nuevamente reducido a  $Fe^{2+}$ , bajo la acción del  $O_2^{\cdot-}$  (reacción de Haber-Weiss - 4), (Finaud y cols., 2006),



### 2.1.2.2 Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )

Es un compuesto reactivo, estable, permeable a las membranas y que tiene vida media larga dentro de la célula. El peróxido de hidrogeno es incapaz de oxidar el ADN o lípidos directamente, aunque que puede inactivar algunas enzimas. Se forma por la acción catalítica de la SOD (reacción 5). Aunque no es un radical libre propiamente dicho por no poseer un electrón desapareado, es considerado Especies Reactivo del Oxigeno (ERO), por su capacidad toxica y su participación en la formación de otros ERO. En reacciones catalizadas por metales, como la reacción Fenton (reacción 6), el  $H_2O_2$  se puede descomponer

en un ión  $\text{OH}^\bullet$ , el mayor reactivo tóxico de entre las ERO (Finaud y cols., 2006; Powers y Jackson, 2008).



### 2.1.2.3 Radical Hidróxilo ( $\text{OH}^\bullet$ )

Producto final de la reacción Fenton, es un radical altamente reactivo y tóxico, de fuerte potencial oxidante, no permeable a membrana y que produce peroxidación lipídica y oxidación de las proteínas. (Finaud y cols., 2006).

### 2.1.2.4 Oxígeno Singlete

Es una forma reactiva del oxígeno electrónicamente excitado, no es un radical (por no poseer electrones desapareados), es permeable a la membrana y tiene una muy corta vida media. Se presenta en dos estados: estado excitado ( $^1\Delta\text{gO}_2$ ), ó estado reactivo más excitado ( $^2\Sigma\text{gO}_2$ ), lo que hace que su capacidad de oxidación sea muy elevada. Por otra parte, la dismutación del ión superóxido en agua puede conducir a la formación de oxígeno singlete en los sistemas biológicos (Powers & Jackson, 2008).

### 2.1.2.5 Especies radicalarias secundarias

La acción de los radicales libres sobre las moléculas biológicas, pueden producir en las células otras especies de radicales libres. Entre estas especies de radicales secundarios podemos incluir los radicales intermedios formados durante la peroxidación lipídica (ej. degradación oxidativa de lípidos poli

insaturados). La bicapa fosfolipídica es la estructura básica de toda membrana biológica y está compuesta por fosfolípidos esterificados con ácidos grasos, siendo en su mayoría ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), proteínas y carbohidratos. La peroxidación de PUFAs como es el caso del ácido araquidónico ocurre en varias etapas. El radical hidroxilo inicia la peroxidación lipídica por extracción de un átomo de hidrogeno de un lado de la cadena del carbono metileno, iniciando la formación de un carbono central, radical lípido y agua. Este carbono central del radical lípido, tiene un electrón desapareado y la molécula se estabiliza por reordenamiento molecular, es decir, dos radicales lípidos pueden entrecruzarse y formar un dienoconjugado o generalmente, el radical lípidico dona un electrón al oxígeno, formando el radical peróxilo ( $\text{LOO}\bullet$ , donde L = ácido graso poli insaturado) e iniciar la propagación de una reacción en cadena. La Peroxidación lipídica (figura II.1), puede producir la degeneración de la estructura de la membrana (alterar la fluidez y aumentar la rigidez) y bajar las funciones de las proteínas (como disminución de la velocidad del flujo del transporte acoplado al ATP y ADP) (Powers y Jackson, 2008).

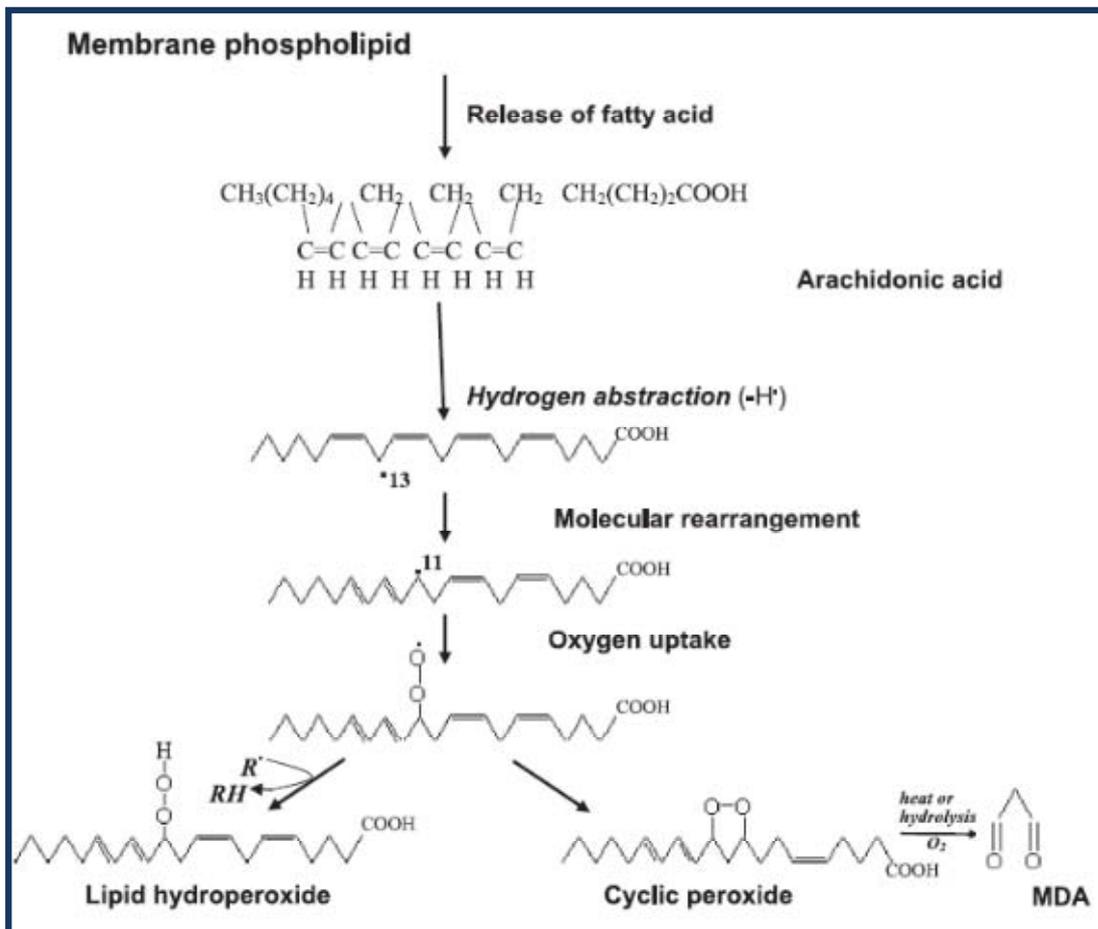


Figura. II.1- Membrana Fosfolipídica, tomada de Powers & Jackson (2008)

### 2.1.3 Generación del Radical Libre

Nuestro organismo frecuentemente produce radicales libres, los cuales no deberían ser una amenaza, ya que el mismo organismo produce sus defensas para mantener el equilibrio homeostático. El problema está en la ruptura de este equilibrio, por diversas situaciones.

Hay varias fuentes de producción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, (ERON), que son continuamente producidas de forma exógena por: exposición a polución ambiental, ingesta excesiva de nutrientes, tabaquismo, alcohol, actividad física, o en cualquier situación en la que aumente el consumo de oxígeno y pueda por tanto producirse un estado agudo de estrés oxidativo. (Fisher-Wellman y Bloomer, 2009; Finaud y cols., 2006).

Dentro de las numerosas situaciones de generación endógena de oxidantes a nivel celular expondremos las más importantes:

### 2.1.3.1 Cadena de transporte de electrón

#### La mitocondria

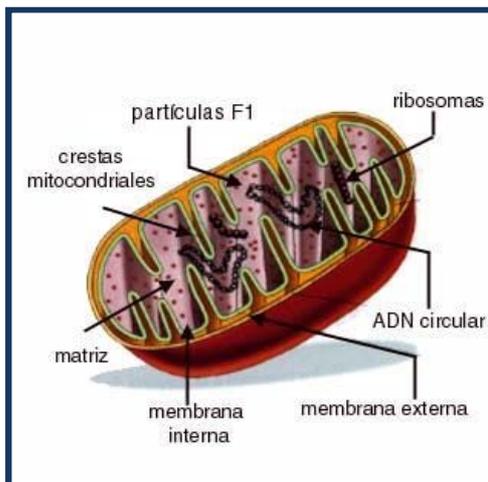
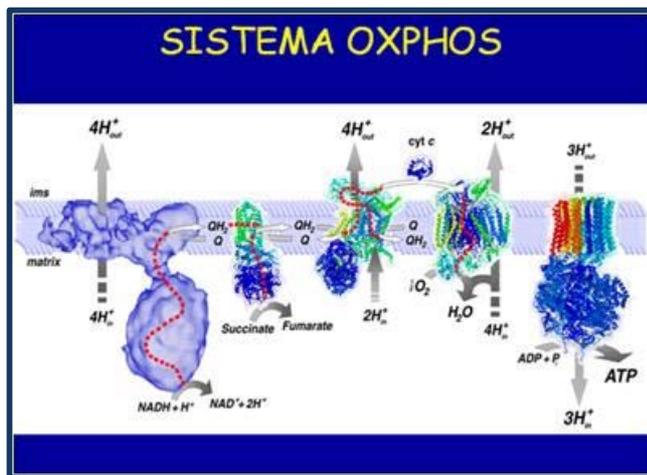


Figura. II.2- La mitocondria

La mitocondria es conocida como la mayor generadora de radicales libres debido al consumo del oxígeno en su función de la producción de ATP (adenosin trifosfato), por la fosforilación oxidativa (figura II.2) (Fisher-Wellman y Bloomer, 2009; Powers y Jackson, 2008; Finaud y cols., 2006).

En la célula, la mitocondria es un orgánulo clave en la producción de energía y también, de forma paralela en la generación de radicales libres. Tiene un funcionamiento autónomo, capacidad de replicarse independiente de la reproducción celular por posee su propio mt ADN (ácido desoxirribonucleico mitocondrial) que regula el funcionamiento autónomo mitocondrial y la codificación genética de sus diferentes estructuras.

La mitocondria tiene como principal función la síntesis de ATP a través del transporte de electrones y de la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Además posee los enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), del catabolismo

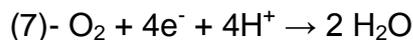


de ácido grasos ( $\beta$ -oxidación) y también ejercen un importante papel en la inhibición o ejecución de la apoptosis, es decir arbitran en la vida o muerte de la célula de los mamíferos (Figura II.3).

Figura. II.3- Cadena de Transporte de Electrón (CTE)

Dos de los procesos fundamentales que se realizan en la

mitocondria son el ciclo de Krebs y la cadena de transportes de electrones que utiliza el oxígeno como aceptor de electrones. Del 95% al 99% del oxígeno consumido en la cadena respiratoria son reducidos a agua por la reducción tetravalente (ecuación-7 abajo descrita), catalizada por la coenzima Q (CoQ) (Finaud y cols., 2006).



Según (Hsin-Chen Lee y Yau-Huei Wei, 2005), alteraciones a nivel intracelular de especies reactivas del oxígeno (EROs), se asocian con cambios en la abundancia de las mitocondrias. Las mitocondrias, al sufrir daños inducidos por excesiva exposición al estrés ambiental, o envejecimiento, se activan para incrementar la producción de la energía necesaria y poder reparar los daños de los componentes celulares. En esta situación, se incrementa el

número de copias del ADN y la expresión de los genes de las vías respiratorias. Cuando los daños son reparados, vuelven a retomar un ciclo celular de crecimiento normal. Sin embargo, cuando la tasa de generación de EROs, es excesiva y los daños sobre estructuras mitocondriales son elevados y no pueden ser reparados (daños oxidativos de componentes intracelulares como el ADN, ARN, proteínas y lípidos), puede inducir a la célula a entrar en proceso de apoptosis.

Según Beckman y Ames (1998) el sistema mitocondrial de transporte de electrones, responsables de la reducción de  $O_2$  a  $H_2O$ , está formado por envuelve 4 complejos multienzimáticos dependientes de un apropiado entorno lipídico. Sin embargo el transporte de electrones mitocondrial no es 100 % eficiente, y en varios puntos se puede producir una reducción monovalente del  $O_2$  y producir  $O_2^{\bullet}$ . Seguidamente, parte del radical superóxido formado, puede sufrir una dismutación por la SOD para formar  $H_2O_2$ , significativo subproducto de la secuencia de reacciones oxidación/ reducción mitocondrial.

En la figura II.4, se muestran los dos lugares de mayor producción de EROs, complejo I y complejo III.

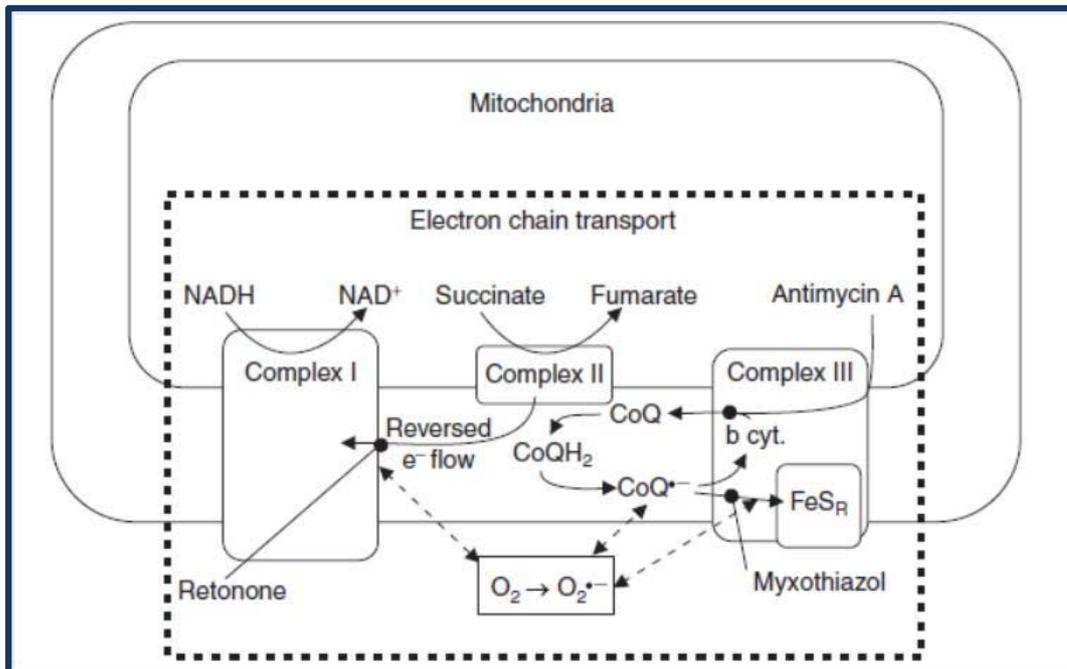


Figura. II.4- Posible localización de formación de EROs mitocondrial dentro de la CTE. b cyt= citocromo b; CoQ= coenzima Q; CoQH<sub>2</sub>= coenzima Q<sub>10</sub> reducida; CoQ•= coenzima Q<sub>10</sub> oxidada; FeSR= proteína hierro-azufre; NAD<sup>+</sup>= nicotinamida-adenina dinucleotideo oxidado; NADH= nicotinamida-adenina dinucleotideo reducido; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>= ion superóxido. Tomada de Finaud et al (2006)

Powers y cols., (2011) en un estudio reciente difieren de lo que hasta ahora se ha considerado respecto a la génesis mitocondrial del radical superóxidos, aspectos que serán discutidos en capítulos siguiente donde relacionamos estrés oxidativo y ejercicio.

### 2.1.3.2 Metabolismo de los ácidos grasos peroxisomal

En la oxidación de los ácidos grasos, se genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como subproducto. Los Peroxisomas poseen alta concentraciones de catalasa, lo que no queda claro es si la filtración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> desde los peroxisomas contribuyen significativamente al estrés oxidativo citosólico en condiciones normales.

### 2.1.3.3 Reacción citocromo P450

Es un complejo multienzimático cuya oxidasa final es una hemoproteína denominada citocromo P450 (CYP). Este sistema se encuentra presente en diferentes tejidos como el riñón, pulmón, piel, intestino, corteza adrenal, testículos, placenta y otros, pero es particularmente activo en el hígado. Además de participar en el metabolismo de sustratos de naturaleza exógena como drogas, pesticidas, procarcinógenos, anestésicos, solventes orgánicos, etc., participa en el metabolismo de sustratos endógenos de importancia biológica como colesterol, ácidos biliares, hormonas esteroidales y ácidos grasos. En los mamíferos, el CYP se encuentra presente en la mitocondria y en diversos tipos de membranas celulares, siendo particularmente abundante en el retículo endoplásmico liso (microsomias). La denominación citocromo P450 proviene de la característica de que esta hemoproteína en su forma reducida y unida a monóxido de carbono, presenta un máximo de absorbancia a los 450 nm. Existen evidencias de que en su mecanismo de acción se generarían especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), además del radical libre sustrato ( $R^{\bullet}$ ) que al unirse a un radical hidroxilo, generaría finalmente el producto hidroxilado (ROH) (Beckaman y Ames, 1998).

### 2.1.3.4 Fagocitosis celular

Durante la fagocitosis, en fagosomas se genera una mezcla de oxidantes y radicales libres, incluyendo  $O_2^{\bullet}$ ,  $H_2O_2$ ,  $NO^{\bullet}$  e hipoclorídricos. La generación de oxidantes por diferentes células inmunes a partir de las 3

fuentes de radicales libres, está en función de la magnitud de la patogénesis, es una inmunidad innata normal e inevitable (Beckaman y Ames, 1998).

#### 2.1.3.5 *Xantina Oxidasa (XO)*

Enzima responsable de la conversión de la hipoxantina a xantina y ésta en ácido úrico. En situaciones homeostáticas actúa como una deshidrogenasa utilizando  $\text{NAD}^+$  como receptor de hidrogeno, pero en situaciones de isquemia/reperfusión o durante el ejercicio físico exhaustivo, la XO puede convertirse en una oxidasa oxígeno-dependiente, utilizando el oxígeno adyacente como receptor de electrones, y generando radical superóxido.

#### 2.1.3.6 *Fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) muscular*

Ubicada en el sarcolema de diferentes orgánulos, en el sarcoplasma y en el interior de los lisosomas, utiliza los fosfolípidos de las membranas para síntesis de ácido araquidónico, sustrato para la acción de la ciclo-oxigenasa y de la lipo-oxigenasa, para la formación de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos. La producción de ERO por la actividad de la PLA<sub>2</sub> es particularmente acentuada por el ejercicio físico (Galván y cols., 2008).

Powers y cols. (2011), apuntan en recientes estudios que las formas de PLA<sub>2</sub> calcio independiente, fueron más determinantes para la actividad de la ERO en condiciones de reposo, mientras que durante la contracción muscular, el estrés por el calor u otros procesos que incrementen el calcio intracelular, la actividad de la PLA<sub>2</sub> calcio dependiente en la producción de EROs es superior.

## **2.2 Sistema de Defensas Antioxidantes**

### 2.2.1 Definiciones

El oxígeno es esencial para la vida del ser humano, para la obtención de energía. Sin embargo, y debido al potencial tóxico del oxígeno, se hacen necesarios sistemas de defensa antioxidante para proteger y mantener la supervivencia celular de los tejidos frente a los efectos negativos de los EROs. El antioxidante tiene la capacidad de ceder un electrón de hidrogeno a un radical libre para dejarlo estable, sin transformarse en moléculas inestables.

Finaud y cols., (2006) definen los antioxidantes como sustancias que ayudan reducir los efectos negativos del estrés oxidativo, bien por la formación de un radical menos activo o por frenar la cadena de interacciones de radicales libres sobre sustratos como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y ADN. Para Galván y cols. (2008), los antioxidantes son cualquier sustancia que a bajas concentraciones y en presencia de un sustrato oxidable, retrasa, previene la oxidación del mismo, inhibiendo la tasa de oxidación.

Los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos trabajan en conjunto y de forma organizada en diferentes sitios (fibras musculares, orgánulos, mitocondria, espacios extracelular y vascular, etc.) con el objetivo de proteger la célula del daño oxidativo durante el aumento de producción de EROs. Para esto, utilizan diferentes estrategias como: convertir los EROs en moléculas menos reactivas y evitar que se transformen en formas más perjudiciales,

minimizando la disponibilidad de pro-oxidantes como hierro y cobre (Powers y Jackson, 2008).

### 2.2.1.1 Clasificación de los antioxidantes

Los antioxidantes pueden ser clasificados siguiendo varios criterios: función y acción predominante (antioxidantes de prevención, de intercepción y de reparación), localización orgánica (intracelulares y extracelulares) y su origen (antioxidantes exógenos provienen de la dieta o antioxidantes endógenos de síntesis endógena) (tabla II.2).

Antioxidantes Exógenos	Antioxidantes Endógenos	
	Extracelulares	Intracelulares
<b>Prevención</b>	<b>Prevención</b>	<b>Prevención</b>
Zinc Selénio	Albumina Bilirrubina Ceruloplasmina Ferritina	Glutation Peroxidasa Superóxido Desmutasa Catalasa Glutation Reductasa
<b>Intercepción</b>	Mioglobina Haptoglobina	<b>Intercepción</b>
ácido Ascórbico Alfa-tocoferol Carotenos		Glutation Ácido Úrico Coenzima Q
		<b>Reparación</b>
		Metaloenzimas

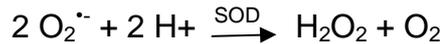
Tabla. II.2- Esquema de antioxidantes según origen, localización y mecanismos de acción. Modificada de Ferreira et al (2007).

### 2.2.2 Antioxidantes Enzimáticos

Los enzimáticos son proteínas de bajo peso molecular, que minimizan el daño oxidativo al catalizar las reacciones químicas y eliminar los radicales libres en células y tejidos. Pueden ser sintetizados por la activación redox de genes específicos, principalmente porque afectan a la unión de factores de transcripción en el ADN (Berzosa y cols., 2011).

### 2.2.2.1 SOD - Superóxido Dismutasa

La SOD está en la primera línea de defensa frente el estrés Oxidativo. Constituye un grupo de enzimas que catalizan la dismutación del radical superóxido, transformándolo en oxígeno y peróxido de hidrógeno.



En mamíferos se expresan tres isoformas: SOD1, SOD2, SOD3 y todas exigen una activación redox de los metales de transición en el sitio activo, para su actividad catalítica sobre el anión superóxido (tabla II.3). SOD1 requiere cobre-zinc como cofactor y está ubicado en el citosol y en el espacio intermembrana de la mitocondria. SOD2 usa magnesio como cofactor y se encuentra en la matriz mitocondrial y SOD3 utiliza cobre-zinc y está localizado en el espacio extracelular, Powers y Jackson, 2008).

Propiedad	SOD 1	SOD 2	SOD 3
Localización celular	Citosol y mitocondria IMS	Matriz mitocondrial	Extracelular
Metal/monomero	1 Cu, 1 Zn	1 Mn	1 Cu, 1 Zn
Masa molecular, Kda	32.5	24.7	30
Subunidad	Dímero	Tetrámero	Tetrámero
Inhibición por CN <sup>-</sup>	Sí	No	Sí
Inhibición por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sí	Sí	Sí
Tasa de velocidad para reacción con O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0.62 x 10 <sup>9</sup>	1.2 x 10 <sup>9</sup>	0.72 x 10 <sup>9</sup>

Tabla. II.3-Propiedades de las isoformas SOD en humanos. Tomada de Powers y Jackson (2008).

La actividad total de la SOD en músculo es inferior a la del hígado y riñones, semejante a la del cerebro, corazón y páncreas y superior a la de los eritrocitos. En el musculo esquelético, del 15 a 35% de la actividad total está localizada en las mitocondrias y el restante (65 a 85%) en el citosol. La capacidad total de esta enzima varía con las características histoquímicas del musculo-esquelético, siendo los músculos con mayor porcentaje de fibras

oxidativas los que poseen más cantidad de esta enzima. (Ferreira y cols., 2007).

#### 2.2.2.2 CAT - Catalasa

Enzima ferropofirínica intracelular, está presente en la mayoría de las células de organismos aerobios, particularmente en peroxisomas (80%) y citosol y en bajas concentraciones o ausente en el plasma. Actúa convirtiendo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>.



La Catalasa también puede utilizar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con el fin de eliminar algunas sustancias a través de una reacción de la peroxidasa. Esta reacción necesita un sustrato, tal como fenol, alcohol (etanol) o ácido fórmico. Tiene menos afinidad con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a bajas concentraciones comparado con la GPX.



#### 2.2.2.3 GPX - Glutathion Peroxidasa

Se localiza en las mitocondrias y en el citosol, aproximadamente en un 55% y 45% respectivamente, del músculo esquelético. Posee una localización próxima a las diversas fuentes de generación de hidroperóxidos, siendo uno de los principales neutralizadores de estas especies moleculares. Su correcto funcionamiento depende de la presencia de selenio en su constitución.

Su función es transformar hidroperóxidos en agua, usando glutathion reducido (GSH) para formar glutathion disulfuro oxidado (GSSG).



Según (Powers y Jackson, 2008), son numerosos los estudios que confirman que el entrenamiento de resistencia aumenta la actividad de la GPX en el músculo esquelético tanto en citosol como en mitocondrias.

#### 2.2.2.4 GR - Glutation Reductasa

Es una flavoproteína, que no posee características antioxidantes directas, aunque es muy importante para el mantenimiento de poder reductor requerido en los procesos de óxido-reducción. Catalizan la reducción del NADPH que aprovecha para pasar GSSG a GSH, por lo que es esencial en el mantenimiento de los niveles óptimos de glutatión reducido.

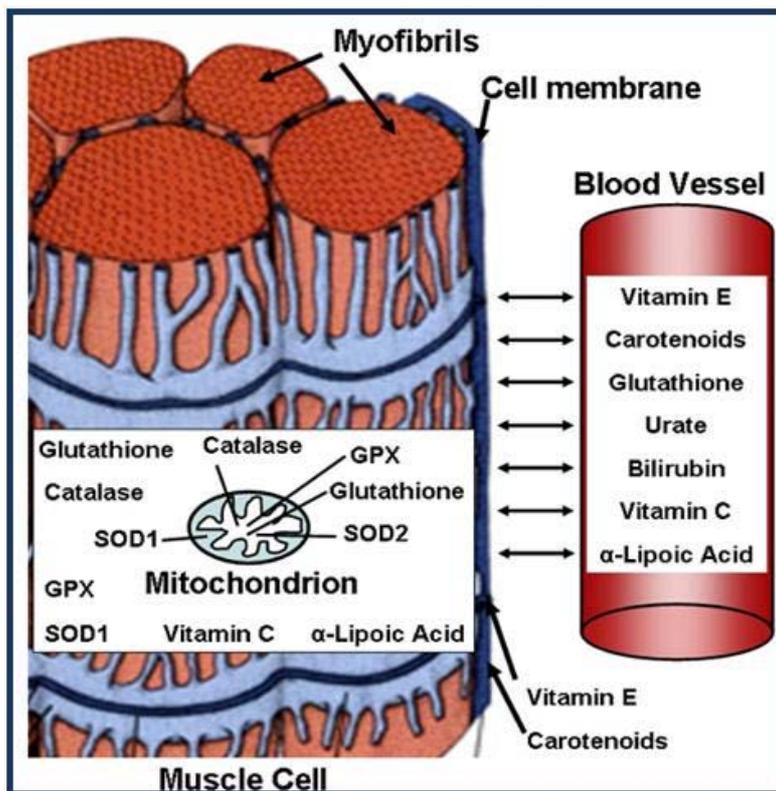


Figura. II.5- Lugar específico de la acción de cada antioxidante (enzimático y no enzimático). Tomada de Powers y Jackson (2008).

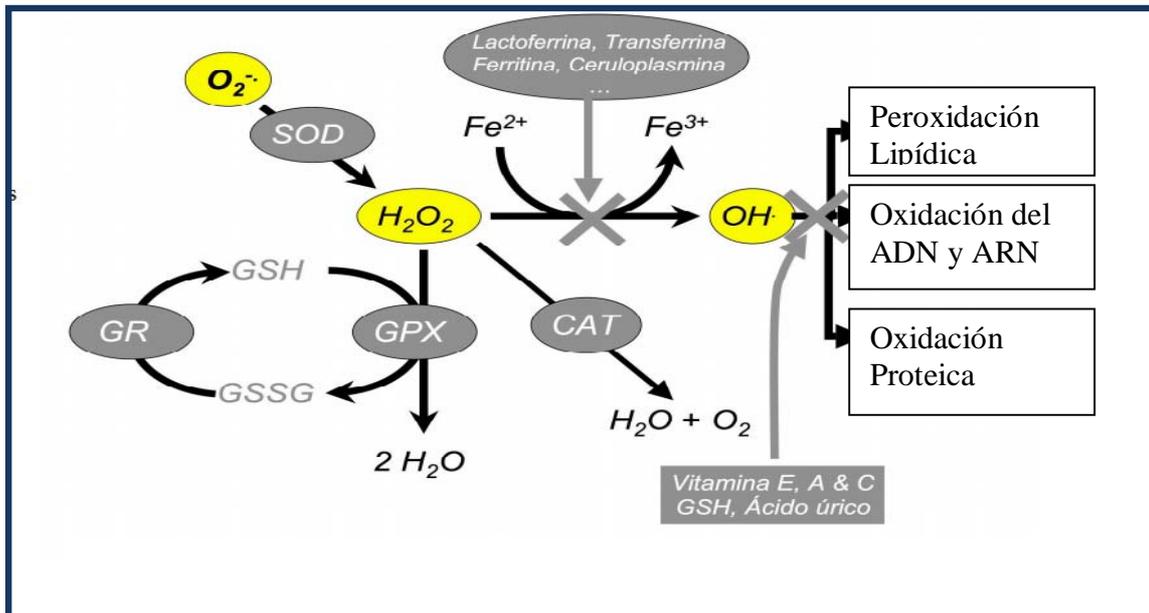


Figura. II.6- Acción de los antioxidantes en los radicales libres. SOD-Superóxido Dismutasa; GR- Glutation Reductasa; GSH y GSSG- Formas reducidas y oxidada de la gulation; CAT- Catalas; ADN-Ácido desoxirribonucleico; ARN- Ácido Ribonucleico. Tomada de Ferreira et al (2007).

En las figuras II.5 y II.6 se observan la localización celular de los antioxidantes y su acción integrada.

### 2.2.3 Antioxidantes No Enzimáticos

Los organismos aerobios poseen, además del sistema de defensas antioxidantes enzimáticos, otras sustancias antioxidantes no enzimáticas, las llamadas lipofílicas (vitaminas E, b-caroteno, ubiquinona y ubiquinol y flavonoides) y las hidrofílicas (vitamina C, y GSH). Todas actúan en la interceptación de las ERO.

#### 2.2.3.1 GSH - Glutation

Principal antioxidante endógeno de carácter no enzimático. Es un compuesto peptídico de la familia de los tioles, muy importantes en las

defensas antioxidantes del miocito, por lo tanto de gran interés durante la actividad física.

Actúa de tres formas:

- a- reaccionando directamente con diferentes radicales libres cediendo electrones;
- b- en la reacción antioxidante, siendo sustrato para la glutatión peroxidasa;
- c- reduciéndose a las formas oxidadas y reciclando otros compuestos como las vitaminas C y E, aumentando así el poder de estos antioxidantes.

Según Fernández y cols. (2009), varios estudios muestran que el contenido muscular de GSH se incrementa en respuesta a la práctica regular de ejercicios de resistencia a alta intensidad (>80%  $VO_{2MAX}$ ).

### 2.2.3.2 Vitamina E (Alfa Tocoferol)

Antioxidante liposoluble muy abundante en la naturaleza, encontrándose en varias formas (alfa, beta, gama y delta), de las que el  $\alpha$  tocoferol es la más activa y abundante. Está presente en el aceite de oliva virgen y es el antioxidante de membrana más eficaz que se conoce. Interviene de diferentes modos: Interacciona con numerosos antioxidantes como: vitamina C, GSH,  $\beta$  caroteno o ácido lipoico; activa la reducción del citocromo C; y reduce el NADH (todavía no está claro su metabolismo en la cadena respiratoria); disminuye la fluidez de la membrana, altera la permeabilidad al fosfato y adicionalmente puede afectar al metabolismo de AMPc, previniendo la peroxidación del ácido araquidónico a prostaglandinas (Galván y cols., 2008).

Otras vitaminas tienen la capacidad de regenerar la vitamina E (glutathion o ascorbato), cuando está en la forma oxidada. La deficiencia de vitamina E aumenta el estrés oxidativo y la fatiga (Finaud y cols., 2007).

#### 2.2.3.3 Vitamina A (Retinol)

Vitamina A es liposoluble y está presente en muchas sustancias lipídicas. Previene la peroxidación lipídica interactuando con los radicales peroxilos. Sus formas activas son el retinol, el retinal y el ácido retinóico, sustancias que se acumulan en el organismo y en altas dosis pueden ser potencialmente tóxicos. Los efectos de la vitamina A se potencian en presencia de vitamina E, este efecto es máximo en una proporción 1:10(retinol:tocoferol), que es precisamente la proporción que mantienen estos compuestos en las membranas de las células biológicas (Niki y cols 1995).

#### 2.2.3.4 Carotenos

Muy abundante en la naturaleza y muy importante en la dieta humana. Al ser liposoluble está presente en membranas celulares. Actúan como agentes fotoprotector frente a los efectos perjudiciales de las radiaciones solares, del propio oxígeno y de los pigmentos fotosensibilizadores (Galván y cols., 2008).

El  $\beta$  caroteno es convertido en vitamina A cuando el cuerpo lo necesita. Todavía su mecanismo de acción no está claro *in vivo*, pero tiende a desactivar las EROs (oxígeno singlete y radicales de lípidos) y reducir la peroxidación lipídica. Aunque menos importante que la vitamina E en el sistema

antioxidante, el  $\beta$ - caroteno y la vitamina A, conjuntamente con las vitaminas C y E protegen las células de las EROs (Finaud y cols., 2006; Frei, 1994).

#### 2.2.3.5 Vitamina C o Acido Ascórbico

La Vitamina C es un compuesto altamente polar, soluble en agua e insoluble en medio lipídico. Es probablemente el antioxidante más importante en fluidos extracelulares y en el citosol. Puede actuar como agente reductor de hidroxilación o reacciones de oxido-reducción, capaz de neutralizar los radicales superóxido, hidroxilo y lipohidroperóxido y formar radical semihidroascorbato, que posteriormente es reducido por el ascorbato. También es capaz de ejercer un papel antioxidante de manera indirecta, mediante la regeneración del alfa-tocoferol (Galván y cols., 2008; Finaud y cols., 2006).

Se requiere para la síntesis de colágeno, de noradrenalina, de carnitina e incluso, algunos estudios sugieren que está implicada en el metabolismo del colesterol a ácidos biliares, lo cual a su vez tiene implicaciones en los niveles de colesterol en sangre (Simon & Hudes, 2000).

La vitamina C protege relativamente a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) contra la oxidación y, por lo tanto, puede disminuir la progresión de aterosclerosis (Frei, 1994).

Altas concentraciones pueden tener efecto prooxidante en presencia de metales de transición como hierro y cobre y conducen a generación de radical hidróxilo, por la reacción Fenton (Frei, 1994; Duracková, 2010).

La figura II.7 muestra las propiedades antioxidantes y el potencial prooxidante del ácido ascórbico.

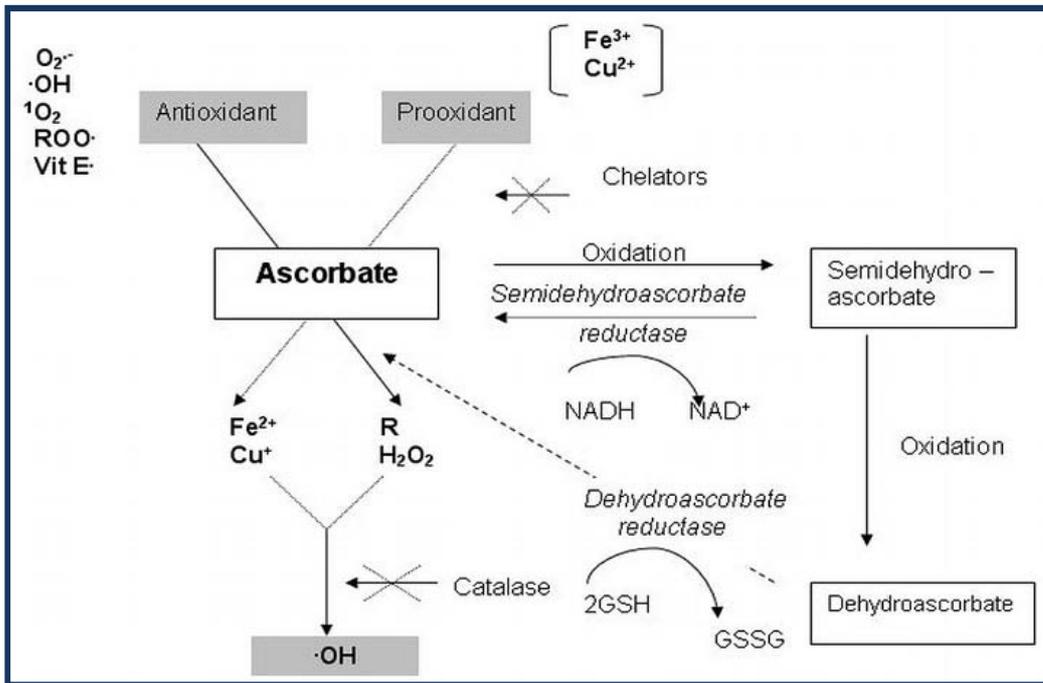


Figura. II.7- Propiedades pro y antioxidantes del ácido ascórbico. Tomada de (Duracková, 2010).

### 2.2.3.6 Coenzima Q<sub>10</sub> (Ubiquinol)

Coenzima Q<sub>10</sub> tiene doble papel en la mitocondria, la primera es ser portador de electrones en la cadena transportadora mitocondrial y la segunda es la de antioxidante, con la capacidad de bloquear la acción de radicales libres y regenerar otros antioxidantes oxidados como la vitamina C y E. (Quiles y cols., 1998).

Además de los efectos beneficiosos de la coenzima Q<sub>10</sub> en enfermedades cardiovasculares, cáncer y en células envejecidas o apoptóticas, actúa como mediador de expresión génica y proteica en músculo. En este caso, la Q<sub>10</sub> actúa como prooxidante dando lugar a O<sub>2</sub><sup>•-</sup> que se convierte en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la SOD. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> actuaría como segundo mensajero en la expresión genética (Finaud y cols., 2006).

### 2.2.3.7 Otros Antioxidantes

Según Galván y cols. (2008), en los últimos años se han descubierto numerosos compuestos antioxidantes, con una acción comprobada *in vitro* aunque no del todo *in vivo*. En plasma podemos enumerar varias moléculas proteicas no enzimáticas como: ceruloplasmina, transferrina, albúmina, haptoglobina y hemopexina. Hay también un grupo de pequeñas moléculas con acción antioxidantes como: el ácido úrico, bilirrubina, licopeno, luteína, zeoxantina, polifenoles, vitamina K entre otros.

## 2.3 Estrés Oxidativo

### 2.3.1 Definición

El Estrés oxidativo fue definido por (Sies, 1985) como la condición de desequilibrio existente entre la acción de prooxidantes (radicales libres) y la de los sistema de defensa antioxidantes, prevaleciendo la acción de los primeros.

En nuestro organismo se producen radicales libres (RL), agentes del estrés oxidativo, de forma natural, procedentes mayoritariamente del proceso de obtención de energía a través de la cadena respiratoria. Es un proceso necesario y continuado, porque vivimos en ambiente oxigenado y oxidante en el que el oxígeno representa el 20% de la atmosfera y es esencial para la vida.

Según (Beckman & Ames, 1998), el  $O_2$  es el más importante oxidante en los organismos aerobios. Posee 2 electrones desapareados en diferentes orbitales moleculares y espines paralelos, como consecuencia acepta los electrones de uno en uno y por lo tanto en presencia de metales de transmisión libre (en especial hierro y cobre), generan  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ . En conjunto puede generar radical hidroxilo (OH), extremadamente reactivo, que se supone es la especie responsable de originar el mayor daño oxidativo sobre las moléculas orgánicas.

Alessio y cols. (1993), definió estrés oxidativo como la acción lesiva de los radicales libres sobre las moléculas orgánicas.

### 2.3.2 Daños oxidativos a las estructuras celulares

Al ser el radical libre una especie altamente inestable, busca su estabilidad por vías de interacciones específicas, principalmente a fosfolípidos de membranas celulares, proteínas y ADN nuclear y mitocondrial.

#### 2.3.2.1 Oxidación de los Lípidos

Fernandez y cols., (2009) definió la peroxidación lipídica como un proceso degenerativo que ocurre en condiciones de estrés oxidativo, dañando las membranas celulares, lipoproteínas y otras estructuras que contienen fosfolípidos insaturados, gluco-lípidos y colesterol.

La peroxidación lipídica lleva a la ruptura de lípidos y formación de una gama de productos oxidativos primarios como, dienos conjugados, hidroperóxidos lipídicos y secundarios como productos de oxidación incluyendo MDA (malonildialdehídos), F2- isoprostano o pentanos, etanos o hexanos expirados. Hay tres etapas en la cadena de reacción de la peroxidación lipídica: iniciación, propagación y terminación. Después del iniciado el proceso oxidativo, éste se propaga hasta que dos radicales libres reaccionan entre sí y de esta forma finalice el proceso. Esto significa que un único evento de iniciación puede desencadenar una amplia reacción de peroxidación lipídica hasta que se agote la disponibilidad de oxígeno y/o de ácidos grasos polinsaturados no oxidados (Gálvan y cols., 2008).

### 2.3.2.2 Oxidación de Proteínas

Las proteínas, por su abundancia en sistemas biológicos, son el mayor objetivo de las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (ERON). Calculándose que pueden ser dianas con el 50-75% del ERON generado (Fisher-Wellman & Bloomer, 2009).

Los daños oxidativos a proteínas pueden ocurrir directamente por interacción con la ERON, o indirectamente por la interacción con productos secundarios (resultado de una interacción de un radical con un lípido o una molécula de azúcar). Los EROs, producen alteraciones en varias regiones de la proteína, conllevando a modificaciones en su estructura, agregaciones intra e intercatenarias y fragmentación proteica.

La modificación de la proteína causa la formación de grupos carbonil dentro de la cadena de aminoácidos. Las proteínas oxidadas se catabolizan con el fin de reciclar aminoácidos, pero el sub producto carbonil no puede entrar en este proceso, por lo tanto, inducen un bloqueo de la proteólisis y una acumulación de proteínas oxidadas. La renovación de proteínas, la transcripción genética y la integridad celular se redujo en situaciones de estrés Oxidativo. Los EROs también tienen la capacidad de alterar el sistema lisosomal y de proteasomas, dos vías principales por las cuales las proteínas se degradan. Los aminoácidos más frecuentemente alterados son la histidina, la prolina, la lisina y la arginina. La vulnerabilidad de la proteína ante la acción de EROs, depende por tanto de su composición aminoácidica y de la accesibilidad de las especies oxidantes a los aminoácidos más reactivos Las proteínas pueden ser oxidadas durante situaciones proinflamatorias, ejercicio

físico o isquemia-reperfusión (Finaud y cols., 2006; Fisher-Wellman & Bloomer, 2009; Gálvan y cols., 2008).

### 2.3.2.3 Oxidación del ADN

La actuación de EROs sobre el ADN, produce un aumento del número de mutaciones, entrecruzamientos, roturas en las cromátidas o pérdidas de fragmentos cromosómicos, dando lugar a la fragmentación y modificaciones oxidativas en las bases púricas y pirimídicas (Gálvan y cols., 2006).

Finaud y cols. (2006), observaron que los EROs son los causantes mayoritarios de las roturas del ADN. El sistema de reparación del ADN es continuo, pero esta capacidad se puede ver desbordada, oxidando el ADN e incrementando la mutagénesis. Esto contribuiría en la aparición de algunos tipos de cáncer y acelerando el envejecimiento celular. Diferentes fuentes de daño al ADN son resultado de: tabaquismo, inflamaciones crónicas y envejecimiento de la mitocondria que aumenta con el ejercicio físico.

## 2.3.3 Estrés oxidativo y el ejercicio

### 2.3.3.1 Efectos de EROs en los sistemas biológicos tras ejercicio físico

Los efectos beneficiosos y la importancia de la actividad física son conocidos, aceptables y muy divulgados de forma general, como agente de la prevención de enfermedades clásicas (cardiovasculares, tensión arterial, diabetes y otros) y parte de hábitos saludables de vida. También es conocida la relación directa del ejercicio en la producción de RL. Se estima que entre el 2 y el 5% del total del oxígeno consumido se reduciría monovalentemente e

implantaría la acción de los ERO. Sin embargo, durante el ejercicio físico, con el aumento de la demanda energética y del consumo de oxígeno, esta tasa podría aumentar entre 15 y 20 veces con respecto a la condición de reposo. Además, tanto factores endógenos (sexo, edad, potencial genético) como exógenos (duración, intensidad, frecuencia y tipo de ejercicio), determinarían la severidad del estrés y las respuestas adaptativas del sistema biológico (Antunes y cols., 2005).

En la Figura II.8 se observa el esquema simplificado de la relación entre la actividad física aguda y/o regular frente a la producción de radicales libres, oxidación lipídica y antioxidantes. (Arquer y cols., 2009).

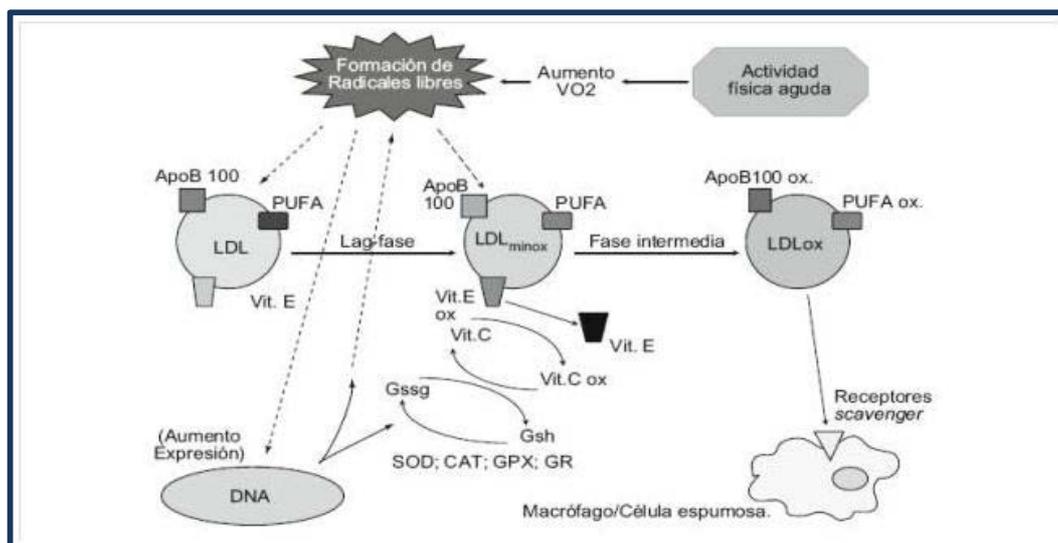


Figura. II. 8- Formación de radicales libres vía actividad física. Tomada de Arquer (2009).

Durante el ejercicio la formación de EROs es proporcional a actividad de la cadena respiratoria, pero no siempre es proporcional al VO<sub>2</sub>. La producción de EROs dentro de la cadena, cambia de acuerdo con la necesidad de ATP,

VO<sub>2</sub>, temperatura central y otros parámetros que varían con la actividad física (Finaud y cols., 2006).

Numerosos autores han considerado a la mitocondria la principal fuente de EROs en las células musculares, indicando que del 2 al 5% del total del oxígeno consumido por las mitocondrias pueden someterse a una reducción monovalente de electrones con la generación de superóxido (Powers y cols., 2011). Se han identificado a los complejos I y III de la CTE como sitios primarios de la producción de radical superóxido en mitocondrias, lo que supone que el aumento en las fibras musculares durante la actividad contráctil está directamente relacionado con el elevado consumo de oxígeno que se produce por aumento de la respiración mitocondrial. Esto implica un aumento de 50 a 100 veces de la producción de superóxido en el músculo esquelético durante la contracción aeróbica. Sin embargo crecen las evidencias en contra de esta conclusión, pues nuevos datos indican que la tasa de producción de superóxidos mitocondriales es considerablemente menor que las estimaciones iniciales. Brand & cols. (citado por Powers, 2011), estiman en menos del 0,15% de oxígeno consumido formaría superóxidos. Además, también crece la evidencia de que las mitocondrias producen más EROs en el estado 4 (basal) en comparación con la respiración activa del estado 3. Estos resultados no apoyan el concepto de que las mitocondrias son las principales fuentes de producción de EROs en el músculo esquelético durante el ejercicio.

Durackcková (2010), comparte esta idea, reiterando que los superóxidos son producidos en la mitocondrias en los estados 3 y 4, y que solamente cerca

de 10% de todo superóxido producido en la célula muscular provienen de la cadena respiratoria.

Según Powers y cols. (2011), el radical superóxido es generado por la transferencia de electrones de la NADPH oxidasa al oxígeno. En el músculo esquelético la NADPH oxidasa se localiza en las fibras musculares (retículo sarcoplasmático, túbulos transversales y sarcolema), la cual, inducida por el ejercicio produciría EROs. La producción de EROs derivada de la acción de esta enzima en músculo, probablemente tiene propósitos fisiológicos, como son la liberación del calcio por el retículo sarcoplasmático y su actividad incrementada por la despolarización.

En la figura II.9, tomada de Powers y cols. (2011), se ilustra los sitios de la fibra muscular esquelética capaces de producir especies reactivas del oxígeno.

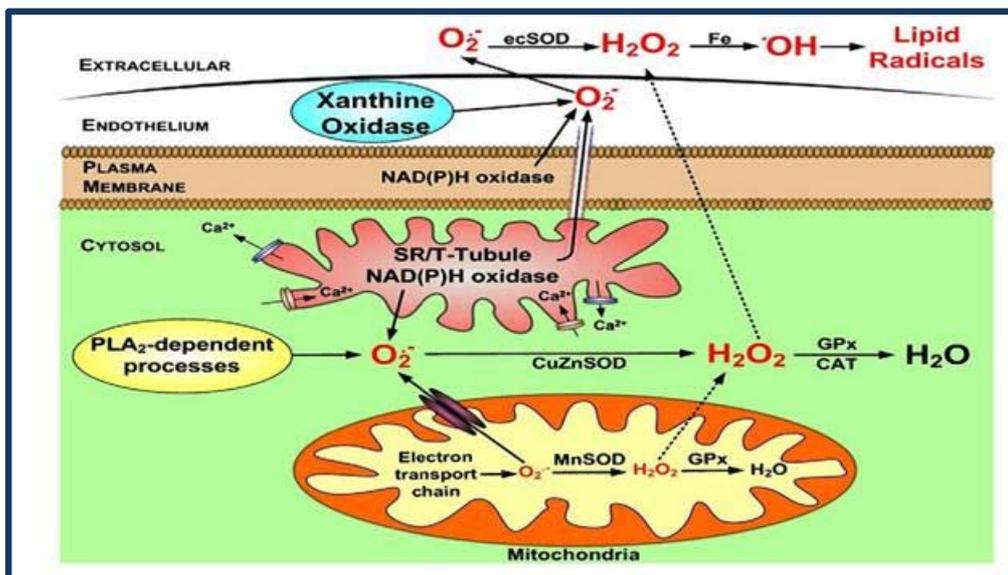


Figura. II.9- Fibra muscular esquelética y producción de EROs. Tomada de (Powers y cols., 2011).

Duracková (2010) resume la situación del estrés oxidativo como una interferencia significativa en los procesos de oxidación-reducción de los

organismos celulares, cambiando el estado redox de la célula. Este cambio estimula o inhibe la actividad de diversas proteínas, lo que cambiaría a su vez las distintas vías de señalización celular. El Ambiente oxidativo favorece la apoptosis y/o necrosis celular mientras la disminución del medio oxidativo favorece la supervivencia de la célula (figura II.10).

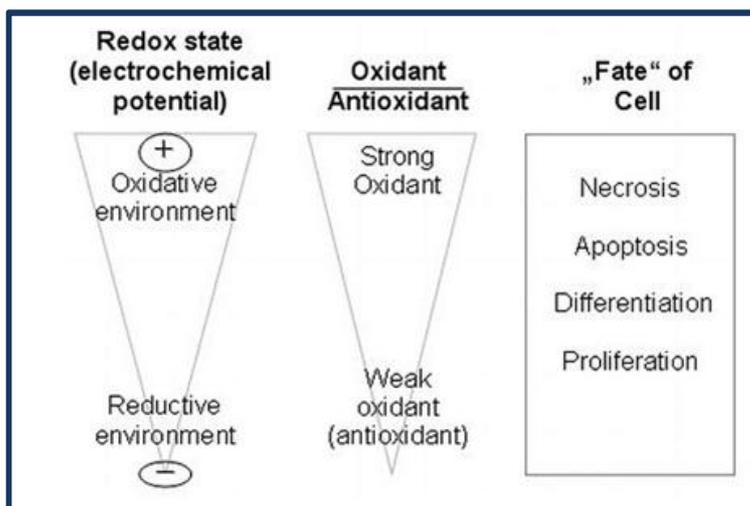


Figura. II.10- Estrés oxidativo y el destino de las células. Tomado de Duracková (2010).

### 2.3.3.2 Puntos positivos y negativos de formación de radical libre

Finaud y cols. (2006), en un estudio de revisión, señalan los efectos positivos y negativos de los ERO. Juegan una importante función durante los procesos inflamatorios causados por el ejercicio, particularmente por ejercicios intensos y traumáticos como ejercicios excéntricos. Actúan en la biogénesis celular como mensajeros o modificadores del estado oxidación-reducción (redox). Participan en la activación de enzimas con la desintoxicación de drogas o en facilitación de repleción de glucógeno. Aún así, los efectos negativos son de consecuencias extremadamente importantes, pues afectan el tamaño y forma de las células, pueden inducir apoptosis, provocar inflamación,

alterar su función y llevar a largo plazo a patologías degenerativas como Cáncer, Alzheimer, Parkinson o envejecimiento celular.

Duracková (2010) también está de acuerdo con el doble papel de las EROs y sugiere que, en ciertas condiciones fisiológicas, se hace necesaria una determinada cantidad de radicales libres, no siendo beneficioso, en este caso, la completa supresión de los mismos.

En la figura II.11 se muestra un esquema de este complejo proceso fisiológico, sus causas e impacto en el organismo.

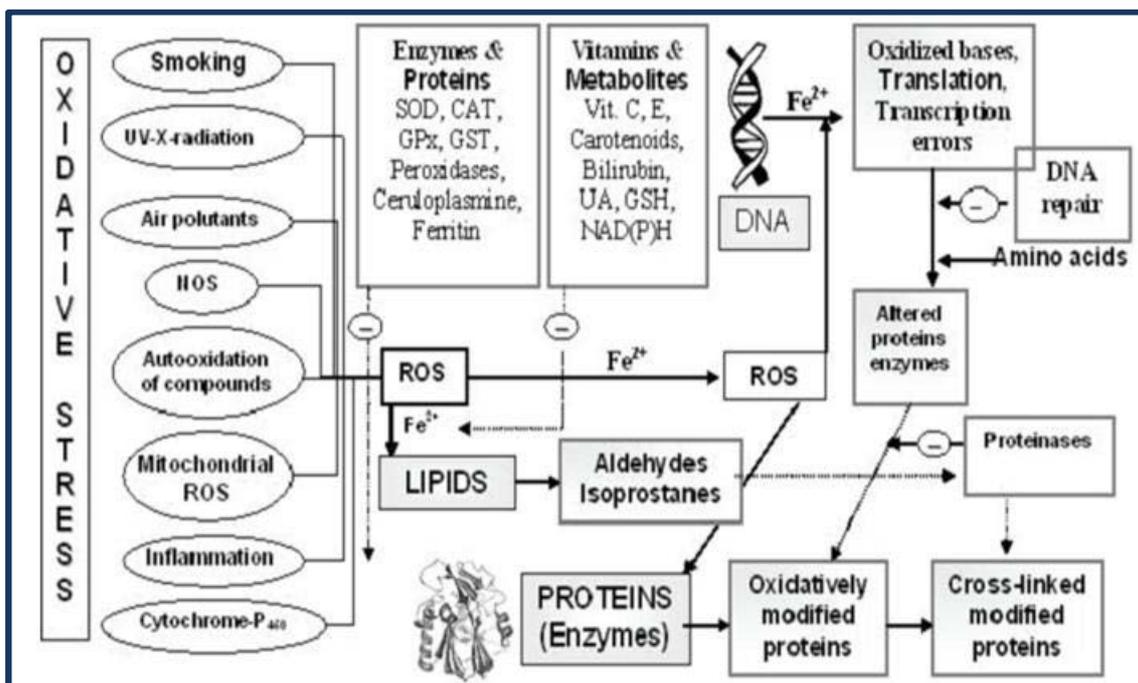


Figura. II.11- Esquema del Estrés Oxidativo, causs y consecuencias. Tomado de Duracková (2010).

Aun, no queda claro si la producción de EROs inducida por el ejercicio y el subsiguiente daño oxidativo, representan una función fisiológica necesaria para inducción de adaptaciones de los mecanismos de defensa antioxidante y a otros parámetros fisiológicos que conducen a la mejora de la salud. En tal

caso, se puede asociar la actividad física regular con la disminución del riesgo de enfermedad y aumento en la expectativa de vida. Sin embargo, la producción excesiva de daño oxidativo, a través de ejercicio de larga duración o el exceso de entrenamiento, puede superar el nivel óptimo mencionado, lo que conllevaría a daños irreparables que podrían desarrollar o favorecer la progresión de enfermedades ya citadas.

### *2.3.3.3 Estrés oxidativo y el ejercicio en diferentes situaciones*

En las últimas décadas se ha cambiado la idea de que la producción de EROs durante el ejercicio era de exclusividad mitocondrial, por un concepto más amplio donde hay participación de diferentes fuentes metabólicas. Destacan aspectos importantes que se deben tener en cuenta como las características del propio ejercicio: intensidad y duración, tipo de contracción muscular y las condiciones ambientales en la que se entrena, dieta, temperatura y presión del oxígeno. El conjunto de estos factores pueden potenciar y conducir a daño molecular y consecuentemente a estrés oxidativo (Fernandez y cols., 2009).

Las vías de generación de las EROs durante el ejercicio son: respiración mitocondrial (cadena de transporte de electrones), metabolismo de prostanoïdes, auto oxidación de catecolaminas y actividad enzimática variada (NADPH oxidasa y xantina oxidasa) en situaciones de isquemia/reperfusión, entre otras, ya explicadas en el capítulo anterior. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la generación de EROs durante la práctica de ejercicio, depende

del tipo de ejercicio (aerobio o anaerobio), de la intensidad y de la duración del ejercicio, consumo de oxígeno y del estrés mecánico impuesto a los tejidos.

#### *2.3.3.4 Estrés oxidativo y ejercicio ocasional*

En franca oposición a los efectos beneficiosos del ejercicio crónico, el ejercicio físico agudo ocasional y exhaustivo, igualmente induce a alteraciones orgánicas, especialmente cuando los diferentes tejidos, órganos o sistemas no hubieran sido adaptados para soportar, sin grandes alteraciones homeostásicas, los diferentes tipos de cargas y el aumento del estrés mecánico que les son exigidos (Ferreira y cols., 2007).

Según Arquer y cols. (2009), hay una diferencia entre el músculo entrenado y el no entrenado. Por un lado hay una mayor utilización de ácidos grasos en el músculo entrenado durante la actividad física. El entrenamiento induce un aumento progresivo de la utilización de grasa de los depósitos intramusculares y una reducción de la utilización de hidratos de carbono.

La actividad física regular es reconocida como una forma de generación de estrés y la exposición crónica a ella la llamamos entrenamiento físico. Con él se producen adaptaciones fisiológicas, en respuesta al aumento de los radicales libres y establecen un papel protector en la prevención de enfermedades (Schneider y Oliveira, 2004).

#### *2.3.3.5 Estrés oxidativo y ejercicios aeróbicos*

En la década de los 80 apareció el primer estudio relacionando el ejercicio con el aumento de EROs (Davies y cols., 1982), lo que desencadenó

una serie de investigaciones que analizaron el estrés oxidativo y el ejercicio, utilizando en la metodología ejercicios aeróbicos (carrera, ciclismo y natación). Se esperaba encontrar una relación directa del ejercicio aeróbico y el aumento del  $VO_2$  con el incremento en la producción de los radicales libres. Sin embargo este fenómeno no ocurrió en bajas intensidades (<50%  $VO_2$  max). En estos casos la capacidad antioxidante no es excedida y por lo tanto no aparece daño. Numerosos estudios muestran un aumento de la actividad enzimática antioxidante (SOD, CAT y GPX), en sangre o en tejidos, tras ejercicio aeróbico, y esta adaptación suele ocurrir muy rápido. Sin embargo, el aumento de la actividad enzimática antioxidante no es proporcional a la intensidad del ejercicio (Finaud y cols., 2006).

#### 2.3.3.6 Estrés oxidativo y ejercicios anaeróbicos

En este tipo de actividades físicas, en las que hay un rotundo predominio de la intensidad sobre la duración, la producción de radicales libres estaría relacionado con las situaciones de hipoxia-reperfusión (Xantina oxidasa) a la que se someterían determinados grupos musculares durante contracciones máximas y mantenidas. Sin embargo, un importante aumento de ácido láctico, acidosis, catecolaminas e inflamación post-ejercicios, caracterizados en ejercicios máximos, son otros factores que podrían aumentar la producción de radicales libres (Finaud y cols., 2006).

Fernández y cols. (2009), indican los ejercicios de corta duración y muy intensos inducen mayor redistribución del flujo sanguíneo hacia músculo, corazón y cerebro, provocando periodos de hipoxia a otros órganos como los

riñones, el bazo y el hígado, hasta que finalice la contracción muscular y los tejidos hipóxicos vuelvan a recibir de forma brusca el flujo sanguíneo. Estos tejidos activan el sistema xantina oxidasa (XO) que forma  $O_2^{\bullet}$  en presencia de oxígeno. En los tejidos no hipóxicos este sistema se encuentra en la forma de xantina deshidrogenasa (XD), involucrado principalmente en la formación de ácido úrico, pero fácilmente convertido a xantina oxidasa durante los episodios de isquemia-reperfusión.

Fisher-Wellman & Bloomer (2009) sugieren que el ejercicio anaeróbico agudo es un estímulo suficiente para aumentar la formación de EROs.

#### *2.3.3.7 Estrés oxidativo y diferencias de género*

Entendemos que las respuestas fisiológicas de hombres y mujeres responden de forma similar al ejercicio, pues sus funcionamientos son semejantes. Aún así, varios estudios muestran diferencias entre atletas hombres y mujeres de semejantes condiciones (edad, nivel de entrenamiento) sometidos a la misma situación, lo que despierta la atención para estudiar estos cambios.

Algunos estudios afirman que las mujeres poseen una desventaja en la respuesta al estrés oxidativo por la baja ingesta de hierro. El estado inadecuado de hierro puede reducir la performance del ejercicio, vía agotamiento del almacenamiento de hierro y consecuentemente disminuir los niveles de hemoglobina. Algunos estudios muestran que anemias y deficiencia de la eritropoyesis están asociadas con aumentos del estrés oxidativo.

Dopsaj y cols. (2010), apuntan a la menstruación y a una nutrición desajustada como factores responsables de las diferencias de parámetros hematológicos femeninos, indicando que la ingesta inadecuada de hierro puede haber sido la principal causa de pérdida de rendimiento de las atletas. Investigaron en un periodo pre competitivo a 138 atletas hombres (12 karatecas, 12 luchadores, 11 kik-bóxer, 8 remeros y 12 jugadores de voleibol) y mujeres (32 voleibol, 12 karate y 15 nadadoras) divididos por grupos metabólicos aerobios, anaerobios y mixtos, con el objetivo de comparar los parámetros de estrés oxidativo específicos de género. Analizaron ROOMS, SOD, LOOH, PAB,  $O_2\bullet$ , AOPP y concluyeron que las atletas femeninas son más susceptibles al estrés oxidativo que los hombres, debido a diferencia de los niveles de ferritina entre los sexos.

Otra línea de investigación es justamente contraria a la primera, donde estudian una supuesta ventaja de las mujeres cara los hombres, debido a la acción de una hormona femenina ( $17\beta$  estradiol), minimizando daños oxidativos.

Tauler y cols. (2008), partieron de la hipótesis de que la diferencia podría ser atribuida a la hormona sexual femenina ( $17\beta$  estradiol), investigaron en ambiente de normoxia los daños oxidativos y las respuestas antioxidantes ocurridas en una sesión de natación, comparando la influencia de género entre 15 chicos ( $16.1 \pm 0.5$  años) y 8 chicas ( $14.7 \pm 0.2$  años). Analizaron la concentración plasmática de  $\beta$ -estradiol, vitamina E, retinol, carotenos, ascórbico, concentración de malonaldehidos y el índice de

carbonilos. Llegaron a la conclusión de que los daños oxidativo inducidos por una sesión de natación son mayores en los niños que en niñas.

Ferrer y cols. (2008), estudiaron los mecanismos oxidantes y antioxidantes en neutrófilos y linfocitos de nadadores tras una sesión de natación intensa y concluyeron que no se afecta directamente la expresión en los linfocitos, a pesar de observar una correlación entre el ejercicio y el sexo, apoyándose en los datos de que las mujeres presentaban mejor estado antioxidante que los hombres.

Kerksick y cols. (2008), también focalizaron su estudio en la hormona femenina  $17\beta$  estradiol ( $E_2$ ), por poseer potentes propiedades antioxidantes y evaluar su efecto sobre el daño muscular inducido por el ejercicio. Ocho hombres y ocho mujeres participaron en el estudio y fueron sometidos a un test de fuerza dinámica máxima, usando una maquina de extensores de rodillas isotónica, cada sujeto realizó 7 series de 10 repeticiones a 120% de 1RM, con 15s de descanso entre las repeticiones y 3min entre las series. En muestras sanguíneas y biopsias musculare analizaron, entre otros, lactato deshidrogenasa (LDH), concentraciones de  $E_2$ , contenido de DNA total, cuantificación de proteínas intramuscular, apoptosis mitocondrial y citoplasmático. Concluyeron que la diferencia de género después del ejercicio excéntrico puede estar relacionada con cambios en la actividad de apoptosis secundaria, cambios de daño muscular y asociado a cascada inflamatoria. Señalan la necesidad de más estudios con la finalidad de aclarar a fondo el potencial femenino para una mayor protección contra el estrés oxidativo endógeno.

Existe una discrepancia en la literatura cuando se habla de las diferencia de género respecto a respuestas al estrés oxidativo, debido a los diferentes tipos de intensidades, estado hormonal y métodos de determinación andrógeno. Algunos estudios atribuyen como punto clave en la diferencia en la producción de estrés oxidativo entre hombres y mujeres, a la producción de testosterona en los hombres aumentando el estrés oxidativo y de estrógenos en mujeres que lo disminuirían (Mestre-Alfaro y cols., 2011).

Sureda y cols. (2008), evaluaron las diferencias de género respecto a las respuestas al ejercicio intenso y al aumento del estrés oxidativo. Participaron en el estudio 15 hombres y 9 mujeres, en una sesión de natación a 75 -80% de la capacidad máxima. Concluyeron que las mujeres parecen estar más protegidas frente el estrés oxidativo inducido por una sesión de natación que los hombres. Bloomer y cols. (2008), en otro estudio similar en nadadores entrenados y no entrenados, en el que utilizaron como marcadores 8 hidroxydeoxyguanosine, observaron que las mujeres entrenadas presentaron un daño oxidativo más pequeño que los demás. No encontraron correlación positiva entre la dieta y los biomarcadores del estrés oxidativo,

Mediante estos datos aún rodeados de conflictos percibimos una necesidad de más estudios e investigaciones que aclaren las diferencias de género en las respuestas fisiológicas al estrés oxidativo inducidas por el ejercicio.

## 2.4 Estrés Oxidativo e Hipoxia

### 2.4.1 Rendimiento deportivo e hipoxia

En el ámbito del rendimiento deportivo, el hombre busca continuamente métodos, que les ayuden a romper barreras, superar límites, ser más resistentes, conquistar victorias. Hace décadas que el entrenamiento en altitud se ha utilizado como recurso ergogénico en el entrenamiento deportivo.

En los entrenamientos a nivel de élite, cualquier variación metodológica que produzca en los atletas una mínima mejora (0,5%) debe ser investigada ya que, por reducida que parezca, puede incrementar el rendimiento final y permitir comprender los beneficios potenciales y los mecanismos de entrenamiento en altitud. (Saunders y cols., 2008).

En la actualidad, tenemos acceso a numerosas investigaciones acerca de entrenamiento en altitud, pero aún no hay unanimidad acerca de su eficacia, sin embargo, muchas investigaciones científicas se equivocan por la metodología adoptada, así como algunos entrenadores fracasan en la eficacia del rendimiento, por no utilizar en la metodología correcta, esto ocurre por varios motivos y por no controlar o estructurar bien el estudio. Los puntos importantes que se debe tener en cuenta son: el tiempo y la duración de exposición a altitud, la altitud adecuada y la aclimatación, la periodización y la intensidad del entrenamiento, las variedades

interindividuales y por último el favorecimiento genético, sin olvidar la readaptación al nivel del mar después de regresar de la altitud.

#### *2.4.1.1 El tiempo y duración de exposición a altitud*

Hay varios estudios que investigan el tiempo de exposición a altitud y la duración para garantizar una mejora en el rendimiento a nivel del mar (Pialoux y cols., 2009; Robach y cols., 2006; Schuler y cols., 2006; Schmitt y cols., 2006; Burtcher y cols., 1996; Lundby y cols., 2005; Friedmann-Bette 2008, Millet y cols., 2010), cada uno tiene una metodología distinta, pero parece haber un consenso en que para obtener éxito, la situación ideal sería una estancia al menos de 3-4 semanas de duración con 14h diarias de exposición a altitud moderada y con suplementos de hierro para obtener éxito sobre la eritropoyesis.

#### *2.4.1.2 Periodización e intensidad del entrenamiento*

La correcta distribución de las fases en el plan de entrenamiento también es muy importante para que no se produzcan pérdidas en las cargas de volumen/intensidad en el entrenamiento (fase de aclimatación, fase primaria de entrenamiento, recuperación, fase preparatoria de regreso al nivel de mar y el volver a nivel del mar) (Millet y cols., 2010). Generalmente los estudios son realizados en el período de preparación de base o en el de recuperación (Laurent y cols., 2006). En cualquier caso, el gran problema en el entrenamiento en altitud es ajustar la carga de intensidad del ejercicio, reduciéndola durante el entrenamiento hasta llegar a la

intensidad similar en comparación con el entrenamiento a nivel del mar. En los estudios de Daniels y Oldridge (1970), Dill y Adams (1971), Burtcher y cols. (1996), Bailey y cols (1998), citados por Friedmann-Bette (2008) se observa que atletas que entrenaron en altitud a una intensidad mayor que en el nivel del mar, aunque no estaba previsto en la planificación, mejoraron su rendimiento al regresar a nivel del mar.

#### *2.4.1.3 Variabilidad individual*

Varias investigaciones apuntan a la variabilidad individual como un factor relevante en los resultados del entrenamiento en altitud al regresar a nivel del mar. En igualdad de condición física y entrenamiento, aparecen variaciones en las adaptaciones musculares, respuestas eritropoyéticas, y reducción de la capacidad aeróbica. No se conocen con exactitud las características individuales de los atletas que producen estas diferencias, pero implican la necesidad, en el curso de la aclimatación, de ajustes continuos e individualizados de intensidad y frecuencia cardíaca para evitar el sobreentrenamiento o desentrenamiento (Friedmann-Bette, 2008). Acerca de este tema se necesita mayor investigación, principalmente con atletas de élite.

#### *2.4.1.4 Altitud adecuada*

Bartsch y Saltin (2008) han revisado las definiciones hechas por expertos sobre el concepto de altitud en relación a sus efectos en la aclimatación, rendimiento deportivo y bienestar de individuos sanos. Llegaron

al consenso de que a baja altitud (entre 500m y 2000m) no hay efectos relacionados con bienestar mientras que a altitudes moderadas (2000m a 3000m) son muy evidentes. Por otra parte, los individuos no aclimatados sufren malestar transitorio durante los primeros días y los deportistas bien entrenados muestran disminución del máximo rendimiento aeróbico, que se restaura por la aclimatación, pero se produce una importante respuesta eritropoyética a las 3-4 semanas. A altitud entre 3000m y 5500m, se aumenta la susceptibilidad de desarrollar enfermedades y una reducción significativa del rendimiento deportivo, incluso después de aclimatación completa. En extrema altitud (por encima de 5500m) es el límite máximo para la adaptación del ser humano a largo plazo. Las altitudes moderadas muestran mejor resultados para lo que se proponen, en la mejora del rendimiento deportivo.

#### *2.4.1.5 Favorecimiento genético*

Schmidt & Prommer (2008) afirmaron que el sistema eritropoyético sólo tiene pequeño impacto en entrenamiento a nivel del mar. La predisposición genética parece ser un requisito previo para alcanzar altas masa total de hemoglobina (tHb) y aumentar la capacidad de resistencia.

Millet y cols. (2010), en un estudio de revisión de los métodos de entrenamiento en hipoxia, han sugerido el uso de las combinaciones de métodos de acuerdo con la característica del deporte, la fase de preparación de entrenamiento y las situaciones de la competición (normoxia ó hipoxia). Llegaron a la conclusión que, a pesar de que el entrenamiento hipóxico

conlleva un aumento de la capacidad hematológica para mejorar el rendimiento habría que tener en cuenta otros importantes factores como son factores centrales (adaptaciones ventilatorias, hemodinámica y neural), factores periféricos (capacidad amortiguadora y economía del musculo), factores importantes en el método LHTL. Estos investigadores sugieren como altitud óptima para maximizar los efectos eritropoyéticos, la comprendida entre los 2200-2500m y 3100m, durante 4 semanas de duración y dosis mínimas de exposición de 12h día.

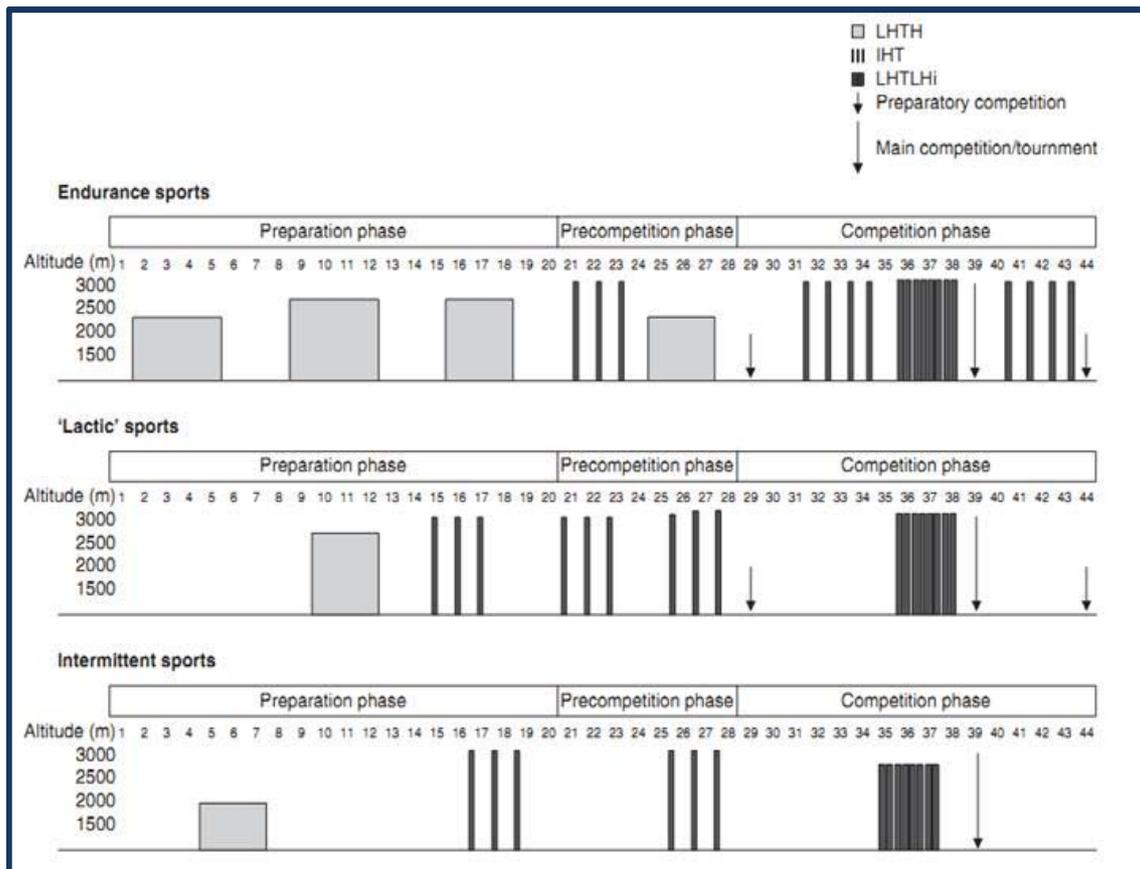


Figura. II.12- Esquema de Periodización y métodos de Entrenamiento en Hipoxia. Tomado de Millet y cols., (2010).

(Figura II.12) Vista esquemática de la periodización de los métodos de hipoxia en la resistencia, deportes glicolítica e intermitente. IHT =

*entrenamiento hipóxico intermitente; LHTH = vivir alto entrenar alto; LHTLHi = vivir alto entrenar bajo y alta intercalados.*

En cuanto a la intensidad, proponen una nueva combinación de método hipóxico llamado LHTLHi (vivir alto, entrenar bajo y alto intercalados) que combina cinco noches a 3000m e intercaladas con dos noches en el nivel del mar, con entrenamiento a nivel del mar y 2, 3 semanas de IHT entrenamiento intermitentes supra umbral (figura II.12).

El entrenamiento en altitud, aunque no tenga 100% de aprobación en el medio científico acerca de su eficacia es muy utilizado, de ahí que sea frecuentemente estudiado. Varias investigaciones han puesto de manifiesto las ventajas en sus aplicaciones (Clark y cols., 2009; Barry Braun 2008; Subudhi & Roach 2008; Schuler y cols., 2007; Burtcher y cols., 1996, Levine & Stray Gundersen, 1997), pero también hay investigaciones que manifiestan que no hay diferencias o ventajas significativas en la aplicación de estos métodos (Clark y cols., 2004; Robert y cols., 2003). Schmitt y cols. (2006), estudiaron la eficacia del LHTL en grupos de 40 atletas de élite de diferentes deportes de resistencia (natación, esquí y carrera), pudiendo confirmar el aumento de pico de potencia de salida (PPO) en mayor medida que en atletas que experimentaron un programa similar LLTL (vivir bajo entrenar bajo) y manteniéndose las diferencias 15 días después del entrenamiento. También han percibido mejoras específicas y no específicas en la economía del trabajo en ambos grupos, pero sin diferencias relevantes entre los grupos al regresar al nivel mar.

Schuler y cols., (2006) probaron en su estudio, que la aclimatación a altitudes moderadas aumenta el consumo máximo de oxígeno ( $VO_2$  máx), las concentraciones de hemoglobina y el contenido arterial de oxígeno. Lundby y cols. (2005), estudiaron ocho residentes a nivel del mar, expuestos a 2h diarias durante 14 días a hipoxia intermitente en cámara hipobárica equivalente a 4100m de altitud. Analizaron en sangre los efectos producidos en diferentes situaciones de ejercicio. Concluyeron que la exposición en estas condiciones no afecta la capacidad del ejercicio a nivel del mar. Posteriormente Lundby y cols. (2006), con objetivo de disminuir el conflicto en la literatura y con colaboración de cuatro centros de investigación, realizaron una serie de estudios de eficiencia mecánica a altitudes elevadas (2500 a 5260m). Estudiaron en laboratorios diferentes a 153 sujetos residentes en altura, sedentarios y de atletas de élite concluyendo que el consumo de oxígeno muscular y la eficiencia mecánica se mantuvieron sin cambios entre los dos grupos (nivel del mar y aclimatación).

Hoppeler y cols. (2008), partieron de la hipótesis de que el estímulo de la adaptación a hipoxia del tejido muscular podría ser ventajoso para el entrenamiento de resistencia, desarrollaron un protocolo experimental mediante el que exponían a los sujetos a altitud sólo durante las sesiones de entrenamiento, realizando la recuperación en normoxia (vivir bajo entrenar alto). No observaron ventajas para el rendimiento a nivel del mar. Robach y cols. (2006), investigaron los efectos de la altitud sobre la eritropoyesis y resistencia aeróbica en 18 nadadores bien entrenados que fueron sometidos a 13 días de entrenamiento utilizando el método LHTL. Aunque

observaron una pequeña ventaja en deportista de élite, pusieron de manifiesto algunos errores metodológicos (elevados valores del volumen de glóbulos rojos en dos de los sujetos estudiados, debido a un fallo en la técnica de respiración y a la muestra reducida). Pialoux y cols. (2009), siguiendo la metodología de Robach y cols. (2006), investigaron el equilibrio entre pro y antioxidantes en nadadores de fondo de élite, antes y después de 13 días de LHTL, concluyendo que este tiempo no afecta la capacidad antioxidante y confirmando que un bajo estímulo genera menor estrés Oxidativo. En su estudio sugieren que el entrenamiento de resistencia puede actuar como un mecanismo “pre-hipóxico”.

#### 2.4.2 Alteraciones fisiológicas del entrenamiento en hipoxia

Hay diferentes métodos de entrenamiento hipóxico/altitud con el fin de aumentar el volumen de eritrocitos, mejorar el consumo máximo de oxígeno y la capacidad de resistencia. Bartsch y Saltin (2008) indican que los ajustes y aclimatación a altura afectan a los sistemas respiratorio y cardiovascular, a la capacidad de transportar oxígeno de la sangre y a las adaptaciones morfológicas, funcionales del músculo-esqueléticas. La magnitud de las respuesta a la altitud varía considerablemente entre los diferentes sistemas y también muestra una gran variabilidad interindividual. Mazzeo (2008) explica que los ajustes metabólicos y fisiológicos ocurridos a la exposición aguda a hipoxia durante el ejercicio, aumenta la distribución de oxígeno y captación del mismo por los tejidos y que estas adaptaciones son la

base para todas las variedades de entrenamiento en altitud, incluyendo el paradigma vivir alto entrenar bajo LHTL.

Magalhães y cols. (2002), estudiaron los beneficios del entrenamiento en altitud, pero los autores mostraron también las desventajas asociadas a este tipo de entrenamiento, tales como: desentrenamiento asociado a la reducción de intensidad y volumen; elevada deshidratación como consecuencia de la disminución del volumen plasmático y sanguíneo; síntomas del mal de montaña (*Acute Mountain Sickness*) como náuseas, vómitos, cefaleas, anorexia, etc.; sobreentrenamiento por desequilibrio entre las cargas y la recuperación.

#### 2.4.3 Estrés oxidativo inducido por el ejercicio e hipoxia

La interacción de hipoxia asociada a baja presión barométrica y sumada a los diferentes estímulos ambientales impuestos por la altitud, frío extremo, cambios de temperatura, humedad absoluta muy baja, aumento de la radiación ultravioleta, entre otros, inicia un exacerbado estrés fisiológico, afectando la cascada de oxígeno y disminuyendo la difusión de oxígeno a los pulmones, sangre y tejidos, es decir, induciendo hipoxia sistémica. Dependiendo de la gravedad, duración y rapidez de la aparición de hipoxia, la disminución de la presión parcial de oxígeno podría comprometer gravemente el metabolismo, promoviendo pérdidas reversibles o irreversibles de los tejidos y alteración en general de la homeostasis celular, conduciendo a la descomposición orgánica y funcional (Magalhães & Ascensão, 2008).

Pialoux y cols. (2006), exponen que, en ambiente de hipoxia, hay un aumento en la producción de catecolaminas y una potencial reducción del estado redox de las mitocondrias, aumentando así la producción de la ERO. Esta situación estaría incrementada con el regreso a nivel del mar, donde el ciclo de re-oxigenación isquemia/reperfusión en el tejido anóxico, inundado por el oxígeno, pueden exacerbar la generación de radicales libres.

Magalhães & Ascenção (2008), mantienen que la exposición crónica o aguda a condiciones de gran altitud ha sido considerada como un importante reto para el organismo, por el hecho de poner en peligro su funcionamiento (cardiorespiratorio, endocrino, metabólico, homeostasis funcional y térmica), evidenciando daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN en diversos tejidos. Por lo tanto, aunque el uso de oxígeno como combustible metabólico, permite un aporte vital y atractivo de energía rica en fosfato, parece que el entorno deprimido de oxígeno aumenta la formación de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno RONS.

La producción exacerbada de  $O_2\bullet$  inducida por el ejercicio físico, acompañada de  $H_2O_2$ , ambas ERO, pueden por sí mismas iniciar el proceso de peroxidación lipídica.

## 2.5 Natación y Estrés Oxidativo

### 2.5.1 Natación Deportiva

La natación es un deporte cíclico, relativamente fácil de aprender y llevado a cabo en el agua, razón por la que se considera muy popular y demandado. Sin embargo, la práctica del mismo en el ámbito competitivo, exige mucha disciplina y horas de entrenamiento diario, ya que el objetivo de sus practicantes debe siempre ser la eficacia y la economía de energía para nadar más rápido en la piscina. La preparación necesaria de un nadador es compleja y sofisticada, buscan de todas las maneras reducir centésimas de segundo que puedan llegar a marcar la diferencia en la posición deseada en el pódium.

Sabemos que factores como: edad, sexo, diferencias individuales, alimentación, descanso adecuado, deben ser tenidas en cuenta para planificar un entrenamiento de natación. En los últimos años la evolución en el entrenamiento ha mejorado mucho el rendimiento de los nadadores. Los entrenadores e investigadores buscan diferentes métodos y herramientas de evaluación y control para planificar y mejorar los entrenamientos de resistencia, de velocidad y potencia de los nadadores.

La intensidad es un importante componente cualitativo del entrenamiento, que determina la carga, el ritmo, las repeticiones, los tipos de ejercicios y sus combinaciones y descanso entre series. Todavía, desde la

perspectiva del estrés oxidativo, la intensidad cobra aún más relevancia, por el hecho de la supuesta correlación entre esfuerzo intenso y generación de estrés oxidativo. Como hemos visto en los capítulos anteriores, la intensidad (dependiendo del grado) puede generar estrés oxidativo y si añadimos la condición de hipoxia, todavía más.

En el entrenamiento de natación, tanto a nivel del mar como en altitud, se utilizan frecuentemente como instrumentos de control de la intensidad del entrenamiento la frecuencia cardíaca, concentraciones de lactato y el consumo de oxígeno. Además se utiliza la escala de percepción subjetiva de esfuerzo como parámetro de carga interna y la velocidad para evaluar la carga externa (Toubekis y cols., 2011; Friedmann y cols., 2004).

## 2.5.2 Herramientas de control de intensidades

### 2.5.2.1 Frecuencia Cardíaca (FC)

Es uno de los parámetros más utilizados para cuantificar la intensidad del ejercicio, por ser rápido, objetivo, sencillo y de bajo coste.

En la natación, como en varios deportes, se utiliza la *frecuencia cardíaca de reposo* como una importante herramienta para planificación y cuantificación de carga e intensidad en los ciclos de entrenamiento, teniendo en cuenta que la frecuencia cardíaca de reposo depende de las adaptaciones fisiológicas, del estado físico, del estado psicológico, de las condiciones ambientales, de la postura, edad y sexo de los atletas.

Los deportistas en general y nadadores en particular, en reposo suelen tener bajas pulsaciones por minutos (entre 40-50 ppm). De hecho cuando se

someten a un gran esfuerzo, la capacidad de recuperación (descenso de la frecuencia) suele ser muy rápida, indica la buena condición en la que se encuentra, o en caso contrario detectar síntomas de sobreentrenamiento. “La recuperación de la FC después de un esfuerzo protocolizado es más rápida cuanto mayor sea la aptitud y preparación física del deportista o su nivel de entrenamiento”, Chicharro (2001). Sin embargo, esta herramienta cuando es utilizada para medir intensidad de esfuerzo en altitud genera controversia en su eficacia (Friedmann y cols., 2004).

#### *2.5.2.2- Concentraciones de lactato*

El ácido láctico, es la molécula que representa el producto final de la intervención metabólica de las fibras de contracción rápida, las cuales intervienen en una fase del ejercicio, donde el individuo comienza a requerir un mayor aporte de energía para poder continuar con el esfuerzo, dando lugar a la activación del metabolismo anaeróbico láctico. La aparición de ácido láctico en sangre va acompañada de la fatiga muscular, debido a la producción paralela de acidez en el organismo; el lactato en sangre es “aclarado” normalmente con rapidez y es reutilizado por el organismo en sus cuatro quintas partes para la resíntesis de fosfágenos de reserva y reposición de la homeostasis en general. La concentración de ácido láctico depende directamente de su liberación, su uso y su eliminación, también existen otros factores que determinan el nivel de concentración lactato como: la condición física, dieta, duración del ejercicio, descanso del atleta, etc. Un buen entrenamiento aeróbico, reduce los niveles de lactato en sangre tras

un esfuerzo de intensidad constante, debido a que las adaptaciones producidas por el entrenamiento generan un buen sistema de aclaramiento a nivel tisular y por tanto, un retraso en la aparición de fatiga y un mayor rendimiento durante el esfuerzo físico. Los niveles de lactato en sangre, en estado de reposo, suelen encontrarse entre los 1,5-2mmol/l. Una persona entrenada acumulará al final del esfuerzo, diferentes niveles de esta molécula según su modalidad deportiva (aeróbica o anaeróbica) en función del porcentaje de fibras musculares que en él prevalezca (fibras musculares de contracción lenta, aeróbicas o fibras musculares de contracción rápida, llamadas también glucolíticas y que dan a lugar altos acúmulos de lactato). En nuestro caso, una persona bien entrenada aeróbicamente, posee adaptaciones fisiológicas que permiten a las fibras de contracción lenta reutilizar el ácido láctico que se va produciendo durante un esfuerzo prolongador a través de transportadores monocarboxílicos MCT1. Este tipo de deportistas mostrarán acúmulos de lactato post ejercicio, entre 6 y 8mmol/l. En cualquier caso, la lactacemia es una buena (fiable) herramienta para medir la intensidad de esfuerzo en altitud.

### 2.5.3 Estrés Oxidativo y Natación

Entrenamiento de tolerancia a la acidez, mal llamado al lactato, es muy utilizado en la planificación de macro ciclo de natación con el objetivo de mejorar la capacidad anaerobia de los nadadores. Maglischo (2003), describe un entrenamiento de tolerancia a la acidez a través de un esfuerzo intervalado de alta intensidad con el objetivo de mejorar el tamponamiento de protones en

músculos y sangre y aumentar la tolerancia al dolor causado por acidosis. Este entrenamiento muy común en natación, podría causar daño muscular, dolor, peroxidación lípidica, oxidación de proteínas e inflamación que afectarían la estructura sarcomérica y empeorando la performance del atleta (Kingsley y cols., 2005, Bloomer, 2007). Los antioxidantes podrían ser de gran importancia en la atenuación de estos daños.

Hay varios estudios diseñados para evaluar los daños oxidativos inducidos por la natación en diferentes intensidades. Inal y cols. (2001), estudiaron los cambios en el sistema antioxidante en nadadores jóvenes (15-21 años), durante dos tipos de sesiones de entrenamiento, aeróbicas (con sesiones de 800m) y anaerobias (con repeticiones de 100m). Los resultados de los niveles de lactato confirmaron el predominio de las vías metabólicas (2,42 mmol-L<sup>-1</sup> y 4,2mmol-L<sup>-1</sup>, respectivamente) así como un aumento de la actividad SOD, GPX, CAT, GSH en ambas intensidades. También confirmaron, un incremento de EROs y también el aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes. Estos autores sugieren que el ejercicio físico regular y de baja intensidad puede aumentar la capacidad de defensa antioxidante, pero si la actividad física es más intensa se necesitaría ayuda de suplementación con antioxidantes, principalmente con vitaminas C y E.

Deminice y cols., (2009), investigaron los efectos del estrés oxidativo y algunos antioxidantes en una única sesión de entrenamiento de natación, específicamente tolerancia al lactato en nadadores jóvenes de élite (21,1 años), concluyeron que en este tipo de entrenamiento hay aumento en los biomarcadores de estrés oxidativo TBARS y CK, pero también hay un

significante aumento en las concentraciones de GSH y ácido ascórbico. Lo que no lleva a entender que entrenamiento de alta intensidad produce radicales libres pero también la actuación de las defensas antioxidantes limita los efectos de EROs.

Pialoux y cols. (2008), en un estudio con 41 nadadores (33 hombres y 8 mujeres), aplica dos situaciones de hipoxia (4800m test y 3000m). Utiliza el método LHTL para conocer los efectos agudos del ejercicio en hipoxia sobre los pro y antioxidantes y concluye que las defensas antioxidantes de atletas altamente entrenados no son suficientes para reparar los daños de la ERO generado por exposición a hipoxia, con o sin ejercicio leve.

No obstante, el empleo de suplementos antioxidantes para atletas sigue siendo motivo de controversia en el ámbito científico, sin alcanzarse aun ningún consenso.



### 3.1 Sujetos del Estudio

En este estudio participaron 12 nadadores voluntarios (6 chicos y 6 chicas), bien entrenados (tabla III.1) y con más de 12 años de práctica de natación y 9 años de participación en alta competición a nivel nacional. Todos ellos realizan una media de 2.8 horas diarias de entrenamiento, 5 días a la semana. Todos los nadadores forman parte del equipo de natación de Granada. Los participantes fueron informados de la propuesta del estudio y de sus posibles riesgos y firmaron su consentimiento informado por escrito. El protocolo fue seguido de acuerdo con la Declaración de Helsinki y aprobado por el comité de ética de la Universidad de Granada.

	<u>n</u>	<u>Edad (años)</u>	<u>Peso Corporal (Kg)</u>	<u>Estatura (cm)</u>	<u>Grasa Corporal (%)</u>
<b>Mujeres</b>	6	21 ± 2.12	59.7 ± 2.03	164.8 ± 1.74	17.71 ± 1.07
<b>Hombres</b>	6	24 ± 1.78	73.2 ± 5.17	176 ± 3.34	7.8 ± 0.46
<b>Media</b>		22 ± 1.46	65.8 ± 3.25	169.9 ± 2.46	13.21 ± 1.66

Tabla.III. 1- Características de los atletas, n=12 (medias ± EEM).

#### 3.1.2 Registro nutricional

Los nadadores fueron informados, en una reunión celebrada dos meses antes de la recogida de datos, acerca de la necesidad de no ingerir suplementos con antioxidantes hasta el final de la última recogida de sangre, debiendo aceptar el compromiso de su cumplimiento. También nos informaron

su dieta rutinaria rellenando un registro nutricional de recuerdo de 24 horas de 5 días de la semana.

### 3.1.3 Análisis Corporal

Al principio del estudio se realizó el análisis corporal de los nadadores obteniendo los datos necesarios para una valoración antropométrica (talla, peso, pliegues y perímetros, índice de masa corporal, cuatro compartimentos corporales, somatotipo y la somatocarta).

#### 3.1.3.1 Valoración Antropométrica

La valoración de la composición corporal de los sujetos incluidos en este estudio siguió las normas y técnicas recomendadas por el International Work Group of Kinanthropometry (I.W.G.K.). Se tomaron diecinueve medidas antropométricas, tres veces consecutivas, tomándose como valor nominal la media de las mismas y valorando el error técnico de las medidas. Previamente se marcaron en el lado derecho del sujeto de estudio, los puntos anatómicos de referencia según los criterios preconizados por el Sociedad Internacional para el avance de la Cineantropometría (ISAK).

**MATERIAL:** Set antropométrico compuesto de plicómetro, compases para medida de amplitudes y cinta para mediciones de perímetros, Harpenden. Báscula digital marca Tefal de 130 kg/100g de precisión. Tallímetro para adultos "T201-T4, ASIMED.

Las medidas antropométricas tomadas en este estudio fueron:

1. Estatura o talla;
2. Peso;
3. Pliegues cutáneos (tricipital, bicipital, subescapular, abdominal, muslo y pierna medial);
4. Perímetros corporales (bíceps relajado, bíceps contraído, cintura, muslo y pierna);
5. Diámetros óseos (biepicondilar del humero, biepicondilar del fémur, biestiloideo).

### 3.1.3.2 Índice de Masa Corporal

Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido el índice de masa corporal como el estándar para la evaluación de los riesgos asociados con el exceso de peso en adultos. El Índice de masa corporal (IMC), resulta de un cálculo entre el peso medido en kilogramos, dividido por la altura medida en metros y elevada al cuadrado, cuyo valor estima el grado de obesidad de un individuo, pues se relaciona directamente con el porcentaje de grasa corporal (excepto en personas con una gran cantidad de masa magra, como deportistas o culturistas).

$$\text{IMC} = \frac{\text{peso (Kg)}}{\text{altura}^2 \text{ (m)}}$$

### 3.1.3.3 Cuatro Compartimentos Corporales

Una técnica muy acorde con el análisis corporal de los deportistas es describir el porcentaje de los diferentes tejidos de un deportista; para ello hemos abordado la metodología de los cuatro compartimentos descrita por de Rose y Guimarães a partir de la ecuación de Matiegka a principios de 1980, que determina el tanto por ciento correspondiente a la masa muscular, masa grasa, masa ósea y masa residual, conociéndose ésta última como la englobada por el peso de los líquidos corporales y vísceras, y que actualmente sigue siendo la más aplicada en la evaluación corporal.

### 3.1.3.4 Somatotipo

Constituye el método para clasificar el tipo corporal o físico, propuesto por Sheldon en 1940 y modificado posteriormente por Heath y Carter en 1967. El somatotipo es utilizado para estimar la forma corporal (morfología) y su composición, principalmente en atletas, capaz de ser comparado con datos ideales según su edad y nivel deportivo alcanzado.

El somatotipo es una descripción de la configuración morfológica actual o una predicción de los futuros y sucesivos fenotipos que una persona puede presentar siempre y cuando el factor nutricional sea constante. Aunque el cálculo del somatotipo antropométrico de Heath-Carter es un procedimiento objetivo, la validez de la calificación depende de la fiabilidad de las medidas utilizadas.

En la actualidad, muchos antropometristas utilizan el error técnico de medición (TEM) para evaluar la consistencia, o la precisión, del medidor de una variable dada (Cameron, 1984, Norton y Olds, 1996). El TEM se calcula aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{TEM} = (\sum d^2 / 2n)^{0.5}; \text{ y } \% \text{TEM} = 100 (\text{TEM}/\text{media})$$

### 3.1.3.5 Somatocarta

Es una representación visual del somatotipo que utiliza dos coordenadas para ubicar a un individuo en un gráfico y poder compararlo con su somatotipo ideal, pudiendo observarse la diferencia entre ellos, contribuyendo de esta manera a la toma de decisiones respecto al entrenamiento y la alimentación.

Coordenada X: Ecto - Endo

Coordenada Y: 2\* Meso – [Endo + Ecto]

## 3.2 Diseño Experimental

Se ha realizado un estudio transversal, con un diseño intragrupo de medidas repetidas, de tipo descriptivo con un grupo en diferentes momentos y situaciones. Se trató de observar y describir la posible modificación en los valores de las variables determinada en el estudio. Las medidas fueron repetidas en estado de reposo, inmediatamente tras el esfuerzo y después de 15min de recuperación. En situaciones de normoxia e hipoxia y a tres intensidades diferentes.

Las variables descritas en el estudio fueron:

Variables independientes: altitud en la que se realiza el entrenamiento (normoxia-630m e hipoxia-2320m) e Intensidad del esfuerzo (baja, media y alta).

Variables dependientes: variables fisiológicas, estrés oxidativo, respuestas antioxidantes y daño al ADN de los linfocitos.

Se realizaron tres sesiones de entrenamiento, de distinta intensidad, repetidas en idénticas condiciones a las dos altitudes mencionadas anteriormente. El diseño experimental para cada una de las sesiones se muestra en la figura III-1.

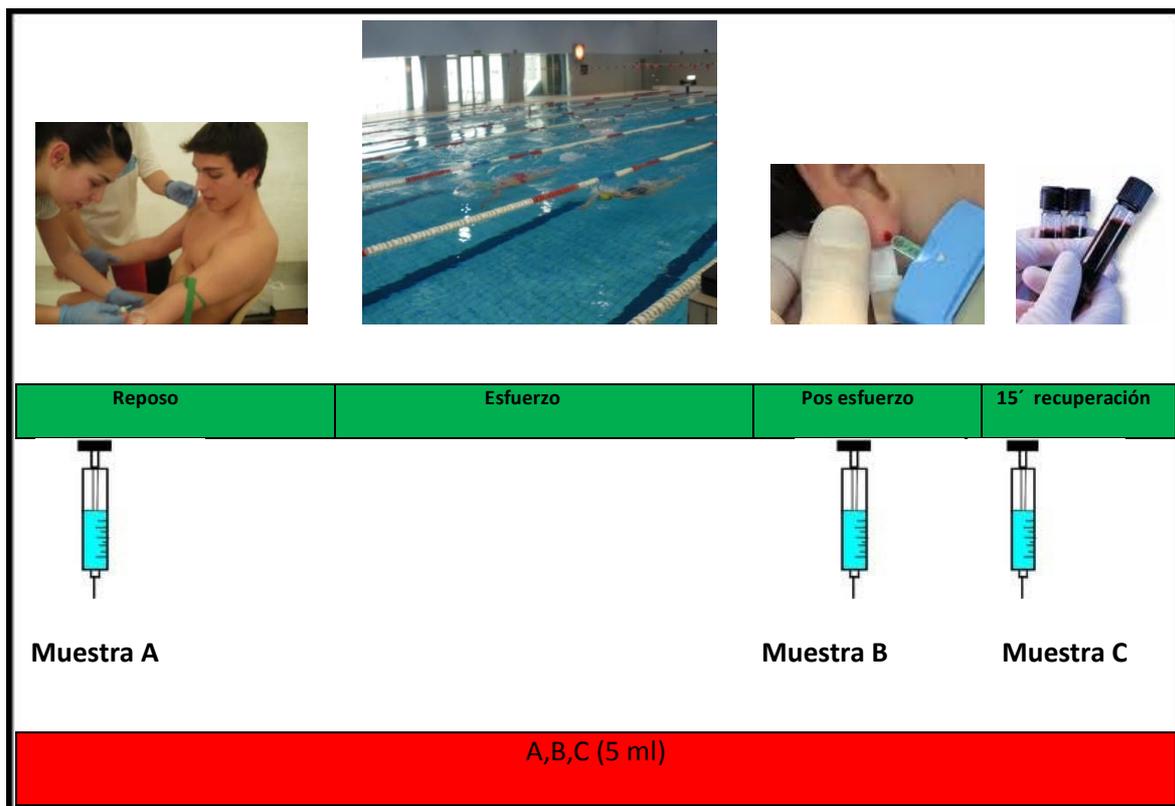


Figura. III-8- Esquema Ilustrativo del Diseño Experimental

### 3.3 Instalaciones usadas en el estudio

El estudio se ha desarrollado en tres instalaciones diferentes: los entrenamientos y toma de datos se llevaron a cabo en la piscina Fuente Nueva de Granada (630m) y en la piscina del CARD (Centro de Alto Rendimiento Deportivo en Sierra Nevada) (2320m). Las dos instalaciones tienen dimensiones olímpicas y ofrecen condiciones adecuadas con sistemas de temperatura, humedad, ventilación y luminosidad controlados. El posterior análisis de las muestras y determinación de los parámetros bioquímicos, se



realizó en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos pertenecientes al Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada.

Figura. III.9- Recogida de sangre de los nadadores

### 3.4 Recogida de datos (extracción de sangre, medición de PA, FC y lactato)

Cada sesiones de entrenamiento se realizó en tres fases:

#### 3.4.1 Fase I - Antes del esfuerzo

Se obtuvieron muestras de sangre venosa de la vena antecubital de los nadadores. Se extrajeron 5ml de sangre que se depositaron en tubos de plástico tratados con heparina de litio y mantenidos en hielo para su posterior

análisis en el Centro de Investigación Biomédica. También se midió lactato y frecuencia cardíaca. Así mismo, se recogieron valores de Presión Arterial mediante un tensiómetro digital.

**MATERIAL:** Tensiómetro digital Omro M10-IT, medidor de lactato, (KDK lactato Corporación Pro System Kyoto Japón), jeringuillas, agujas, tubos para extracciones sanguíneas con anticoagulante: heparina de litio, pulsómetros Polar 610.

### 3.4.2 Fase II - Esfuerzo

Todos los sujetos realizaron tres sesiones de entrenamiento de diferentes intensidades (baja, moderada y submáxima) que se repitieron en idénticas condiciones en Normoxia (663 m) e hipoxia (2320 m). Las sesiones de entrenamiento se realizaron siguiendo la secuencia mostrada en la figura III.3.

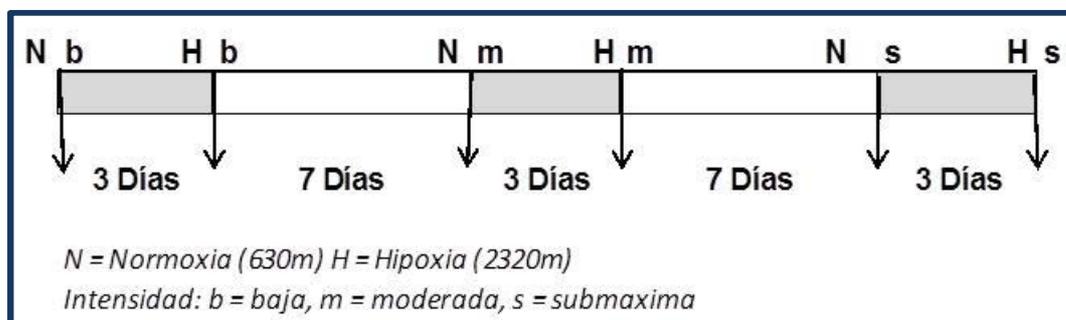


Figura. III.10-Secuenciación de las sesiones de entrenamientos.

### 3.4.2.1 Protocolo del entrenamiento

Todos los sujetos realizaron tres sesiones de entrenamiento a diferentes intensidades (baja, moderada y submáxima), que han sido repetidas en Normoxia e hipoxia. La frecuencia así como los intervalos de descanso entre de las sesiones, de la misma y de diferentes intensidades se muestra en la



Figura. III.11- Sesión de esfuerzo de los nadadores

(figura 3). Las sesiones de entrenamiento se estructuraron en tres bloques: calentamiento, fase principal y vuelta a la calma. Cada uno de ellos tenía una duración de treinta minutos.

Calentamiento y vuelta a la calma siempre fueron similares en cuanto a objetivos y ejercicios (series, repeticiones, descanso, la distancia y el estilo de nado), especialmente centrados en ejercicios técnicos. Por otro lado, dependiendo de la intensidad, el bloque principal se diferenciaba según la exigencia requerida aunque todos lo realizaron siempre a estilo crol.

Las sesiones de entrenamiento se establecieron de acuerdo a los niveles de intensidad descritos por Mújica y cols., (1995). En nuestro estudio, la intensidad más baja consistió en nado continuo, manteniendo una velocidad constante y moderada, centrándose en la ejecución técnica correcta. El objetivo era obtener una acumulación de lactato en torno a 2 mmol/l (según Mujika y cols., La intensidad 1). Por otro lado, la intensidad moderada fue planteada con 30 minutos ejecutando series de 100m, con veinte segundos de descanso

entre cada una. Cada nadador fue informado del ritmo al que debía ejecutar las series, manteniendo siempre constante esta velocidad. El Tiempo objetivo de este segundo nivel se obtiene se dividir por dos el mejor tiempo personal (MTP) de la temporada en 200 metros estilo libre y la suma de diez segundos. En esta zona de entrenamiento, el objetivo era alcanzar una velocidad ligeramente superior al umbral de acumulación de lactato, cerca de 6 mmol/l (de acuerdo con Mujika y cols., al 1995, Intensidad 3). Por último, la mayor intensidad corresponde aproximadamente al ritmo de la carrera de 200 m estilo libre. Este entrenamiento se planteó con tres series de trabajo, de nueve minutos cada una y con dos minutos de recuperación activa entre ellas. En cada serie se realizaban series de 50 metros con veinte segundos de descanso. En este caso, el tiempo para cada repetición se calculó dividiendo por cuatro el MTP de la temporada de 200 metros estilo libre añadiendo dos segundos. Esta última intensidad, de acuerdo con (Mujika y cols., 1995, Intensidad 4), correspondió a una acumulación alta láctica, alrededor de 10 mmol/l.

Durante cada sesión de natación, la frecuencia cardíaca fue registrada con el monitor de ritmo cardíaco (Polar Team 2, Finlandia). Durante la parte principal, el promedio de velocidad también se registró, tomando nota del uso del tiempo para cubrir cada vuelta.

Se analizó el lactato sanguíneo antes, inmediatamente después y a los 15 minutos del final de cada sesión, con el analizador de lactato portátil Pro, a través de muestras de sangre obtenidas de la vena cubital.

**MATERIAL:** Tubos, aletas, paletas de manos, cronómetros, Lactate Pro, Polar Team 2.

### 3.4.3 Fase III - Pos esfuerzo y recuperación

Se obtuvieron muestras de sangre de la vena antecubital de los nadadores, tras concluir las sesiones de entrenamiento así como a los 15 minutos de recuperación. En ambos casos, se extrajeron 5ml de sangre que fueron depositados en tubos de plástico tratados con heparina de litio, mantenidos sobre en hielo, para su posterior análisis en el Centro de Investigación Biomédica. También se midió lactato, frecuencia cardíaca y presión arterial.

#### **Material para hematocrito y hemoglobina:**

Reactivo de Drabking, micropipetas Prolaine de Biogit, micropipetas digitales Ependor fresearch pro de Physio Care orto alresa, centrifuga Biocen para medición de hematocrito.

### **3.5 Parámetros obtenidos en cada sesión de esfuerzo y en las muestras sanguíneas**

Los parámetros obtenidos en cada sesión y fases (Antes, Después y a los 15 minutos pos esfuerzo), frecuencia cardíaca, presión arterial, lactato, hemoglobina, hematocrito (para estos parámetros fueron utilizados los protocolos clásicos).

Los marcadores analizados a posteriori fueron, daño del ADN de linfocitos (Técnica COMET), niveles de estrés Oxidativo de origen lipídico en plasma (TBARS e Hidroperóxidos), antioxidantes enzimáticos en eritrocitos (SOD, catalasa, glutatión peróxidasa y glutatión reductasa) y antioxidantes no enzimáticos en plasma (beta caroteno, retinol, tocoferol y coenzima Q10, todos ellos por cromatografía líquida HPLC).

### 3.5.1 Determinación del daño oxidativo al ADN de linfocitos

Utilizamos 3 fases.

#### 3.5.1.1 Fase I - Aislamiento de linfocitos

**PROTOCOLO:** En el laboratorio, al concluir cada sesión, la sangre fue centrifugada a 3500 rpm, durante 15min a 4° con freno programado. Se tomaron varias alícuotas de plasma que se congelaron a -80°C para las analíticas posteriores. Seguidamente se procedió a separar la fina capa de linfocitos y acto seguido la capa inferior, correspondió a los hematíes (glóbulos rojos).

La capa de leucocitos, se diluyó 1:1 en 3ml de RPMI-1640. La mezcla fue resuspendida y alicuotada en capas sobre 3ml de Histopaque-1077 y llevada a centrifugación a 1750 rpm durante 30 minutos, a 20° c y sin freno programado. El gradiente nos deja una capa de linfocitos entre los medios RPMI-1640 y Histopaque-1077, que fue de nuevo extraída con ayuda de una pipeta Pasteur y alicuotada en 4 ml del medio RPMI-1640 para centrifugar a 1750 rpm durante 15 minutos, a 20 °C y sin frenado programado. Las células

blancas quedaron así precipitadas en el tubo. Tras eliminar el sobrenadante, se resuspendieron los linfocitos con 4ml de medio RPMI-1640 al 10% de SBF. La mezcla fue centrifugada de nuevo en idénticas condiciones de la fase anterior. Se eliminó de nuevo la capa superior y se añadieron 500µl de mezcla fría (SBF al 10% de DMSO). Finalmente, esta fase fue alicuotada en varios tubos Eppendorf que se congelaron a -80°C para su posterior análisis.

**MATERIAL:** Anticoagulante Heparina de Litio, jeringuillas, pipetas pasteur, micropipeta digitales Ependorf research pro de Physio Care, Tubos corning plastico 15 ml, Ependorf de 0,5 y 1 ml de Deltalab, Criobox, Cryo 1°C de Nalgene, Congelador -80°C Thermo Electron Corporation, centrífuga Beckman modelo GS-6R, centrifuga Eppendorf modelo 5804.

**Reactivos:** Fetal Bovine Serum (SBF), F6765 de Sigma, Dimethyl Sulfoxide (DMSO), D5879, de Sigma, RPMI 1640, R7509 de Sigma, Histopaque-1077, 10771 de Sigma.

#### 3.5.1.2 Fase II - Ensayo Cometa (Comet Assay Technique)

**PROTOCOLO:** Fueron utilizados 50 µl de linfocitos, anteriormente aislados, para determinación del daño producido en su ADN. Las células se resuspendieron en 1% de agarosa de bajo punto de fusión (LMP agarosa) y en PBS, pH 7.4, mediante alícuotas en portas para microscopio que poseían una capa de 1% de agarosa normal punto de fusión (calentados a 37° C en un horno Memert un día antes de su utilización y enfriados a 8°C justo antes de su

uso). Los portas con agarosa LMP permitirán la fijación de los linfocitos a 4°C en 5 minutos y, a continuación, éstos se sumergirán en una solución de lisis (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris a pH, 10, 1% Triton X-100 v / v) a 4°C durante una hora para eliminar las proteínas celulares. Tras este tratamiento los portas se colocarán en un tanque que contiene buffer de electroforesis (NaOH 0,3 M y 1 mM EDTA, pH 10 a las 4°C) durante 40 minutos para permitir la separación de las dos hebras de ADN (tratamiento alcalino). La electroforesis se realizó a 25 V, 300 mA y 50W durante 30 minutos. Para concluir, los portas se sometieron a tres lavados de 5 minutos cada uno, con una solución neutralizante (0,4 M Tris, pH 7,5) y se mantuvieron a 4°C antes de la tinción final con 1 mg/ml de 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Los fragmentos de DNA de cada gel se examinaron bajo un microscopio UV con un filtro de excitación de 435 nm y un aumento de 400 (DMLS, Leica).

**MATERIAL:** Microtubos ependorf finos planos de 1,5ml de Deltalab, micropipetas digitales, Ependorf Research Pro, de Physio Care, agitador con calor modelo Magnetic stirrer MSH 300, de Boeco Germany, vortex, modelo autovortex mixer SA1, de Stuart Scientific, láminas para microscopio, Ca 76x26 mm de Menzel-glaser, láminas cubre objetos, 20x 20mm de Deltalab, centrifuga Hettich modelo EBA 12, baño modelo Unitronic-Or de Pselecta, caja Comet para baños alcalinos y de neutralización, balanza digital, modelo BP 110S, de Sartorius, cubeta para electroforesis de Laborlan, microscópio UV, modelo DMLS de Leica, software Komet 5,5 de Kinetic Imaging para Windows Xp,

fuentes de alimentación modelo Power PAC de BIO-RAD, microondas digital de Teka.

**Reactivos:** AGAROSAS High Melting Point (HMP) y Low Melting Point (LMP), EDTA 1M, NAOH (Hidróxido de Sodio), TRIS BASE, PBS (Phosphate buffered saline), HCL 37% (ácido clorhídrico), NACL (Cloruro sódico), DMSO (Dimetil sulfuro), DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), TRITON.

### 3. 5.1.3 Fase III - Parámetros obtenidos mediante la técnica Comet Assay

El daño del ADN, fue automáticamente determinado por el software Komet 5,5 (Kinetic Imaging para Windows Xp), escogiendo como valores más relevantes, % Cell area, % of DNA Head, % of DNA Tail, de 50 a 60 cometas rastreadas al azar por cada muestra del estudio (Figura III.5).

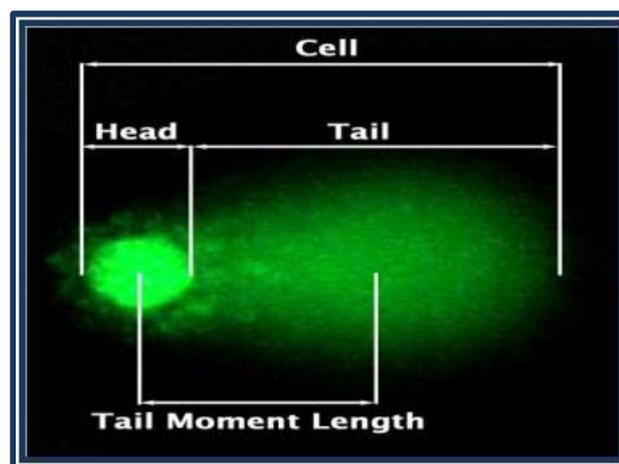


Figura. III.12- Ilustración de un linfocito dañado

**1- Cell Area:** número de píxeles de la imagen binaria de la cometa en total (incluyendo los píxeles que pertenecen a fragmentos de DNA).

**2- % of DNA Head:** determina el % de DNA existente en la parte de la cabeza de la célula y expresa la intensidad de fragmentos de DNA disponibles en esta sección de la célula.

**3- % of DNA Tail:** Determina el % de DNA existente en la parte definida como cola y se calcula restando  $100 - \text{Head \% DNA}$ .

**4- Olive Tail Moment:** se define como el producto de la longitud de la cola y la fracción de ADN total en la cola. Este parámetro incorpora dos medidas en una, el tamaño mínimo detectable de la migración de ADN (que se refleja en la longitud de la cola del cometa) y el número de piezas de rotas (representado por la intensidad de ADN en la cola).

El análisis de estos parámetros nos permitió cuantificar el daño producido en el ADN leucocitarios de nuestros sujetos experimentales, por el entrenamiento deportivo en ambas situaciones de altitud.

### 3.5.2 Determinación de Peroxidación Lipídica en sustancias Reactivas del Ácido Tiobarbitúrico e hidroperóxido en plasma.

#### 3.5.2.1 TBARS

Se ha empleado el método descrito por Orrenius y cols. (1977), que se basa en la medición espectrofotométrica de las sustancias que reaccionan con el ácido Tiobarbitúrico (TBA). Es un método aunque antiguo y de baja especificidad, de alta sensibilidad y actualmente se sigue utilizando como un indicador aproximativo de los niveles de malondialdehido (MDA) presentes en

las muestras y por lo tanto de los niveles de peroxidación lipídica de las mismas.

El protocolo consistió en añadir en microplacas, 50 $\mu$  de muestra (plasma), 75 $\mu$  de ácido acético al 20% y 75 $\mu$  de TBA. El TBA reacciona con el MDA dando lugar a un pigmento de color rosa. Se incubó durante una hora a 60°C y con una agitación mantenida de 100rpm. Tras enfriar se lee en espectrofotómetro a una absorbancia a 532nm.

**MATERIAL:** Tubos de ensayo de vidrio 12x75 mm, guantes desechables, Pipetas ependorf: 50, 75 y 200 $\mu$ l, microplacas, incubadora, espectrofotómetro.

**Reactivos:** Ácido tiobarbitúrico (Kit), TBA diluyente 1(ácido acético), TBA diluyente 2(hidróxido de sodio), Solución SDS (Sulfato de doedecyl), MDA estándar - Malondialdehido Bis (dimetil acetal), MDA diluyente. La lectura ha sido hecha a longitud de 532, medido en nmol/ml de TBA.

### 3.5.2.2- Hidroperóxidos ( $H_2O_2$ )

Los hidroperóxidos han sido cuantificados en plasma por el método xilenol-orange en fase acuosa y lipídica, basado en el principio de que los hidroperóxidos oxidan hierro II a hierro III, el cual reaccionan con el xilenol orange, produciendo un cromóforo de absorción máxima a 560nm. El protocolo consistió en añadir en microplacas 15 $\mu$  de muestras (plasma), 35 $\mu$  de agua bidestilada y 200 $\mu$  de reactivo de color y en la curva patrón peróxido de hidrogeno al 30% y solución de trabajo. Tras incubado a temperatura ambiente

y con agitación mantenida de 250-270rpm durante 30 minutos se leyó en espectrofotómetro la absorbancia a 560nm.

**MATERIAL:** Tubos de ensayo de vidrio 12x75 mm, guantes desechables, pipetas endorf: 50, 75 y 200ul, microplacas falcon, incubadora, espectrofotómetro.

**Reactivos:** Kit Sigma

### 3.6 Extracción y Determinación de Ubiquinonas y Vitamina E

El método de extracción se basa en el protocolo descrito por Kroger y Klingenberg (1978). La ubiquinona Q10,  $\alpha$  tocoferol, vitamina E y betacaroteno fueron extraídos utilizando una mezcla de metanol:Éter de petróleo 60:40. Partimos de una mezcla en tubos de cristal de 250 $\mu$  de SDS, 250 $\mu$  de muestra (plasma), 1ml de etanol:isopropanol y 2,5ml de hexano, después de 1min de agitación (con intervalos de 10seg), centrifugamos a 1500 rpm a 4°C durante 15min. Con pipetas de vidrio capilarizadas se extraen la fase etérea superior a la que añadimos 2,5ml de hexano y volvemos a centrifugar para extraer finalmente el sobrenadante que se sometió a evaporizador en ambiente de nitrógeno. El botón desecado se conservó a -80°C hasta su análisis.

Para la determinación utilizamos cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, siguiendo el método descrito por Battino y cols. (2001). Tras descongelar, se añadieron 150 $\mu$  de éter puro y se pincharon 120 $\mu$  de esta suspensión en HPLC. En la figura III.6 se muestra un registro cromatográfico.

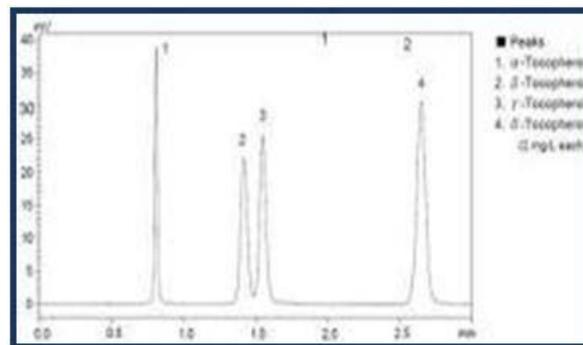


Figura. III.13- Cromatograma del tocoferol

### 3.7 Determinaciones de Antioxidantes Enzimáticos

#### 3.7.1 SOD - Superóxido Dismutasa

Se ha utilizado la técnica de Fridovich y col. (Fridovich I, 1975) ligeramente modificada. El método está basado en la inhibición que ejerce la SOD sobre la reducción del citocromo c medida espectrofotométricamente a 550 nm. El citocromo c se reduce en presencia de anión superóxido, por lo cual se crea “in vitro” un sistema productor de anión superóxido, el sistema xantina-xantina oxidasa, y se observa como la SOD compite con el citocromo c por este anión superóxido a través de un descenso en la producción de citocromo c reducido. Las lecturas se realizaron a 25° C, monitorizando la formación de citocromo c reducido durante un periodo de 2 minutos a 550 nm.

Lo primero es crear un patrón de reducción del citocromo c, para lo cual en una cubeta de 1 ml se mezclan 100 µl de solución de citocromo c 0,1 M en tampón sin azida, 100 µl de xantina 0,0005 M en tampón sin azida y 650 µl de tampón carbonato/bicarbonato (compuesto por Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,02 M y NaHCO<sub>3</sub> 0,02 M ajustado a pH 10). A continuación se le añade la EDTA 0,001 M y azida

sódica 0,1 mM (con el fin de inhibir peroxidasas, sin que se afecte la SOD), y posteriormente se adiciona una cantidad de xantina-oxidasa, determinada anteriormente, suficiente para obtener una reducción de citocromo c de 0,025 a 0,05 unidades de absorbancia por minuto.

Una vez determinada la cantidad de xantina-oxidasa necesaria, se procedió a la determinación de la actividad SOD de las muestras, para lo cual en microplacas con pocillos de 250µl se añaden 30µl de citocromo C, 30ul de xantina, 162µl de buffer (carbonato/bicarbonato 20mM v/v 1:1,25 mas EDTA com PH=10), 8µl de muestra (citosol) com diluición 1:100 y 20µl de Xantina Oxidasa.

Los resultados se expresan como unidades de actividad por mg de proteína. Una unidad de actividad correspondiente a una inhibición del 50% de la reducción del citocromo c.

**MATERIAL:** espectrofotómetro, microplacas, pipetas de 500µ y 100µ, peachímetro.

**Reactivos:** Buffer Carbonato: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, buffer bicarbonato: NaHCO<sub>3</sub>, Xantina, Citocromo C, Xantina Oxidasa.

### 3.7.2 CAT - Catalasa

La técnica utilizada sigue el método descrito por Hugo Aebi (Aebi H, 1984). Este método se basa en un seguimiento de la descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> mediante espectrofotometría a 240 nm como consecuencia de la actividad

catalítica de la catalasa. Para ello utilizamos microplacas con pocillos de 200  $\mu$ . Se añadieron a cada pocillo 90 $\mu$  de buffer fosfato (ph 7.0), 10 $\mu$  de muestras de citosol (diluido 1:100) y 50 $\mu$  de peróxido de hidrógeno. Se agitaron las placas a temperatura ambiente durante 4min a 250rpm y se monitorizó el descenso de absorbencia a 240nm, durante 40s con intervalos de 5seg.

Para los cálculos de la actividad tuvimos en cuenta los mg de proteína por ml en la muestra y el volumen final de muestra.

**MATERIAL:** espectrofotómetro, microplacas falcon, micropipetas de 1000 $\mu$  y 100 $\mu$ , pehachímetro.

**Reactivos:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y PBS (Potasio Fosfato monobásico).

### 3.7.3 Glutati3n Peroxidasa (GPX)

La enzima glutati3n peroxidasa (GPX), tiene como principal funci3n la protecci3n del organismo del efecto degradante de los hidroper3xidos, actúa en la eliminaci3n del per3xido de hidrogeno de las células (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y su transformaci3n en H<sub>2</sub>O. En esta reacci3n el glutati3n reducido (GSH) es convertido en su forma oxidada (GSSG), pero luego es revertido nuevamente a GSH por la acci3n de la glutati3n reductasa (GR). Esta enzima utiliza el NADPH como sustrato y la flavina adenina dinucleotideo (FAD) como cofactor.



Empleamos La técnica basada en el método descrito por Flohé y Wolfgang (1984), ligeramente modificado. En cada pocillo de microplacas de 150 $\mu$ , fueron añadidos 56 $\mu$  de tampón fosfato potásico PBS- (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 pH 7,0) conteniendo EDTA 0,1mM, 19 $\mu$  de GSH 99% en H<sub>2</sub>O bidestilada, 19 $\mu$  glutatión reductasa y 18 $\mu$  de muestra (citosol diluido 1:100).

Fueron encubados a 37°C durante 10min. En espectrofotómetro se añadieron 19 $\mu$  de NADPH 1,5 Mm en 0,1% de NAHCO<sub>3</sub> para la primera monitorización de la reacción química independiente del hidroperóxido durante 3 min a 340 nm, y seguidamente se añadieron 19 $\mu$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% para la segunda monitorización completa de la reacción enzimática a 340 nm durante 5 min.

El descenso en la concentración de NADPH ( $\Delta$ [NADPH] min), se calcula a partir de la disminución de la absorbancia a 340 nm, usando la Ley de Lambert-Beer y el coeficiente de extinción molar.

**MATERIAL:** micropipetas, espectrofotómetro.

**Reactivos:** GSH-Glutathione reduced, 99%, sigma, Glutathione reductase, sigma, NADPH, NAHCO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, EDTA.

#### 3.7.4 Glutation Reductasa

El glutatión (GSH) reduce cualquier enlace disulfuro formado dentro de proteínas citoplasmática de cisteínas donando electrones, convirtiéndose

disulfuro de glutatión (GSSG) forma oxidada. Es una reacción dependiente del NADPH, (figura 7).

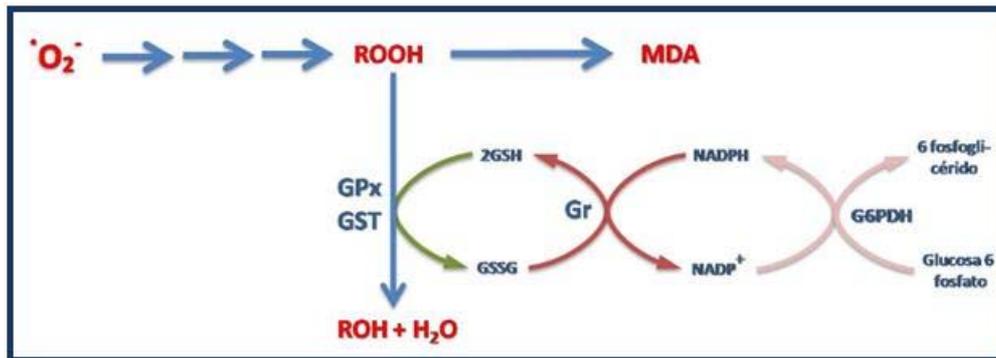


Figura. III.14- Actuación de Glutation Reductasa

La técnica está basada en el método de Inger Carlberg y Bengt Mannervik (1975), donde la oxidación del NADPH es seguida en espectrofotómetro a 340 nm, durante 5 min a una temperatura de 30°C. Tras preparar el tampón fosfato 0,1 M (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O y EDTA) / bicarbonato 1% (NaHCO<sub>3</sub>) ajustado a Ph 7, se añade NADPH y GSSG, incubado a 37°C por 5 min. En microplacas falcon de 150µ, se añaden 20µ de muestra de citosol (dilución 1:100) y 130µ del reactivo, inmediatamente se realiza la lectura en espectrofotómetro.

### 3.8 Tratamiento Estadístico de los Resultados

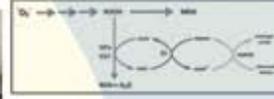
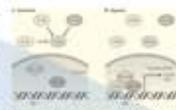
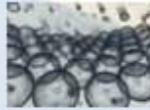
Las determinaciones, en general, han sido realizadas por duplicado, dando como valor la media de las dos determinaciones. Los datos se han

expresado como valor medio  $\pm$  error estándar de la media (n=8 para intensidad 1 y n=12 para las intensidades 2 y 3).

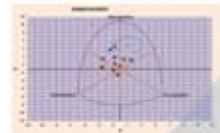
Antes de establecer comparaciones, se estudió la normalidad por el método Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza de las distintas variables por el método de Levene. También hicimos el análisis de los residuos para comprobar las hipótesis de normalidad y homogeneidad.

Las diferencias entre grupos ( $P < 0,05$ ) se establecieron mediante un análisis de modelo mixto lineales, utilizando a posteriori ANOVA de un factor (pos-hoc) de comparación de grupos, utilizando el test de Bonferroni para varianza homogéneas. El nivel de significancia estadística establecida para todo el análisis ha sido ( $P < 0,05$ ).

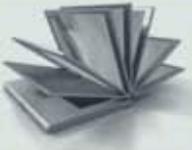
Todo el tratamiento estadístico se ha realizado con el paquete informático SPSS/PC para windows, versión 18.0, en español.



# CAPÍTULO IV Resultados



	12 Jun 2017	22 Jun 2017	12 Jul 2017	22 Jul 2017
Value 1 (Mean)	17711.00	17811.00	17811.00	17811.00
Value 2 (Mean)	18811.00	18811.00	18811.00	18811.00
Value 3 (Mean)	19911.00	19911.00	19911.00	19911.00
Value 4 (Mean)	21011.00	21011.00	21011.00	21011.00



#### 4.1 Composición corporal y somatocarta

En la tabla IV.1, se muestran de forma comparativa los valores de composición corporal, expresados en porcentaje, de los sujetos del estudio y los de referencia (nadadores de elite españoles) publicados por Luengo y cols. (2000). Se ha observado una mayor masa grasa y menor masa muscular en las mujeres del estudio frente a los valores de referencia, mientras que en los hombres se observa una composición opuesta, menor masa grasa y mayor masa muscular con respecto a los de referentes.

		<b>Mujeres (REF)</b>	<b>EEM (REF)</b>	<b>Hombres (REF)</b>	<b>EEM (REF)</b>
<b>Masa grasa</b>	%	17.72(11.66)	± 1.08 (1.84)	7.81 (10.06)	± 0.46 (1.09)
<b>Masa muscular</b>	%	46.92 (50.61)	± 1.17 (1.33)	53.08 (48.75)	± 0.32 (1.06)
<b>Masa ósea</b>	%	14.47 (16.83)	± 0.37 (1.32)	15.01 (17.09)	± 0.38 (1.25)
<b>Masa residual</b>	%	20.9 (20.9)	± 0.0 (0.0)	24.1 (24.1)	± 0.0 (0.0)

Tabla. IV.1- Valores medios  $\pm$  EEM de masa corporal de los nadadores (mujeres y hombres) incluidos en el estudio (%). Los valores de referencia de nadadores elite españoles, publicados por Luengo y col. (2000) se muestran entre paréntesis.

En la figura IV.1, se ha representado la somatocarta de los nadadores así como los valores de referencia publicados por Luengo y col. (2010), en azul claro para varones y rojo claro para mujeres. Como se puede apreciar la distancia de dispersión del somatotipo (SDD) tanto para nadadoras (5,97) como para nadadores (3,71) de nuestro estudio se aleja de las correspondientes referencias.

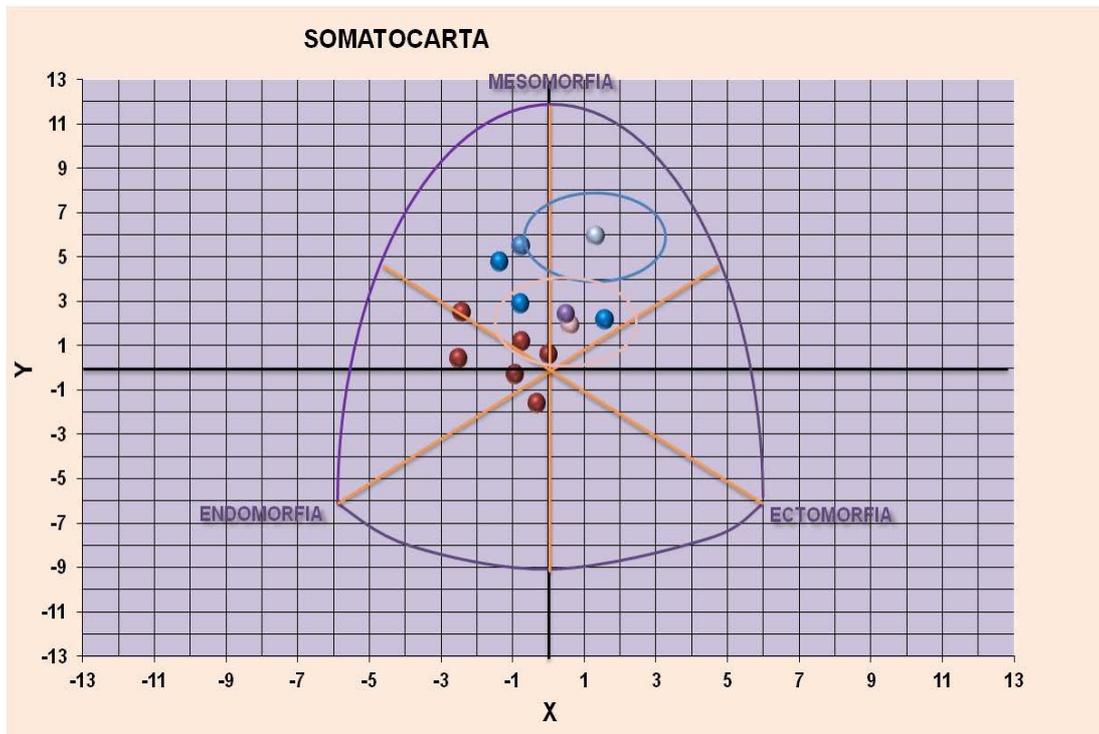


Figura.IV. 1- Somatocarta de los nadadores. Puntos azules para Hombres; puntos rojos para Mujeres; Azul claro y Rojo claro corresponden a los valores de referencia de los nadadores de elite españoles (Luengo y cols, 2000).

## 4.2 Registro nutricional de los nadadores

En la Tabla tabla.IV.2 se muestran los valores medios  $\pm$  EEM de la ingesta calórica de macro y de micronutrientes y sus correspondientes ingestas recomendadas. Lamentablemente no todos los sujetos aportaron los registros alimentarios, de cinco días facilitados, en su momento. Como se puede observar algunos valores se sitúan por debajo de las ingestas recomendadas, sobre todo destaca la ingesta energética y la vitamina E en mujeres.

Nutriente	Unidad	Mujeres				Hombres			
		Cantidad (g)		% IR		Cantidad (g)		% IR	
		Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM
<b>MACRONUTRIENTES</b>	Kcalorias	Kcal	2052,56 ± 237,53		2760,00 ± 0,00		3518,30 ± 297,62		3600,00 ± 0,00
	Kjulios	Kjul	8586,25 ± 993		9623 0		14718,40 ± 1245		125,52
	Colesterol	mg	271,76 ± 21,93				577,95 ± 67,14		
	Fibra	g	28,47 ± 11,44				27,51 ± 4,50		
	Proteínas	g	116,94 ± 36,83		41,80 ±		139,17 ± 11,08		54,00 ±
	Glúcidos	g	468,40 ± 198,67				403,50 ± 43,54		
	Grasas	g	74,28 ± 5,31				142,93 ± 12,74		
	A.G.Mono.	g	30,75 ± 2,44				59,87 ± 3,77		
	A.G.Poli.	g	12,04 ± 2,25				22,63 ± 3,87		
	A.G.Satur.	g	23,94 ± 2,21				47,62 ± 5,05		
<b>VITAMINAS</b>	Vit. A	µg	859,13 ±		800,00		1374,25 ± 519,88		1000,00
	Vit. B1	mg	2,10 ± 0,70		1,10		2,31 ± 0,23		1,40
	Vit. B2	mg	1,92 ± 0,23		1,70		2,98 ± 0,55		2,20
	Vit. B6	mg	2,27 ± 0,61		1,64		3,09 ± 0,71		1,80
	Vit. B12	µg	4,58 ± 0,62		2,00		8,44 ± 1,02		2,00
	Vit. C	mg	87,55 ± 27,49		60,00 ±		177,69 ± 56,77		60,00 ±
	Vit. D	µg	4,54 ± 1,46		5,00		6,16 ± 1,71		5,00
	Vit. E	mg	4,78 ± 0,50		12,00 ±		9,22 ± 1,71		12,00 ±
	Eq. niacina	mg	48,05 ± 16,45		18,20		52,28 ± 6,33		23,80
	Ácido Fólico	µg	349,21 ± 10,87		400,00		375,95 ± 62,54		400,00
<b>MINERALES</b>	Sodio	mg	2974,60 ± 398,37		<2400		5212,80 ± 203,18		<2400
	Potasio	mg	3516,84 ± 887,28		3500,00		4453,50 ± 730,75		3500,00
	Calcio	mg	1085,44 ± 150,97		880,00		1545,05 ± 146,51		800,00
	Fósforo	mg	1976,12 ± 574,75		900,00		3203,20 ± 258,44		700,00
	Magnesio	mg	417,04 ± 167,67		330,00		448,65 ± 62,14		350,00
	Hierro	mg	19,72 ± 6,37		18,00 ±		21,77 ± 3,50		10,00 ±
	Cinc	mg	13,60 ± 4,36		15,00		15,81 ± 1,54		15,00
	Yodo	µg	415,15 ± 58,28		112,00		533,95 ± 117,68		140,00
	Selenio	µg	259,00 ± 172,27		53,00		172,37 ± 19,19		70,00
	Nº			5			4		

Tabla. IV.4-Análisis de las ingestas (media ± EEM) de los sujetos estudiados, distribuidas por sexo.

Esta disminución con respecto a las ingestas recomendadas, pensamos que se deben más a la falta de experiencia a la hora de hacer los registros diarios que a una situación real. Asimismo destaca la elevada ingesta proteica en ambos sexos, lo que lamentablemente, suele ser frecuente en casi todos los deportistas. No obstante, si tenemos en cuenta la ingesta de grasas monoinsaturadas y de micronutrientes antioxidantes, la dieta seguida por los

nadadores de nuestro estudio no debe de interferir en los resultados correspondientes al estrés oxidativo.

### 4.3 Resultados estadísticos

En la mayoría de los casos hemos utilizado, para la representación de las distintas variables, gráficos de barras. En estos casos y para mostrar diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), hemos seleccionado los símbolos abajo descritos:

\* Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) comparando las situaciones de esfuerzo o recuperación frente a reposo.

# Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) comparando las situaciones de recuperación frente a esfuerzo.

& Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) comparando las intensidades 2 o 3 frente a 1 para cada una de las situaciones de esfuerzo (Rep- reposo; Esf-esfuerzo y Rec-recuperación).

\$ Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) comparando la intensidad 3 frente a 2 para cada una de las situaciones correspondientes (Rep- reposo; Esf-esfuerzo y Rec-recuperación).

@ Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ), comparando hipoxia frente a normoxia para cada una de las situaciones correspondientes (Rep-reposo; Esf-esfuerzo y Rec-recuperación).

### 4.3.1- Presión Arterial Sistólica (PaS) y Diastólica (PaD)

No observamos ninguna diferencia estadísticamente significativa en la presión arterial sistólica y diastólica, relacionadas con altitud, intensidad o esfuerzo (Gráficos IV.1 y IV.2). Los valores en reposo se encuentran dentro de la normalidad mientras que los de esfuerzo son más bajos de lo esperado, lo que probablemente se debe a que fueron tomados a los tres minutos postejercicio.

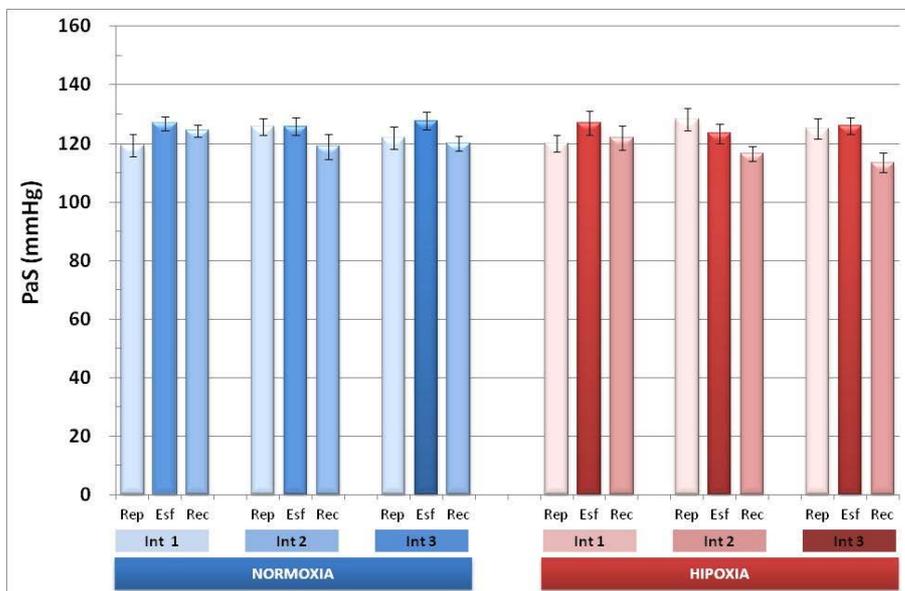


Gráfico. IV.1- Presión Arterial Sistólica en las condiciones: Normoxia e Hipoxia; Intensidades: 1-baja; 2-moderada; 3-alta y en las distintas situaciones: Reposo, esfuerzo y recuperación.

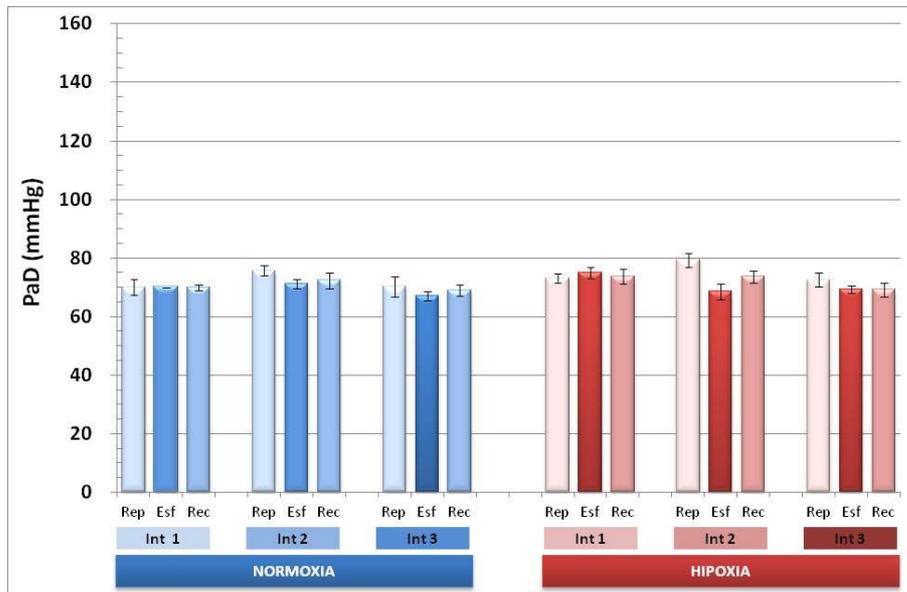


Gráfico. IV.2- Presión Arterial Diastólica en las condiciones: Normoxia e Hipoxia; Intensidades: 1-baja; 2-moderada; 3-alta y en las distintas situaciones: Reposo, esfuerzo y recuperación.

#### 4.3.2 Frecuencia Cardíaca (FC)

En nuestras condiciones experimentales, observamos un aumento gradual de la frecuencia cardíaca, estadísticamente significativo en todas las intensidades y situaciones de esfuerzo como se muestra en el gráfico 3. Tras 15 minutos de recuperación, este parámetro desciende, aproximándose en todos los casos a los valores iniciales de reposo, aunque en intensidad moderada y elevada, siguen siendo diferentes estadísticamente. No se ha observado diferencias relacionadas con la altitud: normoxia e hipoxia.

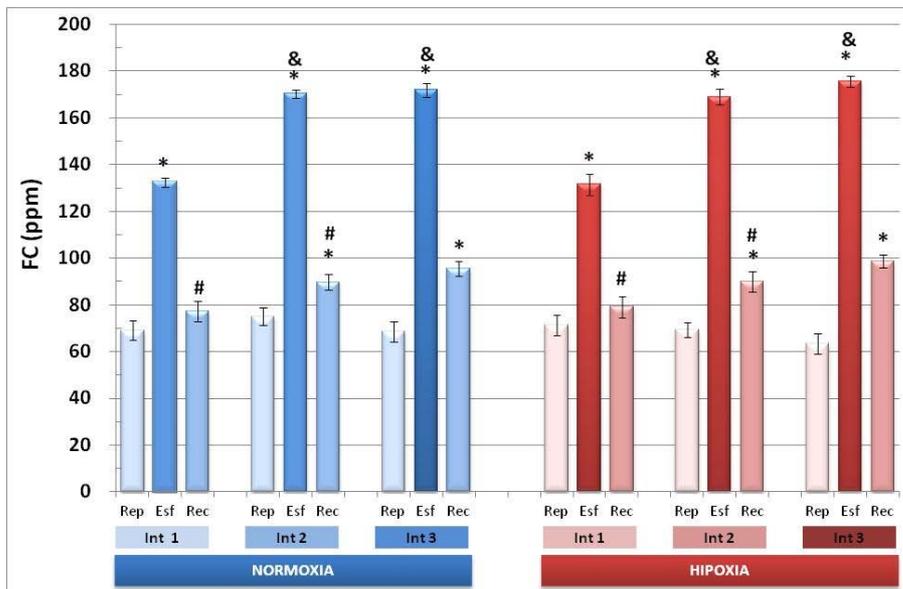


Gráfico. IV.3-Frecuencia Cardíaca (ppm) en las condiciones: Normoxia e Hipoxia; Intensidades: 1-baja; 2-moderada; 3-alta y en las distintas situaciones: Reposo, esfuerzo y recuperación.

#### 4.3.3 Velocidad (m/s)

Las velocidades de nado que se muestran en el gráfico IV.4 corresponden a los valores medios de hombres y mujeres de la fase II de entrenamiento. Como se observa, todos los nadadores se ajustaron a los objetivos marcados para cada intensidad (1.004±0.0041 m/s para intensidad baja; 1,237±0.026 m/s para intensidad media y 1,385±03.031 m/s para alta) manteniéndolas tanto en normoxia como en hipoxia. Por tanto únicamente encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes intensidades de esfuerzo y ninguna diferencia relacionada con la altitud (gráfico.IV. 4).

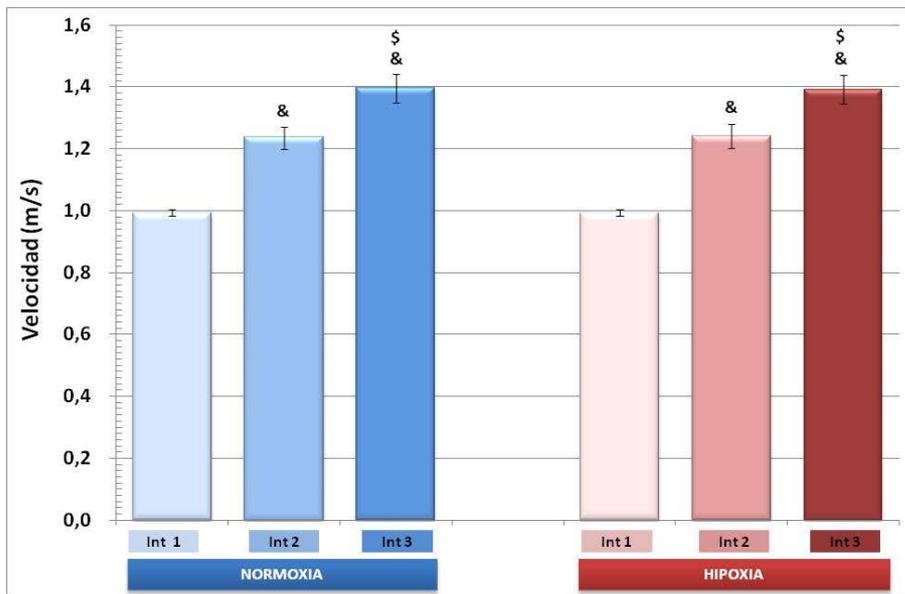


Gráfico. IV.4-Velocidad (m/s) en las condiciones: Normoxia e Hipoxia; Intensidades: 1-baja; 2-moderada; 3-alta y en las distintas situaciones: Reposo, esfuerzo y recuperación.

#### 4.3.4 Lactecimia

Como se muestra en el gráfico IV.5, las tres intensidades determinan incrementos en lactato sanguíneo que son estadísticamente significativas para la intensidad media y alta ( $p < 0.01$ ) tanto en la situación de normoxia como en hipoxia, con respecto a sus correspondientes valores en reposos. Como era de esperar, los valores de la intensidad alta son estadísticamente superiores a los de intensidad media para ambas situaciones experimentales (normoxia e hipoxia). Por otra parte, los valores de recuperación, al igual que ocurría en esfuerzo, son estadísticamente significativos para las dos intensidades superiores con respecto a sus correspondientes reposos.

Lo más destacado, es el mayor incremento (estadísticamente significativo) de las intensidades media y alta en la situación de hipoxia moderada con respecto a normoxia. Asimismo, los valores de aclaramiento de

lactato tras los 15 minutos de recuperación, son de mayor magnitud, aunque no llegan a ser estadísticamente significativos, en normoxia que en hipoxia.

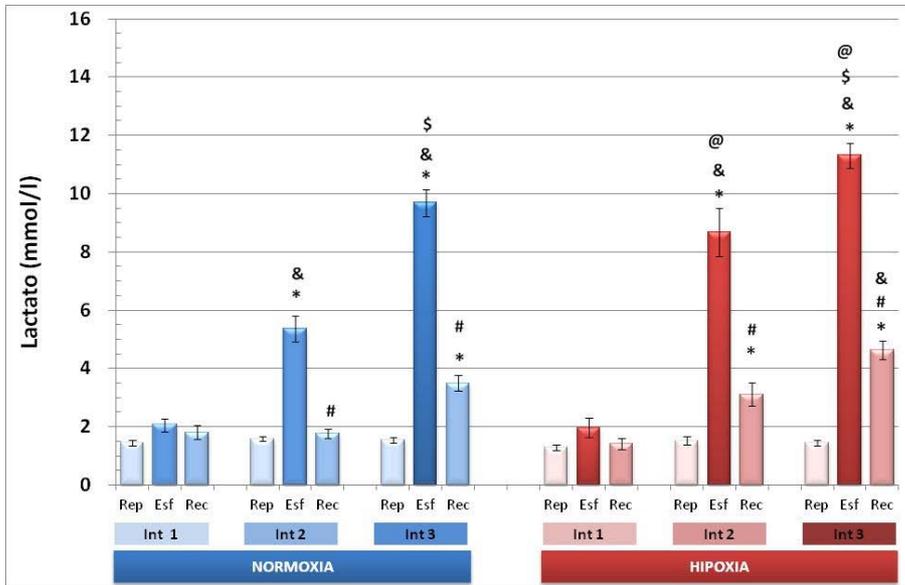


Gráfico. IV.5- Concentración de Lactato  $\pm$ EEM (mmol/l) en las condiciones: Normoxia e Hipoxia; Intensidades: 1-baja; 2-moderada; 3-alta y en las distintas situaciones: Reposo, esfuerzo y recuperación.

#### 4.3.5 Hemoglobina (g/ml)

A pesar que los datos muestran valores ligeramente inferiores en normoxia (en torno a 14 mg/ml) frente a hipoxia (unos 15 g/ml) No encontramos ningún cambio significativo de concentración de hemoglobina relacionados a altitud, intensidad o esfuerzo (Gráfico.IV.6).

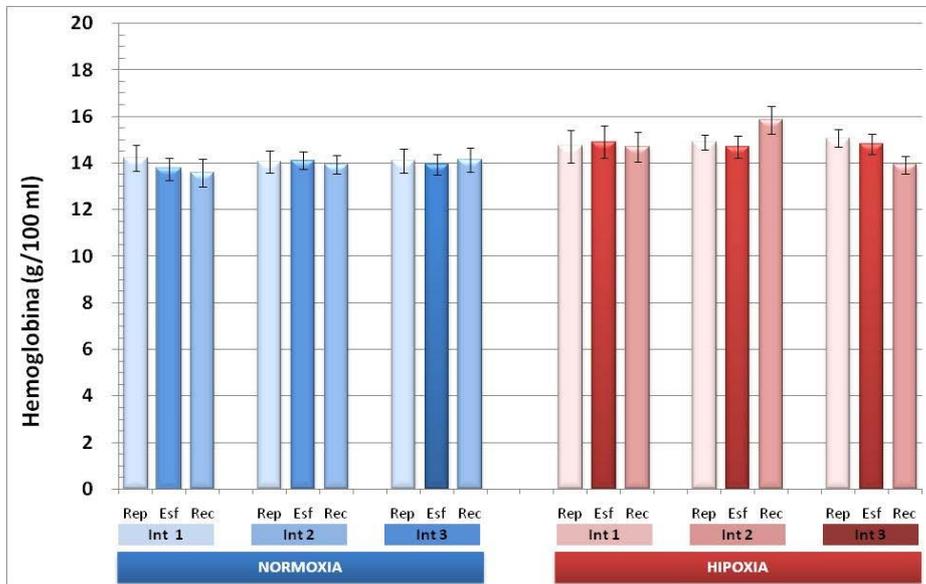


Gráfico.IV. 6-Concentración de Hemoglobina (mg/ 100 ml) en las condiciones de Normoxia e Hipoxia; Intensidades: 1-baja; 2-moderada; 3-alta y en las distintas situaciones: Reposo, esfuerzo y recuperación.

#### 4.3.6 Hematocrito (%)

Aunque sin diferencias estadísticamente significativas, el entrenamiento en hipoxia induce un ligero aumento en los valores de hematocrito comparados con normoxia. Tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas por intensidad (Gráfico IV.7). No obstante, esta ligera hemoconcentración inducida por la hipoxia, determinará el reajuste de aquellos parámetros que se incrementen y poder discriminar de forma apropiada el efecto del entrenamiento en altitud.

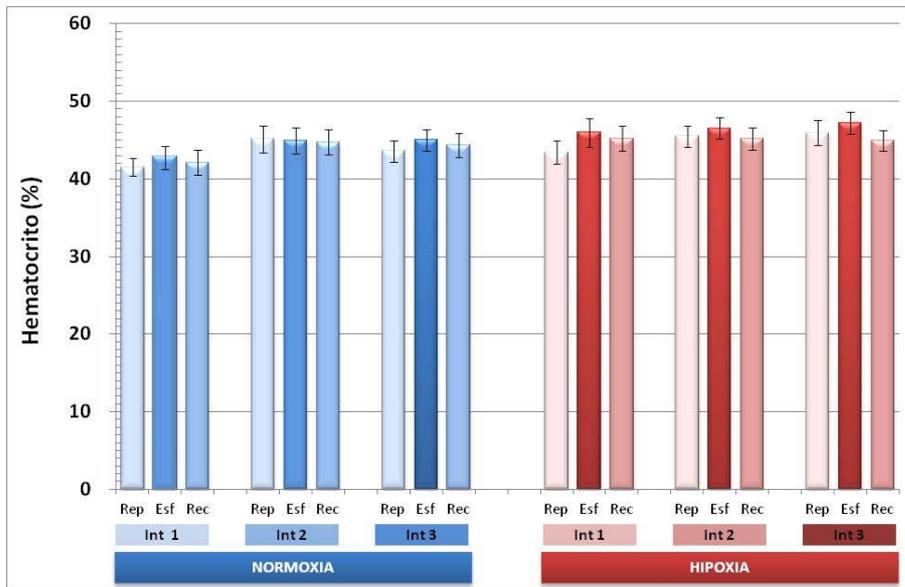


Gráfico. IV.7- Hematocrito (%), en las condiciones: Normoxia e Hipoxia; Intensidades: 1-baja; 2-moderada; 3-alta y en las distintas situaciones: Reposo, esfuerzo y recuperación.

#### 4.4 Resultado de los marcadores de estrés oxidativo

##### 4.4.1 TBARs (nmol/ml)

Encontramos una disminución, en muchos casos significativa, en las concentraciones de TBARs en condición de hipoxia frente normoxia para las diferentes situaciones de esfuerzo (Gráfico.IV.8).

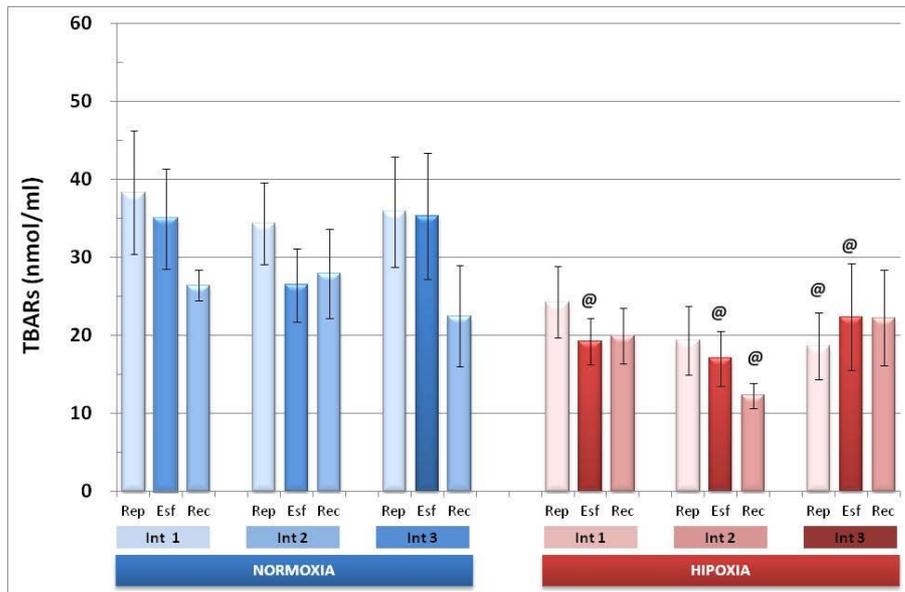


Gráfico. IV.8- Concentración de TBARs plasmáticos (nmol/ml) en las condiciones: Normoxia e Hipoxia; Intensidades: 1-baja; 2-moderada; 3-alta y en las distintas situaciones: Reposo, esfuerzo y recuperación.

#### 4.4.2 Hidroperóxidos (nmol/ml)

La concentración plasmática de hidroperóxidos (Gráfico IV.9), sigue el mismo comportamiento mencionado anteriormente para TBARs, aunque en este caso, solo en dos situaciones de esfuerzo descienden de forma significativa, en las condiciones de esfuerzo en las intensidades 1 y 2 de hipoxia con respecto a normoxia.

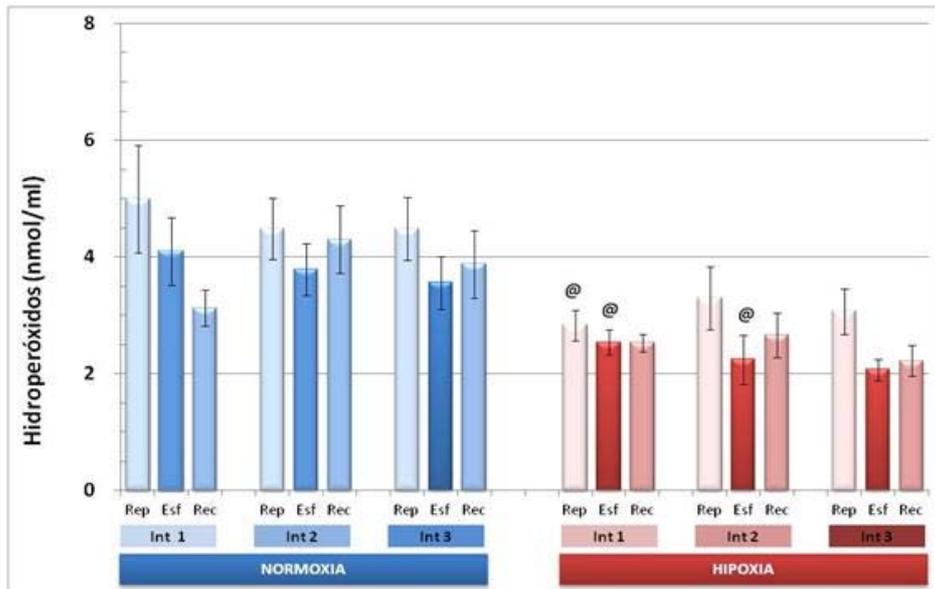


Gráfico.IV. 9-Concentración de Hidroperóxidos plasmáticos (nmol/ml) en las condiciones: Normoxia e Hipoxia; Intensidades: 1-baja; 2-moderada; 3-alta y en las distintas situaciones: Reposo, esfuerzo y recuperación.

#### 4.5 Resultados de Daños al ADN (COMET)

En los resultados del análisis COMET (gráficos IV.10 y IV.11) se observa que no hubo diferencias significativas en el tamaño de la cabeza del ADN ni en la cola que indicasen un mayor daño celular relacionado a las distintas condiciones: altitud, intensidad y esfuerzo.

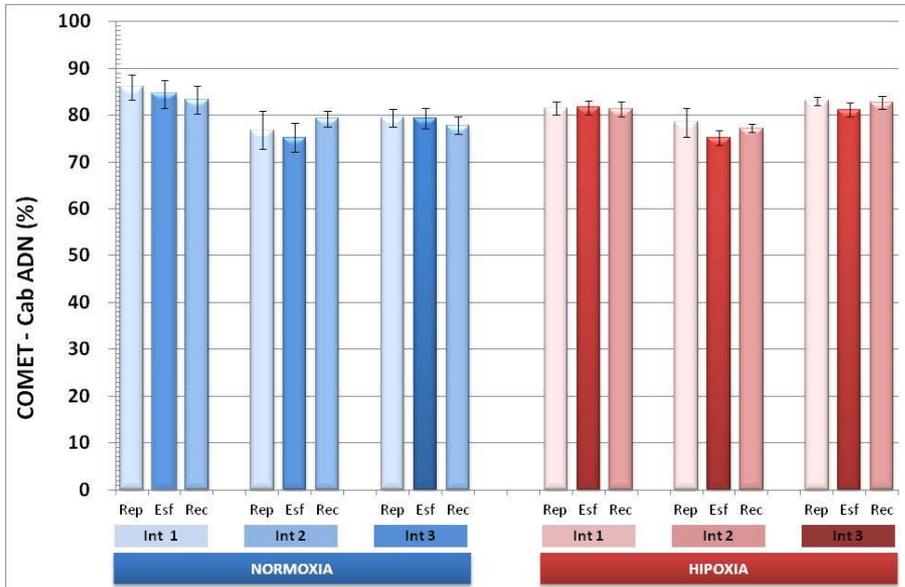


Gráfico. IV.10-COMET-Cabeza del ADN (%) en las condiciones: Normoxia e Hipoxia; Intensidades: 1-baja; 2-moderada; 3-alta y en las distintas situaciones: Reposo, esfuerzo y recuperación.

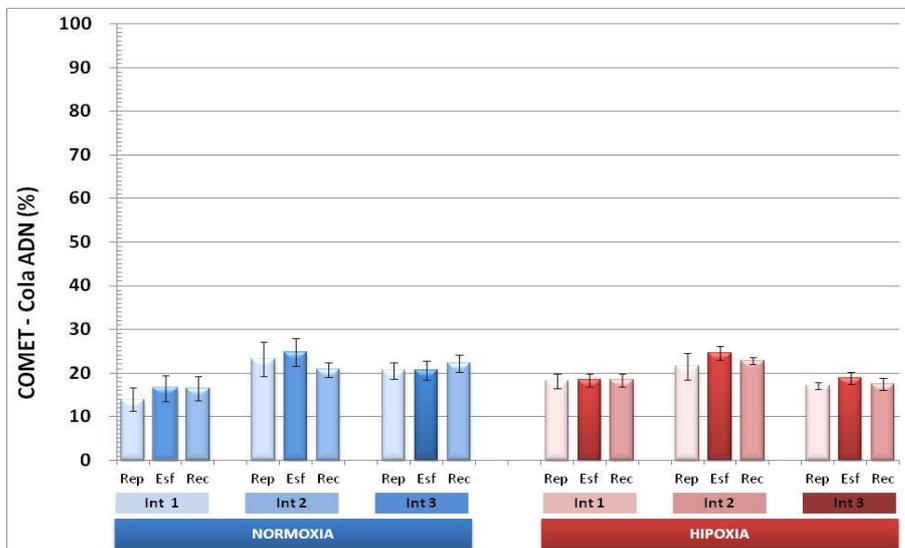


Gráfico. IV.11-COMET Cabeza del ADN en las condiciones: Normoxia e Hipoxia; Intensidades: 1-baja; 2-moderada; 3-alta y en las distintas situaciones: Reposo, esfuerzo y recuperación.

## 4.6 Resultados Antioxidantes Endógenos

### 4.6.1 Superóxido Dismutasa

Los valores de actividad SOD a intensidad 3 son más reducidos que a intensidad 2 en la situación de esfuerzo tanto en normoxia como en hipoxia. Llama la atención las diferencias encontradas en hipoxia en las situaciones de reposo a ambas intensidades así como la diferencia entre hipoxia y normoxia en la situación de reposo. (gráfico.IV.12).

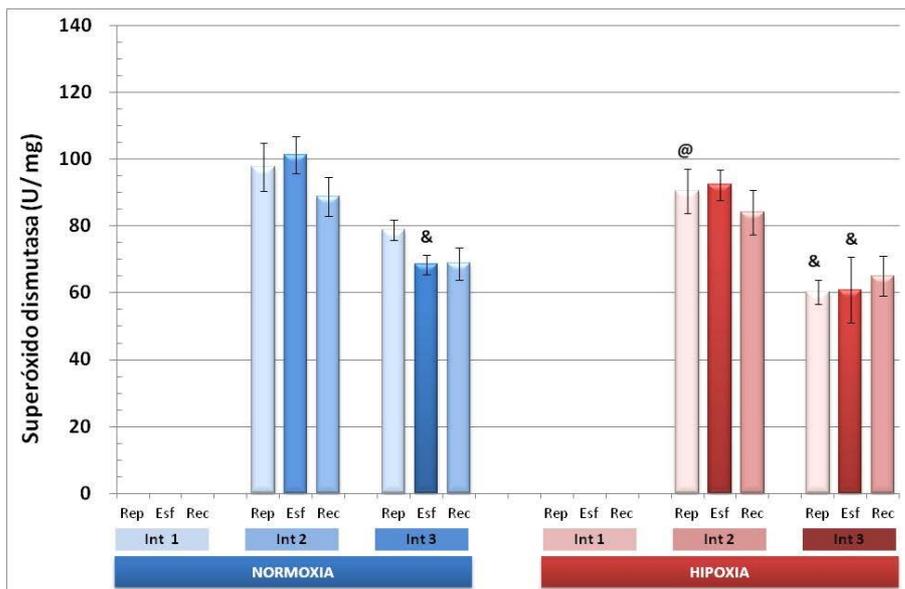


Gráfico. IV.12- Actividad Superóxido Dismutasa (U/mg) en las condiciones: Normoxia e Hipoxia; Intensidades: 1-baja; 2-moderada; 3-alta y en las distintas situaciones: Reposo, esfuerzo y recuperación.

### 4.6.2 Catalasa ( $\text{seg}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )

No hemos observado ninguna diferencia estadísticamente significativa en la actividad de la catalasa comparándose en las distintas condiciones: altitud, intensidad y esfuerzo.

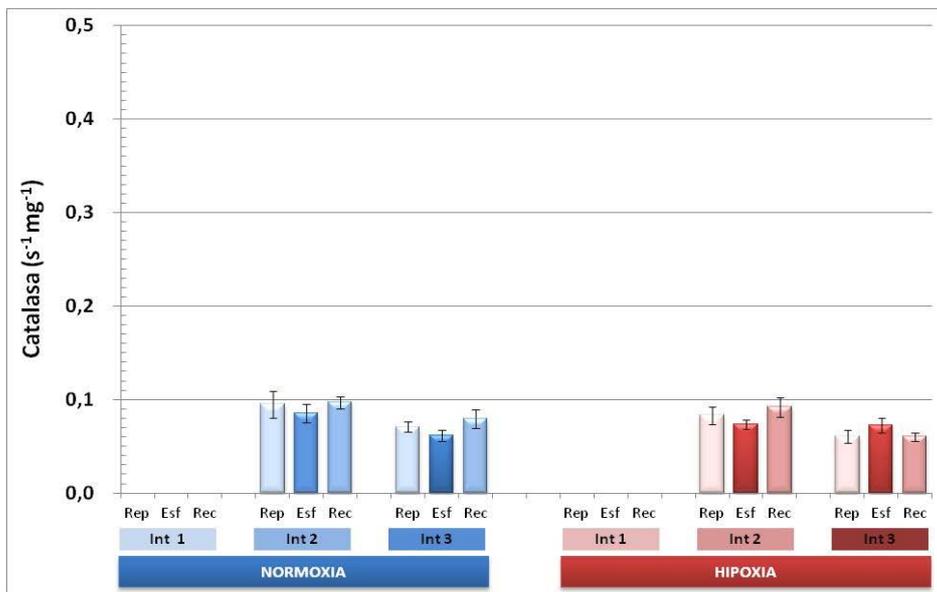


Gráfico. IV.13- Actividad Catalasa ( $\text{seg}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) en las condiciones: Normoxia e Hipoxia; Intensidades: 1-baja; 2-moderada; 3-alta y en las distintas situaciones: Reposo, esfuerzo y recuperación.

#### 4.6.3 Glutación Peroxidasa (GPX)

La actividad de la glutación peroxidasa que se representa en el gráfico IV.14, mostró un comportamiento creciente entre las situaciones de reposo, esfuerzo y recuperación respectivamente. Sin embargo, los valores fueron muy similares entre normoxia e hipoxia a intensidad 2, sin cambios significativos en ninguna situación. En cambio, a intensidad 3, se produce un descenso significativo principalmente en condición de hipoxia en las tres situaciones (reposo, esfuerzo y recuperación) mostrando valores más reducidos que los obtenidos en normoxia a intensidad 3 y a los obtenidos en hipoxia a intensidad 2.

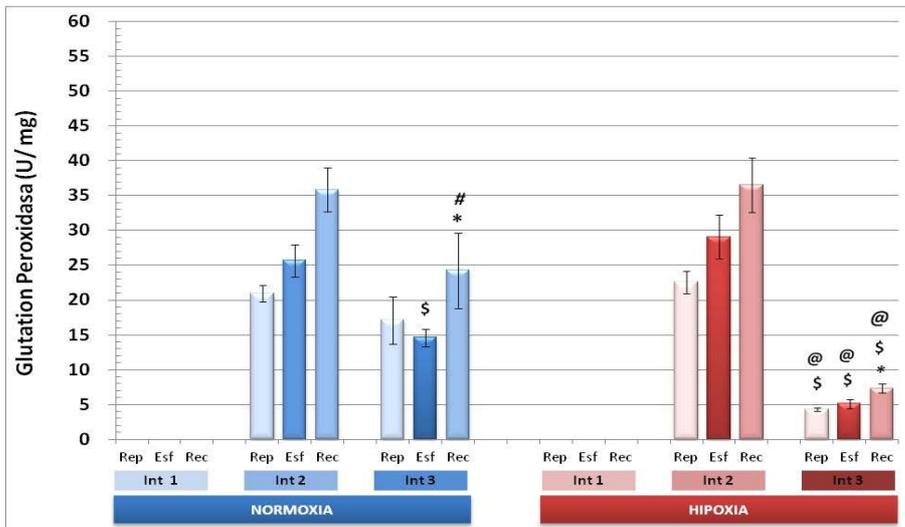


Gráfico. IV.14- Actividad Glutacion Peroxidasa (U/mg) en las condiciones: Normoxia e Hipoxia; Intensidades: 1-baja; 2-moderada; 3-alta y en las distintas situaciones: Reposo, esfuerzo v recuperación.

#### 4.6.4 Glutacion Reductasa (GRX)

La actividad Glutacion reductasa (Gráfico IV.15) solo presenta diferencias estadísticamente significativas, con valores más reducidos en las condiciones de reposo y esfuerzo de la intensidad 3 frente a 2 en hipoxia.

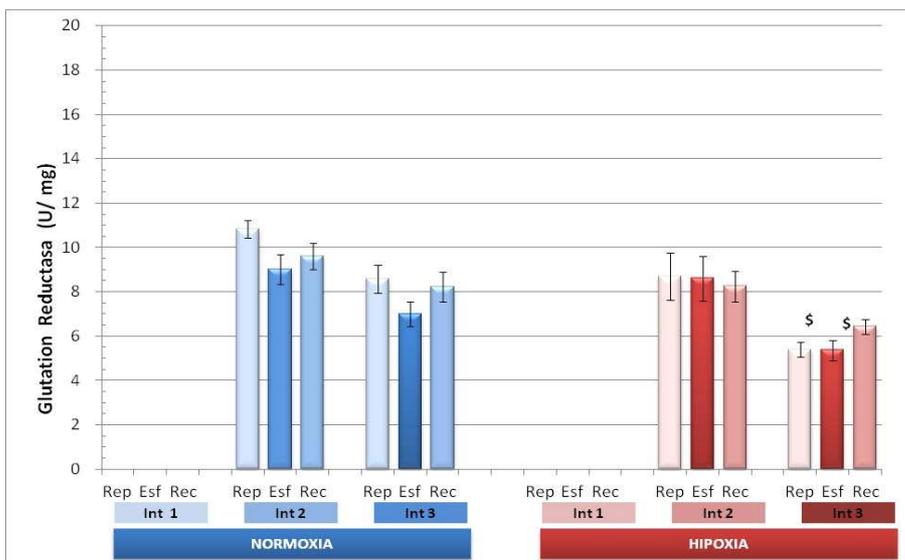


Gráfico. IV.15- Actividad Glutacion Reductasa (GRX) en las condiciones: Normoxia e Hipoxia; Intensidades: 1-baja; 2-moderada; 3-alta y en las distintas situaciones: Reposo, esfuerzo y recuperación.

## 4.7 Resultados de los antioxidantes no enzimáticos

### 4.7.1- Tocoferol

Observamos (Gráfico IV.16) un descenso estadísticamente significativo de la concentración plasmática de tocoferol en la intensidad 2 de hipoxia con respecto a la intensidad 2 de normoxia, en las tres condiciones: reposo, esfuerzo y recuperación.

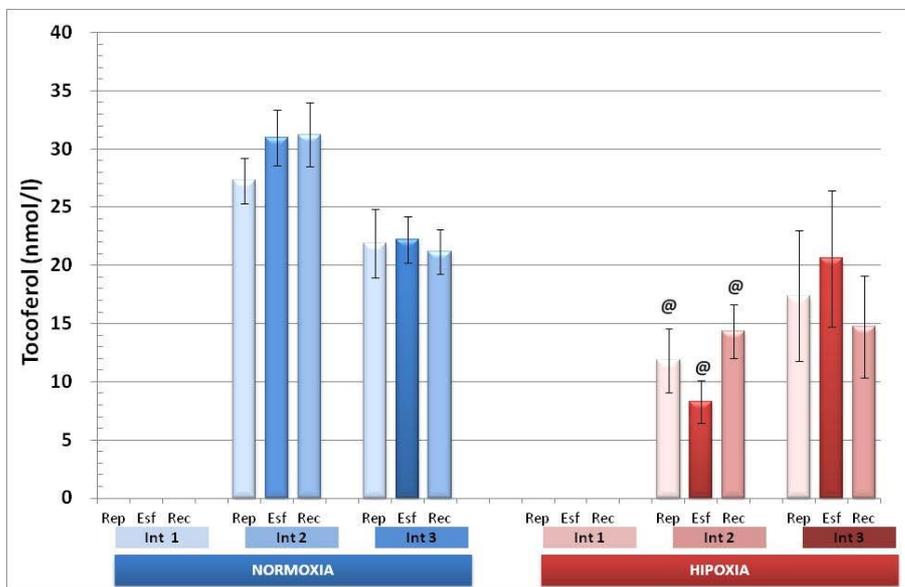


Gráfico. IV.16- Concentración plasmática de Tocoferol (nmol/l) en las condiciones: Normoxia e Hipoxia; Intensidades: 1-baja; 2-moderada; 3-alta y en las distintas situaciones: Reposo, esfuerzo y recuperación.1

### 4.7.2 Retinol

Como se muestra en el gráfico IV.17, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones plasmáticas de retinol, para todas las combinaciones posibles.

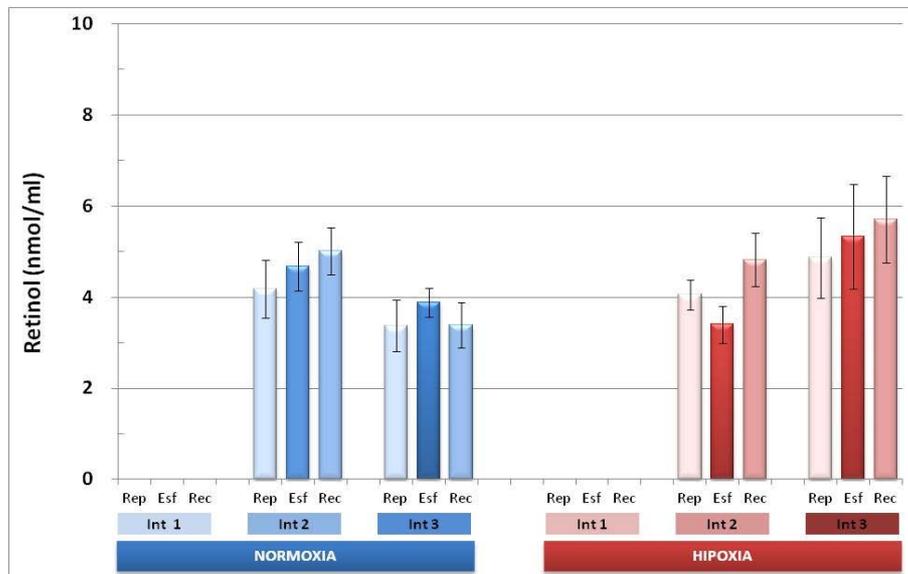


Gráfico. IV.17- Concentración plasmática de Retinol (nmol/ml) en las condiciones: Normoxia e Hipoxia; Intensidades: 1-baja; 2-moderada; 3-alta y en las distintas situaciones: Reposo, esfuerzo y recuperación.

#### 4.7.3 Coenzima Q<sub>10</sub>

Observamos una disminución en los niveles de coenzima Q<sub>10</sub> en hipoxia y con valores estadísticamente significativos en las situaciones de esfuerzo y recuperación de la intensidad 3 frente a 2 de normoxia. Del mismo modo también existen en reposo y recuperación de la intensidad 2 de hipoxia frente a reposo y recuperación de la intensidad 2 de normoxia (Gráfico IV.18).

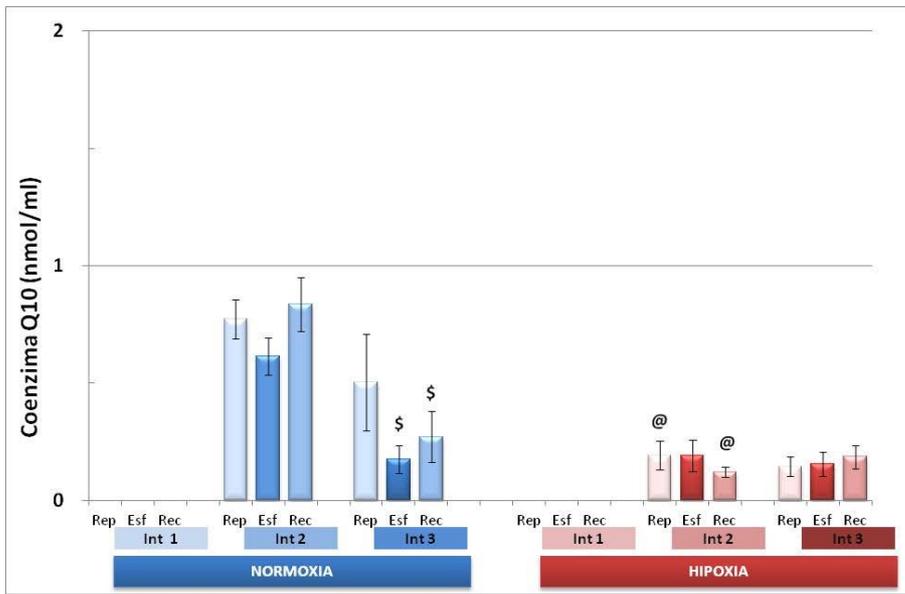
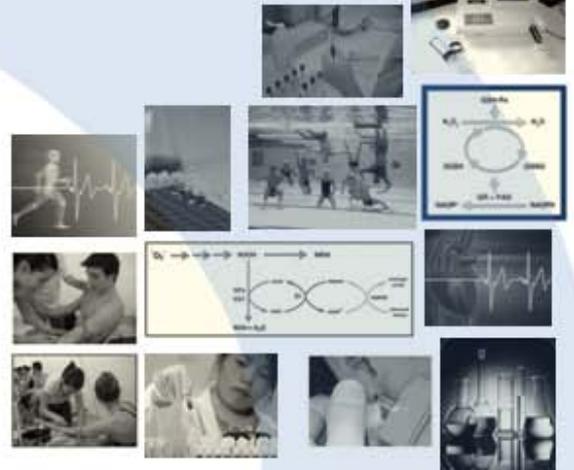
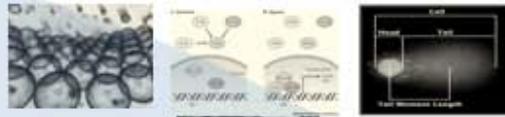
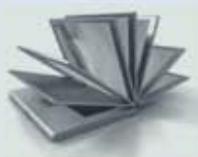
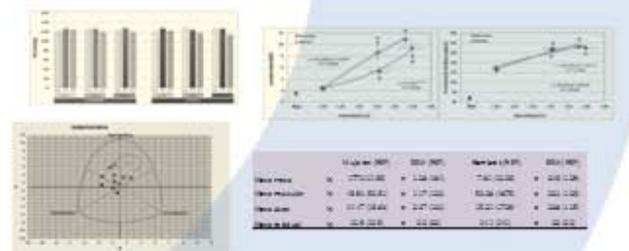


Gráfico. IV.18- Concentración plasmática de Coenzima Q<sub>10</sub> (NMOL/ML) en las condiciones: Normoxia e Hipoxia; Intensidades: 1-baja; 2-moderada; 3-alta y en las distintas situaciones: Reposo, esfuerzo y recuperación.



## CAPÍTULO V Discusión y Conclusiones



	12/10/2015	12/11/2015	12/12/2015	12/13/2015
Mean Price	1.7711 (2.00)	1.7811 (2.00)	1.7811 (2.00)	1.7811 (2.00)
Mean Production	1.8811 (2.00)	1.8811 (2.00)	1.8811 (2.00)	1.8811 (2.00)
Mean Sales	1.8811 (2.00)	1.8811 (2.00)	1.8811 (2.00)	1.8811 (2.00)
Mean Profit	1.8811 (2.00)	1.8811 (2.00)	1.8811 (2.00)	1.8811 (2.00)

## 5.1 Introducción

### 5.1.1 Definición y Caracterización de la Natación

La natación es una práctica deportiva en la que participa la mayor parte de la masa muscular y ésta, utiliza todo el espectro de sustratos energéticos y todos los tipos de sistemas de transferencia de energía (Capelli C. y col., 1998). El medio en el que se realiza la natación presenta diferencias considerables con respecto al resto de prácticas deportivas. Por un lado, las resistencias a vencer durante el desplazamiento y las fuerzas que lo determinan son extremadamente complejas. Por otro, la exigencia de una mecánica respiratoria diferente por encontrarse en un medio acuático. Nadar rápido, requiere la optimización y aprovechamiento de esas fuerzas (gravedad, flotación, resistencia y propulsión) tratando de maximizar unas y minimizar otras, hasta alcanzar la máxima eficiencia desde el punto de vista físico, para tratar de unirlo con el mejor potencial fisiológico del deportista. Son, por tanto, multitud de factores los que pueden afectar la capacidad del nadador. Biomecánica y Fisiología son las herramientas actuales utilizadas por los científicos del deporte de la natación para determinar los factores importantes cara a maximizar el rendimiento (Troup, JP, 1999).

Desde el punto de vista fisiológico, la natación presenta otras peculiaridades que derivan de la posición horizontal y de encontrarse en suspensión en el medio acuoso, lo que comporta aspectos diferenciados de la función cardiovascular con respecto a otras disciplinas deportivas. El gasto cardíaco es, probablemente no limitante para el rendimiento de los nadadores

ya que alcanzan fácilmente los valores máximos durante la carrera. La frecuencia cardíaca máxima, sin embargo suele ser inferior, aproximadamente unos 10 latidos por minuto en comparación a otras disciplinas deportivas como la carrera. Los factores locales, tales como la circulación periférica, la densidad capilar, la presión de perfusión y la capacidad metabólica de los músculos activos, son condicionantes importantes de la capacidad de producción de energía y, también es necesario hacer hincapié en la trascendencia de los movimientos técnicos de la natación. La mejora de la técnica y su óptima ejecución desde el punto de vista biomecánico, complementan en gran medida los continuos avances en el rendimiento (Holmér, 1992).

## **5.2 Porque entrenamiento en Hipoxia?**

Según (Strzata y cols., 2011) Cambios en diferentes condiciones ambientales con reducción de oxígeno, pueden causar adaptaciones sistémicas en el organismo del deportista, que suelen ser descritos como “Dopaje natural”, proceso de adaptación metabólico a un entorno cambiante a nivel celular sin necesidad de consumo de drogas. En el medio deportivo de elite, es muy frecuente el uso de entrenamiento en hipoxia moderada con el objetivo de mejorar la capacidad de transporte de oxígeno e incrementar el rendimiento a nivel del mar (Charles y cols., 2008; Pialoux, 2006; Meeuwsen y cols., 2001).

El entrenamiento en altitud sigue siendo ampliamente estudiado por numerosos grupos de investigación. Sin embargo, la utilización de un diverso

abánico de situaciones experimentales y metodológicas, dificulta la interpretación de los resultados y a su vez determina la continuidad de la controversia sobre su eficacia (Clark y cols., 2009; Barry Braun 2008; Subudhi y Robach 2008; Schuler y cols., 2007; Burtcher y cols., 1996, Levine y Stray Gundersen, 1997). No obstante, la combinación de la actividad física e hipoxia, además del interés por maximizar el rendimiento, nos ofrece una situación fisiológica natural magnífica para profundizar en el conocimiento de sus efectos sobre el equilibrio redox en atletas (Pialoux y cols., 2008; Heinicke y cols., 2009; Kabasakalis y cols., 2011).

### **5.3 Características antropométricas de los nadadores estudiados**

Las características morfológicas de los seres humanos cambian según la edad, el sexo, la raza, la alimentación y el tipo de actividad que desempeñan (Luengo y cols., 2000). En la natación, como en otras prácticas deportivas, la composición corporal y las características morfométricas pueden afectar el rendimiento de los nadadores requiriéndose un patrón morfológico específico para cada estilo natatorio (Zuniga y col., 2011).

En nuestro estudio, la composición corporal de los sujetos experimentales muestra gran homogeneidad para ambos sexos (Tabla III.1.material y método).

Las mujeres participantes tenían un peso y un porcentaje de grasa corporal de  $59.7 \pm 2.03$  kg y  $17.71 \pm 1.07$  % respectivamente. Estos valores son

superiores aunque próximos a los de referencia más apropiados, dado el nivel de los sujetos de nuestro estudio, descritos por Luengo y colaboradores (estudio realizado en nadadores crolistas de la élite española) (Luengo y cols., 2000). El peso y porcentaje de grasa corporal de los varones participantes en nuestro estudio fue de  $73.2 \pm 5.17$  kg y  $7.8 \pm 0.46$  %, que a diferencia de las féminas presentaron valores ligeramente inferiores a los referentes aportados por (Luengo y col., 2000). No obstante, tanto el peso como porcentaje de grasa corporal de nuestros nadadores se sitúan dentro del rango de normalidad aportado por Lavoie y Montpetit (1989), 14 a 19% de grasa corporal para mujeres y de 5 a 10% para varones.

El somatotipo medio fue de 3.48-3.13-2.33 y 2.47-4.16-2.31 para mujeres y hombres respectivamente. Al comparar estos valores con los de referencia (Luengo y cols., 2000), observamos una distancia somatotípica, ó distancia de dispersión del somatotipo (SDD), de 3.73 para mujeres y de 4.16 para hombres. Este índice nos indica que nuestros nadadores no son morfométricamente similares a los de referencia (figura.IV.1.resultados) lo que probablemente se debe a que no todos nuestros sujetos son crolistas. De hecho, si comparamos el SDD con nadadores de varios estilos de referencia mundial, observamos más proximidad en los morfotipos.

En cualquier caso, tanto la composición corporal como el somatotipo de nuestros sujetos experimentales, indican la idoneidad de los mismos para los objetivos de nuestro estudio.

#### **5.4 Parámetros fisiológicos de las sesiones de entrenamiento (Ht, Hb, PaS, PaD, lactato)**

Para los objetivos de nuestro estudio, era esencial el mantenimiento de las condiciones experimentales de las tres sesiones de entrenamiento realizadas en cada una de las altitudes y que a su vez estas fuesen fácilmente repetibles por cualquier otro grupo experimental. El elemento esencial para conseguirlo fue el mantenimiento de la velocidad en cada una de las intensidades a las dos altitudes. Como se muestra en el (gráfico.IV.4.resultados), las velocidades medias fueron de  $0.99\pm 0.01$ ,  $1.23\pm 0.04$  y  $1.40\pm 0.05$  m/s para las tres intensidades en normoxia, valores prácticamente idénticos a los realizados en la situación de hipoxia ( $0.99\pm 0.01$ ,  $1.24\pm 0.04$  y  $1.39\pm 0.05$  m/s). Estas velocidades fueron seleccionadas buscando como objetivo unos valores de lactato en normoxia por debajo del umbral anaeróbico para la intensidad baja, en el entorno del umbral anaeróbico para la segunda y por encima de este para la tercera intensidad.

Esto nos permitiría comprobar el efecto de la altitud moderada sobre uno de los parámetros fisiológicos más indicativos de intensidad.

La lacticemia obtenida a la conclusión de las tres sesiones de entrenamiento en normoxia, que se muestran en el gráfico.V.2, fueron de  $2.05\pm 0.22$ ,  $5.36\pm 0.44$  y  $9.69\pm 0.46$  mmol/l. Estos valores fueron estadísticamente superiores ( $p < 0.05$ ) en la situación de hipoxia para la intensidad media ( $8.67\pm 0.82$  mmol/l) y alta ( $11.31\pm 0.43$  mmol/l), mientras que fueron iguales para la intensidad baja ( $1.96\pm 0.33$  mmol/l).

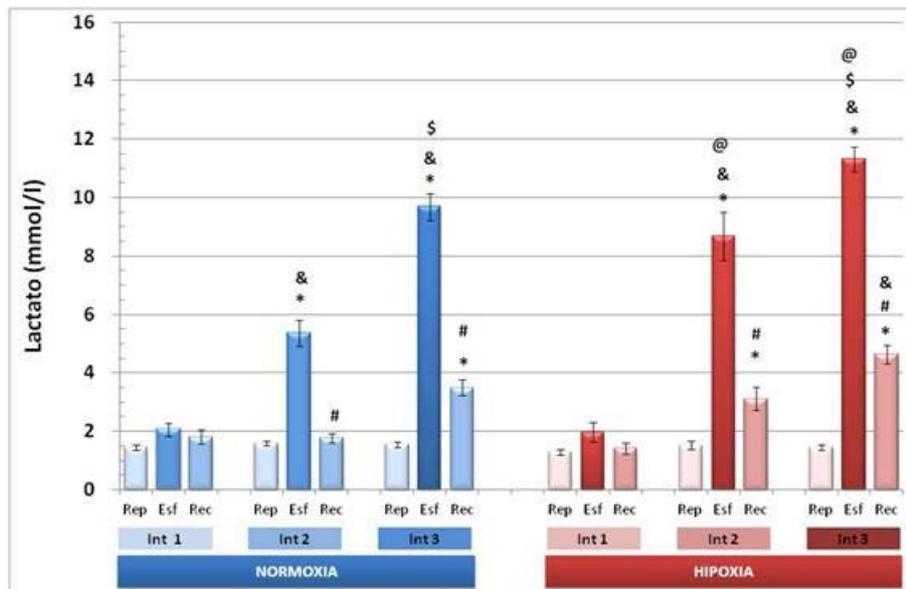


Gráfico.V. 1- Concentración de Lactato (mmol/l) en las condiciones: Normoxia e Hipoxia; Intensidades: 1-baja; 2-moderada; 3-alta y en las distintas situaciones: Reposo, esfuerzo y recuperación.

Uno de los problemas de los estudios comparativos realizados a diferente altitud sobre el nivel del mar, es que los incrementos de los parámetros sanguíneos, como en nuestro caso el lactato, se deban a la hemoconcentración inducida por la exposición aguda a la hipoxia.

Los resultados de hemoglobina y de hematocrito obtenidos al concluir las tres sesiones de entrenamiento y a los 15 minutos de recuperación, en normoxia e hipoxia moderada (gráficos.IV.6 y IV.7.resultados), fueron muy similares y sin mostrar diferencias estadísticamente significativas. No obstante la hipoxia induce una ligera hemoconcentración, similar en magnitud para cada una de las intensidades y en las tres condiciones experimentales: reposo, esfuerzo y recuperación. Si aplicamos el algoritmo de Dill y Costill (Dill, &

Costill, 1974), observamos que en reposo la altitud induce una pérdida media del volumen plasmático del 6% en las tres condiciones indicadas. No obstante, si aplicamos esta corrección sobre los valores de lactato en sangre para las intensidades media y alta (en altitud moderada), obtendríamos los siguientes valores:  $8.15 \pm 0.76$  mmol/l para intensidad media y de  $10.63 \pm 0.40$  mmol/l para la elevada (Gráfico V.3).

A pesar de la corrección, los valores de lactato en hipoxia siguen siendo más elevados con respecto a normoxia, aunque ahora de forma significativa ( $p < 0.05$ ) solo para la intensidad media. En cualquier caso, nuestros resultados están en consonancia con lo observado hasta ahora para otras disciplinas deportivas (Friedmann et al., 2005; Van Hall et al., 2009).

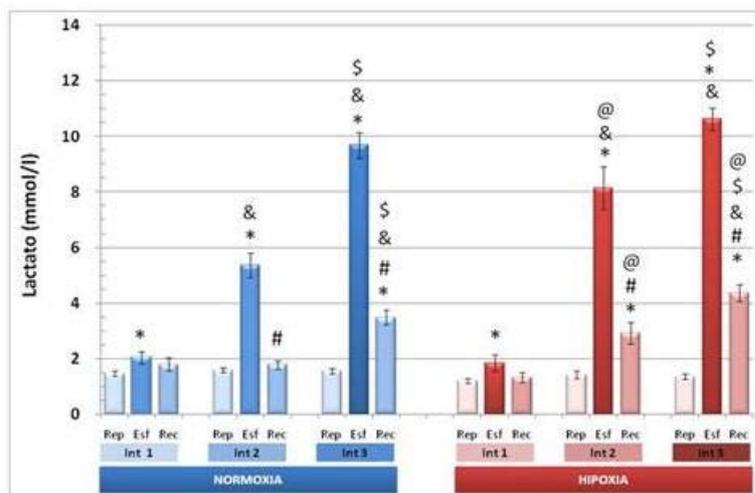


Gráfico.V. 2-Lacticemia (mmol/l) de los nadadores, corregido por la ecuación de( Dill & Costill, 1974)en las altitudes: Normoxia e Hipoxia; Intensidades: 1-baja; 2-moderada; 3-alta y en las distintas situaciones: Reposo, esfuerzo y recuperación.

Estos valores nos indican que a igualdad de intensidad, los músculos involucrados en la natación generan mayor producción de lactato, efecto claramente inducido por la hipoxia. La explicación fisiológica la podemos atribuir a una mayor descarga adrenérgica inducida en ambientes hipoxicos moderados frente a normóxicos, fenómeno ampliamente descrito en bibliografía (Katayama y col., 2010). La acción de las catecolaminas probablemente modifica el perfil de reclutamiento de fibras de contracción rápida, adelantando el reclutamiento de las mismas en hipoxia. Esto estaría de acuerdo con los valores de lactato obtenidos a intensidad media en hipoxia, que son significativamente superiores ( $p < 0.05$ ) a sus correspondientes en normoxia, mientras que a la intensidad elevada, prácticamente máxima, el reclutamiento de las fibras rápidas probablemente se debe igualar en ambas altitudes generando valores de lactato similares.

Lo que sí está claro, es que un aumento sanguíneo de lactato comporta un incremento proporcional de  $H^+$ , los cuales podrían inducir un mayor grado de fatiga sistémica y un incremento en el daño de miofibrillas musculares con respecto a la situación de normoxia a una misma velocidad (Gladden, 2004). Una de las funciones clave del lactato es exteriorizar  $H^+$ , cotransporte realizado por los transportadores monocarboxílicos MCT4 de mayor distribución en fibras rápidas (T. Hashimoto, 2004). Una posibilidad, que habría que comprobar, es precisamente la existencia de algún mecanismo dependiente de la hipoxia (probablemente mediado por HIF-1 $\alpha$ ) que determinase un mayor número y/o actividad de dichos transportadores con el objetivo de exteriorizar más protones e impedir una fatiga de las células musculares. Otra posibilidad podría

relacionarse sencillamente por el incremento metabólico consecuencia de la mayor descarga adrenérgica y que cursaría con una mayor exteriorización de lactato y protones. En cualquier caso, habría que comprobar si la mayor actividad metabólica comportaría un mayor trabajo sarcomérico. Estos últimos supuestos, son precisamente objeto de estudio en nuestro laboratorio.

Paradójicamente y a diferencia de los resultados obtenidos de lactato en sangre, la frecuencia cardiaca tanto a intensidad media ( $170.29 \pm 1.84$  lpm) como a alta ( $171.90 \pm 2.96$  lpm), en hipoxia moderada, son idénticas a las obtenidas en normoxia ( $168.89 \pm 3.35$  y  $175.60 \pm 2.25$  lpm para las respectivas intensidades). Además no existieron diferencias estadísticamente significativas entre ambas intensidades. Otros autores, en condiciones experimentales parecidas a las nuestras, aunque con hipoxia inducida y en corredores de fondo, observan valores inferiores de frecuencia cardiaca en hipoxia a una misma intensidad (Friedmann y col., 2004), existiendo, no obstante, una abierta discusión sobre la altitud a la que se produce dicho descenso. En un estudio de respuesta aguda a 4000 m sobre el nivel del mar, no observaron reducción ni de frecuencia cardiaca ni de gasto cardiaco, manteniéndose constante el volumen sistólico (Stenberg y cols., 1966). No obstante podría deberse a una cuestión de tiempo, requiriéndose al menos cuatro horas para que se produzca un descenso de la frecuencia cardiaca (Saltin, 1996; Lundby y cols., 2001). Por otra parte, (Lundby y cols., 2001) no observaron descensos de frecuencia cardiaca a 3300 m, mientras que otros investigadores describen descensos de la frecuencia cardiaca máxima a una altitud ligeramente inferior a la anterior (3000 m) (Koistinen y cols., 1995) e incluso a 2500 m (Friedmann y cols., 2005;

Katayama y cols., 2010). Estos resultados, son de especial relevancia, puesto que muchos deportistas pueden entrenar en altitud a una intensidad excesiva si solo se guían por la frecuencia cardiaca (Bärtsch y Saltin, 2008). Esto se ve reforzado por el hecho de que durante ejercicios submáximos, la frecuencia cardiaca responde de forma más incrementada a baja que a alta altitud (Bärtsch y Saltin, 2008).

El que no se produzcan cambios en frecuencia cardiaca o estos disminuyan en hipoxia moderada a una intensidad dada, ha sido explicada por un descenso del trabajo cardiaco, probablemente por un descenso del flujo sanguíneo pulmonar y su incremento correspondiente del tiempo de paso de los glóbulos rojos, especialmente en intensidades submáximas y máximas. Esto determinaría una óptima oxigenación de la sangre a su paso por los alveolos, asegurando una óptima saturación de la hemoglobina arterial (Boushel y cols., 2001; Bärtsch y Saltin, 2008). Otra justificación de este hecho, que en realidad determinaría lo anterior, sería por un incrementado del tono parasimpático en hipoxia moderada (Boushel y cols., 2001) como consecuencia de una regulación a la baja de los  $\beta$ -receptores cardiacos (Richalet y cols., 1988; Favret y Richalet, 2007). La contribución de estos investigadores es esencial para justificar el hecho de que a una intensidad dada la frecuencia cardiaca en hipoxia moderada, o no incrementa e incluso disminuye, a pesar de un mayor aumento de liberación de catecolaminas (Katayama y cols., 2010). En nuestro estudio, todo lo anterior se vería acentuado, por ser la natación una práctica deportiva que se realiza en posición horizontal y en suspensión, lo que facilitaría la función cardiaca.

Gran parte de los equipos de los diversos deportes, planifican su estancia a altitud incluyendo una fase de aclimatación, pero es frecuente observar como algunos de ellos lo hacen por corto periodo e incluso con subidas súbitas para entrenar y volver a nivel del mar. En estos casos no solo no se tiene en cuenta la fase de aclimatación sino que tampoco se ajustan las cargas de intensidad para este periodo específico. Según (Schmitt y cols., 2006), la planificación de entrenamiento en altitud sigue siendo muy específico y cualquier error en volumen y/o intensidad puede causar fatiga a largo plazo para el atleta e incluso retrasar o eliminar los efectos positivos de la exposición a altitud.

La frecuencia cardiaca y la concentración de lactato en sangre son las herramientas más utilizadas para el control de la intensidad en el entrenamiento (Toubekis y cols., 2011, Robertson y cols., 2010, Lecoultre y cols., 2009, Greenwood y cols., 2008, Charles y cols., 2008, Schmitt y cols., 2008, Friedmann y cols., 2004), no obstante aun encontramos discrepancias en la equivalencia relativa a la intensidad submaxima de la frecuencia cardiaca en hipoxia. Schmitt y cols., (2006) recomiendan el uso de la variación de frecuencia cardiaca (VFC) como una buena herramienta para monitorizar los efectos de la hipoxia en cargas de esfuerzo para nadadores de elite. Según (Friedmann y cols., 2004) intensidades relativas en normoxia e hipoxia son equivalentes cuando el ejercicio de resistencia se realizan con velocidades inferiores al umbral anaeróbico individual (IAT) o en su entorno. Sin embargo, en hipoxia, la relación de la frecuencia cardíaca y lactato en sangre, deja de ser lineal cuando la intensidad del ejercicio es submaxima. Por tanto entrenar en

hipoxia moderada con la frecuencia cardiaca de referencia de situaciones normóxicas suele ser un error.

En otras disciplinas deportivas, el entrenamiento en altitud moderada en su fase inicial se caracteriza por generar unos valores de lactato sanguíneos superiores a los generados a nivel del mar. Friedmann y cols., (2005), lo demuestra en corredores de fondo sometidos a una prueba de esfuerzo incremental en condiciones de hipoxia moderada (acute normobaric hypoxia). Van Hall y cols., (2009) también lo evidencia aunque en condiciones experimentales muy diferentes (utiliza cicloergometro y en condiciones de hipoxia simulada tanto aguda como crónica a 4100 m sobre el nivel del mar). Sin embargo no hay muchos estudios con este enfoque experimental en nadadores.

Como decíamos en párrafos anteriores, en nuestro estudio, tanto en hombres como en mujeres, observamos que para una misma velocidad de nado, el incremento de lactato sanguíneo es mayor en altitud moderada (2320 m) con respecto a baja (669 m sobre el nivel del mar) y que es más acentuado a intensidad moderada que a submáxima.

El diseño experimental de nuestro estudio tiene entre sus objetivos ofrecer una herramienta que nos permita, de forma rápida y con metodología asequible, optimizar las velocidades de entrenamiento en altitud moderada (Centro de Alto Rendimiento Deportivo de sierra Nevada) y que estas sean equivalentes a las de altitudes inferiores.

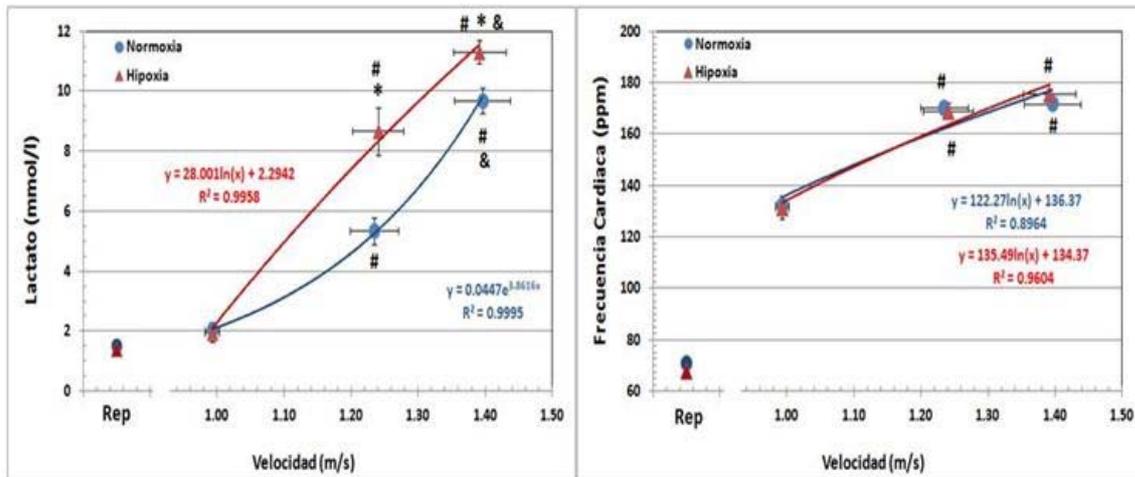


Gráfico.V. 3- Los círculos y cuadrados representan los valores medios  $\pm$  EEM (barras verticales y horizontales para los ejes "y" y "x" respectivamente) de todos los sujetos. Solo se muestran las diferencias estadísticamente significativas para lactato y frecuencia cardíaca ( $p < 0.01$ ). \* indica diferencias entre valores de hipoxia vs normoxia para cada una de las intensidades; # indica diferencias entre intensidades media y/o máximas vs baja; & indica diferencias entre alta intensidad vs media. Las líneas representan el análisis de regresión (mejor ajuste) entre lactato ó frecuencia cardíaca vs velocidad de nado. N= 12.

Como se observa en las figuras del (gráfico.V.4), bastarían tres intensidades de nado para poder correlacionar lactato frente a velocidad y hacer los citados ajustes. Ambas figuras ponen de manifiesto que la dinámica de acumulo de lactato en sangre en hipoxia moderada, tanto para hombres como para mujeres, no sigue una correlación exponencial clásica como la observada en normoxia, sino que el mejor ajuste pasa a ser logarítmico.

Este cambio de cinética no ha sido descrito hasta ahora ni en nadadores ni en otras disciplinas deportivas en las que probablemente sería similar.

**Discusión y Conclusiones**

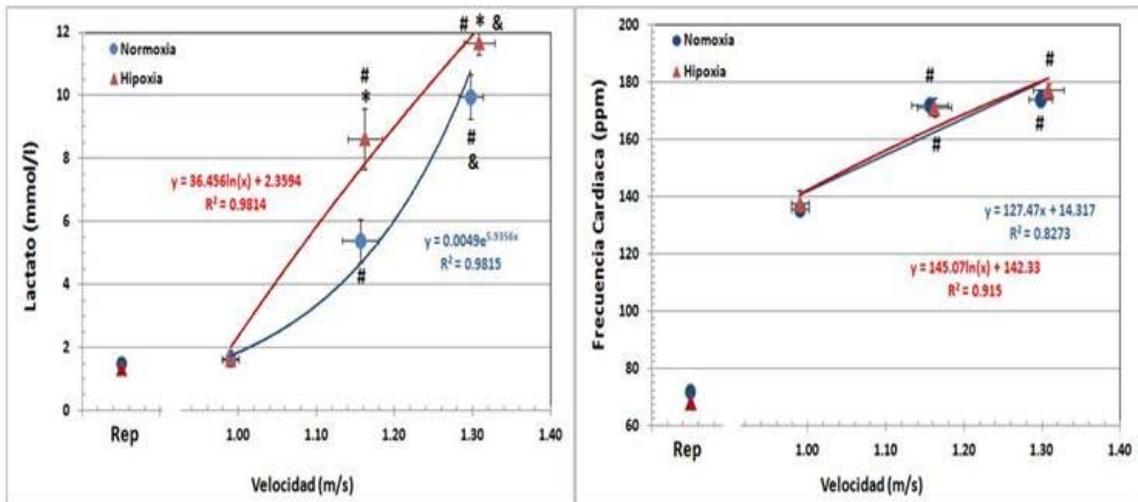


Gráfico.V. 4- Los círculos y cuadrados representan los valores medios  $\pm$  EEM (barras verticales y horizontales para los ejes "y" y "x" respectivamente) de mujeres. Solo se muestran las diferencias estadísticamente significativas para lactato y frecuencia cardíaca ( $p < 0.01$ ). \* indica diferencias entre valores de hipoxia vs normoxia para cada una de las intensidades; # indica diferencias entre intensidades media y/o máximas vs baja; & indica diferencias entre alta intensidad vs media. Las líneas representan el análisis de regresión (mejor ajuste) entre lactato ó frecuencia cardíaca vs velocidad de nado. N = 6.

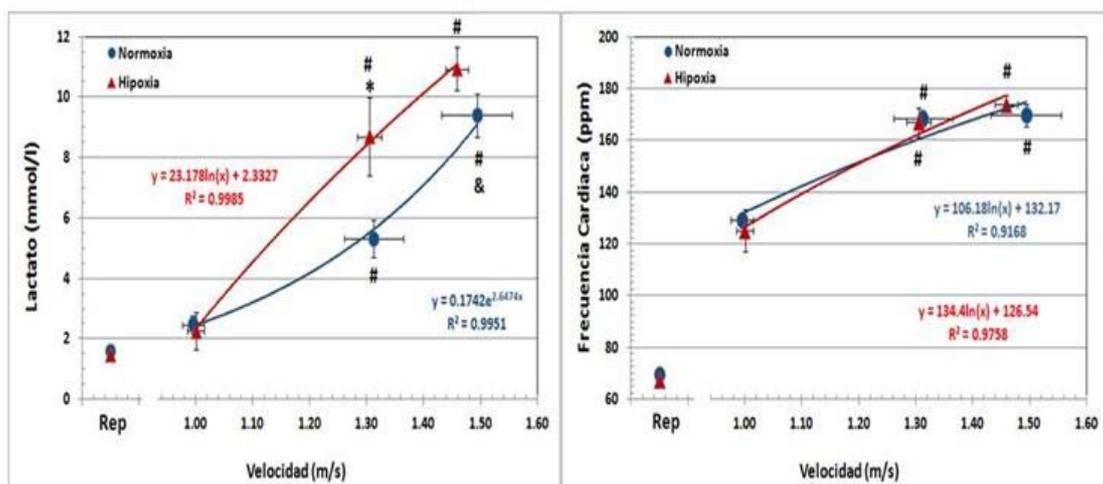


Gráfico.V. 5- Los círculos y cuadrados representan los valores medios  $\pm$  EEM (barras verticales y horizontales para los ejes "y" y "x" respectivamente) de hombres. Solo se muestran las diferencias estadísticamente significativas para lactato y frecuencia cardíaca ( $p < 0.01$ ). \* indica diferencias entre valores de hipoxia vs normoxia para cada una de las intensidades; # indica diferencias entre intensidades media y/o máximas vs baja; & indica diferencias entre alta intensidad vs media. Las líneas representan el análisis de regresión (mejor ajuste) entre lactato ó frecuencia cardíaca vs velocidad de nado. N = 6.

En el caso de las nadadoras (gráfico.V.5), la velocidad de nado que genera un lactato sanguíneo de 6 mmol/l, es de 1.20 m/s en normoxia mientras que en hipoxia moderada dicha concentración se consigue a una velocidad 0.1 m/s inferior (1.10 m/s). Para los varones (gráfico.V.6), esta interpolación determina que la intensidad de nado que genera los 6 mmol/l de lactato es de 1.34 m/s en normoxia y de 1.17 en hipoxia. De esta forma sería fácil y rápido ajustar individualmente para cada atleta, las velocidades de nado en altitud moderada en función de los objetivos del entrenamiento y de sus equivalentes a la situación de normoxia.

Nuestros resultados nos permite concluir que durante el ejercicio en situación de hipoxia aguda moderada, a intensidades moderadas y submaximas, el trabajo metabólico y/o mecánico muscular producido en natación no está correctamente definido por la frecuencia cardiaca y sí por el lactato en sangre. Nuestro estudio evidencia que en las primeras sesiones de entrenamiento en hipoxia moderada es conveniente un ajuste de la intensidad para evitar posibles sobrecargas e incluso desentrenamiento y preferiblemente utilizar los valores de lactato en sangre a los de la frecuencia cardiaca.

## **5.5 Parámetros de Estrés Oxidativo**

### **5.5.1 TBARS e Hidroperóxidos (Normoxia)**

En los resultados de nuestro estudio, tanto en normoxia como en hipoxia, no hemos observado ninguna diferencia significativa en los marcadores de estrés oxidativo de origen lipídico, TBARS e Hidroperóxidos,

por la realización de 90 minutos de actividad física, a ninguna de las intensidades. Es más, incluso muestran una tendencia a disminuir en las situaciones de esfuerzo y a los 15min de recuperación. Estos resultados, están en contra de otros estudios en los que observan incrementos significativos de ambos marcadores. La gran diferencia metodológicamente que presenta nuestro estudio con respecto a la mayoría de publicaciones, es la larga duración (90 minutos) de las sesiones evaluadas desde el punto de vista del estrés oxidativo. Probablemente es un tiempo suficientemente largo como para que los mecanismos de defensa antioxidante y/o los mecanismos reparadores se activen de forma adecuada y atenúen los marcadores de estrés oxidativo de origen lipídico. En un estudio reciente (Kabasakalis y cols., 2011) en el que investigaron los efectos de una ultramaratón de natación, tampoco observaron incrementos ni en la concentración plasmática de TBARS y ni en la capacidad antioxidante plasmática total. En este estudio, los atletas nadaron durante 3.4h y cubriendo 15 km. Los investigadores concluyeron que la baja intensidad y la larga duración no están asociados con el daño oxidativo.

No obstante en nuestro estudio una de las tres intensidades, aunque de larga duración, prácticamente fue máxima. Nuestros datos a alta intensidad estarían de acuerdo con lo observado por Bloomer y cols. (2006), en un estudio con 48 atletas bien entrenados (25 hombre y 23 mujeres) sometidos a una sesión de 6 repeticiones de esfuerzo máximo en cicloergómetro, en el que no observaron aumentos plasmáticos ni en malondialdehído ni en grupos carbonilo asociadas a proteínas. Concluyeron que estas sesiones extenuantes no

aumentan el estrés oxidativo porque los atletas estaban bien entrenados y la apropiada adaptación de los mecanismos de defensa antioxidante.

Otro aspecto que puede ser relevante en estos estudios, es la correcta ingesta de antioxidantes. Aunque nuestro estudio presenta ciertas lagunas, pocos registros y falta de exactitud, en general demuestran un aporte apropiado de antioxidantes. Demenice y cols. (2010) investigaron las respuestas de los marcadores de estrés oxidativos en nadadores bien entrenados sometidos a entrenamiento de alta intensidad (interval training), observando un aumento significativo en los niveles de TBARS, pero en su caso, la ingesta de antioxidante de los atletas estudiados era claramente deficiente, pudiendo este ser el elemento clave en los resultados obtenidos.

### 5.5.2 TBARS e Hidroperóxidos (Hipoxia)

La gran paradoja de nuestro estudio, y probablemente lo más interesante, son los resultados de los marcadores de estrés oxidativo de origen lipídico utilizados. Nosotros partíamos de la hipótesis, de que el estrés físico más el de hipoxia incrementaría los niveles de estrés oxidativo (ver gráficos IV.8 y 9-resultados). Sin embargo nuestros resultados claramente demuestran que solamente el estímulo hipóxico, aunque de forma aguda, disminuye dichos marcadores. Es la primera vez que aparece en bibliografía esta situación, aunque hay que aclarar que nuestro estudio, metodológicamente, difiere del resto, puesto que nuestros nadadores ascendían al ambiente hipóxico moderado para realizar la sesión de entrenamiento y rápidamente volvían a

normoxia. En cualquier caso, debe de existir un mecanismo, de rápida instauración, mediante el que se estimulen de forma eficiente los mecanismos de defensa antioxidante, o bien, que los mecanismos clásicos de producción de especies reactivas derivadas del oxígeno sean menos operativos.

Bailey y cols. (2001), observaron que la hipoxia y ejercicio físico son fuentes independientes de estrés oxidativos. Pialoux y cols. (2009), en una revisión reciente, citan varios estudios que observan una disminución del estado redox mitocondrial durante hipoxia como causa de la generación de EROs, principalmente a nivel III de citocromo aunque también por activación de xantina oxidasa, NADPH-oxidasa y fosfolipasa A<sub>2</sub>. Estos factores, asociados al ejercicio, afectarían negativamente el equilibrio antioxidante. Otros estudios (Heinicke y cols., 2009; Pialoux y cols., 2006; Pialoux 2008), también pusieron de manifiesto aumentos en los marcadores de estrés oxidativo durante el ejercicio en hipoxia.

En general, los estudios anteriores y otros similares, difieren metodológicamente del nuestro puesto que utilizan altitudes más elevadas y su correspondiente fase de aclimatación.

Recientemente, Elegánczyk-kot y cols. (2011), evaluaron los índices pro y antioxidantes en siete atletas de esquí alpino bien entrenados (20 a 29 años), sometidos durante 6 días de entrenamiento a 3160m en la fase de preparación específico. En estas condiciones, observaron un sutil aumento en los índices inmunológicos, pero no hubo cambios en los parámetros prooxidativos (TBARS) ni en antioxidantes (capacidad antioxidante total), atribuyendo los

resultados a posibles adaptaciones por el entrenamiento anaeróbico. Chandel y Budinger (2007), aun que en estudios in vitro, observaron resultados similares a los de nuestro estudio que justificaron la disminución de generación marcadores de estrés oxidativo durante hipoxia, por la activación del HIF-1 y la prevención de la senescencia.

Bailey y cols. (2001), midieron marcadores de peroxidación lipídica, tras la realización de actividad física en hipoxia intermitente en dos grupos de sujetos (14 en normoxia y en 18 hipoxia). Constataron bajos valores de peroxidación lípidica en hipoxia que en normoxia y atribuyeron la causa a una eficiente redistribución de  $\alpha$  tocoferol. Estos autores concluyeron que la baja generación de EROs puede ser una consecuencia del ajuste de mecanismos homeostáticos que instauran los mecanismos adaptativos de protección.

Como decíamos en párrafos anteriores, para justificar nuestros resultados en hipoxia, se deben tener en cuenta las peculiaridades de nuestro diseño experimental, muy diferente a los del resto de investigaciones sobre estrés oxidativo en hipoxia. Por un lado la exposición aguda a altitud moderada (2320m), entrenando durante 3:30 en cada sesión para regresar rápidamente a situación de normoxia. Por otro, el buen nivel de entrenamiento de nuestros nadadores sin menospreciar la ingesta apropiada de antioxidantes. No obstante, queda sin justificar totalmente la paradoja observada del descenso de los marcadores de estrés oxidativo por esta hipoxia moderada y aguda.

Una posibilidad, deriva de estudios recientes en los que se evidencia la formación de supercomplejos mitocondriales (J. Vonck and E. Schafer, 2009)

y/o de fusión de mitocondrias (H. Ding y cols., 2010), que incrementan notablemente la eficiencia en la síntesis de ATP y producen muchas menos especies reactivas derivadas del oxígeno. Estos estudios, realizados en cultivos celulares, muestran como inductor, al menos del primer proceso, a la hipoxia. No obstante, este supuesto habría que ser comprobado si realmente se produce en humanos y de la forma tan rápida en la que opera en nuestro caso.

### **5.6 Marcador de daño al ADN celular (COMET ASSAY)**

Según Wang y cols. (2011), el entrenamiento adecuado en situación de hipoxia, mejora el rendimiento a nivel del mar, pero existen dudas sobre si mejora la función del sistema inmunitario.

Otro marcador de estrés oxidativo, es la evaluación de marcadores de oxidación del ADN. En nuestro estudio hemos utilizado el ensayo cometa (COMET ASSAY) en linfocitos periféricos, para evaluar estos posibles daños y compararlos a los resultados obtenidos en los marcadores de origen lipídico (TBARS y Hidroperóxidos). Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas en ninguna condición (normoxia e hipoxia), ni a las distintas intensidades (baja, media y alta) . La tendencia observada en normoxia ha sido muy parecida a encontrada en hipoxia. A microscopía de fluorescencia, las cabezas del ADN (%) aparecen compactas y las colas (%) pequeñas en todas las situaciones ya citadas (gráficos.IV.10 y IV.11-resultados). Esto nos indica que las estructuras del ADN linfocitario no han sufrido grandes daños o

lesiones. Wang y cols. (2011), demostraron que la hipoxia potencia la supervivencia de los linfocitos, hecho que atribuyen a la activación del HIF-1 mediante la inhibición de la muerte celular.

Los resultados observados con el “COMET ASSAY”, en cierta medida estarían en consonancia con los obtenidos en TBARS y Hidroperóxidos, reforzando a la hipótesis de que los nadadores poseen un eficiente sistema de defensas antioxidantes y que ambos (hipoxia y ejercicio), en nuestras condiciones experimentales, producen un notable descenso del estrés oxidativo y/o de los mecanismos reparadores.

## **5.7 Antioxidantes**

Según la mayoría de investigadores (Sen, 2001), la magnitud de los daños oxidativos depende de la capacidad de las defensas antioxidantes que neutralizan los radicales libres. Varios estudios indican que la práctica deportiva mejora los mecanismos antioxidantes. Kabasakalis y cols. (2009) estudiaron los efectos del ejercicio sobre marcadores de estrés oxidativo en 11 niños y 13 niñas (10-11 años) y no encontraron cambios significativos en el estado redox, atribuyéndolo a un aumento de la actividad antioxidante (Glutathion), incluso sin haber cambio en la dieta. Inal y cols. (2001) analizaron la respuesta de los antioxidantes enzimáticos en 10 nadadores entrenados de ambos sexos (15 - 21 años) tras nadar 100 y 800 metros (vías anaeróbica y aeróbica respectivamente). Observaron un aumento de especies reactivas derivadas del oxígeno, pero también una depleción de las actividades GPX y CAT y un

aumento de GSH, indicando que el ejercicio aumenta la capacidad antioxidante para eliminar los efectos de EROs, pero los niveles de antioxidantes no retornaron a los niveles pre esfuerzo. Estos datos coinciden con los de nuestro estudio, en el que en situación de hipoxia, en la intensidad 3 (alta), se produce un descenso de la actividad glutatión peroxidasa con cambios significativos para todas las situaciones (reposo, esfuerzo y recuperación). El agotamiento de GPX confirma la acción de este antioxidante enzimático en la eliminación de los productos de la peroxidación lipídica. Sin embargo, no observamos cambios en las actividades del resto de antioxidantes enzimáticos estudiados (CAT, GR, SOD), ni en normoxia ni en hipoxia.

En cuanto a los antioxidantes no enzimáticos no encontramos cambios significativos en los niveles de retinol ni en normoxia ni en hipoxia en ninguna situación. Sin embargo, la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol y de coenzima Q<sub>10</sub>, tienden a disminuir en hipoxia frente a normoxia en las 3 intensidades (gráficos IV.17 y 18-resultados). Estos dos antioxidantes, son de los más activos frente a los EROs, (Quiles y cols., 1998; Finaud y cols., 2007).

Nuestro grupo de investigación, ya puso de manifiesto, que en situaciones de estrés oxidativo se produce una fuerte movilización de antioxidantes no enzimáticos del compartimento plasmático hacia las membranas celulares y que dicha movilización era mayor a medida que lo era el grado de estrés oxidativo (Quiles y col., 1998; Quiles y col., 1999; Mataix y col 1998). Estos resultados, reforzarían la hipótesis de que uno de los mecanismos que justificarían la bajada de marcadores de estrés oxidativo en

hipoxia podrá estar mediado por dicha movilización. Se reforzarían de este modo los mecanismos de defensa antioxidante a nivel de membranas celulares y todo ello cursaría con el descenso observado tanto de alfa-tocoferol como de Coenzima Q10 en plasma. Esta hipótesis, no la hemos podido confirmarla, puesto que supone la práctica de biopsias musculares, que no contemplamos en su momento.

## **5.8 Conclusiones**

Nuestros resultados nos permiten concluir:

Objetivo 1º.

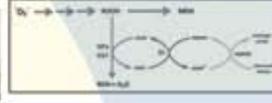
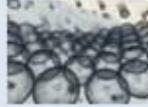
- A igual intensidad de esfuerzo, la hipoxia moderada aguda determina mayor concentración de lactato en sangre que en normoxia, lo que supone un incremento del trabajo metabólico y probablemente del muscular.
- La frecuencia cardiaca no es un buen indicador de esfuerzo en hipoxia moderada aguda y por tanto no es una buena herramienta para ajustar las cargas en las primeras sesiones de entrenamiento.

Objetivo 2º.

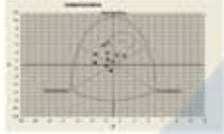
- La cinética de acumulo de lactato en sangre, que en normoxia se ajusta a una ecuación exponencial, en hipoxia lo hace a una ecuación logarítmica.

Objetivo 3º

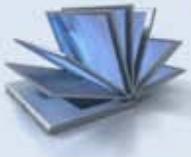
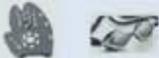
- Atletas de natación bien entrenados, sometidos a entrenamientos de larga duración (90 minutos) a cualquiera de las intensidades ensayadas, no sufren daños causados por estrés oxidativo celular.
- La hipoxia moderada aguda disminuye notablemente los marcadores de estrés oxidativo de origen lipídico, lo que se podría explicar parcialmente por la movilización de antioxidantes no enzimáticos, alfa-tocoferol y coenzima Q10, desde el compartimento plasmático hacia las membranas celulares.



# CAPÍTULO VI Bibliografía



	11 Ago del 2007	22 Oct 2007	Nov del 19 2007	22 Dic 2007
Price Index	100.000000	100.000000	100.000000	100.000000
Price Production	100.000000	100.000000	100.000000	100.000000
Price Retail	100.000000	100.000000	100.000000	100.000000
Price Wholesale	100.000000	100.000000	100.000000	100.000000



- Aebi H. Catalase in vitro (1984). *Meth Enzymol.* **105**:121-6.
- Alessio, H. (1993). Exercise-induced oxidative stress. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *25*(2), 218-224.
- Antunes-Neto, J. M. F., Silva, L. P., & Macedo, D. V. (2005). Biomarcadores de estress oxidativo: Novas possibilidades de monitoramento em treinamento físico. *Rev Bras Cien Mov*, *13*(2), 7-15.
- Arquer, A., Elousua, R., Marrugat, J. (2009). Actividad física y estrés oxidativo. *j.apunts*. doi:10.1016
- Baertsch, P., & Saltin, B. (2008). General introduction to altitude adaptation and mountain sickness. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, *18*, 1-10.
- Bailey, D., Davies, B., & Young, I. (2001). Intermittent hypoxic training: Implications for lipid peroxidation induced by acute normoxic exercise in active men. *Clinical Science*, *101*(5), 465-475.
- Balci, S. S., Okudan, N., Pepe, H., Gokbel, H., Revan, S., Kurtoglu, F., et al. (2010). Changes in lipid peroxidation and antioxidant capacity during walking and running of the same and different intensities. *Journal of Strength and Conditioning Research*, *24*(9), 2545-2550.
- Beckman, K., & Ames, B. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, *78*(2), 547-581.
- Berzosa, C., Gomez-Trullen, E. M., Piedrafita, E., Cebrian, I., Martinez-Ballarín, E., Miana-Mena, F. J., et al. (2011). Erythrocyte membrane fluidity and indices of plasmatic oxidative damage after acute physical exercise in humans. *European Journal of Applied Physiology*, *111*(6), 1127-1133.
- Bloomer, R., Goldfarb, A., & McKenzie, M. (2006). Oxidative stress response to aerobic exercise: Comparison of antioxidant supplements. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *38*(6), 1098-1105.
- Bloomer, R. J., & Fisher-Wellman, K. H. (2008). Blood oxidative stress biomarkers: Influence of sex, exercise training status, and dietary intake. *Gender Medicine*, *5*(3), 218-228.

- Boushel, R., Calbet, J., Radegran, G., Sondergaard, H., Wagner, P., & Saltin, B. (2001). Parasympathetic neural activity accounts for the lowering of exercise heart rate at high altitude. *Circulation*, *104*(15), 1785-1791.
- Braun, B. (2008). Effects of high altitude on substrate use and metabolic economy: Cause and effect? *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *40*(8), 1495-1500.
- Brerro-Saby, C., Delliaux, S., Steinberg, J. G., Boussuges, A., Gole, Y., & Jammes, Y. (2010). Combination of two oxidant stressors suppresses the oxidative stress and enhances the heat shock protein 27 response in healthy humans. *Metabolism-Clinical and Experimental*, *59*(6), 879-886.
- Burtscher, M., Nachbauer, W., Baumgartl, P., & Philadelphia, M. (1996). Benefits of training at moderate altitude versus sea level training in amateur runners ventajas del entrenamiento en la altitud moderada contra el entrenamiento del nivel del mar en corredores aficionados. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, *74*(6), 558-563.
- Cakir-Atabek, H., Demir, S., Pinarbasili, R. D., & Gunduz, N. (2010). Effects of different resistance training intensity on indices of oxidative stress. *Journal of Strength and Conditioning Research*, *24*(9), 2491-2497.
- Calberg, I., & Mannervik, B. (1975). Purification and characterization of flavoenzyme glutathione reductase from rat-liver. *Journal of Biological Chemistry*, *250*(14), 5475-5480.
- Carter, J. E. L. (1976). Somatotypes of Olympic athletes. *Physical Structure of Olympic Athletes. Part II*, , 198-290.
- Capelli, C., Prendergast, D., & Termin, B. (1998). Energetics of swimming at maximal speeds in humans. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, *78*(5), 385-393.
- Chandel, N. S., & Budinger, G. R. S. (2007). The cellular basis for diverse responses to oxygen. *Free Radical Biology and Medicine*, *42*(2), 165-174.
- Clanton, T. L. (2007). Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, *102*(6), 2379-2388.

- Clark, S. A., Quod, M. J., Clark, M. A., Martin, D. T., Saunders, P. U., & Gore, C. J. (2009). Time course of haemoglobin mass during 21 days live high: Train low simulated altitude. *European Journal of Applied Physiology*, 106(3), 399-406.
- De Teresa Galván, C., Guisado Barrilao, R., García, M. C., Ochoa, J., & Ocaña Wilhelmi, J. (2008). Antioxidants and physical exercise: The role of melatonin. [Antioxidantes y ejercicio físico: Funciones de la melatonina] *Revista Andaluza De Medicina Del Deporte*, 1(2), 61-72.
- Deminice, R., Santana Trindade, C., Carvalho Degiovanni, G., Ribeiro Garlip, M., Vannucchi Portari, G., Teixeira, M., et al. (2010). Oxidative stress biomarkers response to high intensity interval training and relation to performance in competitive swimmers. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 50(3), 356-362.
- Ding, H., Ning Jiang, Huijun Liu, Xiaoran Liu, et al (2010). Response of mitochondrial fusion and fission protein gene expression to exercise in rat skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta* 1800 250–256.
- Dill, D., & Costill, D. (1974). Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red-cells in dehydration. *Journal of Applied Physiology*, 37(2), 247-248.
- Dopsaj, V., Martinovic, J., Dopsaj, M., Stevuljevic, J. K., & Bogavac-Stanojevic, N. (2011). Gender-specific oxidative stress parameters. *International Journal of Sports Medicine*, 32(1), 14-19.
- Durackova, Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research*, 59(4), 459-469.
- Elegancyk-Kot, H., Nowak, A., Karolkiewicz, J., Laurentowska, M., Pospieszna, B., Domaszewska, K., et al. (2011). The influence of short-term high altitude training on inflammatory and prooxidative-antioxidative indices in alpine ski athletes. *Journal of Human Kinetics*, 27, 45-54.
- Favret, F., & Richalet, J. (2007). Exercise and hypoxia: The role of the autonomic nervous system. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 158(2-3), 280-286.
- Fernández, J. M., Silva-Grigoletto, M. E., & Túnez-Fiñana, I. (2009). Estrés oxidativo inducido por el ejercicio *Rev Andal Med Deporte*, 2(1), 19-34.

- Ferreira, F., Ferreira, R., & Duarte, J. A. (2007). Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: Influencia do exercício agudo inabitual e do treino físico. *Rev Port Cien Desp*,
- Ferrer, M. D., Tauler, P., Sureda, A., Tur, J. A., & Pons, A. (2009). Antioxidant regulatory mechanisms in neutrophils and lymphocytes after intense exercise. *Journal of Sports Sciences*, 27(1), 49-58.
- Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative stress - relationship with exercise and training. *Sports Medicine*, 36(4), 327-358.
- Fisher-Wellman, K., & Bloomer, R. J. (2009). Acute exercise and oxidative stress: A 30 year history. *Dynamic Medicine*, 8(1).
- Flohé L, Günzler W.A. Assays of glutathione peroxidase. *Meth Enzymol* 1984;**105**:114-20.
- Frei, B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins - mechanisms of action. *American Journal of Medicine*, 97, S5-S13.
- Friedmann, B., Bauer, T., Menold, E., & Bartsch, P. (2004). Exercise with the intensity of the individual anaerobic threshold in acute hypoxia. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 36(10), 1737-1742.
- Friedmann, B., Frese, F., Menold, E., & Bartsch, P. (2005). Individual variation in the reduction of heart rate and performance at lactate thresholds in acute normobaric hypoxia. *International Journal of Sports Medicine*, 26(7), 531-536.
- García, J. J., Berzosa, C., Cebrián, I., Fuentes-Broto, L., Gómez-Trullén, E., Piedrafita, E., et al. (2011). Acute exercise increases plasma total antioxidant status and antioxidant enzyme activities in untrained men. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011
- Gougoura, S., Nikolaidis, M. G., Kostaropoulos, I. A., Jamurtas, A. Z., Koukoulis, G., & Kouretas, D. (2007). Increased oxidative stress indices in the blood of child swimmers. *European Journal of Applied Physiology*, 100(2), 235-239.
- Gladden LB ( 2004). Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *J. Physiol*, 558(1): 5-30

- Hashimoto T, Shinya Masuda, Sadayoshi Taguchi & George A. Brooks. (2005) Immunohistochemical analysis of MCT1, MCT2 and MCT4 expression in rat plantaris muscle. *J Physiol* 567.1 pp 121–129 121.
- Heinicke, I., Boehler, A., Rechsteiner, T., Bogdanova, A., Jelkmann, W., Hofer, M., et al. (2009). Moderate altitude but not additional endurance training increases markers of oxidative stress in exhaled breath condensate. *European Journal of Applied Physiology*, 106(4), 599-604.
- Holmér, I. (1992). Swimming physiology. *Annals of Physiological Anthropology*, 11(3), 269-276.
- Hoppeler, H., Klossner, S., & Vogt, M. (2008). Training in hypoxia and its effects on skeletal muscle tissue. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 18, 38-49.
- Inal, M., Akyuz, F., Turgut, A., & Getsfrid, W. (2001). Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 33(4), 564-567.
- J. Vonck & E. Schafer, 2009. Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009. 1793: 117-124.
- Kabasakalis, A., Kyparos, A., Tsalis, G., Loupos, D., Pavlidou, A., & Kouretas, D. (2011). Blood oxidative stress markers after ultramarathon swimming. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 25(3), 805-811.
- Katayama, K., Goto, K., Ishida, K., & Ogita, F. (2010). Substrate utilization during exercise and recovery at moderate altitude. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 59(7), 959-966.
- Kerksick, C., Taylor, L., Harvey, A., & Willoughby, D. (2008). Gender-related differences in muscle injury, oxidative stress, and apoptosis. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 40(10), 1772-1780.
- Kingsley, MI., Wadsworth, D., Kilduff, LP., McEneny, J., Benton, D. (2005) Effects of phosphatidylserine on oxidative stress following intermittent running. *Med SCI Sports Exerc*:37:1300-6

- Koistinen, P., Takala, T., Martikkala, T., & Leppaluoto, J. (1995). Aerobic fitness influences the response of maximal oxygen-uptake and lactate threshold in acute hypobaric hypoxia. *International Journal of Sports Medicine*, 16(2), 78-81.
- Kröger, A. (1978). Determination of contents and redox state of ubiquinone and menaquinone". *Methods Enzimol.* 53:579-591.
- Lang JK, Packer L. Quantitative determination of vitamin E and oxidized and reduced coenzyme Q by high-performance liquid chromatography with in-line ultraviolet and electrochemical detection. *J Chromatogr* 1987;385:109-17.
- Lavoi, J. & Montpetit, R. (1986). Applied physiology of swimming. *Sports Medicine*, 3(3), 165-189.
- Lee, H., & Wei, Y. (2005). Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(4), 822-834.
- Lecoultre, V., Boss, A., Tappy, L., Borrani, F., Tran, C., Schneider, P., et al. (2010). Training in hypoxia fails to further enhance endurance performance and lactate clearance in well-trained men and impairs glucose metabolism during prolonged exercise. *Experimental Physiology*, 95(2), 315-330.
- Levine, B., & Stray-Gundersen, J. (1997). "Living high training low": Effect of moderate-altitude acclimatization with low-altitude training on performance. *Journal of Applied Physiology*, 83(1), 102-112.
- Luengo, J., Egocheaga, J.E., Egocheaga, J & Dell Valle, M. (2000). Estudio Kinantropométrico de nadadores crolistas de élite española. *Rev. Esp. Antrop. Biol.* 21: 41-49
- Lundby, C., Møller, P., Kanstrup, I. -, & Olsen, N. V. (2001). Heart rate response to hypoxic exercise: Role of dopamine D2-receptors and effect of oxygen supplementation. *Clinical Science*, 101(4), 377-383.
- Lundby, C., Nielsen, T. K., Dela, F., & Damsgaard, R. (2005). The influence of intermittent altitude exposure to 4100 m on exercise capacity and blood variables. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 15(3), 182-187.
- Magalhães, J., & Ascensão, A. (2008). High-altitude hypoxia. A challenging strain targeting cellular redox homeostasis. *Revista Portuguesa De Ciências Desportiva*,

Magalhaes, J., Durarte, J., Ascensao, A., Oliveira, J., & Soares, J. (2002). O desafio da **altitude**: Uma perspectiva fisiologica. / the high-**altitude** challenge: A physiological point of view.2(4), 91.

Maglischo EW. (2003). Swimming fastest. Human Kinetics. 2003 Champaign. III

Mazzeo, R. S. (2008). Physiological responses to exercise at altitude - an update. *Sports Medicine*, 38(1), 1-8.

Meeuwssen, T., Hendriksen, I. J. M., & Holewijn, M. (2001). Training-induced increases in sea-level performance are enhanced by acute intermittent hypobaric hypoxia. *European Journal of Applied Physiology*, 84(4), 283-290.

Mestre-Alfaro, A., Ferrer, M. D., Sureda, A., Tauler, P., Martinez, E., Bibiloni, M. M., et al. (2011). Phytoestrogens enhance antioxidant enzymes after swimming exercise and modulate sex hormone plasma levels in female swimmers. *European Journal of Applied Physiology*, 111(9), 2281-2294.

Millet, G. P., Roels, B., Schmitt, L., Woorons, X., & Richalet, J. P. (2010). Combining hypoxic methods for peak performance. *Sports Medicine*, 40(1), 1-25.

Mujika, I., Chatard, J. C., Busso, T., Geysant, A., Barale, F., & Lacoste, L. (1995). Effects of training on performance in competitive swimming. *Canadian Journal of Applied Physiology = Revue Canadienne De Physiologie Appliquée*, 20(4), 395-406.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244:6049-55.

Orrenius, S., Moldeus, P., Theor, H. (1977). "In: Microsomes and drugs oxidation". Ulrich, V., Roots, L., Hilderbrandt, A. et al (eds).P.292. Pergamon Press. New York.

Pialoux, V., Mounier, R., Rock, E., Mazur, A., Schmitt, L., Richalet, J., et al. (2006). Effects of the 'live high-train low' method on prooxidant/antioxidant balance on elite athletes. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63(6), 756-762.

Pialoux, V., Mounier, R., Brugniaux, J. V., Rock, E., Mazur, A., Richalet, J., et al. (2009). Thirteen days of "live high-train low" does not affect prooxidant/antioxidant balance in elite swimmers. *European Journal of Applied Physiology*, 106(4), 517-524.

- Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews*, 88(4), 1243-1276.
- Powers, S. K., Nelson, W. B., & Hudson, M. B. (2011). Exercise-induced oxidative stress in humans: Cause and consequences. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5), 942-950.
- Quiles JL, Huertas JR, Mañas M, et al.(1998). Plasma antioxidants are strongly affected by iron-induced lipid peroxidation in rats subjected to physical exercise and different dietary fats. *Biol Factors*.;8:119-27.
- Quiles, J., Huertas, J., Manas, M., Ochoa, J., Battino, M., & Mataix, J. (1999). Oxidative stress induced by exercise and dietary fat modulates the coenzyme Q and vitamin A balance between plasma and mitochondria. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 69(4), 243-249.
- Revan, S., Balci, SS., Pepe, H., Kurtog-Lu,F. Short duration exhaustive running exercise does not modify lipid hydroperoxide, glutathione peroxidase and catalase. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. Vol.50. Iss.2pg.235.
- Richalet, J., Larmignat, P., Rathat, C., Keromes, A., Baud, P., & Lhoste, F. (1988). Decreased cardiac response to isoproterenol infusion in acute and chronic hypoxia. *Journal of Applied Physiology*,65(5), 1957-1961.
- Robach, P., Schmitt, L., Brugniaux, J., Roels, B., Millet, G., Hellard, P., et al. (2006). Living high-training low: Effect on erythropoiesis and aerobic performance in highly-trained swimmers. *European Journal of Applied Physiology*, 96(4), 423-433.
- Saltin, B. (1967). Aerobic and anaerobic work capacity at 2300 meters. *Medicina Thoracalis*, 24(4), 205-210.
- Sen CK (2001). Update on thiol status and supplements in physical exercise. *Can J Appl Physiol Suppl* 26:S4–S12.
- Schmidt, W., & Prommer, N. (2008). Effects of various training modalities on blood volume. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 18, 57-69.

- Schmitt, L., How, P., Millet, G., Roels, B., Richalet, J., & Fouillot, J. (2006). Heart rate variability and performance at two different altitudes in well-trained swimmers. *International Journal of Sports Medicine*, 27(3), 226-231.
- Schuler, B., Thomsen, J. J., Gassmann, M., & Lundby, C. (2007). Timing the arrival at 2340 m altitude for aerobic performance. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 17(5), 588-594.
- Sies, H., & Cadenas, E. (1985). Oxidative stress - damage to intact-cells and organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 311(1152), 617-631.
- Schneider, C. D., & de Oliveira, A. R. (2004). Oxygen free radicals and exercise: Mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. [Radicais livres de oxigênio e exercício: Mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico] *Revista Brasileira De Medicina do Esporte*, 10(4), 308-318.
- Stenberg J, Ekblom B, Messin R. (1966). Hemodynamic response to work at simulated altitude, 4000 m. *J Appl Physiol* : 21: 1589–1594
- Strzala, M., Ostrowski, A., & Szygula, Z. (2011). Altitude training and its influence on physical endurance in swimmers. *Journal of Human Kinetics*, 28, 91-105.
- Subudhi, A. W., & Roach, R. C. (2008). Endurance performance at altitude. *Current Sports Medicine Reports*, 7(1), 6-7.
- Sureda, A., Tauler, P., Aguiló, A., Cases, N., Llompарт, I., Tur, J. A., et al. (2008). Influence of an antioxidant vitamin-enriched drink on pre- and post-exercise lymphocyte antioxidant system. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 52(3), 233-240.
- Tauler, P., Ferrer, M. D., Romaguera, D., Sureda, A., Aguiló, A., Tur, J., et al. (2008). Antioxidant response and oxidative damage induced by a swimming session: Influence of gender. *Journal of Sports Sciences*, 26(12), 1303-1311.
- Toubekis, A. G., Tsami, A. P., Smilios, I. G., Douda, H. T., & Tokmakidis, S. P. (2011). Training-induced changes on blood lactate profile and critical velocity in young swimmers. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 25(6), 1563-1570.

- Troup, J. (1999). The physiology and biomechanics of competitive swimming. *Clinics in Sports Medicine*, 18(2), 267.
- van Hall, G., Stromstad, M., Rasmussen, P., Jans, O., Zaar, M., Gam, C., et al. (2009). Blood lactate is an important energy source for the human brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29(6), 1121-1129.
- Wells, G., Schneiderman-Walker, J., & Plyley, M. (2006). Normal physiological characteristics of elite swimmers. *Pediatric Exercise Science*, 18(1), 30-52.
- Zuniga, J., Housh, T. J., Mielke, M., Hendrix, C. R., Camic, C. L., Johnson, G. O., et al. (2011). Gender comparisons of anthropometric characteristics of young sprint swimmers. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 25(1), 103-108