

Universidad de Granada
Instituto de Biotecnología
Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología



**ESTUDIO MULTIVARIABLE SOBRE ACTIVIDAD FÍSICA,
ESTRÉS OXIDATIVO, INFLAMACIÓN Y DAÑO MUSCULAR**

ERIC JAVIER SERRANO CORRO

Pasaporte 1536014

Granada, 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Eric Javier Serrano Corro
D.L.: GR 3962-2009
ISBN: 978-84-692-7842-0

D. DARÍO ACUÑA-CASTROVIEJO, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE **D. ERIC JAVIER SERRANO CORRO**, Licenciado en Medicina por la Universidad de Panamá, República de Panamá, ha realizado bajo su dirección, en el Instituto de Biotecnología del Centro de Investigación Biomédica y en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, el trabajo titulado: **“Estudio Multivariable sobre Actividad Física, Estrés Oxidativo, Inflamación y Daño Muscular”**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 29 de Septiembre de 2009

Vº Bº Director

El interesado

Darío Acuña-Castroviejo

Eric Javier Serrano Corro

Da. GERMAINE ESCAMES ROSA, profesora contratada doctora de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE **D. ERIC JAVIER SERRANO CORRO**, Licenciado en Medicina por la Universidad de Panamá, República de Panamá, ha realizado bajo su dirección, en el Instituto de Biotecnología del Centro de Investigación Biomédica y en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, el trabajo titulado: **“Estudio Multivariable sobre Actividad Física, Estrés Oxidativo, Inflamación y Daño Muscular”**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 29 de Septiembre de 2009

Vº Bº Director

El interesado

Germaine Escames Rosa

Eric Javier Serrano Corro

AGRADECIMIENTOS

El trabajo honesto enaltece la condición humana y más, si persigue el bienestar de los demás.

Después de este tiempo de trabajo en el laboratorio, llega el momento de culminar los resultados obtenidos con la escritura de la tesis. También es el momento de agradecer a toda la gente que me ayudó en la realización de esta investigación.

En primer lugar agradezco al Dr. Darío Acuña-Castroviejo por haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral bajo su dirección y por depositar su confianza en mí. Gracias por compartir conmigo tus conocimientos y por el apoyo incondicional.

Agradezco a la profesora Germaine Escames por su entusiasmo constante para brindarme ayuda mediante su experiencia y valores.

Agradezco a mis compañeros de trabajo: Araceli, Melquiades, Carmen, Iryna, Ana, Anita, José Antonio, Francis, José Carlos, Alberto, Guler, Laura, Mariam, Miguel y Carolina, con los cuales compartí muchas horas de trabajo y momentos de alegrías. Gracias por vuestro apoyo, cariño y comprensión.

Agradezco a los profesores Manuel Castillo y Ángel Gutiérrez por el apoyo que me brindaron al permitirme participar en sus investigaciones. Agradezco a Antonio el haberme orientado desde mis primeros momentos en los devenires de esta maravillosa tierra andaluza. Gracias también a Enrique, Cristóbal, Ignacio, Bernardo, Luis y Álvaro por sus múltiples aportes.

Gracias profesor Alfredo Córdova por apoyarme con tu experiencia en los estudios que realicé contigo en Soria y Navarra.

Agradezco al Hospital Universitario San Cecilio por el soporte institucional que prestaron para la realización del estudio.

A la doctora Berta Torrijos de Arosemena, rectora de la Universidad Especializada de las Américas de la República de Panamá, quien siempre depositó su confianza en mi trabajo.

A mi hija Carla, mi madre Rosa Eneida, mi hermana María Del Carmen, mi hermano Javier Iván y mis sobrinas Angie, Andrea e Isabella, quienes desde tan lejos, Panamá, vierten su amor, alegría y esperanza en mis andares.

A TOD@S GRACIAS

COMUNICACIÓN A SIMPOSIO

Eric Serrano, Cristóbal Sánchez, Antonio Som, Manuel Pueyo, Ángel Gutiérrez, Germaine Escames y Darío Acuña-Castroviejo. Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence HELENA Symposium. 20, 21 y 22 de Abril de 2008, Universidad de Granada, España.

INDICE DE CONTENIDOS

- I. Introducción. 13
 - A. Sobre el estrés oxidativo/nitrosativo y la protección antioxidante durante el ejercicio físico. 23
 - B. Sobre el daño muscular y la respuesta inflamatoria inducida por la carga física. 28
 - C. Sobre la movilización de sustratos energéticos y el perfil metabólico durante el ejercicio y el entrenamiento físico. 35
 - D. Sobre las características del entrenamiento de fuerza y resistencia con ayuda de vibraciones. 37
 - E. Sobre la Prueba Wingate. 39
- II. Objetivos. 40
- III. Hipótesis. 41
- IV. Metodología. 44
 - A. Descripción de los estudios realizados. 44
 - A.1. Del estudio observacional de estrés oxidativo, defensa primaria antioxidante, perfil metabólico, daño muscular, respuesta de citoquinas, melatonina plasmática y su metabolito en orina durante competición de ciclismo profesional (Vuelta Andalucía 2008). 44
 - A.2. Del estudio experimental de alcalinización inducida, peroxidación lipídica, respuesta de citoquina y melatonina plasmática en ciclistas profesionales durante repetición de prueba Wingate. 44
 - A.3. Del estudio experimental de estrés oxidativo, daño muscular, perfil metabólico y respuesta de citoquina en estudiantes universitarios durante entrenamiento de fuerza/resistencia con ayuda de plataforma vibratoria. 46
 - A.4. Del estudio pre-experimental de respuesta de citoquinas y cortisol durante una prueba de fatiga muscular en luchadores y jugadores de balonmano. 47
 - A.5. Del estudio pre-experimental de estrés oxidativo, respuesta de cortisol y citoquinas en ciclistas amateurs que ingirieron maleato de citrulina durante tres días de competición (Vuelta al Bidasoa 2008). 48

B. Técnicas y procedimientos empleados.	48
C. Campos de trabajo.	51
D. Análisis de Datos.	52
V. Resultados.	53
VI. Discusión.	60
VII. Conclusiones.	76
VIII. Bibliografía.	78
IX. Anexo 1: Cuadros.	96
X. Anexo 2: Figuras.	114

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No. 1.

Desglose de las actividades desarrolladas por objetivos de la investigación.

Cuadro No. 2.

Variantes de la fatiga.

Cuadro No. 3.

Indicadores de fatiga.

Cuadro No. 4.

Mediadores de la inflamación inducida por ejercicio y entrenamiento físico.

Cuadro No. 5.

Bioquímica en plasma de ciclistas profesionales durante competición (Vuelta de Andalucía 2008).

Cuadro No. 6.

Análisis bioquímico durante entrenamiento de 8 semanas en estudiantes universitarios.

Cuadro No. 7.

Perfil bioquímico de Ciclistas amateurs durante la Vuelta al Bidasoa 2008.

Cuadro No. 8.

Peroxidación lipídica a diferentes cargas de esfuerzo físico.

Cuadro No. 9.

Respuesta de TNF- α a diferentes cargas de esfuerzo físico.

Cuadro No. 10.

Respuesta de IL-6 a diferentes cargas de esfuerzo físico.

Cuadro No. 11.

Respuesta de IL-1 β a diferentes cargas de esfuerzo físico.

Cuadro No. 12.

Respuesta de melatonina plasmática a diferentes cargas y duraciones de esfuerzo físico.

Cuadro No. 13.

Incremento de los marcadores de daño muscular post-ejercicio según la carga física y el nivel de entrenamiento.

Cuadro No. 14.

Perfil metabólico de ayuno en estado de reposo de acuerdo al nivel de entrenamiento.

Cuadro No. 15.

Incremento de la cortisolemia en respuesta a ejercicios intensos.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1.

Peroxidación lipídica (MDA + 4-HDA en plasma) durante competición de ciclismo profesional (Vuelta Andalucía 2008).

Figura No. 2.

Concentraciones de GSSG y GSH en hematíes durante competición de ciclismo profesional (Vuelta Andalucía 2008).

Figura No. 3.

Índice redox (GSSG/GSH) durante competición de ciclismo profesional (Vuelta Andalucía 2008).

Figura No. 4.

Actividad de glutatión peroxidasa en hematíes durante competición de ciclismo profesional (Vuelta Andalucía 2008).

Figura No. 5.

Actividad de glutatión reductasa en hematíes durante competición de ciclismo profesional (Vuelta Andalucía 2008).

Figura No. 6.

Concentración de melatonina en plasma durante competición de ciclismo profesional (Vuelta Andalucía 2008).

Figura No. 7.

Concentración de 6-sulfatoximelatonina en orina durante competición de ciclismo profesional (Vuelta Andalucía 2008).

Figura No. 8.

Concentraciones de citoquinas en plasma durante competición de ciclismo profesional (Vuelta Andalucía 2008).

Figura No. 9.

Concentraciones de Malonaldehído y 4-Hidroxiálquenal en plasma durante Prueba Wingate.

Figura No. 10.

Concentración de Interleuquina-6 en plasma durante Prueba Wingate el día uno.

Figura No. 11.

Concentración de Interleuquina-6 en plasma durante Prueba Wingate el día dos.

Figura No. 12.

Concentración de Factor de necrosis tumoral alfa en plasma durante Prueba Wingate el día uno.

Figura No. 13.

Concentración de Factor de necrosis tumoral alfa en plasma durante Prueba Wingate el día dos.

Figura No. 14.

Concentración de Interleuquina-1 β en plasma durante Prueba Wingate el día uno.

Figura No. 15.

Concentración de Interleuquina-1 β en plasma durante Prueba Wingate el día dos.

Figura No. 16.

Regresión lineal de concentraciones de hidrogeniones e interleuquina-6 en plasma durante Prueba Wingate.

Figura No. 17.

Concentración de melatonina en plasma durante Prueba Wingate el día uno.

Figura No. 18.

Regresión lineal de concentración de creatina kinasa y mioglobina en plasma durante entrenamiento.

Figura No. 19.

Concentraciones de Malonaldehído y 4-Hidroxialquenal en plasma medidas en reposo durante entrenamiento.

Figura No. 20.

Concentraciones de nitritos y nitratos en plasma medidas en reposo durante entrenamiento.

Figura No. 21.

Concentración de Interleuquina-6 en plasma medida en reposo durante entrenamiento.

Figura No. 22.

Concentración de Factor de necrosis tumoral alfa en plasma medida en reposo durante entrenamiento.

Figura No. 23.

Concentración de Interleuquina-1 β en plasma medida en reposo durante entrenamiento.

Figura No. 24.

Concentración de Interleuquina-6 en plasma en la prueba de fatiga muscular.

Figura No. 25.

Concentración de Factor de necrosis tumoral alfa en plasma en la prueba de fatiga muscular.

Figura No. 26.

Concentración de Interleuquina-1 β en plasma en la prueba de fatiga muscular.

Figura No. 27.

Concentración de Cortisol en plasma en el ejercicio extenuante.

Figura No. 28.

Concentraciones de Malonaldehído y 4-Hidroxialquenal en plasma durante competencia de ciclismo amateur (Vuelta al Bidasoa 2008).

Figura No. 29.

Concentraciones de nitritos y nitratos en plasma durante competición de ciclismo amateur (Vuelta al Bidasoa 2008).

Figura No. 30.

Respuesta de citoquinas proinflamatorias durante competición de ciclismo amateur (Vuelta al Bidasoa 2008).

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Denominación	Sigla
Adenosín difosfato	ADP
Adenosín trifosfato	ATP
Creatina kinasa	CK
Entrenamiento convencional de fuerza	ECF
Factor de necrosis tumoral alfa	TNF- α
Factor nuclear kappa beta	NF κ β
Glutación oxidado	GSSG
Glutación peroxidasa	GPx
Glutación reducido	GSH
Glutación reductasa	GRd
Interferón alfa	INF- α
Interleuquina-1 β ó Interleucina-1 β	IL-1 β
Interleuquina-6 ó Interleucina-6	IL-6
Malonaldehído y 4-hidroxiacetaldehído	MDA y 4-HDA
Reactive nitrogen species	RNS
Reactive oxygen species	ROS
Superóxido dismutasa	SOD
Whole body vibration	WBV

INTRODUCCIÓN

Esta investigación se realizó en el área de Fisiología del Ejercicio. Está fundamentada en los conocimientos actuales sobre generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, citoquinas y liberación de enzimas citosólicas como consecuencia de la realización de cargas variables de ejercicio físico y bajo la influencia del estado de precondicionamiento y naturaleza de los programas de entrenamiento. Relacionó estrés oxidativo, defensa antioxidante, respuesta inflamatoria, daño muscular y carga de trabajo físico a través de la asociación de variables cuantitativas que fueron medidas mediante protocolos estandarizados y técnicas probadas tales como espectrofotometría de luz ultravioleta, fluorimetría y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), entre otras. La investigación está estructurada en cinco etapas: (a) Estudio observacional de esfuerzo intenso y prolongado durante competición de ciclismo profesional. (b) Estudio experimental de alcalinización provocada durante la repetición de una prueba de Wingate caracterizada por esfuerzo máximo explosivo en ciclistas. (c) Estudio experimental de entrenamiento de fuerza/resistencia con ayuda de vibraciones en estudiantes universitarios. (d) Estudio observacional de fatiga muscular provocada por esfuerzo máximo en luchadores y jugadores de balonmano. (e) Estudio pre-experimental de la valoración de una ayuda ergogénica (malato de citrulina) durante una competición de ciclismo amateur.

Este estudio aporta evidencia sobre la asociación entre inflamación inducida por el ejercicio y el estado acidótico láctico. Esta investigación acumula evidencia del perfil metabólico, el estrés oxidativo, la respuesta inflamatoria, el daño muscular, la producción de melatonina y la eficiencia del sistema de defensa primaria antioxidante de ciclistas profesionales expuestos a una combinación de cargas máximas, submáximas y explosivas durante la competencia y durante la prueba cicloergométrica. También aporta información de los parámetros biológicos durante el entrenamiento de fuerza y resistencia y la fatiga. Evalúa los efectos de la alcalinización provocada y la suplementación con malato de citrulina en la respuesta de citoquinas y el estrés oxidativo inducido por ejercicio intenso.

El estrés oxidativo generalmente es descrito como una condición en la cual la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno genera daño a macromoléculas de las estructuras celulares y subcelulares. (Rodríguez et al, 2008). La producción exagerada de radicales libres provocada por el ejercicio ha sido documentado en sedentarios saludables (Alessio 2000 y Jammesa 2004) y en sujetos entrenados (Ortega et al, 2006). En la actualidad, la determinación del estrés oxidativo debe considerarse de rutina para la valoración de pruebas físicas y seguimiento del rendimiento deportivo. Por ello, en esta investigación analizamos el comportamiento de la peroxidación lipídica y la respuesta antioxidante a diferentes cargas de esfuerzo.

Como es sabido, las fuentes específicas de radicales libres durante ejercicio incluyen principalmente la fuga de electrones desde la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, pero también de la reacción de xantina oxidasa, de la oxidación de la hemoglobina y de la activación de neutrófilos (Aguiló et al, 2005). El ejercicio aumenta el consumo de oxígeno, siendo que hasta 2% de éste puede ser convertido en especies reactivas de oxígeno (Nakatani et al, 2005). La melatonina es capaz de depurar directamente una variedad de reactantes tóxicos de oxígeno y nitrógeno, a la vez que estimula las enzimas antioxidantes, aumenta la eficiencia del transporte de electrones y con ello limita la fuga de electrones y la generación de radicales libres y promueve también la síntesis de ATP (León et al, 2004). Es posible que sus metabolitos también actúen como depuradores antioxidantes. Particularmente la 6-hidroximelatonina, bajo la acción de sulfotransferasa, es conjugada en el hígado y luego excretada en la orina (Tan et al, 2007). En este estudio queremos destacar el papel de la melatonina en el ejercicio intenso, por lo cual medimos su nivel plasmático y el metabolito en orina durante la competencia de ciclismo profesional y durante la prueba Wingate.

La melatonina es un antioxidante que directamente depura los radicales libres producidos durante el metabolismo normal de la mitocondria e indirectamente promueve la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa (León et al, 2004). En mamíferos, la síntesis de melatonina en la glándula pineal sirve como código de mensaje para la duración de la oscuridad y es responsable de las concentraciones picomolares y nanomolares de la indolamina en suero (Reiter, 1991a). El ejercicio prolongado promueve la síntesis de melatonina a través de la regulación mediada por especies reactivas sobre la expresión de arilalkilamina N-acetiltransferasa e hidroxindolometiltransferasa (Jaworek et al, 2003).

En esta investigación medimos la respuesta antioxidante al ejercicio mediante la determinación de la concentración de glutatión reducido y oxidado y las actividades de las enzimas glutatión peroxidasa y reductasa en hematíes. Esta determinación en los hematíes nos permitió de manera no invasiva tener una idea del grado de estrés oxidativo intracelular del organismo.

Está demostrado que el principal factor responsable del daño oxidativo durante el ejercicio es el aumento en el consumo de oxígeno. Sin embargo, otros factores tales como la acidosis (Siesjo, 1985), la auto-oxidación de las catecolaminas (Cohen y Heikkila, 1974) y el síndrome de isquemia/reperfusión también inducen daño oxidativo durante la realización de ejercicio anaeróbico supramáximo. Por lo tanto, una prueba Wingate de 30 segundos puede ocasionar estrés oxidativo (Groussard et al, 2003) e inflamación. La sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno inducida por esta modalidad de ejercicio puede ser depurada al menos en parte por melatonina (León et al, 2004), glutatión, ascorbato, vitamina E y metales de transición. Como consecuencia de las interacciones entre radicales libres y antioxidantes, los niveles sanguíneos y tisulares de la melatonina pueden disminuir transitoriamente. Sin embargo, ha sido previamente demostrado que estos potentes estresores relacionados al

ejercicio agudo pueden aumentar la producción de melatonina (Tan et al, 2007), impidiendo entonces el descenso de ésta o aún elevando su concentración sanguínea y sus metabolitos en orina. La concentración sanguínea de melatonina deriva principalmente de la glándula pineal (Antti et al, 2006). La hiperactividad simpática relacionada con el ejercicio puede estimular por sí misma la liberación pineal de melatonina.

Los efectos agudos del ejercicio en los niveles de melatonina varían dependiendo de la hora del día, la intensidad y especialmente la duración del ejercicio. Como ejemplo, el ejercicio nocturno está asociado a la intensa estimulación de la secreción de melatonina, ya que esta hormona está regulada por la descarga adrenérgica (Buxton et al, 2003). Los elevados niveles séricos de melatonina también se encuentran después del ejercicio extenuante, como ocurre particularmente en la carrera de maratón (Ronkainen et al, 1986 y Strassmann et al, 1989) y de manera general en atletas (Laughlin et al, 1991). En la presente investigación, las mediciones de melatonina se realizaron durante horas de la mañana.

Los cambios en los sistemas antioxidantes plasmáticos, sea por inducción de su síntesis o por su depleción, suelen reflejar la producción incrementada de los radicales libres ocasionados por ejercicio en el músculo activo, lo cual demuestra a su vez, la potencialidad de daño a macromoléculas. En ocasiones no se encuentran modificaciones en los niveles circulantes de uno o varios componentes antioxidantes, lo cual está determinado por la eficiencia del resto de los componentes antioxidantes y por la magnitud de la producción de los radicales libres, que a su vez depende de las características del ejercicio físico realizado. Por ejemplo, después de 45 minutos de carrera o 90 minutos de bicicleta a intensidad submáxima, no se reportaron cambios en los niveles plasmáticos de vitamina E (Viguie, 1993, Meydani, 1993). Está claro que la determinación aislada de un solo antioxidante no refleja la dinámica de los sistemas endógenos de defensa antioxidante. La medición del sistema de glutatión suele aportar información valiosa para la interpretación de la balanza entre la producción de radicales, la capacidad de respuesta antioxidante y la variabilidad de daño a macromoléculas. La presente investigación propone un instrumento de medición de parámetros bioquímicos de estrés oxidativo, respuesta antioxidante, respuesta inflamatoria, perfil metabólico y daño muscular en relación con la carga física.

En relación con el rol de las citoquinas en la respuesta inflamatoria al ejercicio, muchos estudios concluyen que la respuesta de IL-6 promueve la síntesis de citoquinas anti-inflamatorias (antagonista del receptor IL-1 e IL-10), deprime la producción de TNF- α y ayuda a movilizar los sustratos extracelulares y/o aumentar la entrega de sustratos durante el ejercicio, explicando al menos en parte los efectos beneficiosos del ejercicio para la salud (Petersen and Pedersen, 2005). Algunos estudios han fallado en la comprobación de la respuesta de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α (Steensberg et al, 2002 y Ullum et al, 1994), mientras que otros han reportado variaciones significativas post-ejercicio en esta citoquina (Dufaux et al, 1989 y Ostrowski et al, 1999). Estos

resultados sugieren que la respuesta de citoquina al ejercicio depende de la carga de entrenamiento, la carga de ejercicio, las modalidades deportivas, los estilos de vida, el estado de salud, la edad y probablemente el género. Por estos antecedentes, procedimos a medir la respuesta de citoquina en ejercicio aeróbico intenso durante la competencia de ciclismo, durante la prueba anaeróbica de Wingate y durante la prueba anaeróbica de levantamiento de pesas hasta la fatiga muscular.

El ejercicio tiene influencias sobre el sistema inmunológico. Altera los factores circulantes, citoquinas y otros mediadores (lactato, IL-6, catecolaminas, hormona de crecimiento y acidosis) que pueden afectar a las células T (Fischer et al 2007, Wong et al 2006 y Kin et al 2006). Además, los linfocitos pueden ser influenciados directamente por la neuroestimulación linfática inducida por el ejercicio (MacNeil et al 1996 y Shepherd et al 2005). Algunos de los efectos del ejercicio en el sistema inmune son de naturaleza mecánica (Radom-Aizik et al, 2007). Las evidencias sugieren que el ejercicio explosivo induce estrés oxidativo asociado a la producción muscular de IL-6. Por lo tanto, los factores circulantes y mediadores señalados reclutan leucocitos que magnifican la respuesta inflamatoria. Es conocido que el ejercicio anaeróbico agudo aumenta la producción de glucocorticoides (Kraemer y Ratamess, 2005).

Aunque es bien sabido que las citoquinas intervienen en la respuesta inflamatoria del ejercicio físico, éstas no lo hacen de la misma manera. La lesión de la fibra muscular después de la carrera está asociada con un aumento discreto de IL-1 β después de 45 minutos y aumenta notablemente durante los siguientes dos días después de la competición. Está ampliamente demostrado que las citoquinas plasmáticas se elevan durante y después de ejercicio intenso. Según algunos autores, el ciclismo, la maratón y otras competiciones deportivas excéntricas inducen IL-6, aunque es controversial la elevación de IL-1 β (Pedersen, 2001 y García M, 2007).

Es posible que puedan existir varios patrones de liberación y acción de las citoquinas. Por ejemplo, el estrés oxidativo en personas no entrenadas es un fuerte estímulo para la producción de citoquinas inducida por ejercicio. En estos casos, los monocitos no juegan un papel en el proceso inflamatorio (Vassilakopoulos et al, 2003).

Algunos estudios contrastan el rol oxidativo y pro-inflamatorio del ejercicio. El ejercicio aumenta y la vitamina E atenúa las expresiones génicas de IL-6, TNF y el factor de crecimiento transformante (TGF) en el vasto lateral de rata (Shacek, 2006). La elevación de IL-6 inducida con el ejercicio está bien correlacionada con el lactato plasmático, la creatina kinasa y los marcadores de estrés oxidativo, pero estas asociaciones disminuyen con el envejecimiento (Dyhr, 2002). La serie de episodios agudos de ejercicio estimula suficientemente la producción de citoquinas proinflamatorias como para inhibir la hormona de crecimiento y el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF). Más allá, TNF α e IL-1 activan la transducción de señal para la transcripción génica de NF κ B y AP-1, los cuales son factores transcripcionales

sobre-expresados para la expresión de manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD) en atletas bien entrenados.

Otros estudios favorecen el rol antioxidante y anti-inflamatorio del ejercicio. Durante el ejercicio moderado se produce IL-6 por las fibras musculares a través de una vía independiente de TNF. En este caso, IL-6 estimula la aparición en la circulación de citoquinas anti-inflamatorias tales como IL-1ra e IL-10; a la vez que inhibe la producción de TNF- α . En adición, IL-6 favorece el recambio lipídico a través de la estimulación de la lipólisis y la oxidación de la grasa. De esta manera se ha sugerido que el ejercicio regular induce supresión de TNF- α y ofrece protección contra la resistencia a la insulina inducida por TNF- α . Recientemente IL-6 fue introducida como la primera mioquina producida y liberada por las fibras musculares esqueléticas, ejerciendo sus efectos en otros órganos de la economía. Es probable que las mioquinas sean mediadoras de los efectos beneficiosos para la salud del ejercicio y que éstas en particular estén involucradas en la protección contra las enfermedades crónicas asociadas con inflamación de bajo grado, como la diabetes mellitus y la enfermedad cardiovascular (Petersen and Pedersen et al, 2005).

Los resultados apuntan a resaltar que la carga y dosificación del ejercicio son importantes determinantes de la respuesta de las citoquinas y del sistema de defensa antioxidante a la sobreproducción de radicales libres.

TNF- α e IL-1 estimulan la producción de IL-6; siendo esta última clasificada tanto como citoquina pro-inflamatoria y anti-inflamatoria (Tilg et al, 1997). La respuesta de citoquina al ejercicio difiere de la respuesta a la sepsis (Febraio et al, 2002 y Suzuki et al, 2002). El hecho de que las clásicas citoquinas pro-inflamatorias, TNF- α e IL-1 β en general no aumentan con el ejercicio submáximo, indica que la cascada de citoquinas inducida por el ejercicio difiere marcadamente de la cascada inducida por infecciones. Típicamente, IL-6 es la primera citoquina presente en la circulación durante ejercicio. El nivel circulante de IL-6 aumenta exponencialmente (hasta 100 veces) en respuesta al ejercicio y declina en el período post-ejercicio (Pedersen et al, 2001).

Se ha descrito por diversos autores un aumento marcado en el nivel circulante de IL-6 después de ejercicio, en ausencia de daño muscular (Castell 1997, Nielsen 1996, Nieman 1998, Nishimoto 2004 y Starkie 2001). El aumento exponencial del nivel plasmático de IL-6 está relacionado con la intensidad del ejercicio, su duración, la masa muscular reclutada y la capacidad de rendimiento del sujeto (Febraio, 2002). El mRNA de IL-6 está regulado al alza en el músculo esquelético contráctil (Jonsdottir, 2000) y la tasa transcripcional del gen IL-6 está marcadamente reforzado con el ejercicio (Keller, 2001). Adicionalmente, se ha demostrado que la proteína IL-6 está expresada en las fibras musculares contráctiles y responde al ejercicio con la liberación muscular de IL-6, lo cual no sucede con TNF- α (Steensberg, 2002).

Como señalamos con anterioridad, IL-6 ejerce efectos inhibitorios sobre la producción de TNF- α e IL-1. IL-6 inhibe la producción de TNF- α inducida por lipopolisacárido (LPS) en cultivos de monocitos humanos y en la línea monocítica humana U937 (Schindler, 1990). En cambio, los niveles de TNF- α son marcadamente elevados en ratones tratados con anti-IL-6 y en ratones knockout (deficientes en IL-6) (Mizuhara 1994); lo cual indica que IL-6 circulante está involucrado en la regulación de TNF- α (Mihai 1996). La aparición de IL-10 e IL-1ra en la circulación después de ejercicio también contribuye con los efectos anti-inflamatorios mediadores del ejercicio moderado. Estas citoquinas y quemoquinas juegan un papel crítico en la activación de granulocitos, monocitos/macrófagos, células naturales asesinas, células T y B y sus reclutamientos a los sitios de inflamación.

El ejercicio moderado puede suprimir la producción de TNF- α inducida por endotoxina en sujetos voluntarios saludables, lo cual evidencia que a esta carga se induce una verdadera respuesta anti-inflamatoria (Tilg 1997 y Starkie, 2001). Esta supresión puede ser explicada a través de vías dependientes e independientes de IL-6. Las concentraciones fisiológicas de IL-6 estimulan la aparición en la circulación de citoquinas anti-inflamatorias (IL-1ra e IL-10). Combinando una dieta hipocalórica, el entrenamiento reduce la inflamación en la circulación, evidenciado por un descenso de la proteína C reactiva, IL-6, IL-8, TNF- α (Vincent 2006) y MCP-1 y de un ascenso en adiponectina. También reduce la inflamación en el tejido adiposo, como lo determina el descenso en la expresión de IL-6 y en los marcadores específicos de macrófagos (Brunn, 2006).

Las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-10 son preferentemente reguladas al alza después de ejercicio expuesto en ambiente frío, en una proporción de 12, 9 y 10 veces respectivamente, en comparación con el ejercicio expuesto en ambiente cálido. Otras citoquinas, IL-2 e IL-6 son reguladas al alza en menor grado (6 y 3 veces respectivamente); en cambio otras no son reguladas (IL-8, IFN- α y TNF- α).

IL-6 está inversamente correlacionada con el nivel de actividad física, la masa muscular y con el mediador anabólico IGF-1 (Zaldivar 2006, Barbieri 2003 y Ferrucci 2002). Cortos períodos de ejercicio intenso también ocasionan elevaciones circulantes de linfocitos T, B, NK, monocitos y neutrófilos. IL-6 aumenta en el músculo esquelético durante ejercicio, en parte desencadenado por el influjo de calcio iónico (Moldoveanu 2000). Sin embargo, la vía de señalización se desconoce. Una posible vía para la inducción de IL-6 mediada por calcio iónico es calcineurina, un activador de NFAT (Keller, 2001).

En resumen, la IL-6 es la mioquina directamente estimulada por la actividad contráctil a través de vías dependientes e independientes de calcio, que median el patrón de liberación de las citoquinas restantes. Por lo tanto, su determinación es fundamental en el contexto de la asociación entre inflamación, daño muscular y estrés oxidativo.

La investigación se interesó además en estimar la posible asociación entre la acidosis láctica y la respuesta de citoquinas durante la prueba anaeróbica Wingate. Además, evaluó las consecuencias de la alcalinización provocada mediante la suplementación con bicarbonato de sodio en el estrés oxidativo generado durante la prueba Wingate. A nivel metabólico sabemos que dependiendo de la intensidad de ejercicio, puede llegarse a diferentes niveles de consumo de fosfocreatina y acidosis intracelular. El ejercicio de intensidad baja degrada moderada cantidad de fosfocreatina, sin cambios en el pH (Roussel et al, 2003). Tal como se espera, a mayor intensidad de ejercicio se inducen mayores cambios metabólicos, usualmente asociados con la acumulación de lactato y acidosis. Una consideración relevante en relación con la prueba Wingate y el ciclismo es la cadencia del pedaleo. Incrementando la cadencia del pedaleo, se eleva la acumulación de lactato sanguíneo en sujetos no entrenados (Hughes et al, 1982) y en ciclistas entrenados (Chavarren et al, 1990). Estas consideraciones sugieren que los aumentos en la cadencia de pedaleo más allá de las tasas usuales, pueden reducir la potencia en el umbral láctico y por ende afectaría notablemente el rendimiento.

Cabe mencionar algunos antecedentes relevantes en relación con la acidosis láctica del ejercicio anaeróbico y la capacidad de amortiguación durante la prueba Wingate. Las contracciones musculares intensas resultan en grandes cambios iónicos y en aumentos en el recambio mitocondrial de ATP, contribuyendo también con la acumulación de hidrogeniones (Edge et al, 2006). Mientras que algunos estudios indican que el rol de la acumulación de hidrogeniones durante el proceso de fatiga de las fibras musculares puede ser limitado (Pedersen et al, 2004), se ha demostrado que la acumulación de hidrogeniones afecta la fosforilación oxidativa, la actividad enzimática y la regulación de iones durante algunas prácticas de ejercicio, por ejemplo cuando las contracciones musculares son repetidas e intensas (Favero et al 1995, Jubrias et al 2003, Spriet et al 1989 y Street et al 2005). Los sistemas de tampones intra y extracelulares actúan para la reducción de la acumulación de hidrogeniones y por lo tanto, participan en la regulación del pH intracelular. Hasta el momento no hay comentarios reportados sobre la acumulación muscular de hidrogeniones en relación con la producción de mioquinas.

Sin embargo, varios estudios han demostrado que la inducción de alcalosis metabólica mejora el rendimiento del acto explosivo único y repetido (Bouissou et al 1988, Costill et al 1984 y Sutton et al 1981). La alcalosis pre-ejercicio atenúa las perturbaciones sanguíneas ácido-básicas durante ejercicio supramáximo y extenuante, independientemente de que el modo de recuperación sea activo o pasivo. Estos hallazgos sugieren que los individuos pueden beneficiarse de la introducción de una condición alcalótica pre-ejercicio mientras se incluye una recuperación pasiva durante los protocolos de entrenamientos de alta intensidad (Siegler et al, 2008). El refuerzo de la producción glucolítica de ATP (Bouissou et al, 1988), aunado al incremento del eflujo muscular de lactato (Spriet et al, 1989) parece contribuir con el mejoramiento de la función muscular en relación con la alcalosis inducida.

Hay evidencia que indica que la sangre extraída durante e inmediatamente después del ejercicio revela elevación del lactato debido a que el ácido láctico es movilizado desde los músculos y titulado in vivo mientras es intercambiado con el fluido intersticial. Ambos fluidos intersticial y plasmático poseen aproximadamente iguales

concentraciones elevadas de bicarbonato que atraviesan rápidamente la mayoría de los capilares, pero lentamente a través de las membranas celulares (Cherniack y Longobardo 1970, Dell y Winters 1970, Woodbury y Miles 1973). La inducción de la alcalosis metabólica mejora el rendimiento del ejercicio prolongado hasta por 30 (George y McLaren 1988) y 60 minutos (McNaughton et al 1999), pero se desconoce hasta el momento el impacto que puede tener en el estrés oxidativo y la respuesta de citoquina durante el sprint de la prueba Wingate. Esta investigación procedió a la medición de estos parámetros biológicos.

Otro aspecto relevante de esta investigación es la valoración integral del estrés oxidativo, la respuesta antioxidante, el perfil metabólico, el daño muscular y la respuesta de citoquinas al entrenamiento. El ejercicio y el entrenamiento físico tienen implicaciones en el rendimiento, en el estado cardiovascular e inmunológico, las cuales están mediadas al menos en parte por sus consecuencias en el estrés oxidativo, el daño muscular y la inflamación. El entrenamiento físico, definido como un conjunto de actividades y ejercicios de periodicidad, ritmo y carga pre-establecidas, orientado generalmente al mejoramiento del rendimiento, las capacidades, la salud y el bienestar en general; tiene por tanto potenciales consecuencias en la producción de radicales libres, en la eficiencia de los sistemas enzimáticos antioxidantes y la mediación de señales inflamatorias.

El ejercicio intenso ocasiona daño muscular independientemente del estado de entrenamiento (Venditti, 1997). Numerosos reportes sustentan el estrés oxidativo generado por el ejercicio. Por ejemplo, el estrés oxidativo elevado, el cual está indicado entre otros, por niveles elevados de malonaldehído, fue reportado en corredores maratonistas y sprinters, al comparárseles con grupos controles bajo las mismas condiciones de reposo (Schippinger et al, 2002). Más allá, el ejercicio prolongado en maratonistas se acompaña de elevaciones plasmáticas significativas de dienos conjugados (Marzatico et al, 1997). Estas evidencias sugieren que tanto el ejercicio intenso de larga duración como el entrenamiento explosivo exceden la capacidad del individuo de detoxificarse de los radicales libres. En cambio, también hay reportes que sugieren que el entrenamiento regular de moderada intensidad parece ayudar en términos fisiológicos a la regulación del estado redox celular. Tal es el caso demostrado de precondicionamiento miocárdico al estrés oxidativo prolongado inducido con el entrenamiento, debido que favorece un proceso de adaptación que aumenta la resistencia a los radicales libres (Radak et al, 2000), lo cual es beneficioso para el sistema inmune.

Los mecanismos potenciales implicados en las alteraciones oxidativas inducidas por el ejercicio son las siguientes: se eleva del consumo de oxígeno en reposo, baja la disponibilidad de oxígeno inducida por las restricciones en el flujo sanguíneo local y ocurre depresión en la sensibilidad del ADP a la respiración mitocondrial. Todos estos cambios producen disminución de la fuerza isométrica e isocinética, menor potencia, aumento en la producción de lactato y elevación de la respuesta cronotrópica al ejercicio

submáximo, pero se hacen menos notorias a la misma carga de esfuerzo cuando la realizan personas entrenadas.

Por lo tanto, las alteraciones oxidativas que pueden ser ocasionadas por el ejercicio intenso y/o episódico, tienen consecuencias en el rendimiento físico y el estado de salud en general y a la vez, son modificables con el entrenamiento. Sabemos por ejemplo que el estado redox celular influye en la ganancia de fuerza isométrica. La fuerza isométrica óptima se alcanza cuando el músculo no fatigado no está expuesto a radicales libres, mientras que el estado oxidativo la disminuye en un 80% (Reid, 2001). Estos hechos resaltan la importancia de investigar la magnitud y los mecanismos mediadores de daño y señalización de la producción elevada de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno durante ejercicio físico y de la capacidad de inducibilidad que tienen los sistemas endógenos de defensa antioxidante para hacerle frente a los radicales libres mediante el ejercicio habitual.

En esta investigación destacamos el papel del entrenamiento de fuerza y resistencia para disminuir la peroxidación lipídica, la formación de productos nitrosativos y para mejorar perfil lipídico y glucémico. La peroxidación lipídica es una consecuencia nefasta de los radicales libres que no son depurados eficientemente por los sistemas endógenos de defensa antioxidante. Las proteínas de membrana se entruzan y disminuye la movilidad de la membrana (Schippinger et al, 2002). Entre otras consecuencias aparece, el 4-hidroxinonal, un metabolito producido de la peroxidación lipídica, considerado agente depletante de glutatión y citotóxico porque inhibe el ciclo celular (Wonisch et al, 1998). Debido a la sencillez y a la precisión de la determinación de metabolitos secundarios y a la validez confirmada de la peroxidación lipídica como indicador de daño a macromoléculas, en esta investigación medimos los niveles plasmáticos de malonaldehído como marcador biológico de estrés oxidativo.

La peroxidación también repercute en las lipoproteínas, por lo tanto inducen aterogenicidad. Por ejemplo, se demostró un aumento significativo del 78% en la susceptibilidad de la peroxidación lipídica de los ciclistas que compitieron 95 km en Sierra Nevada (Ruiz J et al, 2006). Hay que destacar que existen considerables diferencias entre modalidades deportivas del grado de peroxidación lipídica. Los nadadores por ejemplo, tienen mejores perfiles lipídicos que los futbolistas y jugadores de balonmano, teniendo estos últimos elevados cocientes aterogénicos (Ruiz J, 2004). Estas alteraciones lipídicas están probablemente relacionadas con un desbalance en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias. En este estudio comparamos el perfil lipídico y glucémico de ciclistas y estudiantes universitarios entrenados durante ocho semanas.

En resumen, la presente investigación consideró los siguientes parámetros:

(1) Carga física:

- i. Ejercicio aeróbico submáximo y máximo de cuatro días de duración (competencia de ciclismo profesional y amateur);

- ii. Ejercicio anaeróbico máximo de 30 segundos de duración (prueba Wingate);
 - iii. Ejercicio anaeróbico máximo de una hora (levantamiento de pesa hasta la fatiga muscular) y
 - iv. Ejercicio de fuerza y resistencia, moderado y periódico de ocho semanas de duración.
- (2) Marcadores de estrés oxidativo:
- i. Malonaldehído y 4-hidroxiacetaldehído en plasma (peroxidación lipídica) y
 - ii. Nitritos más nitratos en plasma (estrés nitrosativo de proteínas).
- (3) Respuesta antioxidante:
- i. Glutatión reducido y oxidado en hematíes (índice redox);
 - ii. Actividades de glutatión peroxidasa y reductasa en hematíes;
 - iii. Melatonina en plasma y sulfatoximelatonina en orina.
- (4) Respuesta inflamatoria:
- i. Interleuquina-6, Factor de necrosis tumoral-alfa e Interleuquina 1-beta en plasma (citoquinas pro-inflamatorias).
- (5) Daño muscular:
- i. Creatina kinasa, lactato deshidrogenasa, transaminasas y mioglobina en sangre.
- (6) Perfil metabólico:
- i. Glicemia, colesterol, triglicéridos, c-HDL y c-LDL en suero.
 - ii. Cortisol en suero.
 - iii. Bioquímica general: ácido úrico, nitrógeno de urea, creatinina y electrolitos séricos.
- (7) Ayuda ergogénica:
- i. Alcalinización provocada mediante la suplementación con bicarbonato de sodio.
 - ii. Malato de citrulina.

“Esta investigación integra el estrés oxidativo, la respuesta antioxidante, la respuesta de citoquinas, el daño muscular y el perfil metabólico asociado a ejercicio y entrenamiento físico.”

Un episodio de actividad física genera un conjunto de respuestas fisiológicas inmediatas conocidas como respuestas adaptativas al ejercicio agudo. Estas respuestas involucran a todos los sistemas corporales. La práctica habitual de ejercicio o el entrenamiento físico genera modificaciones en estas respuestas al episodio agudo y también en estado de reposo. Este conjunto de modificaciones fisiológicas se denominan respuestas adaptativas al ejercicio crónico. La realización de ejercicio físico tiene por objeto estimular la adaptación morfológica, estructural y funcional de los órganos implicados, directa o indirectamente y mejorar la capacidad de rendimiento físico.

La realización de ejercicio y entrenamiento físico conllevan una serie de beneficios y demandas sobre el organismo que son dependientes de la carga, forma, intensidad, volumen y duración. Los beneficios pueden tener alcances en el rendimiento físico y mental, en los sistemas de transferencia energética y en la salud cardiovascular. Las mayores demandas metabólicas tienen implicaciones en el estrés oxidativo, el daño muscular, en los procesos de inflamación, reparación y en el estado inmunológico.

El ejercicio intenso induce especialmente respuestas inflamatorias en los músculos activos, sobreproducción de radicales libres y cuantiosas movilizaciones de los sustratos energéticos. Por lo tanto, la previsión de la magnitud de daño muscular, de los patrones de respuesta antioxidante y de citoquinas en relación con las cargas de trabajo físico ayuda a intervenir oportunamente en los entrenamientos y a proponer guías metabólicas para la monitorización de la evolución del rendimiento y la condición física.

Esta investigación realiza un estudio multivariable sobre la carga física, estrés oxidativo, inflamación y daño muscular como base científica para justificar la integración de estos parámetros biológicos en el seguimiento de la prescripción de la actividad física, el rendimiento y la condición de salud de los deportistas.

A. Sobre el estrés oxidativo/ nitrosativo y la protección antioxidante durante el ejercicio físico.

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, el estrés oxidativo y nitrosativo y el ambiente forman una compleja relación que influyen en la salud humana y la enfermedad. Las moléculas están expuestas a una plétora de especies oxidantes y nitrosantes en los sistemas biológicos. Sus interacciones con las principales clases de biomoléculas (ácidos nucleicos, lípidos y proteínas) generan múltiples productos nocivos para la integridad funcional de los compartimentos celulares. La generación descontrolada de las especies reactivas produce disturbios en el balance oxidante-antioxidante, tales que alteran la información genética, denaturaliza las proteínas, inactiva enzimas y desordena los sistemas de biomembranas, ocasionando enfermedad, envenenamiento y envejecimiento. La huella del daño inducido por las especies

reactivas puede proveer evidencia de la naturaleza del ataque oxidante. La hipótesis de biomarcadores oxidativos propone que la medición de los niveles de oxidación y nitrosación de las biomoléculas puede proporcionar un índice de los niveles de exposición de los sistemas biológicos (Griffiths HR et al, 2002). Para contrarrestar los efectos de la exposición, se visualiza en la actualidad que la intervención en los estilos de vida de las personas, incluyendo el ejercicio físico, la nutrición y la eliminación del hábito de fumar pueden cooperar positivamente para reforzar el sistema de defensa antioxidante.

El ejercicio físico es una actividad implícita de la vida humana. El cambio biológico más notable que sucede durante el ejercicio es el aumento en la tasa metabólica, el cual está acompañado por un reforzamiento en la tasa de consumo de oxígeno. Esta elevada tasa de flujo de oxígeno a través de la mitocondria provoca incremento en la fuga de electrones, lo cual impone estrés a las organelas. La sobreproducción de las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés reactive oxygen species) y nitrógeno (RNS, del inglés reactive nitrogen species) asociadas con el ejercicio físico contribuyen con el envejecimiento. Por otro lado, el envejecimiento incrementa la producción de las especies reactivas y disminuye la eficiencia del sistema de defensa antioxidante. Se deduce por lo tanto, que las personas envejecidas son especialmente vulnerables al estrés inducido por el ejercicio físico.

Cuando un radical libre (R^*) remueve el átomo bialílico de hidrógeno de un lípido poli-insaturado (LH), se genera un radical libre carbono centrado (L^*) en el proceso de iniciación de la peroxidación lipídica. Este radical reacciona con el oxígeno a una tasa controlada de difusión para formar el radical peroxilo (LOO^*). Esta reacción se acompaña de un rearrreglo en los enlaces dobles para producir un dieno conjugado. Los metales reactivos tales como el hierro y el cobre pueden facilitar la reacción de los reactivos intermediarios con los lípidos.

El radical peroxilo (LOO^*) formado en la reacción inicial remueve entonces el átomo de hidrógeno de otro ácido graso poli-insaturado, produciendo un hidroperóxido lipídico ($LOOH$) y otro radical libre (L^*). En ausencia de reacciones de terminación de cadena, este proceso continua hasta que el ácido graso poli-insaturado se agote. Los productos estables de este proceso son hidroperóxidos (Barber and Bemheim, 1967). En presencia de catálisis metálica, los hidroperóxidos pueden descomponerse en alcoxilos (LO^*) y peroxilos. La perpetuación de estas reacciones intermedias es responsable de la propagación de la peroxidación lipídica. Cuando dos radicales libres interactúan, se forman especies no reactivas, terminando con ello el proceso de peroxidación lipídica.

Muchos métodos están disponibles para la medición de hidroperóxidos lipídicos y sus productos de degradación. El ensayo de ácido tiobarbitúrico (TBA) es el método más comúnmente usado para medir peroxidación lipídica. Se basa en la determinación colorimétrica o fluorimétrica de la reacción de TBA con malonaldehído (MDA), el cual es uno de los productos secundarios derivados de la peroxidación de lípidos.

Los radicales libres reaccionan rápidamente con las membranas biológicas debido a la abundancia de lípidos poli-insaturados. El hierro y cobre presentes en las membranas facilitan la tasa de peroxidación lipídica. Por definición, la peroxidación altera la estructura, la fluidez y la permeabilidad relativa de la bicapa lipídica. La peroxidación lipídica es una fuente importante de productos citotóxicos tales como los aldehídos producidos de la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos. Estos aldehídos son biológicamente activos. Por ejemplo, 4-hidroxinonenal, un producto de la oxidación de ácido araquidónico, es citotóxico y mutagénico. Los aldehídos son capaces de formar puentes cruzados entre proteínas, inactivando enzimas y transportadores de membrana. Una manera de contribuir con la detoxificación de estos productos es mediante la oxidación de MDA a través de aldehído deshidrogenasa mitocondrial.

Dependiendo de la carga y duración del ejercicio físico, éste puede generar la producción adicional de radicales libres para el ataque lipídico. Por otro lado, el entrenamiento puede mejorar la respuesta antioxidante a la peroxidación lipídica inducida por el ejercicio y la suplementación con antioxidantes tales como melatonina y vitamina E pueden reducir la peroxidación lipídica inducida por el ejercicio.

La protección antioxidante adecuada es crucial para que la célula evite el daño ocasionado por las especies reactivas. El ejercicio aeróbico extenuante está asociado con la sobreproducción de especies reactivas en el músculo esquelético, el hígado y el corazón (Davies KJA et al, 1982). En estas circunstancias, las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa proveen la defensa primaria contra las especies reactivas de oxígeno generadas durante el ejercicio. Las actividades de estas enzimas aumentan en respuesta al ejercicio en estudios humanos y de animales. Cuando la duración del ejercicio es relativamente corta (hasta varias horas), el aumento en la actividad catalítica es debido a las modificaciones alostéricas de las moléculas enzimáticas ya existentes y/o por mecanismos covalentes, mas no por inducción de la síntesis de nuevas proteínas enzimáticas (Ji, 1995). Debido al amplio rango de actividad enzimática y a los variables niveles de producción de las especies reactivas en los diferentes tejidos, es variable también la respuesta de la defensa al ejercicio y la magnitud del insulto oxidativo/nitrosativo.

Un episodio agudo de ejercicio aumenta la actividad de la cobre/zinc-superóxido dismutasa (CuZn-SOD), mas no la actividad de la manganeso-superóxido dismutasa (Quintanilha et al, 1983). Debido a que CuZn-SOD tiene una rápida tasa de recambio y una vida media corta (en el rango de minutos), no se puede descartar completamente que la síntesis de nueva proteína contribuya con la respuesta de la enzima al ejercicio que dura algunas horas. La actividad de glutatión peroxidasa tiene respuestas variables al episodio agudo de ejercicio en el músculo esquelético. Es posible que las discrepancias estén relacionadas con la intensidad del ejercicio.

El otro componente esencial de la defensa antioxidante lo constituye el sistema de glutatión. La razón de glutatión reducido/oxidado depende de la utilización y el

transporte celular. La utilización de glutatión reducido (GSH) es controlado por las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRd) y el transporte es controlado por las enzimas del ciclo γ -glutamil. Además, el adenosín trifosfato (ATP) y nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH) son determinantes del estado redox.

El ejercicio aeróbico intenso aumenta la producción de radicales libres y reduce las concentraciones intracelulares de ATP y NADPH debido a la mayor demanda metabólica ocasionada por la actividad muscular. Estos eventos pueden disminuir la capacidad para regenerar GSH a partir de glutatión oxidado (GSSG). Hay numerosas evidencias que indican que un episodio agudo de ejercicio físico extenuante aumenta significativamente el contenido de GSSG en el músculo esquelético (Ji et al, 1992). En cambio, cuando el ejercicio de intensidad moderada es prolongado, no suele ocurrir acumulación de GSSG, lo cual es explicado por un lado, debido a la estimulación simpática que genera el exporte continuo de GSH hepático hacia la sangre y luego al músculo. La otra explicación es el favorecimiento de la inducción de las enzimas que controlan la utilización y el transporte de GSH en respuesta al ejercicio moderado y prolongado.

Otro factor determinante del nivel de GSH en el plasma y el músculo esquelético durante el ejercicio físico es la magnitud de la reserva hepática de GSH. Durante el ayuno, disminuye proporcionalmente el contenido hepático de glutatión reducido. En cambio, la dieta rica en cisteína aporta sustrato para la síntesis de GSH. A pesar de lo anteriormente señalado, la suplementación con GSH exógeno durante el ejercicio tiene poca repercusión en los niveles sanguíneos y musculares de GSH, ya que ejerce una fuerte inhibición por retroalimentación sobre la glutamylcisteína sintetasa, la cual es la enzima catalizadora de la formación del enlace peptídico inicial entre cisteína y glutamato.

Por otro lado, las vitaminas antioxidantes y otros antioxidantes de bajo peso molecular desempeñan también un rol importante en la depuración de radicales libres durante el ejercicio agudo. A diferencia de las enzimas antioxidantes y el sistema de glutatión, los niveles de estos antioxidantes no son estrictamente regulados, razón por la cual son fuertemente influenciados por el ejercicio. La deficiencia de vitamina E exacerba la producción de radicales libres, la peroxidación lipídica y la disfunción mitocondrial en el ejercicio extenuante. Una de las principales funciones antioxidantes de la vitamina C es el reciclaje de la vitamina E. Sin embargo, las altas dosis de vitamina C pueden generar actividad pro-oxidante ya que el ascorbato reacciona con metales iónicos de transición, transformándoles en hidroxilos y otras especies reactivas. Aunque faltan datos para conocer las interacciones de ubiquinona con otros antioxidantes durante el ejercicio, la dieta elevada en ubiquinona ocasiona mayor resistencia a la peroxidación lipídica inducida por hidróperóxido.

El ácido úrico es el producto final del metabolismo de purina y aparece en grandes concentraciones en la circulación después de la contracción muscular intensa, debido a

la excesiva degradación de nucleótidos de adenina ocasionada por la falta de ATP intramuscular. Estos metabolitos purínicos son liberados desde el músculo hacia la sangre y una porción de estos componentes son convertidos en ácido úrico mediante xantina oxidasa de las células endoteliales vasculares. El ácido úrico es un potente antioxidante que depura los radicales hidroxilos y ayuda a preservar los niveles plasmáticos de ascorbato.

Por otro lado, el ácido lipoico es un cofactor de la descarboxilación oxidativa catalizada por cetoácido deshidrogenasas. Su forma reducida, el ácido dihidrolipoico, tiene potencial antioxidante porque depura radicales superóxido, hidroxilo, peróxido e hipocloroso, entre otros. También es un agente quelante de metales iónicos de transición y es capaz de regenerar a las vitaminas E y C, directa e indirectamente mediante la vía del ciclo GSH-GSSG. Además, el ácido dihidrolipoico ejerce un efecto inductor en la expresión de las enzimas antioxidantes mediante la regulación del factor nuclear κ beta, particularmente por la disociación de la subunidad reguladora I κ B del complejo NF- κ B y de la activación de NF- κ B (p50 y p65) al ADN.

El entrenamiento físico regula al alza la inducción de enzimas antioxidantes, lo cual disminuye la susceptibilidad del individuo al estrés oxidativo. El ejercicio físico regular ayuda a prevenir enfermedades cardiovasculares, en parte debido a que el entrenamiento también induce la enzimas del metabolismo de las lipoproteínas. Los sujetos entrenados tienen mayores actividades de la lipoproteín lipasa y de la lecitín colesterol acil transferasa. Consecuentemente, las disminuciones de las concentraciones plasmáticas de triglicéridos, colesterol-lipoproteína de baja densidad (LDL-colesterol), colesterol-lipoproteína de muy baja densidad (VLDL-colesterol) y el incremento de colesterol-lipoproteína de alta densidad (HDL-colesterol) están estrechamente relacionados con el ejercicio.

Las respuestas antioxidantes al ejercicio crónico dependen en gran medida de las características del ejercicio y de la capacidad de respuesta del sistema antioxidante. El ejercicio crónico puede depletar ciertos antioxidantes. Por ejemplo, la concentración de vitamina E disminuye en el músculo esquelético, hígado y corazón después del entrenamiento de resistencia en ratas (Aikawa KM et al, 1984). La reducción de la concentración mitocondrial de vitamina E después del entrenamiento puede ser explicada por la sobreproducción de radicales libres. El contenido muscular de glutatión reducido puede disminuir y la actividad de glutatión peroxidasa aumentar en el entrenamiento de resistencia. Es probable en estos casos que la oxidación de GSH exceda la capacidad de los tejidos de importar el glutatión reducido desde las fuentes extracelulares.

El principal componente de la respuesta antioxidante al entrenamiento es la inducción de enzimas antioxidantes, el cual suele acompañarse de una respuesta inflamatoria. Aunque el entrenamiento puede depletar las reservas antioxidantes no enzimáticas, la célula activa la síntesis de novo de las enzimas superóxido dismutasas, catalasa y

glutación peroxidasa. El cambio adaptativo más consistente ha sido reportado en la glutación peroxidasa mitocondrial (Ji et al, 1992), debido a su mayor sensibilidad a los niveles intracelulares de radicales libres. En humanos, la inducción enzimática antioxidante se correlaciona directamente con el consumo de oxígeno y la carga del entrenamiento.

Las adaptaciones del sistema de glutación al entrenamiento están relacionadas con la utilización y la capacidad celular para la captación de glutación reducido. En comparación con las personas no entrenadas, las entrenadas generalmente demuestran mayor tolerancia a las variaciones sanguíneas de GSH inducidas por ejercicio. Suele haber mayor concentración plasmática de GSH en jóvenes y adultos mayores entrenados respecto a personas sedentarias debido a la elevada tasa de exporte hepático de glutación reducido.

La intensidad y duración de la actividad contráctil determina en gran medida la magnitud de la señalización mitocondrial. Estas señales involucran la activación o inhibición de factores transcripcionales, la activación o inhibición de los factores de estabilidad de mRNA que median los cambios en la degradación de mRNA, alteraciones en la eficiencia translacional, las modificaciones post-translacionales de las proteínas, los cambios en la cinética de transporte de proteínas de importe y las alteraciones en la tasa de plegamiento y ensamblaje de proteínas para la formación de complejos multi-subunidades.

B. Sobre el daño muscular y la respuesta inflamatoria inducida por la carga física.

El ejercicio físico intenso y sostenido provoca inflamación y daño muscular. Cuando la intensidad del ejercicio es máxima y se mantiene durante periodos de tiempo prolongados, se origina daño muscular y fatiga. Esta condición puede ser valorada con el apoyo de las determinaciones de enzimas y proteínas musculares. En el músculo se desarrollan adaptaciones metabólicas en respuesta al entrenamiento como consecuencia de la demanda energética necesaria para la acción muscular. La inflamación se produce en respuesta al daño tisular. Desde el punto de vista clínico, los signos y síntomas de la inflamación incluyen edema, eritema, calor, dolor e impotencia funcional.

Los marcadores de daño muscular incluyen una serie de enzimas, proteínas contráctiles y reguladoras contenidas en las fibras musculares esqueléticas. La enzima aspártico aminotransferasa, también conocida como glutámico oxalacético transaminasa (GOT), fue el primer marcador empleado para el diagnóstico de laboratorio de daño muscular, sobre todo de infarto agudo de miocardio; pero carece de especificidad de tipo de fibra muscular esquelética. La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) se encuentra en casi cualquier tejido, especialmente en músculo esquelético, hígado, corazón, riñón, cerebro, pulmón y eritrocitos. La LDH consiste en un tetrámero compuesto por dos subunidades, M (músculo) y H (corazón). La expresión de la subunidad M es una adaptación en respuesta a un aumento de la glucogenólisis anaerobia para el aporte de energía, dado que alcanza su máxima actividad ante altas concentraciones de piruvato. Esto explica

por qué el músculo esquelético sometido a estrés crónico sobre-expresa las isoenzimas LDH-1 y LDH-2 con predominio de subunidades M.

La enzima creatina kinasa (CK) es clave en la producción de energía celular y en el metabolismo muscular. Existen dos formas de CK, una mitocondrial y otra citosólica. La CK citosólica presenta una unión significativa a las miofibrillas en el músculo esquelético y cardíaco. Es una molécula dimérica compuesta de subunidades B (forma cerebral) o bien M (forma muscular) y existen tres isoenzimas: CKBB (CK-1), CKMB (CK-2) y CK MM (CK-3). La forma mitocondrial de la enzima es también un dímero y probablemente está compuesta de dos subunidades idénticas (CK-Mi). Clínicamente sólo se observa actividad significativa de CK en músculo esquelético, corazón, cerebro, intestino y el útero durante la gestación, encontrándose la máxima concentración en el músculo esquelético. En todos los demás órganos existe una baja concentración o bien una masa insuficiente como para contribuir significativamente a los niveles plasmáticos.

La CK-MM supone la mayor parte de la actividad de la CK del músculo esquelético. El contenido de CK-MB en el músculo esquelético varía dependiendo de la proporción de fibras de contracción lenta, que pueden contener hasta un 5-10% de CK-MB, mientras que las fibras de contracción rápida contienen menos de un 3%. Con el entrenamiento de resistencia, la CK-MB se acumula en el músculo esquelético y puede alcanzar los niveles miocárdicos, motivo por el cual, un nivel elevado de CK-MB, tras ejercicio muscular en atletas debería interpretarse como un indicador de daño muscular esquelético. La degeneración y regeneración crónica muscular conducen a un marcado aumento del contenido de CK-MB. Puede suceder una disminución de la CK sérica tras estímulos de ejercicio continuados; lo cual sugiere que se produciría un menor daño muscular tras el entrenamiento. Este hecho implica el efecto protector muscular del esfuerzo físico regular. A pesar de su asociación con el daño muscular, no se ha encontrado una correlación entre los niveles de CK séricos y el dolor muscular de inicio tardío.

Por su parte, la mioglobina es una proteína fijadora de oxígeno presente en el músculo estriado que se libera rápidamente tras el daño muscular. La mioglobina facilita la difusión de oxígeno en las fibras musculares estriadas y también sirve como depósito de oxígeno en la propia fibra muscular. La mioglobina sólo se encuentra en músculos estriados (esquelético y cardíaco), donde llega a representar un 5-10% de todas las proteínas citoplasmáticas. Su concentración en sangre aumenta rápidamente tras el daño muscular, normalmente entre 2 y 4 horas, y llega al máximo en 5-10 horas siendo su valoración una ayuda interesante a la hora de conocer el estado y la evolución del músculo.

Durante el periodo de entrenamiento y competición, los requerimientos del organismo son intensos y mantenidos a lo largo del tiempo, obligando a establecer unos periodos de recuperación y regeneración tisular, que si no son respetados conducen a la *fatiga*. La fatiga se define como la disminución de la capacidad de producción de fuerza, medida preferiblemente en una máxima contracción voluntaria (MCV) o en un tétanos provocado eléctricamente. La fatiga aguda ocurre durante una sesión de ejercicio sea por entrenamiento o competición, produciendo una disminución del rendimiento o una

parada del ejercicio. La fatiga aguda muscular o de sobre-esfuerzo generalmente ocurre después de una sesión de entrenamiento que excede el nivel de tolerancia al esfuerzo en el músculo. Está acompañada de lesión del tejido muscular, afectando solamente a los músculos involucrados en el ejercicio. La fatiga subaguda, también llamada sobrecarga, ocurre después de uno o varios microciclos relativamente intensos. La fatiga crónica aparece después de varios microciclos en los que la relación entrenamiento o competición y recuperación se desequilibran, lo cual ocasiona un cuadro sistémico de descenso de rendimiento y fatiga (Cuadro No. 2).

La etiopatogenia de la fatiga muscular es compleja y obedece de manera general a depleción energética, acumulación de metabolitos y mediadores inflamatorios. Por ejemplo, cuando la fatiga muscular se produce en menos de 30 segundos, este espacio de tiempo es insuficiente para que la glucólisis anaerobia tenga una contribución importante a la energía requerida para la contracción. Existe una correlación inversa entre las concentraciones de ATP, creatina fosfato y la fatiga muscular local. La depleción del creatina fosfato coincide con una gran caída de la tensión muscular antes de cualquier acumulación valorable de hidrogeniones. La concentración de glucógeno es un determinante principal de la resistencia muscular tanto en las fibras rápidas (tipo II) como en las lentas (tipo I) y su consumo es selectivo para las fibras musculares activas. Las circunstancias que retrasan la disminución del glucógeno almacenado en el músculo, también demoran el inicio de la fatiga muscular local. La sobrecompensación con glucógeno eleva sus niveles en reposo y está asociada con un incremento del tiempo de resistencia en el ejercicio de larga duración. Además, la ingesta de hidratos de carbono durante el ejercicio retrasa la depleción glucogénica y por tanto, el inicio de la fatiga.

La hipoxia local constituye otro factor desencadenante de la fatiga muscular. La deficiencia en el aporte de oxígeno conduce a la puesta en marcha de las vías anaeróbicas de obtención de energía con la consiguiente acumulación de metabolitos ácidos que en última instancia serían los que condicionarían la aparición de la fatiga. La relación lactato-fatiga muscular local no es una simple relación de causa-efecto, ya que otros factores además del descenso del pH intracelular deben estar implicados en la limitación de la fuerza. La mayoría de los efectos del lactato en el desarrollo de la fatiga muscular local están mediados por el incremento de la concentración de H^+ , generados por la disociación del ácido láctico. Sin embargo, parece que la disminución de la potencia asociada con un pH intramuscular bajo puede atribuirse en buena medida a la inhibición de la glucólisis y la subsiguiente interrupción del suministro de energía en forma de ATP. Cuando los atletas entrenados en resistencia desarrollan fatiga en situaciones de actividades de muy larga duración, generalmente está implicada la falta adaptativa de la beta oxidación de las grasas.

Por otro lado, los altos niveles de NH_4^+ (catión amonio) en sangre están asociados con el inicio de la fatiga muscular local que sigue a un ejercicio de entrenamiento de alta intensidad. Cuando la concentración de amonio se incrementa dentro del músculo,

suprime el metabolismo oxidativo por inhibición de las enzimas isocitrato deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa. Sin embargo, el entrenamiento puede disminuir el nivel de NH_4^+ en sangre y retrasar el inicio de la fatiga en ejercicios de duración más prolongada. El incremento de concentración de ácido láctico tiene también un efecto directo sobre la osmolaridad celular, causando un cambio en el volumen de agua en el interior del músculo. El incremento subsiguiente de la presión intracelular conduce a una restricción de la circulación local (isquemia) y a la dilución de los iones acumulados, fenómenos que también están relacionados con el desarrollo de fatiga.

Cuando el trabajo es excéntrico, la fatiga muscular local proviene del daño mecánico, más que de los procesos químicos de la contracción muscular. Las contracciones excéntricas tienen un coste metabólico más bajo que las concéntricas, aunque, la tensión generada a través del número reducido de fibras implicadas es mayor que para las contracciones concéntricas y suficientemente grande como para producir el daño mecánico en las líneas Z, en el retículo sarcoplásmico y en el mecanismo contráctil. Los cambios de la ultraestructura muscular siguen de una respuesta inflamatoria en la que intervienen citoquinas, proteínas reactantes y una variedad de leucocitos. Habitualmente la respuesta inflamatoria es limitada; pero si el ejercicio se prolonga o si no se instauran las terapias reparadoras pertinentes, ocurre rabdomiólisis. Inicialmente los focos de daño estructural se localizan en las miofibrillas y en el citoesqueleto. La rabdomiólisis ocasiona liberación de enzimas musculares, aumento de mioglobina en sangre y mioglobunuria. Si a este estado se añade cierto grado de deshidratación, aumenta el riesgo y las consecuencias de la rabdomiólisis. Además, se puede observar desestructuración en las células dañadas con una degradación de los lípidos y proteínas estructurales.

Como ya hemos mencionado, entre los mecanismos de producción de fatiga tiene una relevancia especial la depleción de sustratos, la acumulación de metabolitos, las alteraciones hidroelectrolíticas y minerales, la alteración de los sistemas reguladores, la disfunción del sistema enzimático muscular, la disminución de los depósitos de proteínas musculares, las alteraciones de los sistemas de control y sus relaciones neuroendocrinas e inmunológicas (Cuadro No. 3).

Los procesos inflamatorios en el músculo activo son desencadenados por la liberación en el foco de insulto de moléculas mediadoras. Estas moléculas tienen distintas actividades: anafiláctica, opsonizadora, quimioatrayente, de adhesión a células endoteliales y vasodilatadora. Las moléculas responsables de la lesión tisular incluyen radicales libres, metaloproteasas, proteasas plasmáticas, mediadores lipídicos, péptidos, aminas, mioquinas, citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas (Cuadro No. 4).

La producción de citoquinas puede comenzar al poco tiempo del inicio del ejercicio extenuante siendo variable el período de tiempo para la normalización de los niveles. Los tiempos de elevación de la IL-6 pueden corresponderse a los del daño muscular. Así, los picos de la actividad de creatina kinasa sérica se producen en las primeras 48

horas tras un esfuerzo intenso y de 3 a 7 días tras el esfuerzo físico excéntrico. De igual forma, la concentración de IL-6 vuelve a valores similares a los de antes del ejercicio de forma rápida tras un ejercicio de resistencia y de forma más prolongada tras un ejercicio intenso durante un tiempo breve. Por otra parte, existen otras citoquinas implicadas en la finalización de la respuesta inflamatoria, entre las que se encuentran los antagonistas de los receptores de IL-1, IL-4 e IL-10. Algunos reportes señalan también un posible rol de las citoquinas anti-inflamatorias en la respuesta inducida por ejercicio (Petersen y Pedersen 2005).

Las citoquinas son polipéptidos originalmente descubiertos en el sistema inmunológico. Sin embargo, muchos tipos celulares producen citoquinas y las funciones biológicas de las mismas van más allá de la regulación inmune. Algunas citoquinas tienen importantes funciones metabólicas y ejercen efectos locales o acciones de tipo hormonal.

La mayoría de los estudios sobre citoquinas provienen de las investigaciones sobre sepsis. En los modelos de sepsis, la cascada de citoquinas consiste del aumento en los niveles de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-1ra, sTNF-R, IL-10, IL-8 y proteína inflamatoria de macrófago (MIP-1 α y β). TNF- α e IL-1 β son citoquinas pro-inflamatorias, mientras que sTNF-R, IL-1ra e IL-10 tienen funciones anti-inflamatorias. IL-6 ha sido clasificada como citoquina pro y anti-inflamatoria, siendo IL-6 circulante principalmente anti-inflamatoria (Xing et al, 1998). La infusión de IL-6 en humanos ocasiona fiebre, pero no produce choque ni síndrome de hiperpermeabilidad capilar, como se observa con las citoquinas pro-inflamatorias típicas IL-1 β y TNF- α . Además, a diferencia de IL-1 β y TNF- α , IL-6 no regula al alza los principales mediadores de la inflamación, tal como el óxido nítrico (Barton, 1997). En cambio, IL-6 es el principal inductor de las proteínas de fase aguda derivadas del hepatocito, muchas de las cuales tienen propiedades anti-inflamatorias. Además, cuando se infunde IL-6 a los humanos, favorece la elevación de los niveles circulantes de las citoquinas anti-inflamatorias IL-1ra e IL-10.

Es posible detectar las variaciones en el plasma de las citoquinas durante y después de ejercicio máximo (Ostrowski K et al, 1999 y Suzuki et al, 2002). El ejercicio no induce aumento en los niveles plasmáticos de TNF- α , excepto algunos pocos estudios que lo demuestran durante el ejercicio intenso o máximo, tales como durante la carrera de maratón (Pedersen et al, 2001). Además, se demuestra que IL-1 β no aumenta en sangre, a pesar de que algunos comentan sobre pequeños cambios relativos (Suzuki et al, 2002).

El hecho de que las citoquinas pro-inflamatorias clásicas TNF- α e IL-1 β no aumentan o aumentan en pequeño grado es importante para hacer entonces la distinción entre la cascada de citoquinas inducida por ejercicio de la cascada de citoquinas en respuesta a infecciones. Típicamente, la primera citoquina que está presente en la circulación después del ejercicio es IL-6, la cual puede aumentar hasta cien veces. Este aumento de IL-6 va seguido de un incremento marcado en la concentración de IL-1ra. La citoquina inhibidora del receptor sTNF y la citoquina anti-inflamatoria IL-10 aumentan después. Además aumentan las concentraciones de IL-8, MIP-1 α y MIP-1 β después de la carrera de maratón (Niess et al, 2000 y Ostrowski et al, 2001). El ejercicio de resistencia induce

la liberación sistémica del factor estimulante de colonia de granulocito (G-CSF), macrófago (M-CSF) y la proteína 1 quimiotáctica de monocito (MCP-1).

Cuando las células mononucleares sanguíneas son analizadas durante y después de ejercicio intenso o máximo y estimuladas *in vitro* para producir citoquinas, la producción *in vitro* de citoquinas se altera (Drenth et al 1995), no cambia o se refuerza (Haahr PM et al 1991). Estos hallazgos pueden ser explicados por las alteraciones en la composición de células mononucleares sanguíneas inducidas por el ejercicio.

IL-12 ha dominado el campo de la inmunidad mediada por células desde su descubrimiento hace más de 15 años y claramente juega un rol esencial en el desarrollo de las células Th1 en una variedad de condiciones. El rol de IL-12 no está limitado a iniciar la respuesta inmune sino que contribuye a mantenerla. Por ello, las respuestas Th1 rápidamente desaparecen en ausencia de IL-12, ocasionando la pérdida de la inmunidad protectora contra patógenos intracelulares. La producción de IL-12 por las células NK es estimulada por varios virus (Scott, 1993), que nuevamente estimulan la producción de IFN- γ . En respuesta al ejercicio, los niveles circulantes de IL-12 aumentan (Suzuki et al, 2002). Sin embargo, aún no está esclarecido el papel de IL-12 inducido por el ejercicio físico.

Aunque TNF- α regularmente no es detectado en el plasma, fácilmente puede ser detectado en orina dos horas después de ejercicio (Suzuki et al, 2002). IL-6 parece ser depurado por la vía hepatoesplácnica (Febraio et al 2002) y también en la orina. Adicionalmente, ha sido demostrado que las concentraciones plasmáticas de IL-4, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL-8 y MCP-1 aumentan inmediatamente después de un ejercicio de corta duración y que las concentraciones urinarias de estas citoquinas se elevan (Suzuki et al, 2002).

Inicialmente se pensó que la respuesta de citoquinas al ejercicio reflejaba la respuesta clásica de fase aguda a la injuria muscular. El daño muscular ocurre cuando el ejercicio enfatiza en contracciones musculares excéntricas. Sin embargo, varios reportes han demostrado que esta respuesta de citoquinas ocurre cuando los movimientos son ejecutados mediante contracciones predominantemente concéntricas y de intensidad moderada (Febraio et al 2002).

En relación con el ejercicio intenso de una hora de duración, que involucra contracciones excéntricas, la creatina kinasa aumenta hasta 100 veces durante cinco días, tanto en sujetos jóvenes como ancianos. Sin embargo, los niveles plasmáticos de IL-6 aumentaron solamente pocas veces inmediatamente después del ejercicio y luego se presenta un nuevo pico a las cuatro horas de la recuperación. Los niveles de TNF poco cambian. El segundo pico de IL-6 suele estar estrechamente correlacionado con el nivel de creatina kinasa.

Es conocido en la actualidad que el ejercicio induce la transcripción de genes de metabolitos en el músculo ejercitado (Pilegaard et al 2000), lo cual demuestra que las

contracciones musculares directamente influyen en el metabolismo. El hallazgo de que la transcripción del gen de IL-6 ocurre localmente en el músculo esquelético contráctil y que IL-6 es vertida a la sangre en grandes cantidades desde una extremidad ejercitada (Febraio et al 2002), abre la posibilidad de que los cambios inmunológicos inducido por el ejercicio están directamente relacionados a las condiciones del músculo contráctil.

Un número de estudios (Ullum H et al, 2000) demostró que el mRNA de IL-6 en monocitos, que es la célula responsable del aumento de IL-6 en plasma durante la sepsis (Pedersen BK et al, 2000), no aumenta como resultado del ejercicio. Mediante la determinación de la producción intracelular de citoquinas se demostró que el número, el porcentaje y la intensidad media de fluorescencia de monocitos teñidos positivos para IL-6 no cambia durante el ejercicio en bicicleta (Starkie RL et al 2000) y hasta disminuye durante una carrera prolongada (Starkie RL et al 2001).

Para probar la posibilidad de que el músculo activo produce IL-6 se realizaron biopsias musculares antes y después de ejercicio dinámico (Ostrowski K et al, 1998). El mRNA IL-6 está presente en pequeñas cantidades en el músculo esquelético en reposo, pero aumenta hasta cien veces en actividad contráctil. Este hallazgo indica que el ejercicio es responsable de la inducción del gen IL-6. Éste es también el caso cuando las contracciones musculares concéntricas son responsables de los movimientos de la extremidad sin el compromiso de daño muscular. No solamente se activa el gen IL-6 en el músculo activo, sino también la proteína IL-6 es liberada en gran cantidad desde la extremidad contráctil y contribuye marcadamente con el aumento en la concentración de plasma arterial inducida por el ejercicio (Steensberg A et al, 2000). La infusión de IL-6 humana recombinante demuestra que IL-6 favorece la producción de cortisol con la misma cinética y en la misma intensidad que durante el ejercicio (Steensberg A et al, 2003). Además, IL-6 induce neutrocitosis y linfopenia tardía en la misma magnitud y con la misma cinética que durante el ejercicio dinámico, lo cual sugiere que IL-6 derivada del músculo debe tener un rol central en la recirculación de leucocitos inducida por el ejercicio. En relación con el ejercicio de carrera extenuante, ocurren grandes incrementos en la expresión génica muscular de IL-1 β e IL-8 y también pequeños incrementos en IL-10 y TNF- α (Nieman DC et al, 2003). Sin embargo, se desconoce si estas citoquinas también son liberadas a la circulación para desempeñar un rol en la inmunomodulación inducida por el ejercicio.

Algunos estudios indican que el entrenamiento de fuerza-resistencia mediante levantamiento de pesas no modifica sustancialmente la respuesta inmunológica (Woods JA et al, 2002). Este ejercicio consistió de 80% de una repetición máxima, 8 repeticiones por set, 3 sets por sesión dos veces a la semana durante doce semanas. En este estudio no hubo cambio significativo en la respuesta de las citoquinas IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-2 y PGE2, ni en el grupo de jóvenes de 22 – 30 años ni en el grupo de adultos mayores de 65 – 80 años de edad.

Durante el envejecimiento aumentan los niveles circulantes de diversas de citoquinas. Así, hay documentaciones de elevación de TNF- α (Dobbs RJ et al, 1999 y Paolisso G et al, 1998), IL-6, IL-1ra (Bruunsgaard H et al 2001) y sTNF-R (Bruunsgaard H et al 1999) en adultos mayores. A pesar de que los niveles circulantes de citoquinas y proteínas de fase aguda están elevados en personas ancianas solamente en razón de dos a cuatro veces respecto a personas jóvenes, está claramente evidenciada la asociación entre la inflamación de bajo grado y la aterosclerosis, la demencia y la diabetes en adultos mayores (Bruunsgaard H et al 1999). Dado que el ejercicio acentúa las contracciones musculares concéntricas y con ello contribuye a reducir las citoquinas pro-inflamatorias, es razonable considerar que algunos tipos de ejercicio en el adulto mayor pueden ayudar a controlar la inflamación de grado bajo de las enfermedades asociadas a la edad.

C. Sobre la movilización de sustratos energéticos y el perfil metabólico durante el ejercicio y el entrenamiento físico.

La identificación de las fuentes predominantes de energía de acuerdo a la carga física es fundamental para la planeación del ejercicio y el entrenamiento. Así, disponemos de los enlaces fosfatos de alta energía (ATP y fosfocreatina) en el sistema inmediato de transferencia energética, el sistema a corto plazo del ácido láctico y el sistema aeróbico de largo plazo de la oxidación de carbohidratos, lípidos y proteínas. Los enlaces fosfato de alta energía almacenados dentro de los músculos proporcionan la energía para cargas de corta duración e intensidad elevada, como el levantamiento de un peso pesado y el sprint de la prueba Wingate. Los sistemas ATP - creatina fosfato y ácido láctico proporcionan alrededor de la mitad de la energía que se necesita para el ejercicio que dura 2 minutos que pretenda alcanzar el mejor rendimiento, mientras que el resto lo proporcionan las reacciones aeróbicas. Para el rendimiento más alto en el ejercicio intenso de 2 minutos, una persona debe poseer una capacidad bien desarrollada de metabolismo aeróbico y anaeróbico. El ejercicio intenso de duración intermedia realizado durante 5 a 10 minutos, como la lucha y el juego de balonmano, exige una mayor transferencia de energía aeróbica. El ciclismo necesita un suministro constante de energía de procedencia aeróbica sin depender de la formación de lactato.

La intensidad y duración de la carga física determinan el patrón de participación de los sistemas de transferencia energética. El sistema aeróbico predomina en el ejercicio dinámico. A elevada intensidad participa dos veces más el metabolismo de los carbohidratos que el de las grasas y proteínas y a baja intensidad, las grasas son el principal combustible.

La oxidación de carbohidratos y lípidos es finamente regulada durante el ejercicio dinámico. La degradación de unidades glucosilo derivadas del glucógeno muscular y la glucosa en sangre generan piruvato mediante la glucólisis, el cual puede ser oxidado o convertido a lactato y alanina. Piruvato deshidrogenasa (PDH) es un complejo multienzimático de la matriz mitocondrial que convierte el piruvato en acetil coenzima

A (CoA). Esta enzima regula la entrada de carbohidrato en el ciclo del ácido tricarbóxico y la subsecuente oxidación. Los mayores activadores de PDH durante el ejercicio son el influjo de calcio en el músculo y el ADP, ya que ambos estimulan la glucólisis y la producción de piruvato, el cual es otro activador de PDH.

Quizás una de las respuestas más estudiadas al ejercicio es el lactato sanguíneo durante el ejercicio incremental. El incremento exponencial de lactato sanguíneo sigue al incremento de la tasa glucolítica y la glucogenólisis muscular durante el ejercicio incremental. En esencia, existe relación íntima entre el umbral láctico, la capacidad de oxidación muscular y la tasa de utilización de carbohidratos durante el ejercicio dinámico (Coyle et al, 1988). El lactato es un metabolito intermediario importante durante y después del ejercicio, ya que es un sustrato para el metabolismo oxidativo y precursor gluconeogénico. El músculo activo es el principal sitio de oxidación de lactato durante ejercicio, el cual contribuye con el 30% de la oxidación total de carbohidratos (Van Hall et al, 2003). En el período post ejercicio se requiere el reabastecimiento de los depósitos de glucógeno muscular. La depleción de glucógeno inducida por ejercicio activa la glucógeno sintasa. Además, la resíntesis de glucógeno muscular depende de la ingestión de carbohidrato, el cual eleva la glucosa y la insulina en sangre. Particularmente, la insulina estimula la translocación del transportador GLUT4 al sarcolema y activa la glucógeno sintasa.

En el metabolismo de lípidos, la habilidad del tejido adiposo para responder al ejercicio dinámico mediante la activación de la hidrólisis de triglicéridos y la liberación de ácidos grasos libres a la sangre es importante para aumentar y sostener la disponibilidad de ácidos grasos libres en el músculo activo. La regulación de la lipólisis del tejido adiposo está enfocada al control de la actividad de la lipasa sensible a hormona. Esta enzima es limitante en la degradación de triglicéridos a diacilglicerol y ácido graso libre y de diacilglicerol en monoacilglicerol y ácido graso libre. El incremento plasmático de catecolaminas durante el ejercicio incrementa la actividad de la lipasa sensible a hormona.

El entrenamiento físico genera adaptaciones metabólicas. Las principales adaptaciones metabólicas al entrenamiento aeróbico se ven reflejadas en cambios de la potencia aeróbica, en las adaptaciones musculares tales como hipertrofia, angiogénesis, inducciones enzimáticas y en los suministros energéticos. Hay mayores depósitos de glucógeno y triglicérido muscular, disminuye la actividad simpática en el ejercicio agudo y se reduce la utilización de carbohidratos durante el ejercicio submáximo. El entrenamiento anaeróbico refuerza la potencia y la capacidad anaeróbica, favorece el reclutamiento de fibras rápidas y los sistemas energéticos ATP-PCr y glucólisis anaeróbica. Ocurre inducción de lactato deshidrogenasa y fosfofructokinasa y elevación del umbral láctico. La capacidad de amortiguación muscular también mejora en el entrenamiento anaeróbico.

Los entrenamientos aeróbicos combinados de fuerza y resistencia también inducen cambios adaptativos en la respuesta endocrina y el perfil metabólico sanguíneo. El entrenamiento aumenta la sensibilidad a la insulina; el descenso normal de la insulina durante el ejercicio está muy reducido en respuesta al entrenamiento. Con el entrenamiento hay menores aumentos de las concentraciones de glucosa durante el ejercicio con cargas semejantes de trabajo tanto absolutas como relativas. Los entrenados tienen ligeras elevaciones de cortisolemia durante el ejercicio.

El ejercicio aeróbico regular es uno de los estilos de vida que afectan favorablemente las concentraciones de colesterol, triglicéridos y lipoproteínas. Otros estilos de vida que también son protectores incluyen el adelgazamiento, el aumento de la fibra liposoluble y el aumento del consumo en el alimento del cociente entre ácidos grasos poliinsaturados y saturados y de ácidos grasos monoinsaturados. Una forma eficaz de evaluar el estado lipoproteico es el índice colesterol total / colesterol HDL. Un cociente menor o igual a 3.5 indica bajo riesgo de enfermedad cardiovascular.

D. Sobre las características del entrenamiento de fuerza y resistencia con ayuda de vibraciones.

La exposición a vibraciones había sido considerada tradicionalmente como perjudicial para el organismo humano. Sus efectos fueron estudiados de manera pormenorizada en medicina del trabajo, habiéndose establecido incluso normativas ISO para evitar al máximo su aparición en los puestos de trabajo. Estas vibraciones suelen caracterizarse por su baja o muy alta frecuencia, su alta amplitud y la larga duración de su exposición al ser humano. Sin embargo, existen otras vibraciones que parecen provocar efectos beneficiosos en el organismo. En este caso, las frecuencias son moderadas (25-40 Hz), las amplitudes pequeñas (2-10 mm) y la corta duración de la exposición (inferior a los 30 minutos con intermitencias).

Desde hace unos años se ha introducido en el mercado una serie de dispositivos capaces de provocar un estímulo mecánico mediante movimientos oscilatorios sinusoidales. Este estímulo se transmite por todo el cuerpo, consiguiendo aumentar la carga gravitatoria a la que es sometido el sistema neuromuscular. Aparece así lo que se conoce como vibraciones de cuerpo completo (Whole-body vibration; WBV) que han de diferenciarse de las vibraciones aplicadas localmente. Las primeras ocurren cuando todo el cuerpo es sometido a movimiento y el efecto no es localizado. Las segundas ocurren cuando una parte determinada del cuerpo es sometida a movimiento, por ejemplo en la aplicación directa al bíceps braquial.

La forma más habitual de aplicar vibraciones con el objeto de mejorar el rendimiento físico es mediante plataformas, que consiguen el efecto "por todo el cuerpo", aunque también se han aplicado de manera localizada empleando mancuernas o cables.

Las investigaciones sobre los efectos de las vibraciones en el ser humano tienen ya una larga tradición. Sus resultados van desde muy perjudiciales, siendo la perspectiva tradicional de la medicina del trabajo; a muy beneficiosos, la cual constituye una perspectiva más actual del campo de la actividad física y el deporte así como el de la rehabilitación. La explicación a estas grandes divergencias podría residir en los diferentes parámetros de vibración empleados. Si anteriormente distinguíamos la localización o no de las vibraciones, también se ha de tener muy en cuenta su frecuencia, amplitud, dirección y duración, ya que el cuerpo humano ha demostrado responder de manera altamente específica a la variación de estos parámetros. La aplicación de vibraciones al cuerpo humano puede ser descrita como placentera o molesta, puede influir en el rendimiento en ciertas tareas y provocar lesiones o enfermedades pero también provocar efectos positivos como el alivio del dolor crónico.

Existen numerosas variables o parámetros que pueden afectar a los movimientos oscilatorios sobre el cuerpo humano, aunque pueden ser divididas en dos grandes categorías: variables extrínsecas (que ocurren fuera del cuerpo humano) y variables intrínsecas (aquellas que ocurren dentro del cuerpo o entre diferentes personas). Entre las variables extrínsecas se mencionan las siguientes:

- Magnitud: la magnitud de una vibración suele expresarse por razones prácticas en unidades de aceleración (m/s^2), empleándose para ello acelerómetros. En los aparatos que se emplean para la mejora del rendimiento físico no se ofrece información sobre este parámetro pero puede obtenerse a partir de la frecuencia (f) y el desplazamiento (d), mediante la ecuación: $a = (2 f)^2 d$. Esto quiere decir que un movimiento oscilatorio sinusoidal con una frecuencia de 30 Hz y 4 mm de desplazamiento resultará en una aceleración de 14,48 g.
- Frecuencia: es el número de ciclos de movimiento sinusoidal realizado en un segundo expresado mediante la unidad hertzio (Hz). El rango de frecuencias de vibración empleadas en los estudios de entrenamiento está entre 23 y 44 Hz.
- Amplitud: es el desplazamiento que se realiza en cada ciclo de movimiento sinusoidal expresado por lo general en mm. El rango de amplitud empleado en los estudios se sitúa entre 2 y 10 mm, aunque el valor más empleado son 4 mm.
- Dirección: las tres principales direcciones de las vibraciones aparecen en los ejes antero-posterior (x), lateral (y) y vertical (z). En el mercado existen plataformas vibratorias donde predomina la dirección vertical y otras donde existe además un marcado componente lateral.
- Duración: algunas respuestas del cuerpo humano dependen fundamentalmente de la duración de la vibración a la que es expuesto. La normativa ISO 2631 establece los límites de tiempo de exposición basándose en los valores de la dosis de vibración. En los estudios orientados a la mejora del rendimiento la exposición total va desde 4 min hasta un máximo de 20.

Hasta el momento no se habían descrito las repercusiones de las vibraciones durante el entrenamiento físico en el estrés oxidativo, el estado inflamatorio y daño muscular inducido por el esfuerzo. El presente estudio analiza las consecuencias del entrenamiento de fuerza y resistencia mediante un programa de 8 semanas, en los parámetros sanguíneos de peroxidación lipídica, nitritos, citoquinas y enzimas musculares. Compara el entrenamiento de fuerza y resistencia en plataforma vibratoria (abreviado WBV, del inglés whole body vibration) y el entrenamiento convencional de fuerza y resistencia sin variaciones en las vibraciones (abreviado ECF).

E. Sobre la Prueba Wingate.

La prueba Wingate es una prueba anaeróbica de duración media e intensidad supramáxima, con un alto grado de validez que se realiza en cicloergómetro que valora la potencia aláctica, la capacidad anaeróbica láctica y aláctica y la resistencia a la fatiga. La prueba Wingate es una modificación de la prueba Katch. Consiste en la realización durante 30 segundos de un ejercicio máximo en el cicloergómetro. Consiste en la aplicación de una carga de trabajo de 45 g/kg de peso en mujeres y de hasta 75 g/kg de peso en hombres. El individuo explorado debe calentar durante 2 minutos y posteriormente pedalear hasta alcanzar la carga marcada. A partir de aquí se cronometran 30 segundos al máximo durante los cuales se anota el número de revoluciones cada 5 segundos. El trabajo total realizado en los 30 segundos es la potencia mecánica y representa la capacidad anaeróbica. La potencia anaeróbica máxima es el trabajo más alto llevado a cabo en cualquier período de 5 segundos. De esta forma podemos comparar la máxima potencia al comienzo de la prueba (primeros 5 segundos) con la obtenida al final de la misma. La diferencia entre la potencia máxima alcanzada y la mínima está relacionada con el grado de fatiga del individuo. La potencia pico es la potencia mecánica más alta que se genera durante cualquier intervalo de 3 ó 5 segundos de la prueba. La interpretación de la prueba Wingate supone que la potencia pico es la capacidad de generación de energía por parte de los fosfatos intramusculares de alta energía, mientras que la potencia total refleja la capacidad glucolítica. En los ciclistas, el 50% del trabajo total en la prueba Wingate proviene del sistema ATP-CrP, el 47% de la glucólisis anaeróbica y solamente el 3% proviene del metabolismo aeróbico, lo cual representa para los primeros 10 segundos, 4 kilojulios provenientes del sistema ATP-CrP y 4 kilojulios de la glucólisis anaeróbica. A los 30 segundos de duración de la prueba, se consumen 20 kilojulios, de los cuales la glucólisis anaeróbica finalmente contribuye con 10 kilojulios y la glucólisis aeróbica con 6 kilojulios.

OBJETIVOS

I. General.

Evaluar integralmente el estrés oxidativo, la defensa antioxidante endógena, el daño muscular, el estado metabólico y la participación de mediadores inflamatorios durante el ejercicio y el entrenamiento físico.

II. Específicos.

(1) Evaluar las consecuencias de diferentes cargas de esfuerzo físico en el daño a lípidos y proteínas producido por la generación exagerada de radicales libres.

(2) Analizar la participación de citoquinas como mediadores de respuesta inflamatoria durante ejercicio, entrenamiento físico y fatiga muscular.

(3) Reconocer la participación de la defensa antioxidante endógena durante el ejercicio intenso.

(4) Evaluar el estado metabólico y el posible daño muscular durante las competencias de ciclismo (profesional y amateur) y durante el entrenamiento de fuerza y resistencia.

(5) Confirmar el efecto del ejercicio físico extenuante en la concentración plasmática de melatonina y urinaria de sulfatoximelatonina.

(6) Analizar la influencia de la alcalinización inducida mediante la administración oral de bicarbonato de sodio sobre la peroxidación lipídica y la respuesta de citoquinas durante la repetición de la prueba Wingate en ciclistas profesionales.

(7) Establecer la posible asociación entre el estado ácido y la concentración sanguínea de citoquina durante una prueba de ejercicio explosivo en el cicloergómetro.

(8) Valorar los efectos del entrenamiento de fuerza y resistencia con ayuda de vibraciones en el estrés oxidativo/nitrosativo y la respuesta inflamatoria en personas previamente no entrenadas.

(9) Estimar los posibles efectos de citrulina en los parámetros oxidativos de ciclistas durante una competición.

En el cuadro No. 1 se desglosan las actividades desarrolladas por objetivos de la investigación.

HIPÓTESIS

La presente investigación propone la siguiente hipótesis de trabajo: La magnitud del estrés oxidativo inducido por ejercicio depende de la carga de esfuerzo físico porque cuanto mayor es la intensidad, duración y frecuencia de la carga, mayor es la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Así, cuando el ejercicio es extenuante, por ejemplo durante la competencia de ciclismo o durante una prueba repetida Wingate a 100% de la capacidad máxima, las concentraciones de metabolitos secundarios de peroxidación lipídica es mayor que cuando el ejercicio es moderado en un programa de entrenamiento de fuerza y resistencia a 60% de la capacidad máxima.

En esta investigación se pretende comprobar que la respuesta de citoquinas pro-inflamatorias es notable en los ejercicios extenuantes y explosivos que generan fatiga y daño muscular. La respuesta de citoquinas es significativa cuando la carga física es intensa. Además, la carga física moderada, acumulada en un programa de entrenamiento de fuerza y resistencia también genera una respuesta de citoquinas pro-inflamatorias.

En esta investigación proponemos que la defensa antioxidante endógena de ciclistas profesionales es eficiente durante el ejercicio intenso prolongado. Debemos suponer en estos casos que no ocurren modificaciones en el estado redox ni en las concentraciones de glutatión reducido y oxidado en los hematíes debido a que existe una fina regulación de la homeostasis de glutatión en atletas. Se espera que la competencia de ciclismo profesional durante cuatro días aumente marcadamente las actividades enzimáticas de glutatión peroxidasa y reductasa.

En este estudio proponemos que el ejercicio intenso prolongado favorece la estimulación noradrenérgica de la pineal y por lo tanto, eleva las concentraciones de melatonina en plasma y su metabolito sulfatoximelatonina en orina. Así, debe haber una marcada elevación matutina de la concentración sanguínea de melatonina durante la competencia de ciclismo profesional, la cual tiene una duración de cuatro días. En cambio, esta elevación no debe ser tan evidente durante una prueba de ejercicio extenuante de corta duración, como es la repetición en tres ocasiones consecutivas de la prueba Wingate.

La investigación postula también que las personas entrenadas en ciclismo tienen adecuada tolerancia a la glucosa y su perfil lipídico denota bajo riesgo de enfermedad cardiovascular. Propone demostrar que después de una competencia de ciclismo de cuatro días, ocurren elevaciones en las concentraciones sanguíneas de transaminasas, creatina kinasa, mioglobina y lactato deshidrogenasa. A diferencia del ejercicio extenuante realizado en la competencia de ciclistas entrenados, proponemos menores cambios en los indicadores de daño muscular en estudiantes previamente no entrenados durante su participación en un programa de entrenamiento de fuerza y resistencia de carga moderada.

El presente estudio postula que la alcalinización provocada por la administración oral de bicarbonato de sodio no modifica el grado de peroxidación lipídica inducido por un ejercicio intenso y explosivo durante la repetición de la prueba Wingate. Además, el estudio plantea que es posible que la alcalinización inducida incremente menos las concentraciones sanguíneas de citoquinas pro-inflamatorias durante la prueba. En el caso contrario, es decir, de no comprobarse el menor incremento de las citoquinas en la alcalosis provocada durante el ejercicio explosivo, posiblemente se debe a la falta oportuna de la corrección de la acidosis intracelular generada por el sprint.

Esta investigación postula que el entrenamiento con ayuda de vibraciones no ofrece una reducción adicional sobre los parámetros de estrés oxidativo ni tampoco sobre la respuesta de citoquinas al entrenamiento de fuerza y resistencia convencional. En este estudio se investiga también la posible influencia del malato de citrulina exógeno en los parámetros oxidativos y nitrosativos durante la competencia de ciclismo amateur. Proponemos que la suplementación con malato de citrulina antes y durante cada etapa de una competencia ciclista, no evita el aumento de la peroxidación lipídica y la formación de nitritos plasmáticos ocasionada por el ejercicio intenso.

Paso a enumerar las hipótesis de trabajo de la investigación:

1.La magnitud del estrés oxidativo inducido por ejercicio depende de la carga de esfuerzo físico. De esta manera, cuando el ejercicio es extenuante, por ejemplo durante la competencia de ciclismo y durante una prueba repetida Wingate, las concentraciones de metabolitos secundarios de peroxidación lipídica se elevan. En cambio, el ejercicio moderado de un programa de entrenamiento de fuerza y resistencia disminuye la peroxidación lipídica en reposo.

2.La respuesta de citoquinas pro-inflamatorias es notable en los ejercicios extenuantes y explosivos que generan fatiga y daño muscular. La intensidad de la respuesta de citoquinas debe ser mayor cuanto mayor es la carga física acumulada. Si la carga física es moderada y dosificada a través de un programa de entrenamiento de fuerza y resistencia, por acumulación también debe generar una respuesta de citoquinas pro-inflamatorias.

3.La defensa antioxidante endógena es eficiente durante el ejercicio intenso y prolongado en ciclistas profesionales. En estos casos no ocurren modificaciones en el estado redox ni en las concentraciones de glutatión reducido y oxidado en los hematíes debido a que existe una fina regulación de la homeostasis de glutatión en atletas. En apoyo a esta regulación, se esperan aumentos marcados en las actividades de glutatión peroxidasa y reductasa.

4.Ocurre marcada elevación matinal de la concentración sanguínea de melatonina durante la competencia de ciclismo de cuatro días. Esta elevación no es tan evidente durante una prueba de ejercicio extenuante de corta duración, como es la repetición en tres ocasiones consecutivas de la prueba Wingate.

5.Las personas entrenadas en ciclismo tienen adecuada tolerancia a la glucosa y un perfil lipídico que denota bajo riesgo de enfermedad cardiovascular. Se espera que los

estudiantes universitarios previamente no entrenados y expuestos a un programa de entrenamiento de fuerza y resistencia de ocho semanas de duración tengan parámetros metabólicos similares.

6.Después de las competencias de ciclismo se elevan las concentraciones sanguíneas de transaminasas, creatina kinasa, mioglobina y lactato deshidrogenasa. Estas elevaciones pueden notarse también después de cada etapa de la competición de ciclismo amateur. A diferencia de estas competiciones realizadas por sujetos entrenados expuestos a ejercicio extenuante, se esperan cambios menores en los indicadores de daño muscular de estudiantes previamente no entrenados durante su entrenamiento de fuerza y resistencia de carga moderada.

7.La alcalinización provocada por el bicarbonato de sodio ingerido, no modifica el grado de peroxidación lipídica inducido por el ejercicio explosivo durante la repetición de la prueba Wingate. Es posible que esta alcalinización incremente menos las concentraciones sanguíneas de citoquinas pro-inflamatorias durante la prueba.

8.La acidosis generada durante la prueba Wingate se correlaciona directamente con la producción de citoquinas pro-inflamatorias.

9.Las vibraciones no ofrecen una reducción adicional sobre los parámetros de estrés oxidativo ni tampoco sobre la respuesta de citoquinas durante el entrenamiento de fuerza y resistencia.

10.La suplementación con malato de citrulina antes y durante cada etapa de la competición de ciclismo amateur no evita la peroxidación lipídica ni la formación de nitritos plasmáticos ocasionada por el ejercicio intenso.

METODOLOGÍA

A. Descripción de los estudios realizados.

A.1. Del estudio observacional de estrés oxidativo, defensa primaria antioxidante, perfil metabólico, daño muscular, respuesta de citoquinas, melatonina plasmática y su metabolito en orina durante cuatro días de competición de ciclismo profesional (Vuelta Andalucía 2008).

Seis hombres sanos y entrenados, adultos jóvenes (media de la edad \pm DE, 24.8 ± 1.2 años) fueron reclutados a participar en el estudio durante la competencia de la Vuelta Ciclista de Andalucía 2008. Todos los sujetos eran no fumadores y practicaban 6-8 horas diarias de ejercicio regular, principalmente bicicleta y entrenamiento de resistencia. La distancia total del recorrido analizado fue 647.6 km, distribuido de la siguiente manera: el primer día (123.4 km, altitud máxima 600 m), segundo día (176.2 km, altitud máxima 1800 m), tercer día (174.5 km, altitud máxima 1250 m) y el cuarto día (173.0 km, altitud máxima 800 m). Las temperaturas ambientales oscilaron entre 6°C y 20°C. La competición ciclista típicamente se caracterizó por una combinación variada de actividades de fuerza-resistencia y episodios explosivos. La carga de trabajo usualmente acumulaba fuerza y potencia submáxima y máxima.

La sangre de los ciclistas se extrajo de la vena antecubital a las 18 horas el día anterior a la competencia (antes de la última comida del día) y luego cuatro días después, también a las 18 horas (el último día de la competencia) para el análisis de bioquímica general, peroxidación lipídica en plasma, determinación de glutatión oxidado y reducido en hematíes, determinación de la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa y reductasa en hematíes y citoquinas plasmáticas. A las 6 horas del primer y último día de la competencia se recogió muestra de sangre y orina para la determinación respectiva de melatonina y 6-sulfatoximelatonina. El análisis de la bioquímica general se realizó en el Hospital de la Universidad de Granada para la medición de glicemia, creatinina, urea, ácido úrico, electrolitos, transaminasas, creatina kinasa, mioglobina, lactato deshidrogenasa y perfil lipídico. El análisis de estrés oxidativo y defensa antioxidante endógena lo realicé en el Laboratorio de Radicales Libres del Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada.

A.2. Del estudio experimental de alcalinización inducida, peroxidación lipídica, respuesta de citoquina y melatonina plasmática en ciclistas profesionales durante repetición de prueba Wingate.

Diez hombres sanos, adultos jóvenes (media de la edad, 20 años; rango, 15 – 29 años) voluntariamente participaron en el estudio. Todos los sujetos eran no fumadores y realizaban 6 – 8 horas diarias de ejercicio regular, mayormente ciclismo, carrera y entrenamientos de resistencia. Antes de la inclusión en el estudio, los sujetos fueron completamente notificados de la naturaleza y posibles riesgos del estudio y aceptaron el consentimiento informado.

Definición de los grupos de estudio:

1. Primer día:

- 1.1. Grupo experimental: Cinco sujetos aleatoriamente seleccionados reciben bicarbonato de sodio vía oral.
- 1.2. Grupo control: Los otros cinco sujetos de la muestra reciben placebo vía oral.

2. Segundo día:

- 2.1. Grupo experimental: Los cinco sujetos del grupo control del primer día, recibiendo esta vez bicarbonato de sodio vía oral.
- 2.2. Grupo control: Los cinco sujetos del grupo experimental del primer día, recibiendo esta vez placebo vía oral.

Los sujetos acudieron al laboratorio de Fisiología del ejercicio para la realización de tres pruebas consecutivas de Wingate durante dos días seguidos. El intervalo de tiempo entre las pruebas fue 20 minutos. Cada día se midió inicialmente las características físicas de los sujetos. Después se extrajo muestras de sangre para las determinaciones basales y luego fueron familiarizados con las actividades explosivas de las pruebas Wingate. Los sujetos fueron instruidos para evitar ejercicio físico intenso, bebidas alcohólicas y café las 24 horas antes de la visita al laboratorio. Previo a la realización de las tres pruebas consecutivas Wingate, cada día los sujetos ingirieron de acuerdo a los grupos aleatorios a los que pertenecían, ya sea bicarbonato de sodio (condición de alcalinización inducida) o placebo. El diseño experimental se realizó de manera cruzada durante los dos días. Los sujetos acudieron al laboratorio 3 horas antes de iniciar la prueba. Primeramente, los sujetos ingirieron el bicarbonato de sodio o su equivalente a una dosis total de 0.3 g / kg masa corporal. La dosis fue repartida en 30 cápsulas, las cuales fueron ingeridas con agua a libre demanda. Las condiciones experimentales eran desconocidas por los sujetos y los evaluadores (método doble ciego).

Después de 90 minutos de la ingestión de bicarbonato o placebo, los sujetos realizaron las pruebas Wingate, con 20 minutos de separación entre las mismas. Todos los ejercicios fueron realizados en el cicloergómetro (POWERMAX-VII, Combi, Tokyo, Japón). La duración y carga fueron ajustadas en un programa software, que también calculaba las rpm pico (Rpmpeak) para un ejercicio dado. El registro de tiempo de las series de cada actividad explosiva fue medido en rpm a una frecuencia de 10 Hz. Los pies de los sujetos fueron amarrados a los pedales para evitar el deslizamiento. La altura de la silla se ajustó de tal manera que permitiera una ligera curvatura a nivel de la rodilla cuando el pedal se encontraba en su posición más inferior.

La concentración plasmática de hidrogeniones y las presiones parciales de los gases fueron analizadas de la sangre extraída de los pulpejos mediante tubos capilares. El analizador de gases sanguíneos (i-STAT, i-STAT Corporation, Abbott Park, IL, USA) fue usado para medir la presión parcial de oxígeno (PO₂), el pH sanguíneo y la concentración plasmática de H⁺. El analizador de gas sanguíneo fue calibrado mediante líquido conocido de calibración (pH: 7.45, PCO₂: 30 torr, PO₂: 160 torr) antes de cada prueba. Se extrajo muestra de sangre venosa basal de antebrazo, una hora antes de la ingesta de bicarbonato de sodio o placebo. Luego se extrajo muestra sanguínea en dos

ocasiones más cada día para la determinación de peroxidación lipídica y citoquinas (antes y después de la prueba Wingate, o sea pre y post test). Enfatizando, la primera muestra representó el estado basal. La segunda y tercera muestras representaron respectivamente las determinaciones pre-test y post-test del primer día. La cuarta y quinta muestras representaron respectivamente las determinaciones pre-test y post-test del segundo día. También se extrajo muestra de sangre a las 9 horas del día (antes de las pruebas Wingate) y a las 12 horas del día (después de las pruebas Wingate) en condiciones de luz artificial, ambas el primer día, para la determinación de melatonina en plasma. En todos los casos, las muestras se almacenaron a -80°C.

A.3. Del estudio experimental de estrés oxidativo, daño muscular, perfil metabólico y respuesta de citoquina en estudiantes universitarios durante entrenamiento de fuerza/resistencia con ayuda de plataforma vibratoria.

Veintinueve estudiantes sanos de segundo año de la Facultad de Ciencias de la Actividad Física y Deporte de la Universidad de Granada voluntariamente fueron reclutados para participar en el estudio. Los sujetos fueron completamente notificados de la naturaleza del estudio y dieron su consentimiento informado.

Definición de los dos grupos de estudio:

- Grupo WBV (Entrenamiento convencional de fuerza y resistencia con modificaciones de los parámetros vibratorios): dos sesiones semanales. Participaron catorce sujetos (trece hombres y una mujer). Los rangos de los parámetros vibratorios utilizados fueron los siguientes: a) Frecuencia 24 – 30 Hz, b) Amplitud 2-4 mm y c) Duración 4-14 min.
- Grupo ECF (Entrenamiento convencional de fuerza y resistencia sin modificaciones de los parámetros vibratorios): dos sesiones semanales. Participaron quince sujetos (doce hombres y tres mujeres).

La metodología del entrenamiento se basó en los principios básicos: (1) Principio del estímulo eficaz de carga, (2) Principio de la progresión, (3) Principio de relación óptima entre la carga y la recuperación, (4) Principio de repetición y continuidad, (5) Principio de la individualidad, (6) Principio de desarrollo multilateral y (7) Principio de periodización. Se combinaron los ejercicios físicos de fuerza y resistencia con características energéticas de los ejercicios cíclicos anaeróbicos y aeróbicos, en su mayoría a cargas moderadas acumuladas.

Una vez divididos los sujetos en dos grupos aleatorios, a ambos se les aplicó un entrenamiento que combina el entrenamiento con vibración (Whole-Body-Vibration, WBV) como pre-fatiga, con un entrenamiento convencional de fuerza (ECF), realizando en una de las dos sesiones semanales, un entrenamiento de contraste o búlgaro para la mejora de la fuerza máxima y explosiva. Al otro día se les aplicará un entrenamiento de resistencia a la fuerza.

La diferencia entre ambos grupos de estudio es que el grupo WBV recibió el entrenamiento con modificaciones en los parámetros vibratorios a lo largo de las 8 semanas. Al grupo ECF no se modificaron los parámetros vibratorios pre-fatiga durante las 8 semanas. Ambos grupos realizaron el entrenamiento con vibración en el laboratorio de fisiología del ejercicio. Una vez terminado y sin descanso intermedio, procedieron a la sala de musculación para realizar el entrenamiento convencional de fuerza.

Todos los sujetos fueron inicialmente evaluados a través de mediciones antropométricas, fuerza muscular en la máquina isocinética Gymnax Iso-2, talla, pruebas de contramovimiento usando el dispositivo Ergo Jump Plus-Bosco System (Biomedic SCP), tolerancia a la fatiga en la prueba CMJ30", el test de una repetición máxima (1-RM), percepción de esfuerzo y análisis de sangre. Todas las mediciones fueron nuevamente realizadas en la quinta semana y una semana después de completado el entrenamiento.

El estudio utilizó un diseño experimental, doble ciego, controlado, en el cual los sujetos fueron aleatoriamente distribuidos en dos grupos para el entrenamiento de fuerza y resistencia, uno a parámetros constantes (ECF) y otro a parámetros crecientes de vibración (WBV).

La sangre fue recogida de una vena del antebrazo en tres momentos: antes, durante (quinta semana) y después del entrenamiento (novena semana), para la determinación analítica de bioquímica general, enzimas musculares, peroxidación lipídica plasmática, nitritos, citoquinas y contenido de glutatión en hemáties. El análisis bioquímico fue realizado en Laboratorio del Hospital de la Universidad de Granada. Las determinaciones de estrés oxidativo e inflamación las realicé en el Laboratorio de Radicales Libres del Instituto de Biotecnología del Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada.

A.4. Del estudio pre-experimental de respuesta de citoquinas y cortisol durante una prueba de fatiga muscular en luchadores y jugadores de balonmano.

Catorce varones sanos fueron reclutados a participar voluntariamente en el estudio (media de edad +/- DE, 23.5 +/- 4.8 años), nueve de los cuales eran luchadores y cinco jugadores de balonmano. Todos asistían a un programa regular de entrenamiento de fuerza y resistencia en la Facultad de Ciencias de la Actividad Física y Deporte de la Universidad de Granada, completando diariamente entre 3-5 horas de ejercicios explosivos, levantamiento de pesas, carrera, natación, lucha y balonmano.

Se extrajo sangre venosa del antebrazo el día previo a la prueba de fatiga (pre-test) y una hora después de haber realizado todos los ejercicios de la prueba (post-test). La prueba de fatiga consistió en la realización de series alternas de quince repeticiones máximas de prensa de banca y squats hasta evidenciar en el potenciómetro, la meseta de la potencia máxima. La sangre extraída se utilizó para la determinación de citoquinas y cortisol.

A.5. Del estudio pre-experimental de estrés oxidativo, respuesta de cortisol y citoquina en ciclistas amateurs que ingirieron malato de citrulina durante los primeros tres días de competencia.

Cinco sujetos sanos, varones jóvenes (media de edad +/- desviación estándar, 20 +/- 1.2 años) voluntariamente participaron en el estudio, durante la competencia de ciclismo amateurs en la Vuelta al Bidasoa 2008. La competencia tuvo un recorrido total de 460.5 km repartido en 4 días así: 123,2 km el primer día; 128,0 km el segundo día; 99,6 km el tercer día y 109,7 km el cuarto día. Treinta minutos antes de cada etapa ingirieron 4 g de malato de citrulina (Stimol ®) disuelto en zumo de fruta, luego 2 g en la mitad de la competencia de cada etapa y 2 g adicionales inmediatamente al finalizar cada etapa. En los primeros tres días de competencia se extrajo sangre de vena de antebrazo una hora antes de ingerir la primera dosis de citrulina (a las 7 horas del día) y una hora después de ingerir la última dosis de citrulina del día, para la determinación de bioquímica general, cortisol, nitritos y malonaldehído en plasma. También se determinaron las concentraciones plasmáticas de citoquinas antes y después de la competencia.

B. Técnicas y procedimientos empleados.

Las mediciones y técnicas que empleé fueron las siguientes: (a) Determinación de metabolitos secundarios (malonaldehído y 4-hidroxi-alquenos) de la peroxidación lipídica en plasma por espectrofotometría (Esterbauer y Cheeseman, 1990). (b) Determinación de citoquinas plasmáticas: interleuquina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e interleuquina-1 β (IL-1 β) por fluorimetría (LINCOplex kit). (c) Determinación de nitritos y nitratos plasmáticos por espectrofotometría (Green et al, 1981). (d) Determinación de las actividades de glutatión peroxidasa y reductasa en hematíes por fluorimetría ultravioleta (Griffith et al 1999). (e) Medición del contenido de glutatión reducido y oxidado en hematíes por fluorescencia (Hissin y Hilf, 1976). (f) Medición de melatonina en plasma mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y su metabolito en orina (sulfato de melatonina) mediante el kit comercial ELISA IBL Hamburg. (g) Determinación de la bioquímica general en sangre: glucosa, creatinina, urea, ácido úrico, electrolitos, transaminasas, lactato deshidrogenasa, creatina kinasa, mioglobina, colesterol total, triglicéridos, HDL-colest, LDL-colest, cortisol; gasometría y lactato en sangre capilar.

Los procedimientos utilizados en cada técnica fueron los siguientes:

1. Determinación de malonaldehído y 4-hidroxi-alquenos en plasma.

Se utilizó el kit comercial Bioxytech LPO 568 (Oxis Research, Portland, OR, USA) que estimó la concentración de malonaldehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenal (4-HDA) en plasma. Las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 5 minutos. Luego se añadió 200 μ l del sobrenadante a 650 μ l del reactivo Aldrich diluido (N-metil-2-

fenilindol en acetonitrilo diluido 3:1 en metanol). Luego se añadió 150 µl de ácido metansulfónico y fue incubada la reacción a 45°C durante 40 minutos. La reacción se detuvo en frío y pasó a centrifugarse a 3500 rpm durante 10 minutos. Simultáneamente se preparó una curva estándar de siete puntos. La peroxidación lipídica fue determinada mediante la reacción de fenilindol, MDA y 4-HDA, la cual produce un cromóforo detectable mediante espectrofotometría a 586 nm (Estebauer and Cheeseman, 1990). Los niveles fueron expresados en nmol/ml.

2. Determinación de nitritos y nitratos plasmáticos.

Las muestras plasmáticas fueron desproteinizadas con ácido sulfosalicílico frío 6%, incubándose a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego centrifugado a 10,000 g durante 15 min. Luego 50 µl de sobrenadante fue incubado con 4 µl de NaOH 1.25%, 36 µl de solución fosfato amortiguadora 14 mM que contenía 50 mU de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, 750 µM de glucosa 6-fosfato, 30 mU de nitrato reductasa y 10 µl de NADPH 3 µM durante 60 minutos a temperatura ambiente. El nitrito es medido con la reacción Griess (Green et al, 1981), el cual convierte el nitrito en un compuesto azo que puede ser detectado espectrofotométricamente a 550 nm. Los reactivos Griess son naftietilendiamina 0.1% y sulfanilamida 1%. Los niveles fueron expresados en nmol/ml.

3. Determinación de citoquinas en plasma.

Se utilizó el kit LINCOPlex (Linco Research) para medir la concentración de tres citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF- α). El ensayo fue realizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, 50 µl de la solución de trabajo que contiene las microesferas ligadas a cada uno de los anticuerpos específicos contra las citoquinas mencionadas fue vertido a cada pocillo, luego lavado dos veces con 200 µl de solución buffer de lavado Linco-Plex y filtrado hasta la sequedad. Luego 25 µl de alícuotas de plasma diluidas 1:4 con los diluyentes específicos de muestra Linco-Plex fueron añadidos a cada pocillo e incubados durante 60 min a temperatura ambiente.

Luego de dos lavados con 200 µl de solución buffer de lavado Linco-Plex, las microcápsulas fueron incubadas con 25 µl de una solución con anticuerpo de detección durante 30 minutos a temperatura ambiente, cada anticuerpo específico a una citoquina. Después de otros dos lavados, las microesferas se incubaron con 25 µl de solución estreptavidina-ficoeritrina durante 30 minutos a temperatura ambiente y se procedió con dos lavados más. Las microesferas se resuspendieron en cada pocillo con 100 µl de tampón de lectura (Sheath fluid Linco-Plex) y se determinó la concentración de cada citoquina mediante un lector fluorimétrico (BioPlex Analyzer, BioRad, Madrid, España). Paralelamente se construyó una curva estándar para cada citoquina. Los niveles fueron expresados en pg/ml.

4. Determinación del contenido de glutatión reducido y oxidado en hematíes.

Los hematíes fueron hemolizados en buffer fosfato (10 mM fosfato sódico, 1 mM EDTA-Na₂, pH 6.25). Luego se desproteinizó con ácido tricarbóxico 10% frío y centrifugado a 20,000 g durante 15 min. Para la medición de glutatión reducido, 10 µl de sobrenadante fue incubado con 10 µl de solución optaldehído-etanol (1 mg/ml) y 180 µl de buffer fosfato (100 mM fosfato sódico, 5 mM EDTA-Na₂, pH 8.0) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se midió la fluorescencia de las muestras a 350 nm de excitación y 420 nm de emisión en un lector de fluorimetría (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, USA). Para la medición de glutatión oxidado, alícuotas de 200 µl de sobrenadante fueron pre-incubados con 80 µl de solución N-etilmaleimida (5 mg/ml en agua destilada) durante 40 minutos a temperatura ambiente y luego alcalinizado con 720 µl NaOH 0.1N. Luego alícuotas de 30 µl fueron incubadas con 10 µl de solución optaldehído y 160 µl de NaOH 0.1 N durante 25 minutos a temperatura ambiente. La fluorescencia fue luego medida en las mismas condiciones de excitación y emisión. Las concentraciones de GSH y GSSG fueron calculadas de acuerdo a curvas previamente preparadas. Los niveles fueron expresados en µmol/g de hemoglobina, para lo cual la hemoglobina fue determinada por espectrofotometría con el reactivo Drabkin.

5. Determinación de las actividades de glutatión peroxidasa y reductasa en hematíes.

Para medir la actividad de glutatión peroxidasa, 10 µl de la muestra fue agregada a 240 µl de la solución de trabajo que contiene tampón fosfato 100 mM pH 7.5, 4 mM azida sódica, 60 mM GSH, 20 mM NADPH y 0.5 U/ml glutatión reductasa. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos, la reacción inicia agregando 10 µl de hidropéroxido cuménico (0.3%). La actividad de glutatión peroxidasa fue determinada siguiendo la oxidación de NADPH durante 3 minutos a 340 nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Germany (Griffith, 1999)). Para medir la actividad de glutatión reductasa, 35 µl de la muestra fue agregado a 465 µl de la solución de trabajo que contiene también el tampón fosfato 10 mM pH 7.5 y 2.5 mM GSSG (30 mg en 20 ml de tampón fosfato). Después de la incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente, la reacción inicia agregando 8.5 µl de NADPH 12 mM. La actividad de glutatión reductasa fue determinada durante 3 minutos a 340 nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta UV-1603 Shimadzu. Ambas actividades enzimáticas fueron expresadas en µmol NADP oxidado / min / g hemoglobina.

6. Determinación de la concentración de melatonina en plasma.

La melatonina fue extraída agregando 1 ml de triclorometano a 500 µl de plasma. Esta solución es agitada durante un minuto a 1400 rpm, luego centrifugada durante un minuto a 11000 rpm. Las proteínas y el sobrenadante son eliminados. La fase acuosa es separada de la fase lipofílica con 500 µl de NaHCO₃ 50 mM pH 10.25. Estos procedimientos se repiten dos veces más. Finalmente, 500 µl de la muestra se colocan en el concentrador (SpeedVac System) durante 33 minutos (presión de vacío 5.1). Los

pellets son congelados a -80°C hasta el momento de la medición. Se resuspende el pellet con 100 μl de fosfato sódico 100 mM, 0.1 mM EDTA y acetonitrilo 25%. Luego se vierte 50 μl de esta fase móvil en el tubo de HPLC. La lectura de los parámetros para el cromatógrafo líquido de alto rendimiento (Shimadzu HPLC) son: tasa de eflujo 1 ml/min, volumen de inyección 20 μl , $\text{Ex} = 285 \text{ nm}$ y $\text{Em} = 345 \text{ nm}$. El tiempo de retención es 8.9 minutos. La columna usada de HPLC fue Waters Sunfire C18 tamaño 5 μm . Los niveles de melatonina se expresaron en pg/ml.

7. Determinación de la concentración de 6-sulfatoximelatonina en orina.

Se utilizó el kit ELISA BUHLMANN 6-SMT, Suiza. Las muestras de orina se diluyeron 1:200. Después de pipetear 50 μl de la muestra diluida, se agregaron consecutivamente 50 μl conjugado M6S-Biotin y 50 μl de antisuero a los pocillos y fueron incubados durante tres horas a 4°C . Luego se lavó cuatro veces y se añadió 100 μl de enzima marcada Estreptavidina-HRP y se procedió a la incubación durante 30 minutos. Otros cuatro tiempos de lavado fueron realizados. Luego se agregó 100 μl del sustrato tetrametilbenzidina a cada pocillo e incubado durante 15 minutos. Se agregó 100 μl de ácido sulfúrico 0.25 M y la lectura de absorbancia se realizó a 450 nm. Se calcularon las concentraciones en escala logarítmica de acuerdo a la absorbancia neta (B/Bo). Los niveles fueron expresados en ng/ml.

C. Campos de trabajo.

Los sujetos participantes pertenecen a diferentes sectores del ambiente deportivo. Los seis voluntarios del estudio en la Vuelta de Andalucía 2008 son del Equipo Caja Sur. El recorrido de esta competencia se desarrolló entre Marbella, Granada y Córdoba. Las extracciones de sangre las realicé durante la competencia. Los diez voluntarios del estudio de alcalinización durante las pruebas de Wingate son ciclistas andaluces. Sus pruebas físicas y extracciones de sangre se realizaron en un Laboratorio de Fisiología del Ejercicio de la Ciudad de Granada. Los veintinueve voluntarios del estudio de entrenamiento con ayuda de la plataforma vibratoria son estudiantes de la Facultad de Ciencias de la Actividad Física y Deporte de la Universidad de Granada. Las pruebas físicas y extracciones de sangre se realizaron en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada. Los catorce voluntarios del estudio de fatiga muscular pertenecen a equipos de lucha y balonmano de la Facultad de Ciencias de la Actividad Física y Deporte de la Universidad de Granada. Las pruebas físicas se realizaron en el campus de la Facultad. Las extracciones de sangre las realicé en el Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada y también en el campus de la Facultad. Los cinco sujetos del estudio de citrulina son ciclistas amateurs que pertenecen al equipo Lizarte de Pamplona. Las extracciones de sangre las realicé durante la competencia en Irudes. Todas las muestras extraídas las transporté en cadena de frío (a -4°C) y las llevé en menos de doce horas al Instituto de Biotecnología del Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada, donde las congelé a -80°C hasta su procesamiento. Cada grupo de muestras las procesé separadamente con

una duración de hasta un mes para cada estudio. La duración del procesamiento de todas las muestras fue cinco meses.

D. Análisis de los datos.

Se utilizaron las medidas convencionales de tendencia central y dispersión de la estadística descriptiva para la presentación de los resultados y la estadística inferencial para el análisis de los datos mediante los programas GraphPad Software Inc. Versión 3.05, 32 bit para Win 95/NT y Slide Write plus para Windows Versión 7.0. Se utilizaron pruebas t para la comparación de medias de dos grupos y análisis de regresión lineal para la asociación de dos variables.

RESULTADOS

A continuación presento los resultados encontrados en esta investigación en el siguiente orden:

- A. Resultados del estudio observacional de estrés oxidativo, defensa primaria antioxidante, perfil metabólico, daño muscular, respuesta de citoquinas, melatonina plasmática y su metabolito en orina durante competición de ciclismo profesional (Vuelta Andalucía 2008).
- B. Resultados del estudio experimental de alcalinización inducida, peroxidación lipídica, respuesta de citoquina y melatonina plasmática en ciclistas profesionales durante repetición de prueba Wingate.
- C. Resultados del estudio experimental de estrés oxidativo, daño muscular, perfil metabólico y respuesta de citoquina en estudiantes universitarios durante entrenamiento de fuerza/resistencia con ayuda de plataforma vibratoria.
- D. Resultados del estudio pre-experimental de respuesta de citoquinas y cortisol durante una prueba de fatiga muscular en luchadores y jugadores de balonmano.
- E. Resultados del estudio pre-experimental de estrés oxidativo, respuesta de cortisol y citoquina en ciclistas amateurs que ingirieron malato de citrulina durante los primeros tres días de competición (Vuelta Bidasoa 2008).

A. Resultados del estudio observacional del estrés oxidativo, defensa primaria antioxidante, perfil metabólico, daño muscular, respuesta de citoquinas, melatonina plasmática y su metabolito en orina durante competición de ciclismo profesional (Vuelta Andalucía 2008).

A.1. Análisis bioquímico: perfil metabólico y daño muscular (Cuadro No. 5).

Las concentraciones plasmáticas de sodio y cloruro aumentaron significativamente después de la competición ciclista de cuatro días de duración (de 126.0 ± 3.4 a 143.3 ± 3.5 mEq/L y de 89.6 ± 2.8 a 102.5 ± 2.2 mEq/L respectivamente, $p < 0.005$). La concentración de urea también aumentó significativamente (de 47.5 ± 2.3 a 61.8 ± 3.5 mg/dl, $p < 0.005$). No cambiaron los niveles de ácido úrico ni glicemia en ayuno. Hubo incrementos sustanciales en las transaminasas (GOT de 34.5 ± 6.1 a 54.6 ± 4.6 U/L, $p < 0.05$ y GPT de 23.3 ± 3.4 a 39.0 ± 2.6 U/L, $p < 0.05$) y en la mioglobina (de 63.5 ± 14.5 a 107.5 ± 11.9 ng/ml, $p < 0.05$). Los incrementos en CK y LDH no fueron significativos. El perfil lipídico demostró muy bajo riesgo cardiovascular en los sujetos. El colesterol-HDL aumentó significativamente de 58.0 ± 2.6 a 73.9 ± 2.0 mg/dl

($p < 0.0005$). Aunque no significativo, se notó un descenso en la concentración plasmática de triglicéridos.

A.2. Estrés oxidativo y defensa primaria antioxidante.

La peroxidación lipídica plasmática aumentó después de la competición ciclista de 9.86 ± 0.92 a 13.04 ± 1.36 nmol/ml ($p = 0.06$) (Figura 1). Aunque los contenidos de GSH y GSSG en hematíes no variaron significativamente (Figura 2), se notó un incremento leve en el índice redox (GSSG/GSH de 0.15 ± 0.01 a 0.17 ± 0.01) (Figura 3). En cambio, la actividad de glutatión peroxidasa aumentó significativamente de 24.95 ± 3.61 a 59.06 ± 14.11 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{gHb}$ ($p < 0.05$) (Figura 4). De igual manera, la actividad de glutatión reductasa aumentó significativamente de 2.92 ± 0.17 a 3.20 ± 0.19 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{gHb}$ ($p < 0.05$) (Figura 5). Se observó una respuesta aguda de la melatonina a los episodios de ejercicio. La melatonina plasmática aumentó después del ejercicio extenuante de 3.11 ± 0.28 a 6.33 ± 1.12 pg/ml, $p < 0.05$) (Figura 6). Aunque no fue significativo, se observó un incremento en la concentración urinaria de 6-sulfatoximelatonina después de la competencia ciclista de 10.51 ± 2.24 a 13.03 ± 2.74 ng/ml (Figura 7).

A.3. Respuesta de citoquinas al ejercicio intenso prolongado.

IL-6 y TNF- α se elevaron significativamente después del ejercicio intenso y prolongado (de 0.92 ± 0.28 a 2.92 ± 0.57 pg/ml y de 5.14 ± 1.98 a 11.87 ± 2.43 pg/ml respectivamente, $p < 0.05$). IL-1 β no se incrementó significativamente (de 1.44 ± 0.90 a 3.04 ± 0.93 pg/ml) (Figura 8).

B. Resultados del estudio experimental de alcalinización inducida, peroxidación lipídica, respuesta de citoquina y melatonina plasmática en ciclistas profesionales durante repetición de prueba Wingate.

B.1. Peroxidación lipídica en plasma.

En ambos días se demostraron en el grupo bicarbonato y en el grupo placebo, incrementos en la peroxidación lipídica después de tres pruebas Wingate consecutivas. En el primer día, la peroxidación lipídica aumentó en el grupo placebo de 8.02 ± 1.04 a 11.15 ± 1.46 nmol/ml y en el grupo bicarbonato de 12.02 ± 1.28 a 15.33 ± 1.36 nmol/ml. En el segundo día, la peroxidación lipídica aumentó significativamente en el grupo placebo, de 9.23 ± 0.82 a 13.63 ± 1.19 nmol/ml ($p < 0.05$). Aunque no significativo, el incremento de la peroxidación lipídica también fue detectado el segundo día en el grupo bicarbonato, de 8.14 ± 0.82 a 11.32 ± 1.02 nmol/ml (Figura 9).

B.2. Respuesta de citoquinas el ejercicio intenso agudo.

- IL-6:

Todos los sujetos de ambos grupos tuvieron niveles plasmáticos de IL-6 por encima de los límites usuales respecto a personas no entrenadas antes de iniciar las pruebas, lo cual es reflejo del entrenamiento intenso en el que estaban sometidos los sujetos inmediatamente antes del estudio (para los grupos placebo y bicarbonato resultó respectivamente 19.68 ± 3.63 y 16.94 ± 2.72 pg/ml). En ambos grupos, IL-6 aumentó después de las pruebas Wingate del primer día así: de 18.82 ± 3.10 a 26.7 ± 3.42 y de 17.76 ± 2.51 a 22.98 ± 2.63 pg/ml en los grupos placebo y bicarbonato respectivamente (Figura 10). Otra vez, la elevación de IL-6 fue significativa en el segundo día en el grupo placebo (de 22.74 ± 1.35 a 31.52 ± 1.45 pg/ml, $p < 0.05$). Aunque no significativa, el incremento de IL-6 también fue observado el segundo día en el grupo bicarbonato (de 31.58 ± 3.43 a 37.14 ± 3.36 pg/ml) (Figura 11).

- TNF- α :

A diferencia de lo que fue observado en el nivel basal de IL-6, el nivel basal de TNF- α fue normal en los dos grupos (placebo y bicarbonato, 4.46 ± 1.60 y 3.35 ± 0.97 pg/ml respectivamente). En ambos grupos se elevó TNF- α después de las pruebas Wingate en el primer día (de 4.35 ± 1.71 a 8.85 ± 2.05 y de 4.22 ± 1.37 a 7.35 ± 2.35 pg/ml, respectivamente) (Figura 12). Una vez más, una elevación significativa de TNF- α fue observada el segundo día en el grupo placebo (de 3.21 ± 0.98 a 6.97 ± 1.14 pg/ml, $p < 0.05$). TNF- α se elevó de manera no significativa el segundo día en el grupo bicarbonato, de 4.52 ± 1.03 a 7.65 ± 1.54 pg/ml (Figura 13).

- IL-1 β :

Las concentraciones basales de IL-1 β se encontraron dentro de los límites bajos normales (respectivamente en los grupos placebo y bicarbonato (0.80 ± 0.22 y 0.83 ± 0.22 pg/ml). En ambos grupos, las tres pruebas Wingate consecutivas cada día elevaron el nivel plasmático de IL-1 β . Para el primer día, la elevación resultó respectivamente para el grupo placebo y el grupo bicarbonato así: de 0.98 ± 0.23 a 1.66 ± 0.31 y de 1.29 ± 0.50 a 1.72 ± 0.18 pg/ml (Figura 14). En el segundo día, también hubo elevación significativa ($p < 0.05$) en el grupo placebo, de 0.62 ± 0.19 a 1.87 ± 0.33 pg/ml. Sin embargo, la elevación de IL-1 β en el grupo bicarbonato no fue significativa (de 0.69 ± 0.22 a 1.93 ± 0.66 pg/ml) (Figura 15).

B.3. Asociación encontrada entre las concentraciones plasmáticas de hidrogeniones e interleucina-6.

Mediante el modelo de regresión lineal se observó una asociación muy significativa ($p < 0.0001$, $r = 0.9567$, r cuadrado = 0.9154) entre las concentraciones plasmáticas de hidrogeniones e IL-6 durante el estado acidótico de las pruebas Wingate y después de las mismas. La ecuación estimada fue $y = -5.76 + 0.45 \cdot x$ (Figura 16).

B.4. Determinación de melatonina en plasma.

Aunque de manera no significativa, se observó en la muestra total de los diez sujetos un incremento en el nivel plasmático matutino de melatonina después de las tres pruebas Wingate consecutivas (de 2.06 ± 0.33 a 2.53 ± 0.40 pg/ml) (Figura 17).

C. Resultados del estudio experimental de estrés oxidativo, daño muscular, perfil metabólico y respuesta de citoquina durante entrenamiento de fuerza/resistencia con ayuda de plataforma vibratoria en estudiantes universitarios.

C.1. Análisis bioquímico: Perfil metabólico y daño muscular. Cuadro No. 6.

Hubo un descenso significativo de la glicemia en el grupo ECF (de 93.0 a 78.1 mg/dl, $p < 0.005$). Aunque no significativo, también hubo un descenso de la glicemia en el grupo WBV (de 94.7 a 84.7 mg/dl). Estos resultados sugieren que ocho semanas de entrenamiento de fuerza y resistencia mejoran la resistencia a la insulina y la captación celular de glucosa. No hubo variaciones en los niveles plasmáticos de urea, creatinina ni ácido úrico. Es posible que ocurriera redistribución compartamental de líquidos durante el entrenamiento, como lo evidencian las elevaciones en las concentraciones plasmáticas de sodio y cloruro en la quinta semana y sus descensos después del entrenamiento. La hemodilución relativa que finalmente ocurre se debe principalmente al aumento adaptativo en el volumen plasmático inducido por el entrenamiento. El perfil lipídico mostró un bajo riesgo cardiovascular en ambos grupos.

Hubo un aumento no significativo de creatina kinasa en plasma en el grupo ECF, el cual no resultó en el grupo WBV (de 288.7 a 385.5 y de 233.7 a 238.2 U/L respectivamente). Los niveles disminuyeron en ambos grupos después del entrenamiento. Aunque no hubo cambios en los niveles plasmáticos de la mioglobina, lactato deshidrogenasa ni transaminasas, el análisis de regresión lineal indicó que la concentración plasmática de mioglobina está directamente relacionada con la concentración plasmática de creatina kinasa ($r = 0.6758$, $p < 0.0001$). Se propone la siguiente ecuación para la relación mencionada: $y = 24.508 + 0.06123x$. (Figura 18).

Estos resultados indicaron que no hubo daño muscular sustancial asociado al entrenamiento, pero es posible que la vibración ayude a mantener la integridad funcional muscular, tal como lo sugirió el menor incremento de creatina kinasa en el grupo WBV que recibió entrenamiento con modificaciones de la plataforma vibratoria.

C.2. Estrés oxidativo y nitrosativo.

En relación con los marcadores de estrés, se encontraron en ambos grupos, elevaciones plasmáticas en estado de reposo de los metabolitos de peroxidación lipídica y también las concentraciones plasmáticas de nitritos en la quinta semana de entrenamiento. En el grupo ECF, la peroxidación lipídica aumentó de 7.67 a 9.34 nmol/l y en el grupo WBV, de 8.56 a 9.59 nmol/L. En cambio, se detectaron descensos de la peroxidación lipídica en reposo en ambos grupos después de las ocho semanas de entrenamiento (7.33 y 6.29 nmol/l respectivamente), siendo significativo el descenso solamente en el grupo WBV (Figura 19).

Los nitritos plasmáticos en reposo aumentaron significativamente de 24.01 a 28.33 nmol/l en la quinta semana ($p < 0.005$) y luego disminuyeron a 22.26 nmol/l después del entrenamiento ($p < 0.0005$). El mismo patrón fue observado por separado en ambos grupos entrenados (Figura 20).

C.3. Respuesta de citoquinas al entrenamiento.

IL-6, TNF- α e IL-1 β fueron medidas en reposo para conocer la respuesta de citoquinas al entrenamiento de fuerza y resistencia. Se observaron incrementos progresivos de las concentraciones plasmáticas de las tres citoquinas en ambos grupos durante el entrenamiento. En el grupo ECF, IL-6 aumentó de 24.03 a 29.53 pg/ml en la quinta semana y a 36.70 pg/ml en la novena semana. De manera significativa, en el grupo WBV hubo menor concentración de IL-6 antes de entrenamiento (10.32 pg/ml); sin embargo, en este grupo también hubo incremento de IL-6 durante la quinta y novena semana, aunque en menor magnitud (respectivamente 12.42 y 12.57 pg/ml). Figura 21.

Las concentraciones plasmáticas de TNF- α e IL-1 β significativamente aumentaron durante el entrenamiento. Las concentraciones de TNF- α duplicaron en la quinta semana y quintuplicaron en la novena semana en el grupo ECF. Incrementos similares ocurrieron en el grupo WBV. En términos generales, pude observar una marcada respuesta pro-inflamatoria de citoquinas en el grupo ECF, aunque no tan marcada en el grupo WBV, tal como se evidenció el incremento de TNF- α en ambos grupos (Figura 22). En cambio, la elevación de IL-1 β solamente fue significativa en el grupo ECF ($p < 0.005$). Figura 23.

D. Resultados del estudio pre-experimental de la respuesta de citoquinas y cortisol durante una prueba de fatiga muscular en luchadores y jugadores de balonmano.

D.1. Respuesta de citoquinas. Figuras 24, 25 y 26.

Hubo un incremento significativo de las concentraciones sanguíneas de IL-6, TNF- α e IL-1 β en luchadores y jugadores de balonmano después de la prueba de fatiga muscular ocasionado por el levantamiento repetido de pesas. En luchadores, el incremento de IL-6, TNF- α e IL-1 β ocurrió así respectivamente: de 4.63 ± 1.25 a 19.03 ± 6.26 pg/ml ($p < 0.05$), de 2.34 ± 0.44 a 26.03 ± 4.53 pg/ml ($p < 0.0005$) y de 0.34 ± 0.08 a 2.76 ± 0.44 pg/ml ($p < 0.0005$). En jugadores de balonmano, el incremento de IL-6, TNF- α e IL-1 β ocurrió así respectivamente: de 5.81 ± 1.03 a 25.86 ± 8.29 pg/ml ($p < 0.05$), de 6.86 ± 1.21 a 31.85 ± 6.00 pg/ml ($p < 0.005$) y de 0.47 ± 0.08 a 5.66 ± 0.79 pg/ml ($p < 0.0005$).

Pude apreciar en la muestra total de este estudio, que el mayor incremento de la concentración sanguínea de citoquina como consecuencia de la prueba de fatiga muscular, correspondió a IL-1 β (9x), seguido de TNF- α (6.1x) e IL-6 (3.2x). Estos incrementos fueron más acentuados en los jugadores de balonmano que en los luchadores.

D.2. Respuesta de cortisol. Figura 27.

Se compararon los niveles plasmáticos de cortisol antes y después del ejercicio físico extenuante en los luchadores (n=9) y jugadores de balonmano (n=5). Tal como mencioné con anterioridad en la metodología, el ejercicio extenuante de luchadores y jugadores de balonmano consistió en la prueba de fatiga muscular mediante las series prolongadas de repetición máxima en el squat y prensa de banca.

Sin embargo, el aumento del cortisol después de la prueba de fatiga en luchadores y jugadores de balonmano no fue significativo: respectivamente de $16.8 \pm 1.7 \mu\text{g/dl}$ a $21.1 \pm 1.6 \mu\text{g/dl}$ y de $18.8 \pm 2.2 \mu\text{g/dl}$ a $23.0 \pm 1.7 \mu\text{g/dl}$.

E. Resultados del estudio pre-experimental del perfil metabólico, daño muscular, estrés oxidativo, respuesta de cortisol y citoquina en ciclistas amateurs que ingirieron malato de citrulina durante los primeros tres días de competición (Vuelta al Bidasoa 2008).

E.1. Análisis bioquímico: perfil metabólico y daño muscular. Cuadro No. 7.

No hubo variación en el nivel de glicemia ni en las transaminasas en cada etapa ni en el transcurso de la competencia. Se observó un incremento de lactato deshidrogenasa, especialmente en la primera etapa, de 222.0 ± 21.6 a 314.0 ± 25.4 U/L ($p < 0.05$). Hubo un aumento significativo de la creatina kinasa al finalizar la competencia: de 94.4 ± 17.1 U/L al inicio de la competencia se elevó a 186.2 ± 25.7 U/L al final de la misma ($p < 0.05$). Hubo incrementos significativos de mioglobina sérica en cada etapa: etapa uno, de 29.0 ± 2.7 a 92.0 ± 12.8 U/L ($p < 0.005$); etapa dos, de 41.2 ± 3.5 a 109.0 ± 20.1 U/L ($p < 0.05$) y etapa tres, de 39.4 ± 3.8 a 86.2 ± 16.8 U/L ($p < 0.05$). No hubo variaciones en el perfil lipídico de colesterol total, triglicérido ni colesterol-HDL.

E.2. Estrés oxidativo: peroxidación lipídica y formación de nitritos plasmáticos. Figuras 28 y 29.

Los niveles plasmáticos de malonaldehído y 4-hidroxi-alquenos se elevaron diariamente después de cada etapa de la competencia ciclista: en el primer día de 3.7 ± 0.32 a 7.58 ± 4.08 nmol/ml ($p = 0.057$), en el segundo día de 4.02 ± 0.74 a 8.12 ± 1.44 nmol/ml ($p < 0.05$) y en el tercer día de 4.49 ± 0.65 a 9.07 ± 0.93 nmol/ml ($p < 0.005$). De igual manera, los niveles plasmáticos de nitritos se elevaron diariamente después de cada etapa de la competencia ciclista: en el primer día de 25.94 ± 0.96 a 36.61 ± 4.08 nmol/ml ($p < 0.05$), en el segundo día de 27.42 ± 1.36 a 37.22 ± 3.20 nmol/ml ($p < 0.05$) y en el tercer día de 27.67 ± 0.99 a 37.29 ± 1.42 nmol/ml ($p < 0.0005$).

Hubo una tendencia diaria al incremento, aunque de manera no significativa, de las concentraciones basales (antes de cada etapa) de los metabolitos de peroxidación lipídica (MDA y 4-HDA): etapa uno (3.7 ± 0.32 nmol/ml), etapa dos (4.02 ± 0.74 nmol/ml) y etapa tres (4.49 ± 0.65 nmol/ml).

El mismo fenómeno fue observado de manera no significativa en el comportamiento de la peroxidación lipídica post-ejercicio en el transcurso de las etapas: etapa uno (7.58 ± 1.72 nmol/ml), etapa dos (8.12 ± 1.44 nmol/ml) y etapa tres (9.07 ± 0.93 nmol/ml). Sin embargo, esta tendencia no fue evidente en las concentraciones basales de nitritos

plasmáticos: etapa uno (25.94 ± 0.96 nmol/ml), etapa dos (27.42 ± 1.36 nmol/ml) y etapa tres (27.67 ± 0.99 nmol/ml).

Tampoco se notó tendencia de incremento de la nitrosación post-ejercicio durante el transcurso de las etapas: etapa uno (36.61 ± 4.08 nmol/ml), etapa dos (37.22 ± 3.20 nmol/ml) y etapa tres (37.29 ± 1.42 nmol/ml).

E.3. Respuesta de citoquinas pro-inflamatorias. Figura 30.

Además, hubo incremento no significativo de las citoquinas IL-6, TNF- α e IL-1 β después de la competencia ciclista en los sujetos de estudio que ingirieron malato de citrulina. Las concentraciones de IL-6 antes y después de la competencia fueron respectivamente las siguientes: 8.72 ± 3.09 y 9.95 ± 4.06 pg/ml. Las concentraciones de TNF- α antes y después de la competencia fueron respectivamente las siguientes: 1.70 ± 1.16 y 6.46 ± 3.71 pg/ml. Las concentraciones de IL-1 β antes y después de la competencia fueron respectivamente las siguientes: 0.36 ± 0.10 y 0.40 ± 0.15 pg/ml.

E.4. Respuesta de cortisol al estrés de ejercicio extenuante. Figura 27.

El ejercicio extenuante valorado de los ciclistas amateurs fue la competición de la Vuelta al Bidasoa en los primeros tres días. Hubo aumento significativo del cortisol después de la competencia de ciclismo: de 11.1 ± 1.0 μ g/dl a 19.7 ± 1.0 μ g/dl ($p < 0.0005$).

DISCUSIÓN

A. Del estudio observacional de estrés oxidativo, defensa primaria antioxidante, perfil metabólico, daño muscular, respuesta de citoquinas, melatonina plasmática y su metabolito en orina durante competición de ciclismo profesional (Vuelta Andalucía 2008).

La diuresis disminuyó aunque de manera no significativa después de la competición (de 3.13 ± 0.22 a 2.91 ± 0.18 ml/min), lo cual sugiere la ocurrencia de pérdida relativa de agua. El descenso de la diuresis ayuda a corregir la hipertonicidad plasmática en relación con la hipernatremia y la azotemia. La elevación de urea en plasma también se puede deber a que el ejercicio prolongado indujo oxidación de proteína. Hay evidencia previa que sugiere la participación del rápido descenso en el volumen plasmático y el estrés químico por la pérdida de agua en los hematíes durante el ejercicio intenso y prolongado (Petibois, 2005).

El urato es un producto del metabolismo de purina y se ha sugerido que desempeña un rol antioxidante. El ejercicio extenuante induce un marcado incremento de urato en plasma, debido al aumento en la degradación de nucleótidos de adenina. Además, durante el ejercicio intenso, hay mayor conversión de xantina en ácido úrico debido a la xantina oxidasa que bajo la acción de xantina deshidrogenasa. La xantina oxidasa usa la molécula de oxígeno como un aceptor de electrones, generando el anión superóxido como producto terminal, lo cual contribuye con el estrés oxidativo durante el ejercicio (Hellsten 2000 and Aguiló 2007). La elevación de urato en plasma fue observada con anterioridad durante el Tour de Ciclismo en España 2001, en asociación con los cambios observados en las actividades enzimáticas antioxidantes de los hematíes. En el presente estudio, no se observó variación en el nivel de ácido úrico en plasma. La modalidad y duración de la competencia deportiva, así como la cantidad y calidad de antioxidantes de la dieta influyen también en el nivel de participación de las interacciones de los antioxidantes del sistema de defensa endógena en función de la progresión de las cargas físicas acumuladas.

En relación con el perfil lipoproteico, reafirmamos en el estudio de la Vuelta de Andalucía un aumento significativo en el colesterol-HDL. Tanto el ejercicio aeróbico como el anaeróbico son capaces de alterar el perfil de lipoproteínas y aumentar colesterol-HDL circulante (Aellen et al 1993). HDL protege al organismo de los daños oxidativos de LDL (Kontush et al 2003). Además, se demostraron cambios adaptativos en la capacidad protectora HDL sobre LDL en el ejercicio crónico debido a la inducción de enzimas antioxidantes asociadas a HDL (Brites et al 2006).

El ejercicio intenso induce la generación adicional de radicales libres. Este incremento ocasiona un aumento en la peroxidación lipídica. La posibilidad de que ocurran desajustes en el sistema de defensa antioxidante enzimático y no enzimático dependen

del estado previo de entrenamiento (Clarkson y Thompson, 2000). Los ejercicios lactacidémicos ejercen una influencia importante en la peroxidación lipídica debido a la inhibición del sistema de defensa antioxidante en el hematíe (Oostenbrug 1997).

Hubo un 32% de incremento en la peroxidación lipídica de los sujetos de estudio en la vuelta ciclista. Este estudio sugiere que los ciclistas evaluados poseen un eficiente sistema regulador de la homeostasis de glutatión, ya que solamente fue observado 13% de incremento en el índice GSSG/GSH; acompañado de 136% incremento en la actividad de glutatión peroxidasa, 9.5% incremento en la actividad de glutatión reductasa y 203% incremento en la melatonina plasmática. Previamente se había demostrado que la melatonina mantiene la homeostasis de GSH en mitocondrias aisladas mediante un mecanismo independiente de sus propiedades depuradoras de radicales libres (Martin et al 2000a).

El estudio de la Vuelta de Andalucía demostró elevación significativa de melatonina en plasma después de ejercicio extenuante, lo cual sugiere su participación en la regulación de glutatión. Además, la elevación de melatonina plasmática se acompañó de un incremento en la concentración urinaria de 6-sulfatoximelatonina después de la competencia. Este resultado apoya la relación directa previamente descrita entre la melatonina plasmática y su metabolito 6-sulfatoximelatonina urinaria (Bojkowski et al 1987, Markey et al 1985).

El glutatión reducido (GSH) es uno de los más importantes antioxidantes corporales, por lo tanto se ha identificado como un marcador crítico de estrés oxidativo. Es una molécula tiólica no proteica, lo que la hace un agente bioquímico versátil que sirve para una variedad de funciones biológicas normales, incluyendo el transporte de aminoácidos, la síntesis de proteína y DNA, para la regulación de la actividad enzimática y la respuesta inmune. Siendo el hígado el principal sitio de detoxificación, éste contiene eficientes mecanismos de defensa antioxidante para la depuración de especies reactivas. GSH endógeno juega un importante rol en la depuración de radicales libres, detoxificación de drogas y químicos en el hígado. La depleción de GSH hepático es un factor gatillo para la iniciación de la peroxidación lipídica durante el ejercicio intenso. Los eritrocitos son más vulnerables al daño oxidativo durante el ejercicio intenso debido a la exposición continua al flujo elevado de oxígeno, alta concentración de ácidos grasos poli-insaturados y el hierro del grupo hemo (Smith et al, 1991).

En los atletas entrenados de resistencia, ha sido reportado un 30% de descenso en GSH después del ejercicio ciclista que alcanza el consumo máximo de oxígeno (VO₂máx). En estos individuos también se ha detectado 13% de descenso en GSH después de un ejercicio ciclista estacionario a 60% VO₂máx. El aumento de GSSG eritrocitario después de la etapa ciclista ocurre paralelamente al aumento de la actividad de glutatión reductasa en hematíe, la enzima que reduce GSSG a GSH usando equivalentes reductores de NADPH. Casi todo el glutatión sanguíneo proviene del contenido celular, principalmente de los eritrocitos (Aguiló et al 2005).

Debe considerarse entonces que cuando la alta producción de radicales de oxígeno excede la capacidad de detoxificación de las enzimas antioxidantes, ocurre un cambio

en el estado redox intracelular y modificaciones de los centros catalíticos de enzimas antioxidantes. Ambas situaciones están asociadas con inhibición enzimática. Entre las enzimas antioxidantes en el músculo esquelético, la actividad de superóxido dismutasa consistentemente se eleva con el entrenamiento físico de una manera dependiente de la intensidad. La actividad de glutatión peroxidasa incrementa con el entrenamiento de resistencia. Por otro lado, el efecto del entrenamiento en la actividad de catalasa ha sido inconsistente y controversial. El tipo de fibra muscular es un importante factor determinante de que el entrenamiento pueda influenciar la actividad de las enzimas antioxidantes. Los tipos de fibras musculares tienen patrones particulares de reclutamiento y variable capacidad intrínseca antioxidante (Li, 2008). La producción de radicales libres que acompaña el consumo de oxígeno acentuado promueve la inducción de la actividad de glutatión peroxidasa, lo cual explica el descenso post-ejercicio de GSH, seguido de una inactivación enzimática como consecuencia de la actividad de los radicales libres (Elosua et al 2003). El incremento en las actividades de catalasa y glutatión peroxidasa barren las elevaciones de peróxido de hidrógeno, mientras que la regulación al alza de SOD reduce la posibilidad de formación de radical hidroxilo mediante la reacción Haber-Weise. GSH no solamente provee con sustrato a la glutatión peroxidasa para la modulación de la concentración celular de hidroperóxido, sino que también modula el estado redox intracelular. Cuando la razón GSH/GSSG disminuye, los tioles localizados en los sitios activos de las enzimas claves pueden ser oxidados para formar puentes disulfuro intra y entre proteínas (Li, 2007).

Las enzimas antioxidantes ayudan a prevenir la peroxidación lipídica y la disfunción proteica durante el estrés oxidativo y nitrosativo asociado con el ejercicio y la isquemia por reperfusión, mientras que la proteína de golpe de calor 72 (HSP 72) ayuda en la recuperación subsecuente mediante la promoción de la restauración de la enzima disfuncionante y evitando la agregación de proteínas severamente denaturalizadas (Latchman, 2001). Juntos, los mecanismos protectores de HSP72 y los antioxidantes endógenos complementan acciones contra los radicales libres (Starnes and Taylor, 2007).

La actividad de glutatión reductasa controla los niveles endógenos de GSH, por lo tanto regula el mantenimiento de GSH durante el entrenamiento físico. En el estudio de la Vuelta de Andalucía, se demostró claramente la eficiencia de la regulación de glutatión en ciclistas de elite, ya que la actividad de glutatión reductasa se elevó significativamente. El aumento en los niveles de glutatión reductasa también fue observado en el músculo esquelético de ratas expuestas a ejercicio extenuante (Lew & Quintanilha 1991 y Ji et al 1992). Para depurar las especies reactivas generadas durante el ejercicio, la producción de glutatión se eleva para mantener el nivel de glutatión reducido en el hígado de rata. Se reportó que el ejercicio de resistencia aumenta la actividad de glutatión reductasa en el músculo esquelético de rata (Ji et al 1992). En otros casos, la actividad de glutatión reductasa disminuye cuando existe poca disponibilidad de NADPH.

El estudio de la Vuelta ciclista de Andalucía demostró incremento sanguíneo de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a cuatro días de ejercicio extenuante. Hubo

incremento de IL-6 en 217%, incremento de TNF- α en 159% e incremento de IL-1 β en 111%. Sin embargo, la magnitud del incremento de citoquinas en plasma en este estudio fue menor que la de otros estudios, los cuales reportaron incrementos de IL-6 en 19x (Steensberg et al 2000) y 63x (Ostrowski 1998). En estos estudios, las respuestas marcadas de IL-6 también fueron medidas después de episodios prolongados de ejercicio extenuante, por ejemplo en extensión dinámica de una pierna durante cinco horas (Steensberg et al 2000) y en carrera de maratón de dos horas (Ostrowski et al, 1998).

Como se ha citado, tuvo lugar una elevación significativa de melatonina en respuesta al episodio intenso de ejercicio prolongado. Este resultado se puede explicar por la estimulación noradrenérgica de la glándula pineal. Ya que melatonina es un depurador directo de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y contribuye con la homeostasis de glutatión, teóricamente puede consumirse durante las competencias extenuantes de ciclismo prolongado. Se puede esperar también la reposición de los depósitos mediante la regulación al alza de la síntesis pineal y extrapineal. Reportes previos argumentaron esta posibilidad (Lucía et al, 2001). Otras evidencias anteriores fueron demostradas mediante la elevación aguda de 6-sulfatoximelatonina en orina inmediatamente después de cada día de competencia de ciclismo profesional y en la atenuación consecutiva de las concentraciones basales después de cada semana en el Tour de Ciclismo Español 2001. Es más, la producción de melatonina puede aumentar mediante estresores de baja intensidad tales como la restricción dietética en ratas y el ejercicio en humanos (Tan et al, 2007).

Aún falta discutir las implicaciones del estrés oxidativo generado por el ejercicio intenso y prolongado en los niveles circulantes de melatonina y en las inducciones de las enzimas antioxidantes. Por ejemplo, el peróxido de hidrógeno puede estimular la expresión de enzimas antioxidantes, proteínas inmunoactivas tales como citoquinas, quemoquinas y factores transcripcionales. Entre las posibles vías involucradas figuran el factor nuclear (NF) κ B, la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), la vía de fosfoinosítido 3-quinasa (PI3K)/Akt, la activación p53 y la respuesta de golpe de calor (Allen y Tresini, 2000). El mecanismo molecular de los radicales libres para la inducción enzimática subyace principalmente en las interacciones de las secuencias de los genes reguladores de los genes antioxidantes, usualmente pero no siempre, en la región promotora y en los factores transcripcionales (TF, también conocidos como proteínas ligadoras de DNA) (Li 2007). ERK1/2 rápidamente es activado en los modelos de ratas y ratones ejercitados (Nader et al, 2001), como también en el músculo esquelético de humanos entrenados y no entrenados después de prueba aguda de ciclismo submáximo (Yu et al, 2003) y el ejercicio de carrera de maratón (Yu et al, 2001). El ejercicio de resistencia y fuerza aumentan la fosforilación de ERK1/2 (Kramer et al, 2007).

Mis resultados confirmaron la hipótesis de trabajo en relación con los cambios adaptativos en la defensa antioxidante de ciclistas profesionales expuestos a ejercicio

físico intenso prolongado. En estos sujetos no ocurrieron modificaciones sustanciales en el estado redox ni en las concentraciones de glutatión reducido y oxidado en los hematíes debido a que su condición atlética les confiere una fina regulación de la homeostasis de glutatión durante el esfuerzo intenso. La evidencia presentada sobre esta regulación se refiere a que en la competición de cuatro días, aumentó marcadamente las actividades de la glutatión peroxidasa y reductasa, la melatonina en sangre y su metabolito en orina.

Por otro lado, es importante considerar el tiempo de colección de la muestra de sangre para evaluar la magnitud del estrés oxidativo, el daño muscular y la inflamación. Steinberg (2007) encontró niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias antes del aumento de MDA y 4-HDA. Este hallazgo concuerda con las observaciones de Suzuki y col (1999), quienes midieron un incremento significativo en la concentración plasmática de IL-6 en el minuto 30 de un ejercicio ciclista de carga constante de 90 minutos de duración; mientras que la producción de radicales libres medida por quimioluminiscencia ocurrió a los 60 minutos. Debe enfatizarse que los niveles de MDA y 4-HDA solamente son marcadores de peroxidación de los lípidos de membrana, consecutivo a la producción intracelular de radicales libres y al consumo de GSH en los hematíes. Más estudios se requieren para aclarar los mecanismos por los cuales el estrés oxidativo inducido por el ejercicio promueven diferentes patrones de liberación de citoquinas e interacciones entre los componentes del sistema de defensa antioxidante.

B. Del estudio experimental de alcalinización inducida, peroxidación lipídica, respuesta de citoquina y melatonina plasmática en ciclistas profesionales durante repetición de prueba Wingate.

En el estudio de la respuesta al ejercicio anaeróbico de intensidad supramáxima hubo evidencia de peroxidación lipídica y un ligero incremento de la melatonina plasmática, posiblemente por estimulación noradrenérgica de la glándula pineal y/o regulación al alza de la síntesis de melatonina, como se ha descrito anteriormente (Jaworek et al 2003). El ejercicio en humanos puede tener efectos rápidos y retardados en la secreción de melatonina, aparentemente es dependiente de la duración del ejercicio (Díaz López y Colmenero). Además, en reposo el nivel de melatonina en plasma es mucho más bajo a las 1200 h que a las 0900 h en la mañana (Buxton et al 2003). Hay que tomar en cuenta que en nuestro estudio, la medición de melatonina antes del Wingate fue de las 0900 y después de la prueba a las 1200 h. Aún así, hubo un incremento de la concentración en sangre de melatonina con el Wingate. El consumo rápido de melatonina fue previamente descrito durante la realización de ejercicio anaeróbico extenuante (Tan et al 2007), ya que sirve como primera línea de defensa molecular contra el daño oxidativo. En su lugar, en el presente estudio se sugiere la estimulación noradrenérgica pineal y el aumento de la propia síntesis de melatonina. La producción de melatonina inducida por el estrés oxidativo puede ser un fenómeno universal que sucede en organismos

unicelulares, plantas y animales, incluyendo humanos (Leon et al 2004). Los mecanismos moleculares involucran la vía AP-1 para la inducción del gen de la hidroxindol-O-metiltransferasa (Tan et al 2007 y Rodríguez et al 1994).

Se ha demostrado que la prueba Wingate estimula intensamente los sistemas ATP-fosfocreatina y glicólisis (Smith y Hill, 1991) y por lo tanto activa el catabolismo purínico (Starling et al 1996) y la producción de ácido láctico (Grainer et al 1995). La prueba Wingate resulta en un mayor incremento en el nivel de catecolamina plasmática (Zouhal et al, 1998). Estas evidencias explican que el ejercicio anaeróbico explosivo de muy corta duración promueve la acidosis metabólica y la fatiga muscular. Como consecuencia, es razonable esperar que suceda estrés oxidativo y la respuesta de citoquina pro-inflamatoria como consecuencia de la repetición de la prueba Wingate, tal como fue observada en el presente estudio. Varios argumentos han sido citados en relación con la fatiga muscular inducida por el ejercicio anaeróbico. De acuerdo con Gaitanos et al (1993), la declinación de la potencia máxima durante el ejercicio explosivo intermitente ocurre debido a la depleción de sustrato energético y de la acumulación de metabolitos. Sin embargo, en su experimento no se demostró descenso significativo de los niveles de fosfocreatina, glucógeno muscular ni ATP como consecuencia de la contracción muscular sostenida (St. Clair Gibson et al 2001). Alternativamente, algunas investigaciones sugieren que la depleción de sustrato energético y la acumulación de metabolitos contribuyen con la fatiga muscular como una señal aferente hacia el sistema nervioso central (Gandevia 1998; Lambert et al 2005; St Clair Gibson y Noakes 2004; St Clair Gibson et al 2001).

Es importante considerar que puede ocurrir un incremento notable del nivel de lactato plasmático post-ejercicio después de una alcalosis metabólica provocada por bicarbonato de sodio (Doudouros et al, 2006). Esta elevación puede ser ocasionada por la mayor entrada de lactato al torrente sanguíneo debido al aumento en el gradiente de lactato músculo : sangre. Stephens et al (2002) encontraron que la ingestión de bicarbonato ocasiona leve alcalosis muscular, pero no tiene efecto en el metabolismo muscular ni en rendimiento durante el ejercicio intenso en atletas entrenados. Además, durante la acidosis metabólica provocada por ejercicio, la administración intravenosa de bicarbonato aumenta la capacidad de amortiguación de la sangre y atenúa el descenso del pH intracelular en el músculo activo (Nielsen et al, 2002).

Los resultados del presente estudio de alcalinización provocada durante la prueba Wingate consecutiva sugieren que la ingestión de bicarbonato de sodio durante el primer día facilitó la recuperación del músculo activo para el día siguiente; ya que este grupo de sujetos tuvo mejor rendimiento en el segundo día en que solamente recibió placebo. Además, la mayor potencia máxima alcanzada en el segundo día se correlaciona con mayores concentraciones plasmáticas de malonaldehído y citoquinas pro-inflamatorias. Estos resultados son comparables con los encontrados por Groussard et al (2003), quienes señalaron que la recuperación del ejercicio está asociada con incremento significativo (2.7 veces) en la producción de radicales lipídicos detectados por espectroscopía; así como también el cambio en el nivel de glutatión reducido en hemáties (descenso en 13.6%) y el aumento en la actividad de superóxido dismutasa (11.7%). No obstante, en nuestro estudio la alcalinización inducida con bicarbonato de sodio no aumentó significativamente el mismo día el nivel de peroxidación lipídica ocasionada por la prueba repetida Wingate. En términos de relevancia clínica, Matsuura

et al (2007) encontraron que la administración oral de bicarbonato de sodio no afecta la actividad muscular evidenciada en la electromiografía de superficie durante ejercicios repetidos de ciclismo explosivo. En cambio, la administración oral de bicarbonato de sodio ocasiona alcalosis metabólica, retraso en el descenso del pH intramuscular y un período de recuperación suficiente de 360 segundos para eliminar los efectos de la resíntesis de fosfocreatina que se observa en la actividad electromiográfica.

Los amortiguadores no bicarbonatados también han sido probados en actividades de ciclismo explosivo. Carnosina (alanil-L-histidina) y anserina (alanil-1 metil-L-histidina) son dipéptidos que contienen histidina y están presentes en el cerebro, corazón, piel, hígado, riñón y músculo esquelético de una variedad de animales (Chan et al 1994 y Crush 1970). Se sugiere que debido a que los valores de pKa de carnosina y anserina son respectivamente 6.83 y 7.03 (Bate-Smith 1938 y Crush 1970), sus capacidades de secuestro de protones es elevado; por lo tanto son tampones importantes en el sistema de amortiguación no bicarbonato (Abe 2000, Hultman 1980 y Parkhouse et al 1984). De hecho, es posible reducir la acidosis en el ejercicio intenso mediante la ingestión oral de carnosina y anserina, durante los cuales una gran cantidad de hidrogeniones son producidos (Suzuki et al, 2006). Juel (2008) recientemente presentó una revisión detallada de la regulación de pH en el músculo esquelético humano. Explica que en el ejercicio de baja intensidad, la formación de lactato y la participación de la remoción de hidrogeniones dependiente de lactato son bajas; de manera que para esta carga de trabajo, los principales mecanismos de remoción de hidrogeniones son independientes de lactato. En cambio, durante el ejercicio intenso, como en la prueba repetida Wingate, ambos mecanismos participan; pero que la remoción independiente de lactato solamente duplica, mientras que la remoción dependiente de lactato aumenta al menos cinco veces. Estos sistemas alternativos de remoción de hidrogeniones deben ser tomados en cuenta para la interpretación de los resultados diversos en relación con los efectos ergogénicos de la administración de bicarbonato y otros tampones durante los ejercicios de ciclismo explosivo.

Como dijimos, carnosina y anserina están particularmente presentes en el músculo esquelético y en él juegan roles como tamponadores celulares (Abe 2000, Parkhouse et al 1984 y Tanokura et al 1976). Anserina no existe en el músculo esquelético humano (Mannion et al 1992). La concentración de carnosina en el músculo esquelético humano es mayor en fibras tipo II que en fibras tipo I (Harris et al 1998). Además, los atletas explosivos tienen mayores concentraciones de carnosina y demuestran mayor tiempo de resistencia en las pruebas anaeróbicas de velocidad que los maratonistas o sujetos no entrenados (Parkhouse et al, 1985). Se ha reportado que existe una correlación positiva entre la concentración de carnosina en el músculo esquelético y la potencia media durante el pedaleo máximo de 30 segundos (Suzuki et al, 2002). Por otro lado, debe considerarse además el contraste señalado por Péronnet y Aguilaniu (2006) respecto al modelo clásico de Wasserman. Basado en datos experimentales, encontraron que el bicarbonato no es el principal amortiguador en el músculo. Además señalaron que el descenso en la concentración plasmática de bicarbonato durante el ejercicio no es una imagen en espejo del aumento en la concentración plasmática de lactato y que el tamponamiento de hidrogeniones por el bicarbonato no aumenta la producción de dióxido de carbono en el músculo sobre lo que es producido por el metabolismo aeróbico.

En relación con el gasto energético durante el ejercicio intenso, la degradación de fosfocreatina se caracteriza por un componente primario similar al que se obtiene durante el ejercicio moderado y adicionalmente un componente de declinación lenta (Haseler et al 2004 y Rossiter et al 1999). Un factor importante que contribuye con el componente lento de fosfocreatina puede involucrar la acidosis intracelular, generando así una tasa enlentecida de fosforilación oxidativa, de lo cual se esperaría que resulte en una mayor tasa de hidrólisis que suple el mantenimiento de ATP. Más aún, Street et al (2005) demostraron un enlace entre la acumulación intersticial de hidrogeniones y cationes de potasio durante el ciclismo extenuante de corta duración, mediante canales potásicos dependientes de ATP, los cuales son sensitivos a los cambios en las concentraciones de hidrogeniones y por ende, potencialmente peligrosos para la excitabilidad cardiaca. El músculo esquelético libera potasio durante la actividad contráctil, lo cual es especialmente notable durante el ejercicio intenso, pudiendo alcanzar concentraciones plasmáticas hasta de 7 mM (Juel et al 1990).

Este estudio claramente demostró que la repetición de la prueba Wingate en tres ocasiones durante dos días consecutivos genera una respuesta de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF α e IL-1 β), la cual estuvo asociada con peroxidación lipídica pero no fue atenuada con la alcalinización inducida mediante la administración oral de bicarbonato de sodio. Un pequeño incremento en el nivel plasmático de melatonina también fue detectado. A pesar de que la saturación de oxígeno capilar (ScO₂) siempre se mantuvo dentro de límites normales (ScO₂>90%) en ambos grupos, se ha descrito con anterioridad que el aumento de la concentración de ciertas citoquinas correlaciona con la hipoxemia inducida por ejercicio (Nielsen 2003), ya que las citoquinas estimulan a los mastocitos y granulocitos basofílicos a degranular histamina, el cual es un potente broncoconstrictor. Durante el ejercicio máximo ocurre un ascenso abrupto de lactato en sangre que ocasiona el descenso de pH por debajo de 7.1, lo cual puede ser crítico para la ScO₂ de acuerdo a la curva de disociación de O₂ de la hemoglobina. En este caso, la administración de bicarbonato de sodio ayuda a mantener la estabilidad en la capacidad de tamponamiento sanguíneo, lo cual atenúa la acidosis y ayuda a mantener la SaO₂ en límites normales. TNF- α es una citoquina pro-inflamatoria que es típicamente producida por las células T después de la estimulación antigénica. De elevarse crónicamente, puede ocasionar una variedad de enfermedades (Clark et al, 2005). Excepto por la citoquina IL-6, la cual estuvo elevada en condiciones basales debido al nivel de entrenamiento de los sujetos de estudio, TNF- α e IL-1 β se elevaron agudamente en el estudio Wingate, dado que sus determinaciones basales se encontraron en límites normales bajos.

En este estudio fue notable la relación directa entre las concentraciones plasmáticas de hidrogeniones e interleuquina-6 durante e inmediatamente después de la repetición de la prueba Wingate. En cambio, el modelo de regresión lineal no detectó asociaciones entre hidrogeniones y otras citoquinas medidas. En base a estos resultados encontrados, postulo que la IL-6 se produjo localmente en el músculo activo en una proporción directa al influjo masivo de calcio que fue acentuado por la acidosis durante el ejercicio anaeróbico supramáximo. Además, esta acumulación de hidrogeniones puede potenciar la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y en consecuencia empeorar el estrés oxidativo y la inflamación. Previamente se ha descrito que la expresión de la citoquina mRNA IL-6 es inducida mediante vías dependientes de calcio-calcineurina y

factor de necrosis tumoral (Petersen y Pedersen, 2005). No obstante, más investigaciones se requieren para evaluar la posible asociación entre IL-6 e hidrogeniones en otras poblaciones y diseños experimentales.

Con este estudio se comprobó la hipótesis de trabajo: que la alcalinización provocada mediante la administración oral de bicarbonato de sodio no modifica la peroxidación lipídica ocasionada por el ejercicio intenso y explosivo durante la repetición de la prueba Wingate. Aunque no encontramos evidencia de que la alcalinización incrementa menos las concentraciones sanguíneas de citoquinas pro-inflamatorias durante la prueba, pudimos constatar que la acidosis generada durante la prueba Wingate se correlaciona directamente con la producción de la citoquina pro-inflamatoria IL-6.

C. Del estudio experimental de estrés oxidativo, daño muscular, perfil metabólico y respuesta de citoquinas en estudiantes universitarios durante entrenamiento de fuerza y resistencia con ayuda de plataforma vibratoria.

Las adaptaciones metabólicas al entrenamiento de fuerza y resistencia claramente fueron observadas en esta investigación. A pesar de que Petiboisa y Delerisb (2005) también reportaron cambios en las concentraciones plasmáticas de moléculas, sus registros revelaron los mayores cambios en el metabolismo lipídico (triglicéridos, ácidos grasos y glicerol) y menos notables en el metabolismo de carbohidratos (glucosa y lactato).

De hecho, el entrenamiento físico favorece la defensa antioxidante enzimática contra los radicales libres (Husain 2002). Sin embargo, las células de mamíferos están equipadas tanto con sistemas protectores enzimáticos como no enzimáticos (Pushpalata et al 2005). Esta defensa clásicamente incluye enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y antioxidantes no enzimáticos (vitaminas A, C, E y glutatión reducido). Las enzimas antioxidantes trabajan en conjunto para depurar los radicales libres (Michiels et al 1994). Durante el ejercicio prolongado sucede regulación al alza en las actividades y expresiones de SOD, CAT y GPx, como respuesta antioxidante al incremento de la producción de radicales libres de oxígeno y nitrógeno (Chance et al 1979).

Se ha documentado que el ejercicio agudo produce un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, especialmente de los complejos de transporte de electrones (Meijer 2002, Nissen 2003 y García 2007). Estos radicales libres atacan macromoléculas, particularmente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Michael 2005). Esta es la razón por la cual después de los esfuerzos físicos, se detectan numerosos metabolitos de la peroxidación lipídica, tales como malonaldehído y 4-hidroxiacetonales; así como también de la nitrosación de proteínas, las cuales se detectan mediante incrementos en los niveles plasmáticos de nitritos. Estos marcadores de estrés y daño están directamente relacionados con el entrenamiento, intensidad y duración de la carga física y especialmente influenciados por la eficiencia de la defensa antioxidante endógena y exógena (Charlotte 2006).

Las enzimas antioxidantes son la primera línea de defensa contra el estrés oxidativo (Mills 1997, Botwell 1998). La superóxido dismutasa transforma los aniones superóxido en peróxido de hidrógeno. La glutatión peroxidasa y la catalasa reducen el peróxido de hidrógeno respectivamente en moléculas de agua y oxígeno, usando equivalentes reductores de NADPH, dihidrolipoato y ácido ascórbico (Volker 2001 y Rohit 2007). A manera de discusión en este sentido, cabe resaltar que estas actividades enzimáticas aumentan mediante mecanismos alostéricos y covalentes durante el ejercicio agudo y son inducidas las expresiones génicas y las modificaciones post-traduccionales mediante la práctica regular de ejercicio y el entrenamiento físico (Szygula 1990).

El estrés oxidativo depende de la producción de radicales libres y la eficiencia del sistema de defensa antioxidante. El ejercicio y el entrenamiento afectan ambos componentes. En primera instancia, la producción de especies reactivas está directamente relacionada con la carga de trabajo físico (Keong 2006 y Tee 2006). Por otro lado, el entrenamiento favorece la eficiencia del sistema de defensa antioxidante endógeno y la eliminación de radicales libres (Tokish 2004).

Previo al presente estudio de entrenamiento de fuerza y resistencia, los sujetos estuvieron expuestos aisladamente a cargas leves a moderadas de ejercicio. Luego el entrenamiento consistió de ejercicio regular de intensidad y volumen moderado a submáximo. Se observó en la quinta semana de entrenamiento un incremento en la peroxidación lipídica y nitritos plasmáticos, lo cual sugiere que la sobreproducción de radicales libres sobrepasó en gran medida su depuración por el sistema de defensa antioxidante. No obstante, a continuación del entrenamiento durante tres semanas adicionales, se observó un descenso significativo en estos marcadores de estrés, lo cual sugiere el aumento de la eficiencia de la defensa antioxidante. Estudios previos indican que los efectos diversos del entrenamiento en las enzimas antioxidantes dependen de la cantidad de masa muscular activa que es reclutada, de la compartimentación celular de radicales libres generados y de la capacidad antioxidante específica de los tejidos (Pushpalatha et al 2005).

En este estudio fue evidente la respuesta de citoquina pro-inflamatoria en el grupo que recibió entrenamiento convencional de fuerza y resistencia (ECF) y fue menos evidente en el grupo que recibió este entrenamiento con incrementos vibratorios (WBV). Recalcamos que ambos grupos recibieron la misma carga de trabajo y número de sesiones. La única diferencia fue el incremento vibratorio que recibió uno de los grupos (el grupo WBV). A diferencia del presente estudio, Petersen y Pedersen (2005) encontraron que el ejercicio físico induce un estado anti-inflamatorio caracterizado por la supresión de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-1 β) y la activación de citoquinas anti-inflamatorias (receptor soluble del factor de necrosis tumoral y el antagonista del receptor de interleucina-1). Las diferencias en el patrón de respuesta de citoquinas observado entre autores probablemente está relacionado con la carga de trabajo físico, la condición física, el estado de salud, la dieta, el estilo de vida, la temperatura y la cantidad de masa muscular activa reclutada (Walsh 2001 y Navarro 2007).

Estos resultados me permiten analizar tres situaciones distintas de ejercicio en relación con el estrés oxidativo y la respuesta de citoquinas. En primer lugar, se analiza el caso de la práctica regular de ejercicio moderado, el cual induce la expresión de enzimas

antioxidantes. Este incremento de la defensa mejora la eliminación de radicales libres y suele acompañarse de la inducción en la expresión de mRNA IL-6 a través de una vía dependiente de calcio-calcineurina. Por consiguiente, se evidencia un patrón anti-inflamatorio de respuesta de citoquina, el cual ayuda a mantener la homeostasis y la integridad del músculo hipertrofiado. La segunda situación de ejercicio es por el contrario, cuando el mismo es episódico y/o de elevada carga. Esta eventualidad favorece la producción excesiva de radicales libres, los cuales sobrepasan la capacidad de eliminación del sistema antioxidante. Como resultado de este desbalance, ocurre daño a macromoléculas y estrés oxidativo sobre la sarcómera, cisternas y miofilamentos. En respuesta al insulto de la fibra muscular, especialmente si la contracción es excéntrica, se induce la expresión de IL-6 esta vez a través de la vía dependiente de TNF- α , promoviendo así al mismo tiempo un patrón de respuesta de citoquina de tipo pro-inflamatoria, en ayuda a la reparación muscular. La tercera situación de ejercicio es algo similar a la segunda. En este caso, el patrón inflamatorio de respuesta de citoquina en el músculo activo ocurre cuando el sujeto no entrenado inicia la práctica de ejercicio regular. Casi cualquier nivel de carga física ocasiona inicialmente estrés oxidativo, daño muscular e inflamación en sujetos no entrenados. A medida que el ejercicio físico se practica con regularidad a carga moderada mediante un programa de entrenamiento, como ocurrió en el presente estudio, disminuye el insulto oxidativo/nitrosativo, el daño muscular y la inflamación. Como consecuencia, después de varias semanas de entrenamiento progresivo, el músculo activo repara completamente y se acentúa la hipertrofia. Estos procesos pueden ser explicados mediante la inducción completa del sistema de defensa antioxidante y del sistema de transferencia energética; y el patrón anti-inflamatorio de respuesta de citoquina es interpretado como un fenómeno adaptativo necesario para la integridad de la fibra muscular.

En resumen, con este estudio comprobé que el entrenamiento de fuerza y resistencia al cabo de ocho semanas disminuye los parámetros de peroxidación lipídica y formación de nitritos plasmáticos en estudiantes universitarios previamente no entrenados. Sin embargo, tal como fue postulado en la hipótesis de trabajo, las vibraciones no ofrecieron una reducción adicional significativa sobre los parámetros de estrés oxidativo ni sobre la respuesta de citoquinas al entrenamiento de fuerza y resistencia convencional.

D. Del estudio de la respuesta de cortisol y citoquinas durante una prueba de fatiga muscular en luchadores y jugadores de balonmano.

Este estudio confirmó claramente que la contracción muscular excéntrica de la repetición máxima en la serie prolongada de levantamiento de pesa eleva significativamente las citoquinas pro-inflamatorias. El incremento de TNF- α fue más evidente en este tipo de ejercicio anaeróbico máximo que el que fue observado en los ejercicios dinámicos durante las competencias de ciclismo (Cuadro No. 9).

En este estudio, la respuesta de incremento de cortisol al estrés físico de la prueba no fue significativa (Cuadro No. 15). Es posible que el pico máximo de cortisolemia durante este ejercicio extenuante no se presentara al momento de la extracción de

sangre, ya que se realizó una hora después de la carga física. La magnitud de la respuesta de cortisol depende en gran medida de la intensidad y duración del ejercicio, el nivel de forma física, el estado nutricional y el ritmo circadiano.

E. Del estudio cuasi-experimental de estrés oxidativo, respuesta de cortisol y citoquina en ciclistas amateurs que ingirieron malato de citrulina durante los primeros tres días de competición (Vuelta al Bidasoa 2008).

Se documentó anteriormente que la suplementación con L-citrulina aumenta la concentración plasmática de L-arginina en mayor proporción que cuando se suplementa oralmente con L-arginina (Hickner et al 2006). Los beneficios ergogénicos de malato de citrulina en el ejercicio intenso que fueron propuestos en el estudio de Hickner et al fueron la detoxificación de metabolitos acumulados, el incremento de la producción aeróbica de ATP y el favorecimiento del uso energético de las proteínas. Estos efectos obedecen a que de malato de citrulina, su componente citrulina opera en el ciclo intermediario de la urea para la detoxificación de amonio acumulado y su componente malato actúa como sustrato anapletórico del ciclo del ácido tricarbóxico. En el presente estudio de la Vuelta al Bidasoa no se verificó metodológicamente el beneficio ergogénico de citrulina sobre el rendimiento durante la competencia; no obstante hubo evidencia de daño muscular provocado por la carga física intensa de la competencia, ya que se elevaron significativamente los marcadores enzimáticos y proteicos en sangre (creatina kinasa, mioglobina y lactato deshidrogenasa).

Además, la suplementación con malato de citrulina en cada etapa de la competición de ciclismo amateur no evitó el aumento de la peroxidación lipídica y la formación de nitritos plasmáticos en relación con el ejercicio extenuante.

Aquí el incremento de cortisolemia fue significativo, por lo que pudo tener efectos anti-inflamatorios e inmunosupresores, inhibiendo al menos parcialmente la síntesis de IL-1 β y TNF- α . En estos sujetos, a pesar de la elevada intensidad de la carga física de la competencia, no hubo incrementos significativos de los niveles séricos de las citoquinas pro-inflamatorias. A su vez, el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal suele ser potenciado por la IL-6, lo cual favorece la producción y liberación de ACTH y cortisol. De esta manera, la elevación de IL-6 contribuye al mantenimiento de la respuesta endocrina al estrés físico.

F. Comparación entre los estudios del estrés oxidativo, la respuesta antioxidante, el perfil metabólico, el daño muscular y la respuesta de citoquinas en diferentes escenarios y cargas de trabajo físico.

Los cinco grupos de sujetos que participaron en esta investigación tenían diferentes niveles de condición física. Los grupos de estudio estuvieron expuestos a diferentes

cargas de esfuerzo físico. Los sujetos que participaron de la Vuelta de Andalucía 2008 están acostumbrados a pruebas físicas intensas y a competencias de ciclismo profesional. Los sujetos del estudio Wingate también son ciclistas de élite. En cambio los que participaron en el estudio de entrenamiento físico con vibraciones, tuvieron bajo a moderado nivel de condicionamiento físico. Esta investigación reafirma que el ejercicio intenso muy corto (una hora en la prueba Wingate) o de días (tres ó cuatro días de competición ciclista) elevó la peroxidación lipídica (32% ascenso respecto al valor basal). En cambio el ejercicio moderado, repartido en un programa de entrenamiento de fuerza y resistencia de ocho semanas de duración, disminuyó significativamente la peroxidación lipídica basal o de reposo (16% descenso respecto al valor basal). Cuadro No. 8.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que la magnitud del estrés oxidativo provocado por ejercicio depende de la carga de esfuerzo físico. Cuando el ejercicio es extenuante, como lo fue la competición de ciclismo y la prueba repetida Wingate, las concentraciones de metabolitos secundarios de peroxidación lipídica se elevan. Cuando el ejercicio es moderado, como lo fue el entrenamiento de fuerza y resistencia, la peroxidación lipídica basal disminuye.

Esta investigación sugiere una relación entre la respuesta de citoquinas pro-inflamatorias y la carga física: que la respuesta de citoquinas es notable en los ejercicios extenuantes y explosivos que generan fatiga y daño muscular o que estén asociados a contracción excéntrica. Particularmente fue demostrada la participación del factor de necrosis tumoral alfa. El mayor incremento de TNF- α post-ejercicio fue observado en la carga intensa excéntrica, generada de la serie prolongada de repetición máxima (prueba de fatiga), el cual resultó en 6x; seguido de la carga acumulada en el entrenamiento de fuerza y resistencia, el cual resultó en 4.4x (Cuadro No. 9). Estos resultados sugieren que aún cuando la carga física es moderada y dosificada en un programa de entrenamiento de fuerza y resistencia, por acumulación también genera una respuesta de citoquinas pro-inflamatorias.

El estudio sugiere que la respuesta de citoquinas es mayor cuanto mayor es la carga física acumulada. Los mayores incrementos post-ejercicio de las respuestas de IL-6 e IL-1 β circulantes ocurrieron en las pruebas explosivas Wingate, de carga intensa lactacidémica. IL-6 incrementó en 3.2x e IL-1 β incrementó en 9x; seguido de la competición de ciclismo profesional donde IL-6 incrementó en 2.2x e IL-1 β incrementó en 1.1x (Cuadros No. 10 y 11).

Reafirmamos en esta investigación que las citoquinas mencionadas participan de la respuesta inflamatoria al ejercicio y el entrenamiento físico. Hemos explicado con evidencia que IL-6 es la primera citoquina presente en la circulación durante ejercicio. Según datos previos, el nivel circulante de IL-6 aumenta exponencialmente (hasta 100 veces) en respuesta al ejercicio y declina en el período post-ejercicio (Pedersen et al, 2001). El aumento marcado en el nivel circulante de IL-6 después de ejercicio, aún en ausencia de daño muscular, ha sido consistentemente demostrado (Castell 1997, Nielsen 1996, Nieman 1998, Nishimoto 2004 y Starkie 2001). Además, TNF- α e IL-1 estimulan

adicionalmente la producción de IL-6 (Tilg et al, 1997). Estas citoquinas no solamente juegan un rol en la respuesta inflamatoria, sino también favorecen la respuesta antioxidante endógena. Un mecanismo identificado es la inducción de la expresión génica de enzimas antioxidantes. Por ejemplo, en atletas bien entrenados, TNF α e IL-1 activan la transducción de señal para la transcripción génica de NFkB y AP-1, los cuales son factores transcripcionales sobre-expresados para la expresión de manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD).

En esta investigación fue evidente una marcada elevación matinal de la concentración sanguínea de melatonina durante cuatros días de competición ciclista intensa. No obstante, esta elevación no fue significativa durante una prueba de ejercicio extenuante de corta duración, como fue la prueba Wingate (Cuadro No. 12).

Como señalé anteriormente, los potentes estresores relacionados al ejercicio agudo pueden aumentar la producción de melatonina (Tan et al, 2007), impidiendo así el descenso de melatonina que fuera desencadenado por su interacción con los radicales libres o aún elevando la concentración sanguínea de ésta y su metabolito en orina. Un hecho fundamental es que la concentración sanguínea de melatonina deriva principalmente de la glándula pineal (Antti et al, 2007). Así que la hiperactividad simpática relacionada con el ejercicio es un poderoso determinante de su liberación pineal. Cito nuevamente, la producción de melatonina inducida por el estrés oxidativo es un fenómeno universal que sucede en organismos unicelulares, plantas y animales, incluyendo humanos (Leon et al 2004) y que los mecanismos moleculares involucran la vía AP-1 para la inducción del gen de la hidroxindol-O-metiltransferasa (Tan et al 2007 y Rodríguez et al 1994).

Al comparar los incrementos de los marcadores de daño muscular asociados a cargas intensas y moderadas de esfuerzo físico (Cuadro No. 13), hubo semejanzas en las dos competiciones de ciclismo, la Vuelta de Andalucía y la Vuelta al Bidasoa 2008. En ambas, los marcadores mostraron elevaciones sustanciales (entre 15 y casi 200%), siendo notables los incrementos de creatina kinasa y mioglobina en sangre. Hubo menor elevación sanguínea de transaminasas y lactato deshidrogenasa en las competiciones de ciclismo. Estas elevaciones se notaron también después de cada etapa en la competición amateur. En cambio, ante la carga moderada, que fue acumulada durante el entrenamiento de fuerza y resistencia en los estudiantes, los marcadores no superaron el 15% de incremento. Esta menor elevación puede obedecer al menos en parte a los adecuados tiempos de recuperación que fueron repartidos entre las dos sesiones semanales a lo largo de las ocho semanas, lo cual favorece la reparación y regeneración muscular.

En esta investigación constaté que las personas entrenadas en ciclismo tienen adecuada tolerancia a la glucosa y el perfil lipídico caracterizado por bajo riesgo de enfermedad cardiovascular. Estos parámetros metabólicos también fueron observados en las personas previamente no entrenadas que estuvieron expuestas a entrenamiento de fuerza y resistencia.

Las glicemias observadas dentro de los rangos normales durante los esfuerzos probablemente dependieron del balance entre la captación muscular de la glucosa y su liberación hepática. En reposo, la liberación hepática de glucosa es facilitada por el glucagon, el cual promueve la glucogenólisis y la gluconeogénesis. Durante el ejercicio aumenta más la secreción pancreática de glucagon. La actividad muscular también incrementa la tasa de liberación suprarrenal de catecolaminas, las cuales favorecen la glucogenólisis. Verificamos en la prueba de fatiga que el cortisol aumentó durante el esfuerzo, lo que favorece el catabolismo proteico y cuyos aminoácidos libres pueden ser utilizados para la gluconeogénesis. Por su lado, la hormona de crecimiento aumenta la movilidad de ácidos grasos libres y disminuye la captación celular de glucosa, manteniéndose en la circulación. Las hormonas tiroideas promueven la glucólisis y la beta oxidación de los lípidos.

De manera general, el entrenamiento de resistencia disminuye la magnitud de la respuesta hormonal a un nivel estándar de ejercicio. El ejercicio a la misma intensidad absoluta produce una respuesta hormonal menor en las personas entrenadas que en sus homólogos no entrenados. Sin embargo, el ajuste de la intensidad del ejercicio a un porcentaje de la capacidad máxima de cada persona, esto es, la misma intensidad relativa, elimina la diferencia de la respuesta hormonal relacionada con el entrenamiento. En nuestro estudio, excepto por el nivel de triglicéridos, encontramos el mismo perfil metabólico en estado de reposo en atletas y estudiantes entrenados (Cuadro No. 14). Es posible que el mayor nivel de triglicéridos en atletas estuviera relacionado con la dieta hipercalórica que consumieron. Además, ocho semanas de entrenamiento de fuerza y resistencia favorece en gran medida la ruta de la oxidación de ácidos grasos sobre la reserva de glucógeno, lo que beneficia el rendimiento del ejercicio prolongado.

Hay que tomar en cuenta que durante el ejercicio dos factores juegan un rol esencial en la regulación de la movilización de lípidos: uno es la redistribución del flujo sanguíneo y el otro es el balance de las hormonas de respuesta al esfuerzo físico. El entrenamiento de resistencia mejora la capacidad de beta oxidación de ácidos grasos, especialmente los triglicéridos almacenados dentro del músculo activo. El aumento de la lipólisis se produce por el mayor flujo sanguíneo dentro del músculo entrenado que favorece una mayor cantidad de enzimas que movilizan las grasas de los adipocitos y que metabolizan las grasas dentro de las fibras musculares.

La actividad física modifica la respuesta del cortisol, dependiendo de la intensidad y duración del ejercicio, el nivel de forma física, el estado nutricional e incluso el ritmo circadiano. La producción de cortisol aumenta con la intensidad del ejercicio. Se producen concentraciones especialmente elevadas de cortisol en el ejercicio prolongado de ciclismo de larga duración, la carrera de maratón y el excursionismo (McArdle et al, 2004). Este nivel plasmático de cortisol suele permanecer elevado hasta dos horas durante la recuperación.

El aumento de la producción de cortisol al estrés de ejercicio extenuante ayuda en la movilización rápida de sustratos energéticos mediante la neoglucogénesis y también confiere una acción anti-inflamatoria (Córdova y Navas, 2000). Frente a ejercicios intensos y fatigantes, en deportistas bien entrenados durante un periodo largo, se

aprecia una menor respuesta en la producción de cortisol. El ejercicio intenso produce un aumento del cortisol que retorna a niveles basales en unas horas. En caso de ejercicio físico intenso continuado, el cortisol basal está elevado, acompañado de una alteración del ritmo diario del cortisol, permaneciendo más o menos elevado durante todo el día.

En esta investigación observamos elevación significativa de cortisolemia después de la competición de ciclismo amateur, la cual no fue tan evidente después de las series de repetición máxima hasta la fatiga en luchadores y jugadores de balonmano (Cuadro No. 15). Un factor explicativo es la duración del ejercicio intenso, ya que la competencia ciclista de la Vuelta al Bidasoa fue valorada en los primeros tres días; en cambio la prueba de fatiga solo al cabo de una hora. Sugerimos que la duración del estrés físico intenso refuerza la magnitud de la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-corteza suprarrenal. Otro factor explicativo del mayor incremento de la cortisolemia en los ciclistas es el estrés psicológico adicional implicado por la competición.

CONCLUSIONES

1. Esta investigación acumuló evidencia científica del perfil bioquímico, el estrés oxidativo, la defensa antioxidante, la respuesta de citoquinas, el daño muscular y la producción de melatonina en ciclistas, luchadores, jugadores de balonmano y estudiantes expuestos a una variedad de cargas físicas durante competiciones, pruebas de esfuerzo y entrenamiento físico. Aportó información de los parámetros oxidativos y la respuesta pro-inflamatoria durante el ejercicio dinámico, el sprint y la fatiga. Evaluó los efectos de la alcalinización oral con bicarbonato de sodio y la ayuda ergogénica con malato de citrulina en la respuesta de citoquinas y el estrés oxidativo inducido por ejercicio intenso. Este estudio evidenció una asociación lineal directa entre el estado acidótico y la concentración plasmática de IL-6 durante la prueba Wingate.
2. La magnitud del estrés oxidativo provocado por el ejercicio depende de la carga de esfuerzo físico. De esta manera, cuando la carga es extenuante, por ejemplo durante la competición de ciclismo y durante una prueba repetida Wingate, los niveles de peroxidación lipídica se elevan. En cambio, el entrenamiento que consiste de la práctica de ejercicio físico de carga moderada disminuye la peroxidación lipídica de reposo. Por otro lado, la alcalinización provocada mediante la administración oral de bicarbonato de sodio no modifica el grado de peroxidación lipídica generado por un ejercicio intenso y explosivo durante la repetición de la prueba Wingate. Además, la suplementación oral con malato de citrulina durante la competición de ciclismo no evita el aumento de la peroxidación lipídica y la formación de nitritos plasmáticos provocada por el ejercicio físico.
3. Reafirmamos en esta investigación que hay una respuesta inflamatoria a consecuencia del ejercicio y/o el entrenamiento físico en la que participan las citoquinas pro-inflamatorias. La respuesta de citoquinas pro-inflamatorias determinada mediante la elevación de IL-6, TNF- α e IL-1 β en plasma es significativa durante la competición de ciclismo y en los ejercicios extenuantes y explosivos que generan fatiga y daño muscular. La respuesta de citoquinas es mayor cuanto mayor es la carga física acumulada. Sin embargo, cuando la carga física es moderada y dosificada a través de un programa de entrenamiento de fuerza y resistencia de ocho semanas de duración, por efectos acumulativos también genera una respuesta de citoquinas pro-inflamatorias. Además, la ayuda vibratoria no ofrece una reducción adicional sobre los parámetros de estrés oxidativo ni tampoco sobre la respuesta de citoquinas al entrenamiento de fuerza y resistencia.

4. El ejercicio físico intenso prolongado induce cambios adaptativos en la defensa antioxidante de ciclistas profesionales. En estos casos no ocurren modificaciones en el estado redox ni en las concentraciones de glutatión reducido y oxidado en los hematíes debido a la existencia de una fina regulación de la homeostasis de glutatión en atletas. Para ello aumenta significativamente las actividades de glutatión peroxidasa y reductasa durante la competición de ciclismo. Además, ocurre elevación matutina de la concentración sanguínea de melatonina y su metabolito en orina.

5. El ciclismo y el entrenamiento de fuerza y resistencia favorecen la tolerancia a la glucosa y el perfil lipídico se caracteriza por ser de bajo riesgo de enfermedad cardiovascular. El ejercicio intenso de una competición de ciclismo eleva los marcadores sanguíneos de daño muscular, especialmente creatina kinasa y mioglobina. En cambio, el ejercicio moderado y regular acumula una carga física que genera menos daño muscular. Además, la respuesta de cortisol al estrés físico depende de la duración del ejercicio físico. Así, la elevación sanguínea de cortisol es mayor en la competición de ciclismo de tres días de duración que en la prueba de fatiga de una hora de duración.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abe H. Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. *Biochemistry* 2000;65:757–765.
2. ACSM. Guidelines for exercise testing and prescription. 2000; 6th Edition.
3. Aellen R, Hollmann W, Boutellier U. Effects of aerobic and anaerobic training on plasma lipoproteins. *Int J Sports Med* 1993;14:396–400.
4. Aikawa KM, Quintanilha AT, deLumen BO et al. Exercise endurance training alters vitamin E tissue levels and red blood cell hemolysis in rodents. *Bioscience Report* 1984;4:253-257.
5. Aguiló A, Taulera P, Fuentespina E et al. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiology & Behavior* 2005;84:1–7.
6. Alessio H, Hagerman AE, Fulkerson BK et al. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2000;32:1576–1581.
7. Allen, RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Rad. Biol. Med.* 2000; 28:463–499.
8. Antti A, Mero M, Vahalummukka JJ et al. Effects of resistance exercise session after oral ingestion of melatonin on physiological and performance responses of adult men *Eur J Appl Physiol* 2006;96:729–739.
9. Barber AA and Bemheim F. Lipid peroxidation: Its measurement, occurrence and significance in animal tissue.
10. Barbieri M, Ferrucci L, Ragno E, Corsi A, Bandinelli S, Bonafe M, Olivieri F, Giovagnetti S, Franceschi C, Guralnik JM, and Paolisso G. Chronic inflammation and the effect of IGF-I on muscle strength and power in older persons. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E481–E487, 2003.
11. Barton BE. IL-6: insights into novel biological activities. *Clin Immunol Immunopath* 1997;85:16-20.
12. Bate-Smith EC. The buffering of muscle in rigor: protain, phosphate and carnosine. *J. Physiol.* 1938;92:336–343.
13. Bojkowski C, Arendt J, Shih M et al. Melatonin secretion in humans assessed by measuring its metabolite, 6-sulfatoxymelatonin. 1997.

14. Botwell, J.L., Leese, G.P., Smith, K., Watt, W., Nevill, A., Rooyackers, O., Wagenmakers, A.J.M. and Rennie, M.J. *J Appl Physiology* 85:1744-1752, 1998.
15. Bouissou P, Defer G, Guezennec CY et al. Metabolic and blood catecholamine responses to exercise during alkalosis. *Med. Sci. Sport. Exerc.* 1988;20:228–232.
16. Brites F, Zago V, Verona J, et al. HDL capacity to inhibit LDL oxidation in well-trained triathletes. *Life Sci* 2006;78:3074–81.
17. Brunn JM, Helge JW, Richelsen B, Stallknecht B. Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not skeletal muscle in severely obese subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290:E961–7.
18. Bruunsgaard H, Pedersen M, Pedersen BK. Ageing and proinflammatory cytokines. *Curr Opin Hematol* 2001;8:131-136.
19. Bruunsgaard H, Andersen-Ranberg K, Jeune B, et al. A high plasma concentration of TNF α is associated with dementia in centenarians. *J Gerontol* 1999;54A:357-364.
20. Buxton O, Lee C, L'hermite-Bale M et al. Exercise elicits phase shifts and acute alterations of melatonin that vary with circadian phase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284: R714–R724.
21. Castell LM, Poortmans JR, Leclercq R, Brasseur M, Duchateau J, and Newsholme EA. Some aspects of the acute phase response after a marathon race, and the effects of glutamine supplementation. *Eur J Appl Physiol* 75: 47–53, 1997.
22. Chan WK, Decker EA, Chow CK et al. Effect of dietary carnosine on plasma and tissue antioxidant concentrations and on lipid oxidation in rat skeletal muscle. *Lipids* 1994;29:461–466.
23. Chance B, Sies H and Boveries A. *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. *Physiol Rev* 59:72–77, 1979.
24. Charlotte Keller, Ylva Hellsten, Adam Steensberg, Bente Klarlund Pedersen. *Differential regulation of IL-6 and TNF- α via calcineurin in human skeletal muscle cells*. *Cytokine* 36:141–147, 2006.
25. Chavarren J and Calbet JA Cycling efficiency and pedaling frequency in road cyclist. *Eur. J. Appl. Physiol.* 1990;80:555–563.

26. Cherniack NS and Longobardo GS. Oxygen and carbon dioxide gas stores of the body. *Physiol Rev* 1970;50:196–243.
27. Clark J, Vagenas P, Panesar M et al. What does tumour necrosis factor excess do to the immune system long term? *Ann Rheum Dis* 2005;64:iv70–6.
28. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am. J. Clin. Nutr.* 2000;72:637S–646S.
29. Cohen F, Heikkila R. The generation of hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine dialuric acid and related cytotoxic agents. *J Biol Chem* 1974;249:2447–2450.
30. Córdova A y Navas F. *Fisiología deportiva*. 2000. Editorial Gymnos, España.
31. Costill, DL, Verstappen F, Kuipers H et al. Acid-base balance during repeated bouts of exercise: influence of HCO₃. *Int. J. Sports Med.* 1984;5:228–231.
32. Coyle EF, Coggan AR, Hopper MK et al. Determinants of endurance in well-trained cyclists. *J Appl Physiol* 1988;64:2622-2630.
33. Crush KG. Carnosine and related substances in animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 1970;34:3–30.
34. Davies KJA, Quantanilla AT, Brooks GA and Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1982;107:1198-1205.
35. Dell RD and Winters RW. A model for the in vivo CO₂ equilibration curve. *Am J Physiol* 1970;219:37–44.
36. Diaz Lopez B and Colmenero MaD. Influence of physical training on the Syrian hamster's melatonin rhythm. *Neuroscience Letters* 2007;428:68–71.
37. Dobbs RJ, Charlett A, Purkiss AG, et al. Association of circulating TNF-alpha and IL-6 with ageing and parkinsonism. *Acta Neurol Scand* 1999, 100:34-41.
38. Douroudos I, Fatouros I, Gourgoulis V et al. Dose-Related Effects of Prolonged NaHCO₃ Ingestion during High-Intensity Exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 2006;38(10):1746–1753.
39. Dufaux B, Order U. Plasma elastase-alpha 1-antitrypsin, neopterin, tumor necrosis factor, and soluble interleukin-2 receptor after prolonged exercise. *Int. J. Sports Med* 1989; 10:434–438.

40. Drenth JP, van Uum SH, van Deuren M, et al. Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates ex vivo TNF-alpha and IL-1beta production. *J Appl Physiol* 1995;79:1497-1503.
41. Dyhr Toft, A., Jensen, L., Bruunsgaard, H., Ibfelt, T., Halkjaer-Kristensen, J., Febbraio, M. and Pedersen, B. (2002). *Am J Cell Physiol* 283:289-295.
42. Edge J, Bishop D and Goodman C. Effects of chronic NaHCO₃ ingestion during interval training on changes to muscle buffer capacity, metabolism, and short-term endurance performance. *J Appl Physiol* 2006;101: 918–925.
43. Edge J, Bishop D and Goodman D. The effects of training intensity on muscle buffer capacity in females. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2005;5:1–9.
44. Elosua R, Molina L, Fito M et al. Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. *Atherosclerosis* 2003;167:327–334.
45. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth Enzymol* 1999;186: 407-421.
46. Favero TG, Zable AC, Bowman M et al. Metabolic end products inhibit sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release and [H]ryanodine binding. *J Appl Physiol* 1995;78: 1665–1672.
47. Febbraio MA, Ott P, Nielsen Hb, et al. Hepatosplanchnic clearance of interleukin-6 in humans during exercise. *Am J Physiol* 2003;260:496-497.
48. Febbraio MA, Pedersen BK. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J* 2002;16:1335-1347.
49. Ferrucci L, Penninx BW, Volpato S, Harris TB, Bandeen-Roche K, Balfour J, Leveille SG, Fried LP, and Md JM. Change in muscle strength explains accelerated decline of physical function in older women with high interleukin-6 serum levels. *J Am Geriatr Soc* 50: 1947–1954, 2002.
50. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S et al. Inhibitory effect of tumor cell derived lactic acid on human T cells. *Blood* 2007.
51. Forbes SC, Raymer GH, Kowalchuk JM et al. NaHCO₃-induced alkalosis reduces the phosphocreatine slow component during heavy-intensity forearm exercise. *J Appl Physiol* 2005;99:1668–1675.
52. Gaitanos GC, Williams C, Boobis LH et al. Human muscle metabolism during intermittent maximal exercise. *J Appl Physiol* 1993;75:712–719.

53. Gandevia SC. Neural control in human muscle fatigue: changes in muscle afferents, motoneurons and motor cortical drive. *Acta Physiol Scand* 1998;162:275–283.
54. García, Ma. C. (2007) Tesis Doc “Efectos de la melatonina, coenzima Q10 y Phlebodium Decumanum sobre el estrés oxidativo en el ejercicio físico intenso”. U. Granada.
55. George K.P. and D.P. Maclaren. The effect of induced alkalosis and acidosis on endurance running at an intensity corresponding to 4 mM blood lactate. *Ergonomics* 1988;31:1639–1745.
56. Goldfinch J, Mcnaughton JL and Davies P. Induced metabolic alkalosis and its effects on 400 m racing time. *Eur. J. Appl Physiol* 1988;57:45–48.
57. Granier P, Mercier B, Mercier J et al. Aerobic and anaerobic contribution to Wingate test performance in sprint and middle-distance runners. *Eur J Appl Physiol* 1995;70:58–65.
58. Green, L.C., Ruiz de Luzuriaga, K., Warner, D.A. 1981. Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7764-7768.
59. Griffith HR, Moller L, Bartosz G et al. *Mol Aspects Med* 2002;23:101.
60. Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Rad Biol Med* 1999; 27:922-935.
61. Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G et al. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol* 2003;89: 14–20.
62. Haahr PM, Pedersen BK, Fomsgaard A, et al. Effect of physical exercise on in vitro production of interleukin 1, interleukin 6, tumor necrosis factor-alpha, interleukin 2 and interferon-gamma. *Int J Sports Med* 1991;12:223-7.
63. Harris RC, Dunnett M and Greenhaff PL. Carnosin and taurine contents in individual fibres of human vastus lateralis muscle. *J Sports Sci* 1998;16:639–943.
64. Haseler LJ, Kindig CA, Richardson RS et al. The role of oxygen in determining phosphocreatine onset kinetics in exercising humans. *J Physiol* 2004;558:985–992.
65. Hellsten Y. The role of xanthine oxidase in exercise. *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise*. Amsterdam Elsevier Science; 2000. p.153–76.

66. Hickner RC, Tanner CJ, Evans CA et al. L-citrulline reduces time to exhaustion and insulin response to a graded exercise test. *Med Sci Sports Exerc* 2006;38:660-666.
67. Hirche H, Hombach V, Langohr HD et al. Lactic acid permeation rate in working gastrocnemii of dogs during metabolic alkalosis and acidosis. *Pflugers Arch* 1975;356:209-222.
68. Hisssin PJ and Hilf R, 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem*, 74, 214-226.
69. Hollidge-Horvat MG, Parolin ML, Wong D et al. Effect of induced metabolic alkalosis on human skeletal muscle metabolism during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;278:E316-E329.
70. Hughes EF, Turner SC and Brooks GA. Effects of glycogen depletion and pedaling speed on "anaerobic threshold". *J Appl Physiol* 1982;52:1598-1607.
71. Hultman E and Sahlin K. Acid-base balance during exercise. *Exerc Sport Sci Rev* 1980;8:41-128.
72. Husain K. Exercise conditioning attenuates the hypertensive effects of nitric oxide synthase inhibitor in rat. *Mol Cell Biochem* 231:129-37, 2002.
73. Inal M, Akyuz F, Turgut A et al. Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 2001;33:564-567.
74. Inbar O, Rotsein A, Jacobs I et al. The effect of alkaline treatment on short-term maximal exercise. *J Sport Sci* 1983;12:95-104.
75. JammesaY, Steinberg JG, Bregeona F et al. The oxidative stress in response to routine incremental cycling exercise in healthy sedentary subjects. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2004;144:81-90.
76. Jaworek J, Leja-Szpak A, Bonior J et al. Protective effect of melatonin and its precursor L-tryptophan on acute pancreatitis induced by caerulein overstimulation or ischemia/reperfusion. *J Pineal Res* 2003; 34:40-52.
77. Ji LL, Katz A, Fu RG et al. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle. Effect of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol* 1992;73:1854-59.
78. Jonsdottir IH, Schjerling P, Ostrowski K, Asp S, Richter EA, and Pedersen BK. Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. *J Physiol* 528: 157-163, 2000.

79. Jubrias SA, Crowther GJ, Shankland EG et al. Acidosis inhibits oxidative phosphorylation in contracting human skeletal muscle in vivo. *J Physiol* 2003;533:589–599.
80. Juel C. Review: Regulation of pH in human skeletal muscle: adaptations to physical activity. *Acta Physiol* 2008;193:17–24.
81. Juel C, Bangsbo J, Graham T et al. Lactate and potassium fluxes from human skeletal muscle during and after intense, dynamic, knee extensor exercise. *Acta Physiol Scand* 1990;140:147–159.
82. Keller C, Steensberg A, Pilegaard H, Osada T, Saltin B, Pedersen BK, and Neufer PD. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *FASEB J* 15: 2748–2750, 2001.
83. Kellum JA, Song M and Almagro E. Hyperchloremic acidosis increases circulating inflammatory molecules in experimental sepsis. *Chest* 2006;130:962–967.
84. Kellum JA, Song M and Li J. Science review: Extracellular acidosis and the immune response: clinical and physiological implications. *Critical Care* 2004, 8:331-336.
85. Kellum JA, Song M and Li J. Lactic and hydrochloric acids induce different patterns of inflammatory response in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2004;286:686-692.
86. Keong, Ch., Singh, H. and Singh, R. *JSSM* 5:629-639, 2006.
87. Kin NW and Sanders VM. It takes nerve to tell T and B cells what to do. *J Leukoc Biol* 2006;79:1093–104.
88. Kramer H, Goodyear L. Exercise, MAPK, and NF- κ B signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2007;103: 388–395.
89. Kraemer WJ and Ratamess NA. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. *Sports Med.* 2005;35:339–361.
90. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1881–8.

91. Lambert EV, St Clair Gibson A and Noakes TD. Complex systems model of fatigue: integrative homeostatic control of peripheral physiological systems during exercise in humans. *Br J Sports Med* 2005;39:52–62.
92. Laughlin GA, Loucks AB and Yen SSC. Marked augmentation of nocturnal melatonin secretion in amenorrhic athletes, but not in cycling athletes: unaltered by opioidergic or dopaminergic blockade. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:1321–1326.
93. Latchman DS. Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovasc. Res.* 2001;51:637–646.
94. Leon J, Acuña-Castroviejo D, Sainz R et al. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sciences* 2004;75:765–790.
95. Lew H, Quintanilha A. Effect of endurance training and exercise on tissue antioxidant capacity and acetaminophen detoxification. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1991;16:21–27.
96. Li Li J. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radical Biology & Medicine* 2008;44:142–152.
97. Li Li J. Antioxidant signaling in skeletal muscle: A brief review. *Experimental Gerontology* 2007;42:582–593.
98. Lucía A, Díaz B, Hoyos J et al. Hormone levels of world class cyclists during the Tour of Spain stage race. *Br J Sports Med* 2001;424,35:424–430.
99. Meijer, E., Goris, A., van Dongen, J., Bast, A. and Westerterp, K. *JAGS* 50:349-353, 2002.
100. Matsuura R, Arimitsu T, Kimura T et al. Effect of oral administration of sodium bicarbonate on surface EMG activity during repeated cycling sprints. *Eur J Appl Physiol* 2007;101:409–417.
101. McNaughton L and Thompson T. Acute versus chronic sodium bicarbonate ingestion and anaerobic work and power output. *J Sports Med Phys Fitness* 2001;41:456–462.
102. McNaughton L, Dalton B and Palmer G. Sodium bicarbonate can be used as an ergogenic aid in high-intensity, competitive cycle ergometry of 1 h, competitive cycle ergometry of 1 h duration. *Eur J Appl Physiol* 1999;80:64–69.
103. MacNeil BJ, Jansen AH, Greenberg AH et al. Activation and selectivity of splenic sympathetic nerve electrical activity response to bacterial endotoxin. *AJP—Regul Integr Comp Physiol* 1996;270:R264–70.

104. Mainwood GW and Worseley-Brown P. The effect of extracellular pH and buffer concentration on the efflux of lactate from frog sartorius muscle. *J Physiol* 1975;250:1–22.
105. Mannion AF, Jakeman PM, Dunnett M et al. Carnosine and anserine concentrations in the quadriceps femoris muscle of healthy humans. *Eur J Appl Physiol* 1992;64:47–50.
106. Marsh S, Coombes J. Review Exercise and the endothelial cell. *International Journal of Cardiology* 2005;99:165– 169.
107. Markey S, Higa S, Shih M et al. The correlation between human plasma melatonin levels and urinary 6-hydroxymelatonin excretion. *Clinica Chimica Acta* 1985;150:221-225.
108. Martin M, Macias M, Escames G et al. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB Journal* 2000a;14(12):1677–1679.
109. Marzatico F, Pansarasa O, Bertorelli L et al. Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J Sports Med Phys Fitness* 1997;37:235–239.
110. McArdle W, Katch F y Katch V. *Fundamentos de Fisiología del Ejercicio*. 2004. McGraw-Hill, 2ª. Edición.
111. Meydani, M., W. J. Evans, G. Handelman, L. Biddle, R. A. Fielding, S. N. Meydani, J. Burrill, M. A. Fiatarone, J. B. Blumberg, and J. G. Cannon. Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. *Am. J. Physiol.* 264 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 33): R992–R998, 1993.
112. Meilhac O, Ramachandran S, Chiang K. Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1681– 8.
113. Michael S. Davis, Jerry R. Malayer, Lori Vandeventer, Christopher M. Royer, Erica C. McKenzie, and Katherine K. Williamson. *Cold weather exercise and airway cytokine expression*. *J Appl Physiol* 98: 2132–2136, 2005.
114. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Ramaclé J. *Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu Zn – SOD for all survival against oxidative stress*. *Free Rad Biol Med* 17:235–248, 1994.

115. Mihai G. Netea, Joost P.H. Drenth, Natasja De Bont, Anneke Hijmans, Monique Keuter, Edi Dharmana, Pierre N.M. Demacker, Jos W.M. van der Meer. A Semi-Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction Method For Measurement Of mRNA For TNF-Alpha And IL-1B In Whole Blood Cultures: Its Application In Typhoid Fever And Exentric Exercise. *CYTOKINE*, Vol. 8, No. 9 (September), 1996: pp 739–744.
116. Mills P, Marlin D, Scott C and Smith N. *J Appl Physiology* 82:1035-1039, 1997.
117. Mizuhara H, O'Neill E, Seki N, Ogawa T, Kusunoki C, Otsuka K, Satoh S, Niwa M, Senoh H, and Fujiwara H. T cell activation associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6. *J Exp Med* 179: 1529–1537, 1994.
118. Moldoveanu AI, Shephard RJ, and Shek PN. Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in blood mononuclear cells. *J Appl Physiol* 89: 1499–1504, 2000.
119. Nader GA, Esser KA. Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise. *J Appl Physiol* 2001;90:1936–1942.
120. Nakatani K, Komatsu M, Kato T et al. Habitual exercise induced resistance to oxidative stress. *Free Radical Research* 2005;39(9): 905–911.
121. Navarro A and Boveris A. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C670-C686, 2007.
122. Nielsen HB, Secher N, and Pedersen BK. Lymphocytes and NK cell activity during repeated bouts of maximal exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 271: R222–R227, 1996.
123. Nielsen HB, Hein L, Svendsen LB et al. Bicarbonate attenuates intracellular acidosis. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002;46: 579–584.
124. Nielsen, HB. Arterial desaturation during exercise in man: implication for O₂ uptake and work capacity. *Scand J Med Sci Sports* 2003;13:339–358.
125. Nieman DC, Davis JM, Henson DA, et al. Carbohydrate ingestion influences skeletal muscle cytokine mRNA and plasma cytokine levels after a 3-h run. *J Appl Physiol* 2003;94:1917-1925.
126. Nieman DC, Nehlsen-Canarella SL, Fagoaga OR, Henson DA, Utter A, Davis JM, Williams F, and Butterworth DE. Effects of mode and carbohydrate

- on the granulocyte and monocyte response to intensive prolonged exercise. *J Appl Physiol* 84: 1252–1259, 1998.
127. Niess AM, Sommer M, Schlotz E, et al. Expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human leukocytes: responses to running exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2000;32:1220-1225.
 128. Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Hashimoto J, Azuma J, and Kishimoto T. Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 50: 1761–1769, 2004.
 129. Nissen S. and Sharp R. *J Appl Physiology* 94:651-659, 2003.
 130. Ortega FB, Castillo MJ. Extreme mountain bike challenges may induce sub-clinical myocardial damage. *J Sports Med Phys Fitness* 2006;46:1-5.
 131. Oostenbrug GS, Mensink RP, Hardeman MR et al. Exercise performance, red blood cell deformability, and lipid peroxidation: effects of fish oil and vitamin E. *J Appl Physiol* 1997;83:746–752.
 132. Ostrowski K, Rohde T, Asp S, et al. The cytokine balance and strenuous exercise: TNF-alpha, IL-2beta, IL-6, IL-1ra, sTNF-r1, sTNF-r2 and IL-10. *J Physiol (Lond)* 1999;515:287-291.
 133. Ostrowski K, Rohde T, Asp S, et al. Chemokines are elevated in plasma after strenuous exercise in humans. *Eur J Appl Physiol* 2001;84:244-245.
 134. Ostrowski K, Rohde T, Asp S et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J. Physiol.* 1999;515:287–291.
 135. Ostrowski K, Rohde T, Zacho M, et al. Evidence that IL-6 is produced in skeletal muscle during prolonged running. *J Physiol (Lond)* 1998;508:949-953.
 136. Paolisso G, Rizzo MR, Mazziotti G, et al. Advancing age and insulin resistance: role of plasma tumor necrosis factor-alpha. *Am J Physiol* 1998;275:E294-E299.
 137. Parkhouse WS, Mckenzie DC, Hochachka PW et al. Buffering capacity of deproteinized human vastus lateralis muscle. *J. Appl. Physiol.* 1985;58:14–17.
 138. Parkhouse WS and Mckenzie DC. Possible contribution of skeletal muscle buffers to enhanced anaerobic performance: a brief review. *Med Sci Sports Exerc.* 1984;16:328–338.

139. Pedersen TH, Nielsen OB, Lamb GD et al. Intracellular acidosis enhances the excitability of working muscle. *Science* 2004;305:1144–1147.
140. Pedersen BK, Steensberg A, and Schjerling P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *J Physiol* 536: 329–337, 2001.
141. Pedersen BK, Steensberg A, Schjerling P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *J Physiol (Lond)* 2001;536:329-337.
142. Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. *Physiol Rev* 2000;80:1055-1081.
143. Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J. Appl. Physiol.* 2005;98:1154–1162.
144. Péronnet F and Aguilaniu B. Lactic acid buffering, nonmetabolic CO₂ and exercise hyperventilation: A critical reappraisal. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2006;150:4–18.
145. Petibois C, Deleris G. Erythrocyte Adaptation to Oxidative Stress in Endurance Training. *Archives of Medical Research* 2005;36:524–531.
146. Pilegaard H, Ordway GA, Saltin B, et al. Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. *Am J Physiol* 2000;279:E806-E814.
147. Pushpalatha K., Vadluri G. and Kesireddy S. Response of Hepatic Antioxidant System to Exercise Training in Aging Female Rat. *Journal of Experimental Zoology* 303A:203-208,2005.
148. Radak Z, Sasvari M, Nyakas C, Pucso J, Nakamoto H, Goto S. Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium. *Arch Biochem Biophys* 2000;376:248–51.
149. Radom-Aizik S, Leu SY, Cooper DM et al. Serum from exercising humans suppresses t-cell cytokine production. *Cytokine* 2007;40:75–81.
150. Reid MB. Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 90:724–731, 2001.

151. Reiter RJ. Melatonin: The chemical expression of darkness. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1991a;79(1–3):C153–C158.
152. Rodríguez MI, Escames G, López LC et al. Improved mitochondrial function and increased life span after chronic melatonin treatment in senescent prone mice. *Experimental Gerontology* (2008).
153. Rodriguez JR, Mazuruk K, Schoen TJ et al. Structural analysis of the human hydroxyindole-O-methyltransferase gene. Presence of two distinct promoters. *J Biol Chem* 1994; 269:3169–3177.
154. Rohit Gokhale, S. Chandrashekara, K.C. Vasanthakumar. *Cytokine response to strenuous exercise in athletes and non-athletes—an adaptive response*. *Cytokine* 40:123–127, 2007.
155. Ronkainen H, Vakkuri O, Kauppila A. Effects of physical exercise on the serum concentration of melatonin in female runners. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1986;65:827–829.
156. Rossiter HB, Ward SA, Doyle VL et al. Inferences from pulmonary O₂ uptake with respect to intramuscular [phosphocreatine] kinetics during moderate exercise in humans. *J Physiol* 1999;518: 921–932.
157. Roussel M, Mattei JP, Le Fur Y. Metabolic determinants of the onset of acidosis in exercising human muscle: a ³¹P-MRS study. *J Appl Physiol* 2003;94:1145–1152.
158. Ruiz, J.R., Mesa, J., Mingorance, I., Rodríguez, A. and Castillo, M.J. (2004). *Rev Esp Cardiol* 57(6):499-506.
159. Ruiz, J.R., Ortega, F.B., Castillo, M.J., Gutiérrez, A. and Agil, A. (2006). *Int J Sports Med* 27:587-589.
160. Rush JW, Turk JR, Laughlin MH. Exercise training regulates SOD-1 and oxidative stress in porcine aortic endothelium. *Am J Physiol, Heart Circ Physiol* 2003;284:H1378– 87.
161. Sacheck, J., Cannon, J., Hamada, K., Vannier, E., Blumberg, J. and Roubenoff, R. (2006). *Am J Physiol Endocrinol Met* 291:340-349.
162. Santalla A, Perez M and Montilla M. Sodium bicarbonate ingestion does not alter the slow component of oxygen kinetics in professional cyclists. *J Sports Sci* 2003;21:39–47.

163. Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, and Dinarello CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 75: 40–47, 1990.
164. Schippinger, G., Wonisch, W., Abuja, P.M., Frankhauser, F., Winklhofer-Roob, B.M. and Halwachs, G. (2002). *Eur J Clin Inv* 32:686-692.
165. Scott P. IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science* 1993;260:496-497.
166. Shepherd AJ, Beresford LJ, Bell EB et al. Mobilisation of specific T cells from lymph nodes in contact sensitivity requires substance P. *J Neuroimmunol* 2005;164:115–23.
167. Siesjo BK, Bendek G, Koide T et al. Influence of acidosis on lipid peroxidation in brain tissues in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 1985;5:253–258.
168. Siegler JC, Keatley S, Midgley AW et al. Pre-exercise alkalosis and Acid-base recovery. *Int J Sports Med* 2008;29(7):545-51.
169. Smith JC and Hill DW. Contribution of energy systems during a Wingate power test. *Br J Sports Med* 1991;25:196–199.
170. Starnes J, Taylor R. Exercise-Induced Cardioprotection: Endogenous Mechanisms. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 2007;39(9):1537–1543.
171. St Clair Gibson A, Lambert MI and Noakes TD. Neural control of force output during maximal and submaximal exercise. *Sports Med* 2001;31:637–650.
172. St Clair Gibson A and Noakes TD. Evidence for complex system integration and dynamic neural regulation of skeletal muscle recruitment during exercise in humans. *Br J Sports Med* 2004;38:797–806.
173. Spriet LL, Lindinger MI, McKelvie RS et al. Muscle glycogenolysis and H⁺ concentration during maximal intermittent cycling. *J Appl Physiol* 1989;66:8–13.
174. Starkie RL, Angus DJ, Rolland J, et al. Effect of prolonged submaximal exercise and carbohydrate ingestion on monocyte intracellular cytokine production in humans. *J Physiol (Lond)* 2000;528:647-655.
175. Starkie RL, Rolland J, Angus DJ, et al. Circulating monocytes are not the source of elevations in plasma IL-6 and TNF-alpha levels after prolonged running. *Am J Physiol* 2001;280:C769-C774.

176. Starling RD, Trappe TA, Short KR et al. Effect of inosine supplementation on aerobic and anaerobic cycling performance. *Med Sci Sports Exerc* 1996;28:1193–1198.
177. Steensberg A, Keller C, Starkie RL et al. IL-6 and TNF- α expression in, and release from, contracting skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002;283:E1272–E1278.
178. Steensberg A, van Hall G, Osada t, et al. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J Physiol (Lond)* 2000;529Pt1:237-242.
179. Steensberg A, Fischer CP, Keller C, et al. IL-6 enhances plasma IL-1 α , IL-10 and cortisol in humans. *Am J Physiol* 2003;285:E433-E437.
180. Steinberg JG, Ba A, Brégeon F et al. Cytokine and Oxidative Responses to Maximal Cycling Exercise in Sedentary Subject. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2007;39,6:964–968.
181. Stephens TJ, Mckenna MJ, Canny BJ et al. Effect of sodium bicarbonate on muscle metabolism during intense endurance cycling. *Med Sci Sports Exerc* 2002;34(4):614–621.
182. Strassmann RJ, Appenzeller O, Lewy AJ et al. Increase in plasma melatonin, endorphin, and cortisol after a 28.5-mile mountain race: relationship to performance and lack of effect of naltrexone. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69:540–545.
183. Street D, Nielsen JJ, Bangsbo J et al. Metabolic alkalosis reduces exercise-induced acidosis and potassium accumulation in human skeletal muscle interstitium. *J Physiol* 2005;566:481–489.
184. Sureda A, Ferrer M, Tauler P et al. L-citrulline-malate supplementation enhances the protein degradation and retards the progression of oxidative stress induced by a cycling stage.
185. Sutton JR, Jones NL and Toews CJ. Effect of pH on muscle glycolysis during exercise. *Clin Sci* 1981;61:331–338.
186. Suzuki Y, Nakao T, Maemura H et al. Carnosine and Anserine Ingestion Enhances Contribution of Nonbicarbonate Buffering. *Med Sci Sports Exerc* 2006;38(2):334–338.

187. Suzuki Y, Ito O, Mukai N et al. High level of skeletal muscle carnosine contributes to the latter half of exercise performance during 30-s maximal cycle ergometer sprinting. *Jpn J Physiol* 2002;52:199–205.
188. Suzuki K, Nakaji S, Yamada M, et al. Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. *Cytokine kinetics Exerc Immunol Rev* 2002;8:6-48.
189. Suzuki K, Totsuka M, Nakaji S. Endurance exercise causes interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics and muscle damage. *J. Appl. Physiol.* 1999; 87:1360–1367.
190. Szygula, Z. *Erythrocytic system under the influence of physical exercise and training.* *Sports Med.* 10: 181–197, 1990.
191. Tan D, Lucien C, Manchester M et al. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J. Pineal Res.* 2007; 42:28–42.
192. Tanokura M, Tasumi M and Miyazawa T. Nuclear magnetic resonance studies of histidine-containing di- and tripeptides. Estimation of the effects of charged groups on the pKa value of the imidazole ring. *Biopolymers* 1976;15:393–401.
193. Tee J, Bosch A. and Lambert M. *Sports Med* 37(10):827-836, 2007.
194. Tilg H, Dinarello CA, and Mier JW. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol Today* 18: 428–432, 1997.
195. Tiriyaki GR and Atterbom HA. The effects of sodium bicarbonate and sodium citrate on 600 m running time of trained females. *J Sports Med* 1995;35:194–198.
196. Tokish J, Kocher M and Hawkins R. *Am J Sports Med* 32:1543-1553, 2004.
197. Ullum H, Haahr PM, Diamant M, et al. Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1alpha, IL-1beta, IL-6 or TNF-alpha pre-mRNA in BMNC. *J Appl Physiol* 1994;77:93-7.
198. Van Hall G, Jensen-Urstad M, Rosdahl H et al. Leg and arm lactate and substrate kinetics during exercise. *Am J Physiol* 2003;284:E193-E205.
199. Vassilakopoulos, T., Karatza, M., Katsaounou, P., Kollintza, A., Zakyntinos S. and Roussos, Ch. (2003). *J Appl Physiology* 94:1025-1032.
200. Venditti P, Di Meo S. Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. *Int J SportsMed* 1997;18:497–502.

201. Vincent T. Los, Henk P. Haagsman. TNF- α inhibits adult fast myosin accumulation in myotubes. *Cytokine* 35 (2006) 154–158.
202. Viguie, C. A., B. Frei, M. K. Shigenaga, B. N. Ames, L. Packer, and G. A. Brooks. Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. *J. Appl. Physiol.* 75: 566–572, 1993.
203. Volker Adams, Karsten Lenk, Andreas Schubert¹, Stephan Gielen, Gerhard Schuler, Rainer Hambrecht. Differentially Expressed Genes In L6 Rat Skeletal Muscle Myoblasts After Incubation With Inflammatory Cytokines. *CYTOKINE*, Vol. 13, No. 6 (21 March), 2001: pp 342–348.
204. Walsh B, Tonkonogi M. and Malm C. *Med Sci Sport Exerc* 33:436-441, 2001.
205. Woods JA, Lowder TW, Keylock KT. Can exercise training improve immune function in the aged? *Ann N Y Acad Sci* 2002;959:117-127.
206. Woodbury JW and Miles PR. Anion conductance of frog muscle membranes: one channel, two kinds of pH dependence. *J Gen Physiol* 1973;62:324–353.
207. Wong PK, Quinn JM, Sims NA et al. Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis Rheum* 2006;54:158–68.
208. Wonisch W, Kohlwein SD, Schaur J, Tatzber F, Guttenberger H, Zarkovic N et al. Treatment of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* with the lipid peroxidation product 4-HNE provokes a temporary cell cycle arrest in G1 phase. *Free Radic Biol Med* 1998;25:682–7.
209. Xia Y, Dawson VL, Dawson TM et al. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6670-6674.
210. Xing Z, Gauldie J, Cox G et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998;101:311-320.
211. Yu M, Stepto NK, Chibalin AV et al. Metabolic and mitogenic signal transduction in human skeletal muscle after intense cycling exercise. *J Physiol* 2003;546:327–335.
212. Yu M, Blomstrand E, Chibalin AV et al. Marathon running increases ERK1/2 and p38 MAP kinase signalling to downstream targets in human skeletal muscle. *J Physiol* 2001;536: 273–282.

213. Zaldivar F, Jessica Wang-Rodriguez, Dan Nemet et al. Constitutive pro- and anti-inflammatory cytokine and growth factor response to exercise in leukocytes. *J Appl Physiol* 2006;100:1124-1133.
214. Zouhal H, Rannou F, Gratas-Delamarche A et al. Adrenal medulla responsiveness to the sympathetic nervous activity in sprinters and untrained subjects during a supramaximal exercise. *Int J Sport Med* 1998;19:172–176.

Anexo 1

Cuadros

Cuadro No. 1

Desglose de las actividades desarrolladas por objetivos de la investigación

Objetivos	Actividades desarrolladas
<p>1. Evaluar las consecuencias de diferentes cargas de esfuerzo físico en el daño a lípidos y proteínas producido por la generación exagerada de radicales libres.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Medición de metabolitos de peroxidación lipídica durante el ejercicio intenso prolongado (Competencia de ciclismo profesional, Vuelta Andalucía 2008). • Medición de metabolitos de peroxidación lipídica durante ejercicio intenso explosivo (repetición de Prueba Wingate en ciclistas profesionales). • Medición de metabolitos de peroxidación lipídica y formación de nitritos durante entrenamiento físico de fuerza y resistencia en estudiantes universitarios. • Medición de metabolitos de peroxidación lipídica y formación de nitritos durante ejercicio intenso prolongado (Competencia de ciclismo amateur, Vuelta Bidasoa 2008).
<p>2. Analizar la participación de citoquinas como mediadores de respuesta inflamatoria durante ejercicio, entrenamiento físico y fatiga muscular.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Medición de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF-α e IL-1β) durante ejercicio intenso prolongado (Competencia de ciclismo profesional, Vuelta Andalucía 2008). • Medición de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF-α e IL-1β) durante ejercicio intenso explosivo (repetición de Prueba Wingate en ciclistas profesionales). • Medición de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF-α e IL-1β) durante entrenamiento físico de fuerza y resistencia en estudiantes universitarios. • Medición de citoquinas pro-inflamatorias

	<p>(IL-6, TNF-α e IL-1β) durante prueba de fatiga muscular mediante levantamiento de pesas en luchadores y jugadores de balonmano.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Medición de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF-α e IL-1β) durante ejercicio intenso prolongado (Competencia de ciclismo amateur, Vuelta Bidasoa 2008).
3. Reconocer la participación de la defensa antioxidante endógena durante el ejercicio intenso.	<ul style="list-style-type: none"> • Medición de las concentraciones de glutatión reducido y oxidado en hematies, el índice redox y las actividades de glutatión peroxidasa y reductasa durante el ejercicio intenso prolongado (Competencia de ciclismo profesional, Vuelta Andalucía 2008).
4. Evaluar el estado metabólico y el posible daño muscular durante las competencias de ciclismo (profesional y amateur) y durante el entrenamiento de fuerza y resistencia.	<ul style="list-style-type: none"> • Medición de glicemia, perfil lipídico, función renal, creatina kinasa, mioglobina, lactato deshidrogenasa y transaminasas en sangre durante la competencia de ciclismo profesional (Vuelta Andalucía 2008). • Medición de glicemia, perfil lipídico, función renal, creatina kinasa, mioglobina, lactato deshidrogenasa y transaminasas en sangre durante la competencia de ciclismo amateur (Vuelta Bidasoa, 2008). • Medición de glicemia, perfil lipídico, función renal, creatina kinasa, mioglobina, lactato deshidrogenasa y transaminasas en sangre durante entrenamiento de fuerza y resistencia.
5. Confirmar el efecto del ejercicio físico extenuante en la concentración plasmática de melatonina y urinaria de sulfatoximelatonina.	<ul style="list-style-type: none"> • Medición de la concentración plasmática de melatonina y urinaria de sulfatoximelatonina durante ejercicio intenso prolongado (Competencia de ciclismo profesional, Vuelta Andalucía 2008). • Medición de la concentración plasmática de melatonina durante repetición de prueba Wingate en ciclistas profesionales.
6. Analizar la influencia de la alcalinización inducida mediante la administración oral	<ul style="list-style-type: none"> • Comparación entre grupo que recibió bicarbonato de sodio y grupo que recibió placebo sobre los parámetros de

<p>de bicarbonato de sodio sobre la peroxidación lipídica y la respuesta de citoquinas durante la repetición de la prueba Wingate en ciclistas profesionales.</p>	<p>metabolitos de peroxidación lipídica y citoquinas en plasma durante la prueba repetida Wingate en ciclistas profesionales mediante estudio experimental cruzado doble ciego.</p>
<p>7. Establecer la posible asociación entre el estado ácido y la concentración sanguínea de citoquina durante una prueba de ejercicio explosivo en el cicloergómetro.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Uso del modelo de regresión lineal para estimar la asociación entre las concentraciones de hidrogeniones y citoquinas pro-inflamatorias.
<p>8. Valorar los efectos del entrenamiento de fuerza y resistencia con ayuda de vibraciones en el estrés oxidativo/nitrosativo y la respuesta inflamatoria en personas previamente no entrenadas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Comparación entre grupo entrenado con ayuda de vibraciones y grupo entrenado convencionalmente sobre los parámetros de metabolitos de peroxidación lipídica, formación de nitritos plasmáticos y niveles plasmáticos de citoquinas en estudiantes universitarios de la licenciatura en ciencias de la actividad física y deporte mediante estudio experimental.
<p>9. Estimar los posibles beneficios de citrulina en los parámetros oxidativos de ciclistas entrenados durante una competencia.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Medición de metabolitos de peroxidación lipídica y formación de nitritos plasmáticos antes y después de la competencia de ciclismo amateur en sujetos que ingirieron malato de citrulina durante la competencia Vuelta Bidasoa 2008.

Cuadro No. 2
Variantes de la fatiga

TIPO	AGUDA	SUBAGUDA	CRONICA
Denominación	(Agujetas)	(Sobrecarga)	(Fatiga y/o Sobreentrenamiento)
Aparición	1 sesión	1-2 microciclos	> 4 microciclos
Recuperación	2-3 días	1-2 semanas	> 1 mes
Duración	2-3 días	12-15 días	> 20 días
Afectación muscular	Local	General	General
Daño muscular	+	+++	+++++
Afectación general	+	++	+++++

Cuadro No. 3

Indicadores de fatiga

Síntomas de fatiga	Indicadores biológicos
Apatía Disminución de la fuerza Dolor muscular Descenso del rendimiento deportivo Manifestación de las alteraciones electrolíticas, metabólicas y endocrinas Hiperexcitabilidad neuromuscular	↑ Creatina kinasa, Lactato deshidrogenasa, Transaminasas ↑ Mioglobina, Aldolasa ↑ Proteínas fase aguda (Ferritina, Proteína C reactiva) ↑ Hormonas de estrés (Cortisol, ACTH) ↑ Linfocitos (%) ↑ Citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1 β)

Cuadro No. 4

Mediadores de la inflamación inducida por ejercicio y entrenamiento físico

Radicales libres	Peróxido de hidrógeno, anión superóxido, peroxinitrito
Metaloproteasas	MMP-2, MMP-3, MMP-9
Mediadores lipídicos	Prostaglandinas, Tromboxanos, Leucotrienos, Lipoxinas Factor activador de plaquetas (PAF)
Proteasas plasmáticas	Complemento, Quininas Sistema de coagulación y fibrinólisis
Factor activador de plaquetas	PAF
Péptidos y aminas	Histamina, Serotonina, Neuropeptidos
Citoquinas pro-inflamatorias	IL-1 β , IL-6, IFN γ , TNF α
Quimiocinas	IL-8, Eotaxina

Cuadro No. 5

Bioquímica en plasma de ciclistas profesionales durante competición

(Vuelta de Andalucía 2008)

(n=6, x +/- SEM)

Parámetro	Control	Antes	Después
Glucosa	70-100 mg/dl	83.0 +/- 6.2	85 +/- 5.5
Urea	10-50 mg/dl	47.5 +/- 2.3	61.8 +/- 3.5 **
Creatinina	0.7-1.2 mg/dl	0.85 +/- 0.01	0.92 +/- 0.04
Ácido úrico	3.4-7.0 mg/dl	4.0 +/- 0.1	4.6 +/- 0.3
Sodio	135-142 mEq/L	126.0 +/- 3.4	143.3 +/- 3.5 **
Cloruro	92-104 mEq/L	89.6 +/- 2.8	102.5 +/- 2.2**
GOT	10-38 U/L	34.5 +/- 6.1	54.6 +/- 4.6*
GPT	5-41 U/L	23.3 +/- 3.4	39.0 +/- 2.6**
LDH	240-480 U/L	395.6 +/- 27.9	458.3 +/- 31.4
CK	38-190 U/L	282.5 +/- 70.4	542.6 +/- 102.3
Mioglobina	28-72 ng/ml	63.5 +/- 14.5	107.5 +/- 11.9*
Colest total	100-200 mg/dl	154.0 +/- 7.3	161.1 +/- 7.4
Colest HDL	>40 mg/dl	58.0 +/- 2.6	73.9 +/- 2.0***
Colest LDL	50-125 mg/dl	64.1 +/- 1.7	73.6 +/- 7.9
Triglicérido	50-150 mg/dl	159.3 +/- 35.9	99.0 +/- 6.8

* p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.0005

Cuadro No. 6 Análisis bioquímico durante entrenamiento de 8 semanas en estudiantes universitarios (x +/- SEM)

Parámetro (Rango normal)	*p<0.05			**p<0.005		
	Pre	Int	Post	Pre	Int	Post
Glucosa (70-110 mg/dl)	93 +/- 2.6 (15)	**78.4 +/- 3.2 (13)	**78.1 +/- 3.4 (10)	94.7 +/- 3.3 (12)	86.6 +/- 3.5 (12)	84.5 +/- 4.7 (11)
Urea (10-50 mg/dl)	34.5 +/- 2.0 (15)	36.1 +/- 2.7 (12)	31.7 +/- 0.8 (10)	35.4 +/- 2.0 (12)	31.8 +/- 2.0 (12)	30.8 +/- 2.2 (12)
Creatinina (0.7-1.2 mg/dl)	1.04 +/- 0.03 (15)	1.06 +/- 0.04 (13)	1.01 +/- 0.04 (10)	1.02 +/- 0.04 (12)	1.0 +/- 0.04 (13)	0.95 +/- 0.03 (12)
Ácido úrico (3.4-7 mg/dl)	5.1 +/- 0.3 (15)	5.5 +/- 0.3 (13)	5.0 +/- 0.2 (10)	5.2 +/- 0.2 (12)	4.9 +/- 0.3 (13)	4.8 +/- 0.2 (12)
Sodio (135-145 mEq/L)	133.3 +/- 0.4 (15)	**137.8 +/- 1.5 (12)	132.5 +/- 0.9 (10)	132.7 +/- 0.6 (12)	135.2 +/- 1.2 (12)	**131.6 +/- 0.6 (12)
Cloruro (92-104 mEq/L)	95.1 +/- 0.4 (15)	**100.1 +/- 1.1 (11)	95.6 +/- 1.0 (10)	94.2 +/- 0.6 (12)	96.2 +/- 1.3 (12)	94.7 +/- 0.5 (11)
GOT (10-38 U/L)	23.1 +/- 1.8 (15)	29.1 +/- 2.8 (12)	24.7 +/- 2.2 (10)	23.5 +/- 2.6 (12)	24.6 +/- 2.3 (12)	24.2 +/- 1.9 (12)
GPT (5-41 U/L)	16.8 +/- 1.7 (15)	24.1 +/- 3.1 (13)	19.6 +/- 1.5 (10)	26.2 +/- 5.2 (12)	21.3 +/- 1.8 (12)	20.2 +/- 1.3 (12)
LDH (240-480 U/L)	349.1 +/- 12.1 (15)	344.2 +/- 14.0 (12)	391.5 +/- 42.1 (10)	329.4 +/- 10.8 (12)	331.8 +/- 12.8 (12)	361.0 +/- 31.6 (12)
CK (38-190 U/L)	288.7 +/- 63.8 (15)	384.5 +/- 57.7 (12)	260.3 +/- 81.0 (10)	233.7 +/- 47.5 (12)	238.2 +/- 52.4 (12)	185.5 +/- 31.6 (12)
Mioglobina (28-72 ng/ml)	42.6 +/- 7.6 (15)	44.9 +/- 2.4 (13)	40.7 +/- 3.8 (11)	35.6 +/- 4.3 (12)	43.5 +/- 5.9 (12)	34.2 +/- 3.2 (12)
Colest total (100-200 mg/dl)	149.1 +/- 6.6 (15)	146.2 +/- 8.0 (13)	143.1 +/- 6.6 (12)	158.9 +/- 7.6 (12)	145.7 +/- 8.9 (12)	140.2 +/- 6.2 (12)
Colest -HDL (>40 mg/dl)	57.8 +/- 2.7 (15)	54.3 +/- 2.8 (13)	51.9 +/- 2.8 (12)	50.6 +/- 3.2 (12)	50.6 +/- 3.4 (12)	48.6 +/- 3.4 (12)
Colest-LDL (50-125 mg/dl)	74.9 +/- 6.2 (15)	80.8 +/- 7.0 (13)	84.2 +/- 7.0 (12)	84.2 +/- 7.0 (12)	88.7 +/- 8.1 (12)	80.8 +/- 8.4 (12)
Triglicérido (50-150 mg/dl)	81.9 +/- 6.2 (15)	80.0 +/- 9.3 (13)	97.4 +/- 8.9 (11)	98.6 +/- 6.7 (12)	102.1 +/- 8.6 (12)	94.5 +/- 8.2 (12)

Cuadro No. 7

Perfil bioquímico de la Vuelta Bidasoa 2008

(n = 5, x +/- SEM)

Parámetro	Rango normal	Etapa uno		Etapa dos		Etapa tres	
		Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después
glucosa	70-100 mg/dl	86.8 +/- 2.5	81.0 +/- 6.0	74.6 +/- 5.3	79.8 +/- 2.6	78.8 +/- 5.4	87.0 +/- 4.5
GOT	10-38 U/L	20.6 +/- 1.9	24.6 +/- 2.2	22.0 +/- 2.7	27.2 +/- 3.0	23.0 +/- 2.5	26.0 +/- 4.1
GPT	5-41 U/L	14.8 +/- 2.2	18.2 +/- 2.3	15.6 +/- 1.5	18.4 +/- 2.0	16.0 +/- 2.3	17.4 +/- 3.0
LDH	240-480 U/L	222.0 +/- 21.6*	314.0 +/- 25.4*	261.4 +/- 16.1	323.0 +/- 23.4	226.0 +/- 27.4	287.6 +/- 34.7
CK	38-190 U/L	94.4 +/- 17.1 °	132.6 +/- 15.6	138.6 +/- 17.2	190.0 +/- 15.2	155.2 +/- 13.9	186.2 +/- 25.7 °
Mioglobina	28-72 ng/ml	29.0 +/- 2.7** °	92.0 +/- 12.8**	41.2 +/- 3.5*	109.0 +/- 20.1*	39.4 +/- 3.8*	86.2 +/- 16.8* °
Colesterol total	100-200 mg/dl	150.8 +/- 6.6	162.6 +/- 11.4	148.2 +/- 10.5	159.4 +/- 9.3	136.2 +/- 10.3	137.6 +/- 14.5
Triglicérido	50-150 mg/dl	99.2 +/- 21.8	92.6 +/- 21.2	76.2 +/- 16.6	73.8 +/- 19.1	54.8 +/- 13.6	52.4 +/- 11.1
HDL-colest	> 40 mg/dl	70.8 +/- 8.2	73.4 +/- 9.3	72.2 +/- 10.2	71.8 +/- 8.7	70.0 +/- 8.7	66.2 +/- 9.5

*p<0.05 comparando antes y después de una etapa

**p<0.005 comparando antes y después de una etapa

°p<0.05 comparando antes y después de la competencia

Cuadro No. 8

Peroxidación lipídica a diferentes cargas de esfuerzo físico

Carga física	n	MDA y 4-HDA (nmol/mL)		% cambio
		Antes	Después	
Carga intensa prolongada: Competencia de ciclismo profesional (4 días).	6	9.86 +/- 0.92	13.04 +/- 1.36	32% ascenso
Carga intensa de corta duración: Prueba Wingate repetida 3 veces en ciclistas profesionales (1 hora).	10	10.02 +/- 0.92	13.24 +/- 1.08 *	32% ascenso
Carga moderada, repartida y prolongada: Entrenamiento moderado de fuerza y resistencia en estudiantes previamente no entrenados (8 semanas).	29	8.11 +/- 0.47	6.81 +/- 0.39 *	16% descenso

Cuadro No. 9

Respuesta de TNF- α a diferentes cargas de esfuerzo físico

Carga física	n	TNF- α (pg/ml)		Incremento en
		Antes	Después	
Carga intensa: Serie prolongada de repeticiones máximas hasta la fatiga (90 minutos)	14	3.96 +/- 0.77	28.11 +/- 3.56****	6x
Carga intensa: Tres repeticiones de prueba Wingate (60 minutos)	10	4.07 +/- 0.61	7.71 +/- 0.85**	0.9x
Carga intensa: Competencia de ciclismo profesional (4 días)	6	5.14 +/- 1.98	11.87 +/- 2.43*	1.3x
Carga acumulada, repartida y prolongada: Entrenamiento de fuerza y resistencia (8 semanas)	29	2.02 +/- 0.38	10.94 +/- 1.31****	4.4x

Cuadro No. 10

Respuesta de IL-6 a diferentes cargas de esfuerzo físico

Carga física	n	IL-6 (pg/ml)		Incremento en
		Antes	Después	
Carga intensa: Serie prolongada de repeticiones máximas (90 minutos)	14	18.29 +/- 1.89	20.37 +/- 1.92	0.1x
Carga intensa: Tres repeticiones de prueba Wingate (60 minutos)	10	5.05 +/- 0.87	21.47 +/- 4.88**	3.2x
Carga intensa: Competencia de ciclismo profesional (4 días)	6	0.92 +/- 0.28	2.92 +/- 0.57*	2.2x
Carga acumulada, repartida y prolongada: Entrenamiento de fuerza y resistencia (8 semanas)	29	24.03 +/- 12.18	29.53 +/- 15.19	0.23x

Cuadro No. 11

Respuesta de IL-1 β a diferentes cargas de esfuerzo fisico

Carga fisica	N	IL-1 β		Incremento en
		Antes	Después	
Carga intensa: Serie prolongada de repeticiones máximas (90 minutos)	14	1.13 +/- 0.26	1.69 +/- 0.17	0.5x
Carga intensa: Tres repeticiones de prueba Wingate (60 minutos)	10	0.38 +/- 0.06	3.80 +/- 0.54 ***	9x
Carga intensa: Competencia de ciclismo profesional (4 días)	6	1.44 +/- 0.90	3.04 /- 0.93	1.1x
Carga acumulada, repartida y prolongada: Entrenamiento de fuerza y resistencia (8 semanas)	29	0.94 +/- 0.25	1.33 +/- 0.25	0.41x

Cuadro No. 12

Melatonina plasmática a diferentes
cargas y duraciones de esfuerzo físico

Carga	Duración	n	Melatonina en plasma AM (pg/ml)		Incremento en
			Antes	Después	
Competencia de ciclismo profesional	4 días	6	3.11 +/- 0.28	6.33 +/- 1.12*	1.0x
Serie de tres pruebas Wingate consecutivas	1 hora	10	2.06 +/- 0.33	2.53 +/- 0.40	0.2x

Cuadro No. 13

Incremento de los marcadores de daño muscular post-ejercicio
según carga física y nivel de entrenamiento

Parámetro	% Incremento de marcadores en sangre post-ejercicio		
	Luego de carga intensa durante competencia de ciclistas profesionales (4 días) n=6	Luego de carga intensa durante competencia de ciclistas amateur (3 días) n=5	Luego de carga moderada acumulada durante entrenamiento de estudiantes universitarios (8 semanas) n=29
GOT	58%	26%	7%
GPT	67%	18%	7%
CK	92%	97%	14%
Mioglobina	69%	197%	6%
LDH	16%	29%	10%

Cuadro No. 14

Perfil metabólico en estado de reposo de acuerdo al nivel de entrenamiento

Parámetro	Control	Entrenamiento de ciclistas profesionales n=6	Entrenamiento de estudiantes universitarios (8 semanas) n=29
Glucosa	70-100 mg/dl	83.0 +/- 6.2	81.47 +/- 2.98
Colest total	100-200 mg/dl	154.0 +/- 7.3	141.6 +/- 4.4
Colest-HDL	>40 mg/dl	58.0 +/- 2.6	50.2 +/- 2.2
Colest- LDL	50-125 mg/dl	64.1 +/- 1.7	83.2 +/- 4.6
Triglicérido	50-150 mg/dl	159.3 +/- 35.9	95.8 +/- 5.9 *

Cuadro No. 15

Cortisolemia en respuesta a ejercicios intensos

*** $p < 0.0005$

Atletas	Ejercicio intenso	Cortisolemia ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	
		Antes	Después
Luchadores (n=9)	Series de RM hasta fatiga (una hora)	16.8 +/- 1.7	21.1 +/- 1.6
Jugadores de balonmano (n=5)	Series de RM hasta fatiga (una hora)	18.8 +/- 2.2	23.0 +/- 1.7
Ciclistas amateurs (n=5)	Competencia (cuatro días)	11.1 +/- 1.0	19.7 +/- 1.0 ***

Anexo 2
Figuras

Figura No. 1

Peroxidacion lipidica (MDA and 4-HDA en plasma)

Competencia de ciclismo profesional - Vuelta Andalucia 2008

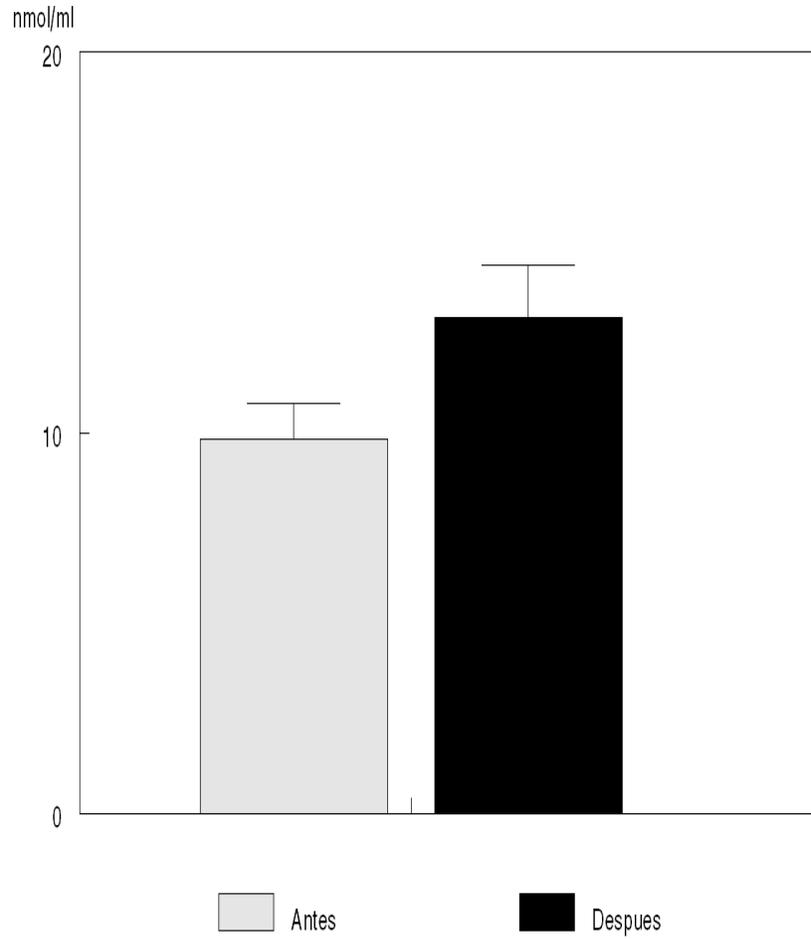


Figura No. 2

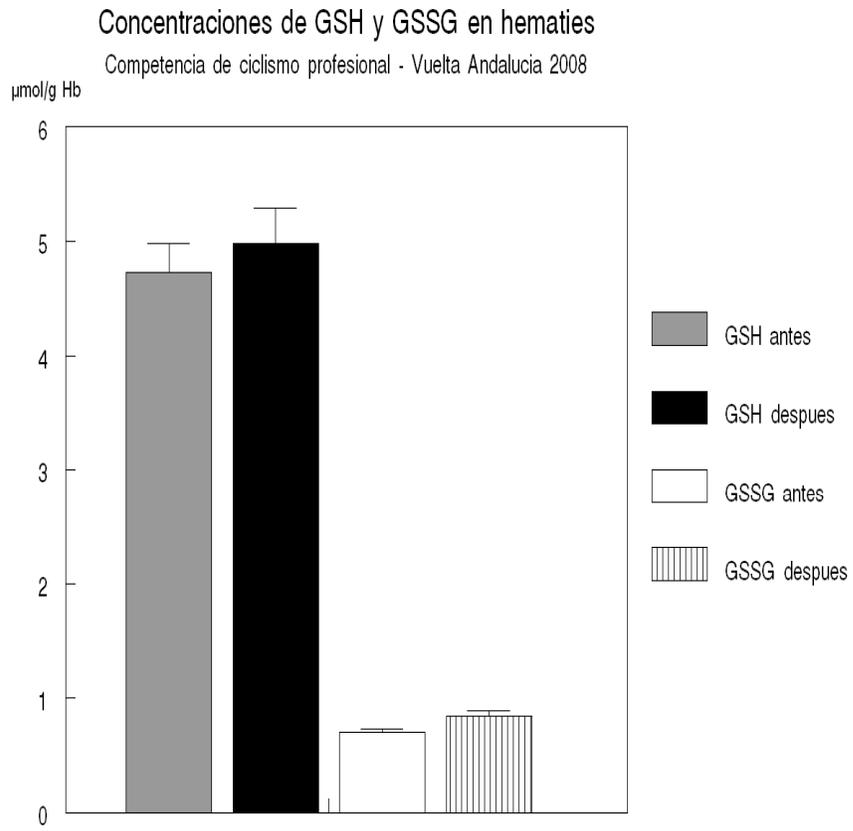


Figura No. 3

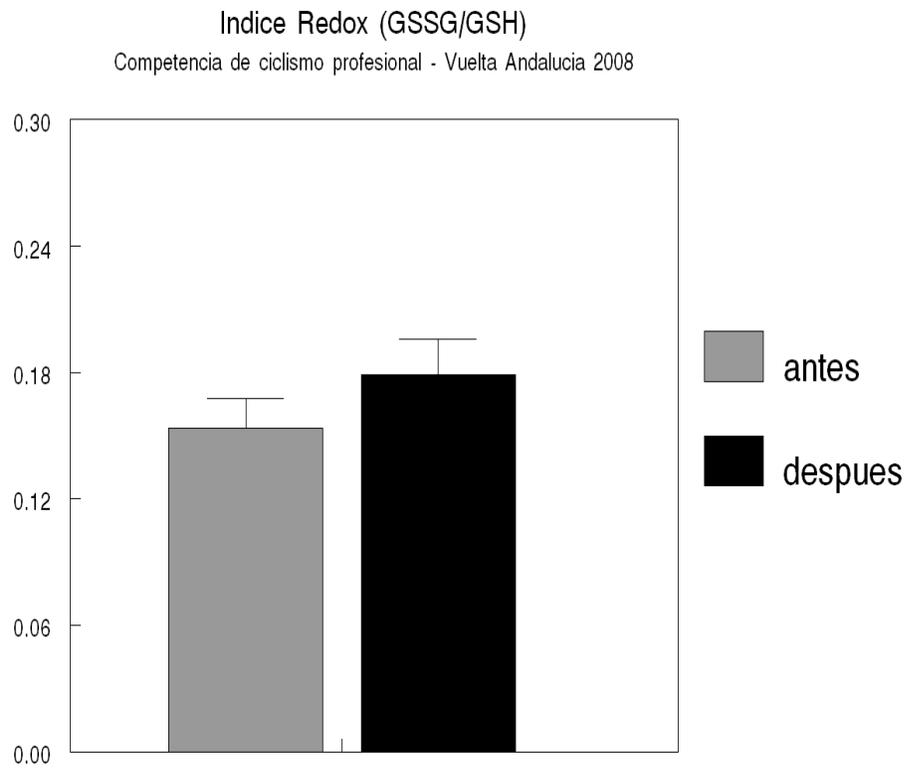


Figura No. 4

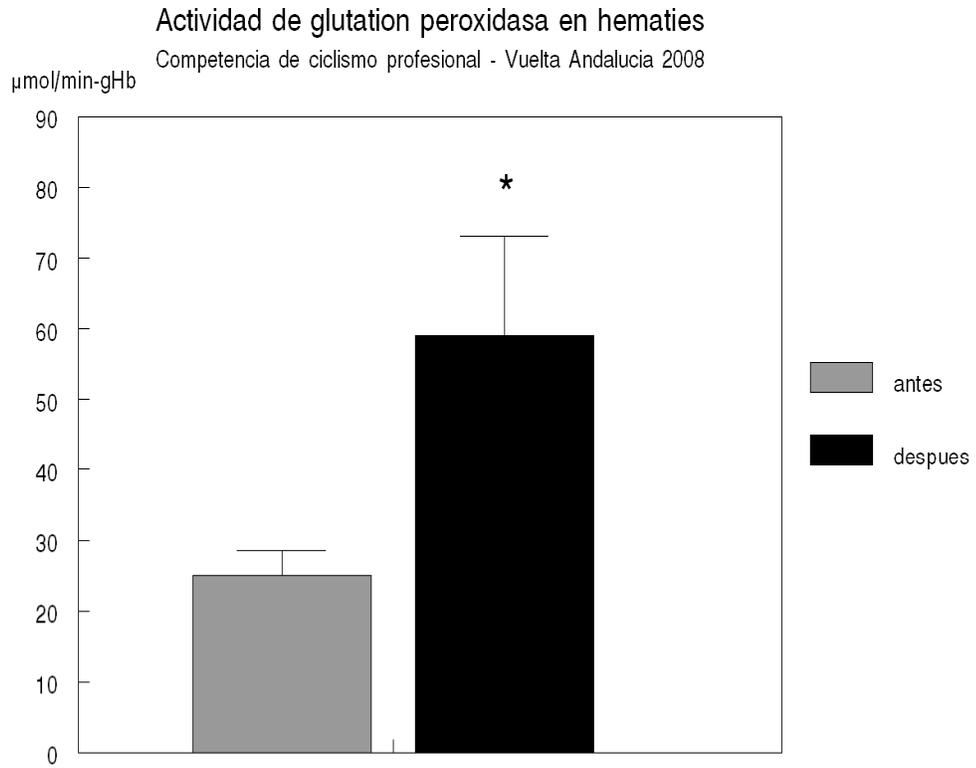


Figura No. 5

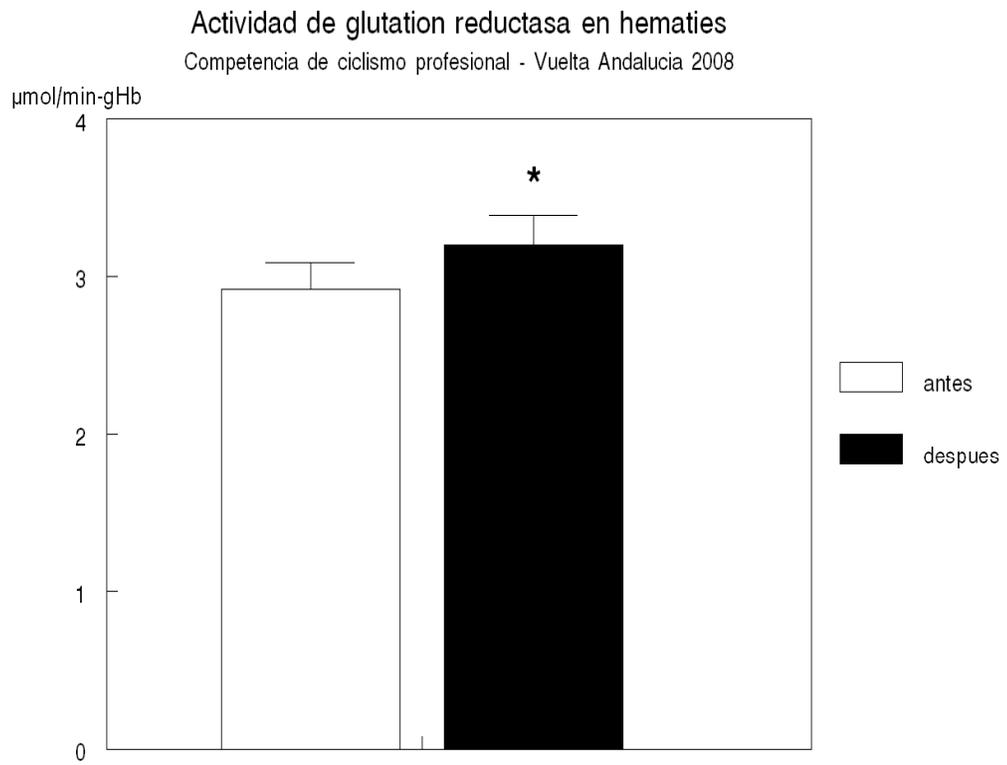


Figura No. 6

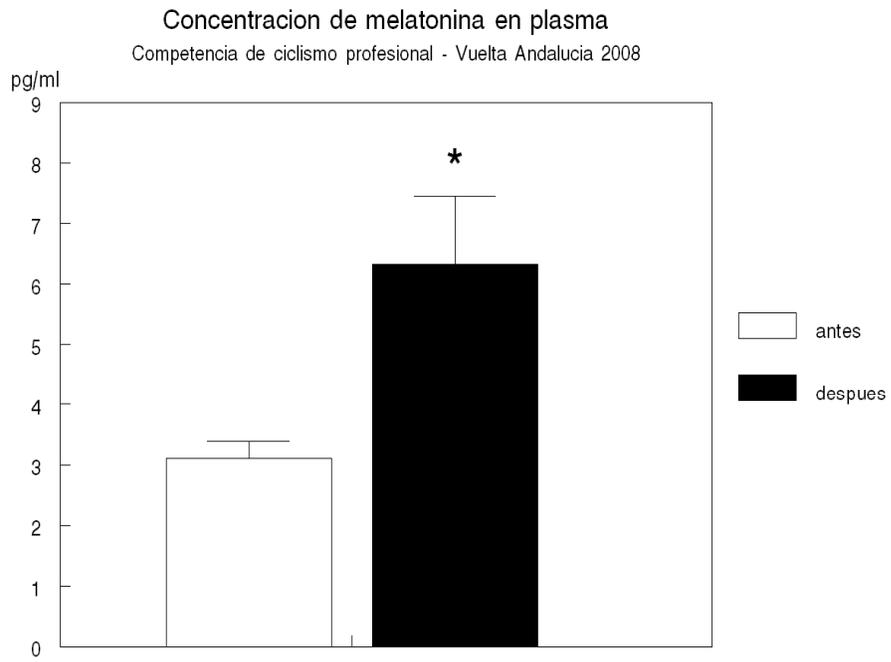


Figura No. 7

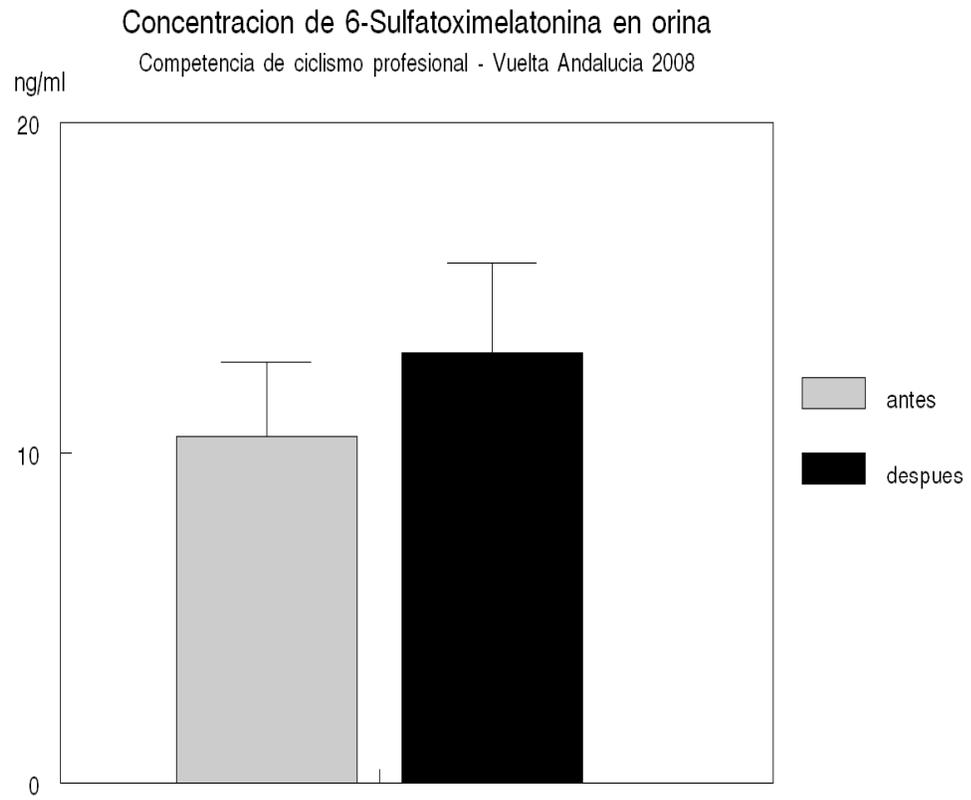


Figura No. 8

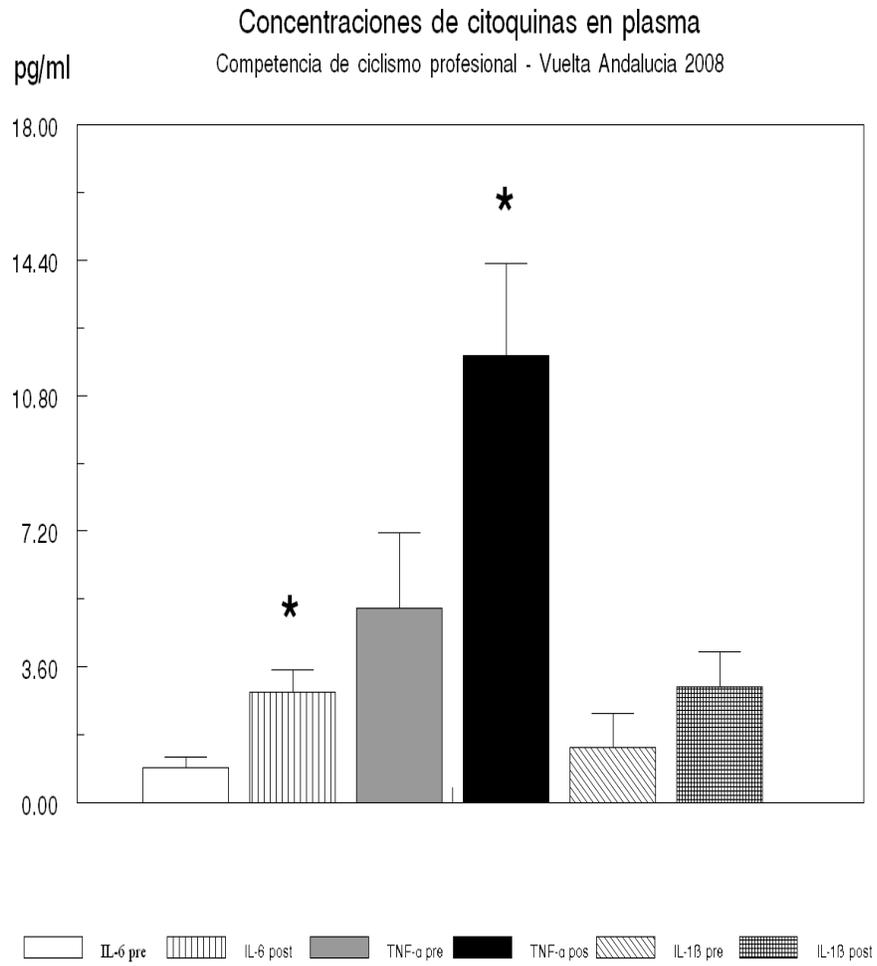


Figura No. 9

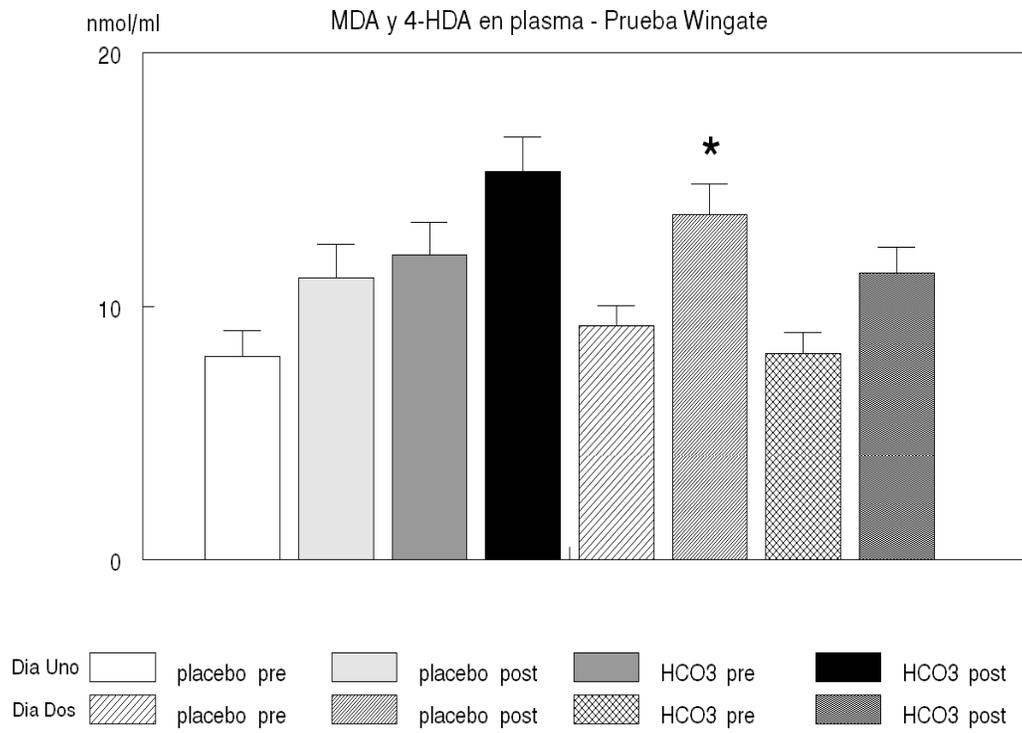


Figura No. 10

IL-6 en plasma (Prueba Wingate - Dia uno)

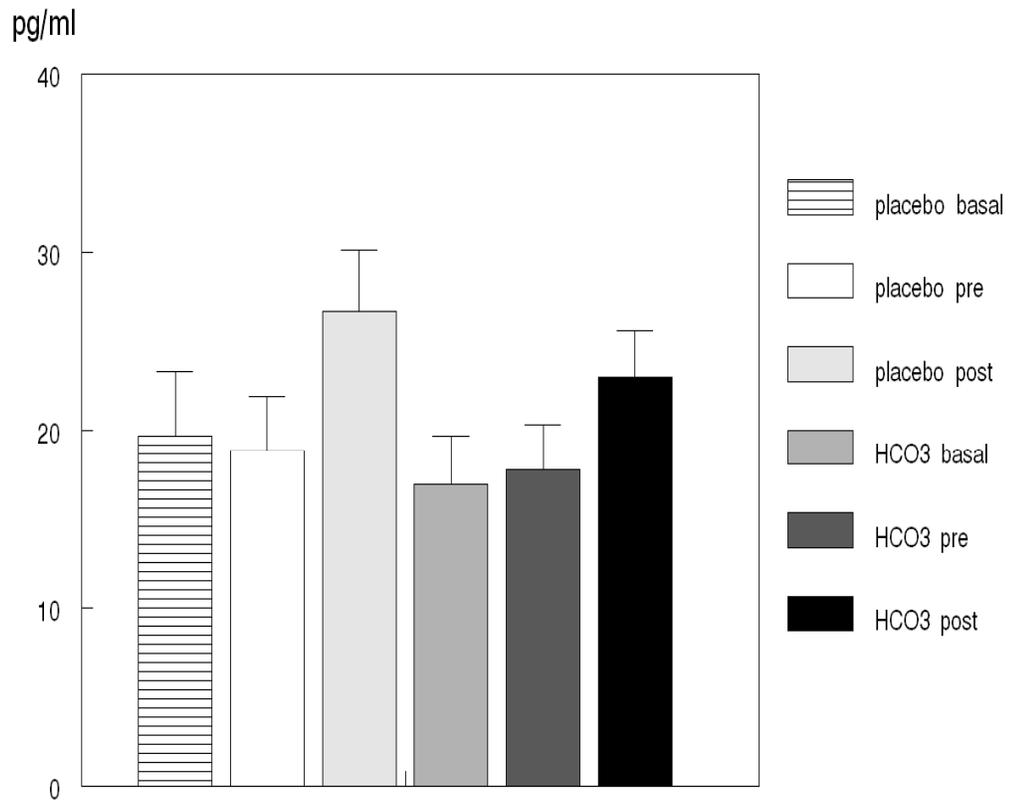


Figura No. 11

IL-6 en plasma (Prueba Wingate - Dia dos)

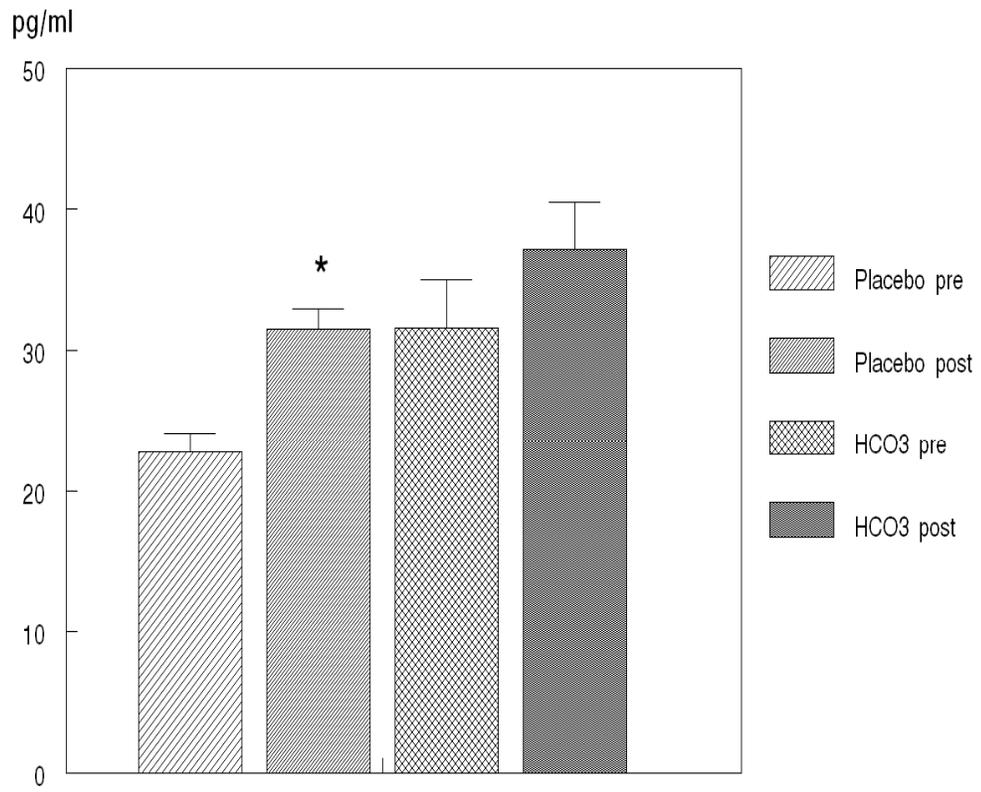


Figura No. 12

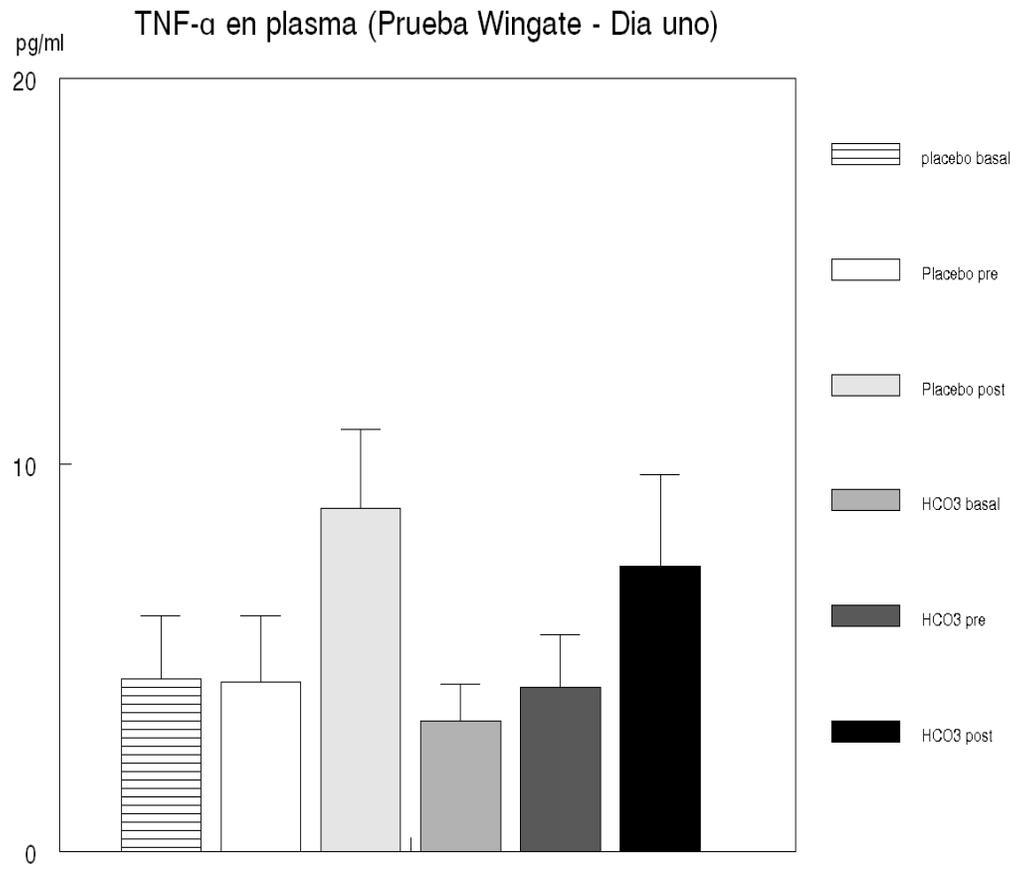


Figura No. 13

TNF- α en plasma (Prueba Wingate - Dia dos)

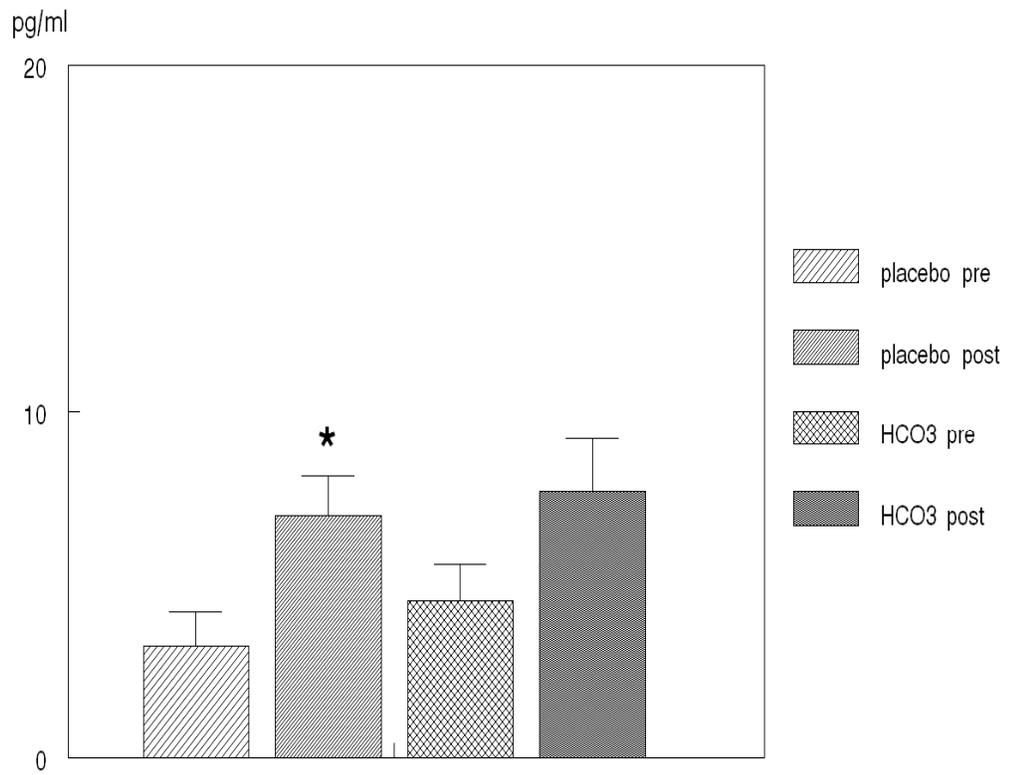


Figura No. 14

IL-1 β en plasma (Prueba Wingate - Dia uno)

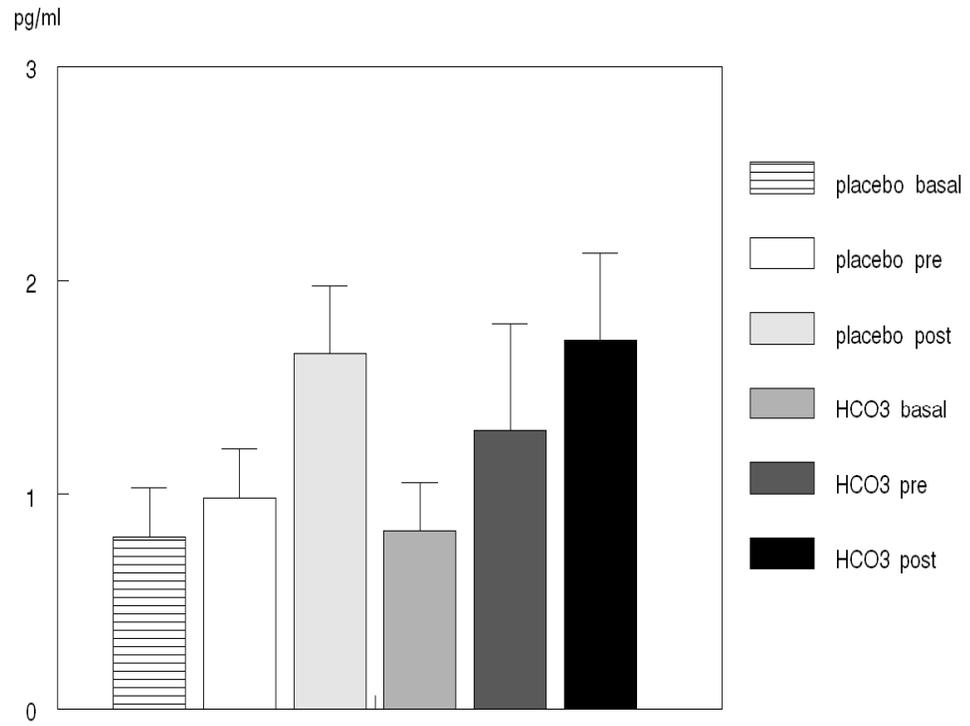


Figura No. 15

IL-1 β en plasma (Prueba Wingate - Día dos)

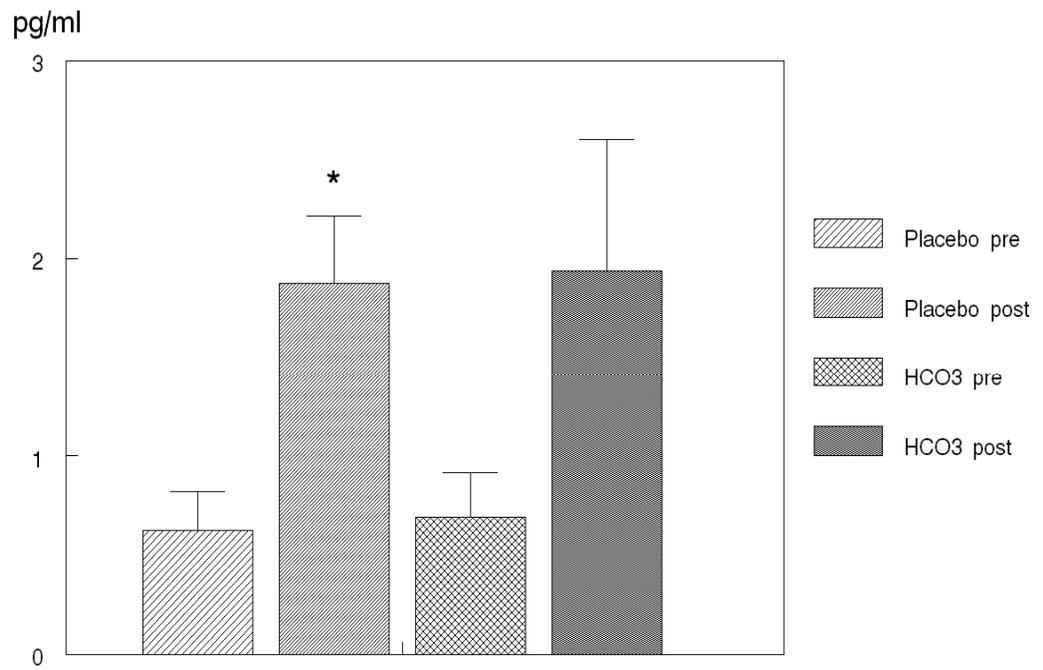


Figura No. 16

Regresion lineal de concentraciones de hidrogeniones e IL-6 en plasma

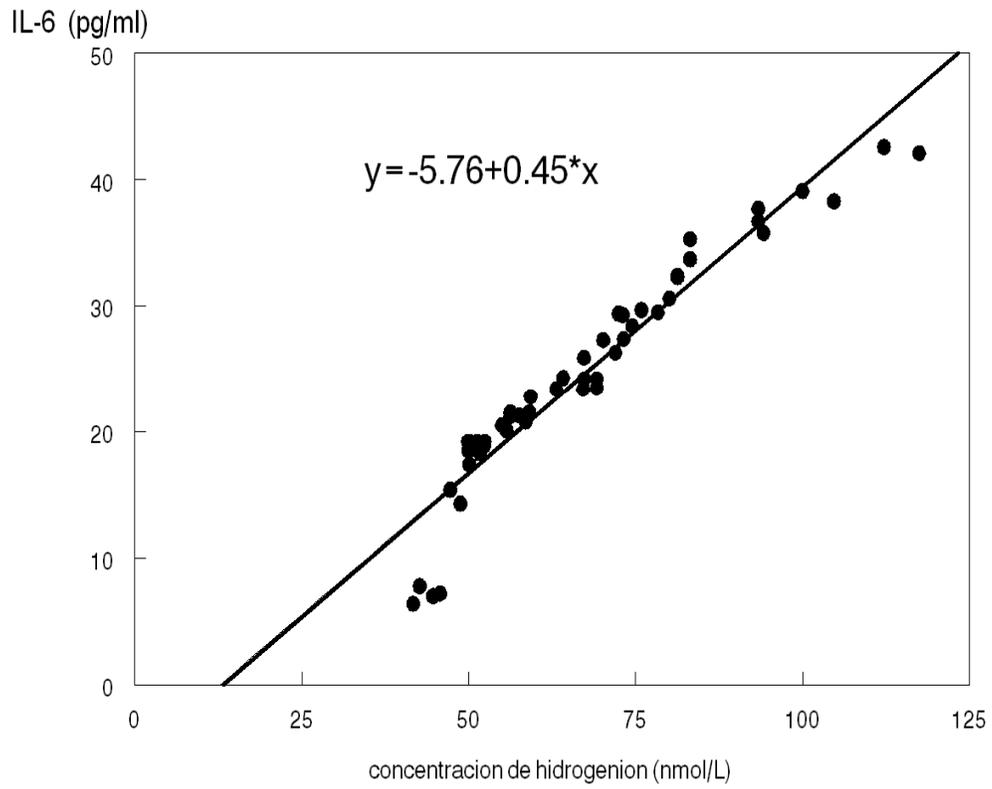


Figura No. 17

Concentracion de melatonina en plasma (Prueba Wingate - Dia uno)

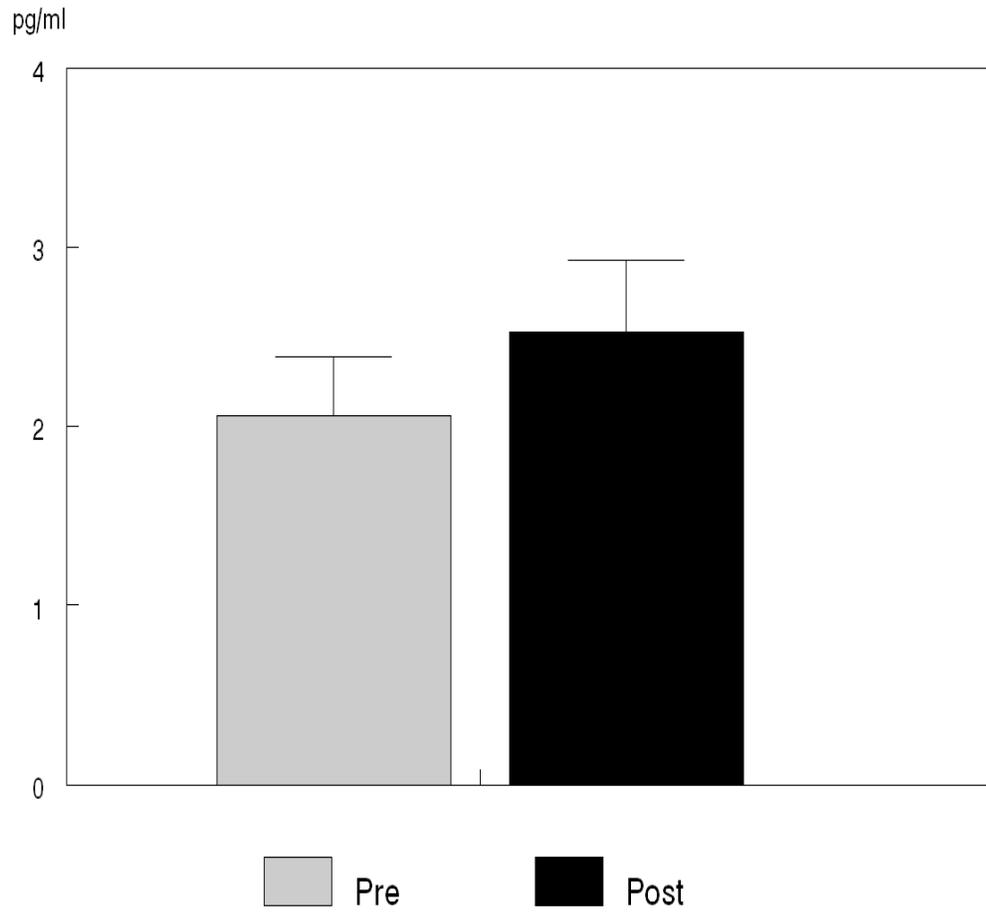


Figura No. 18

Regresion lineal de creatina kinasa y mioglobina en plasma durante entrenamiento

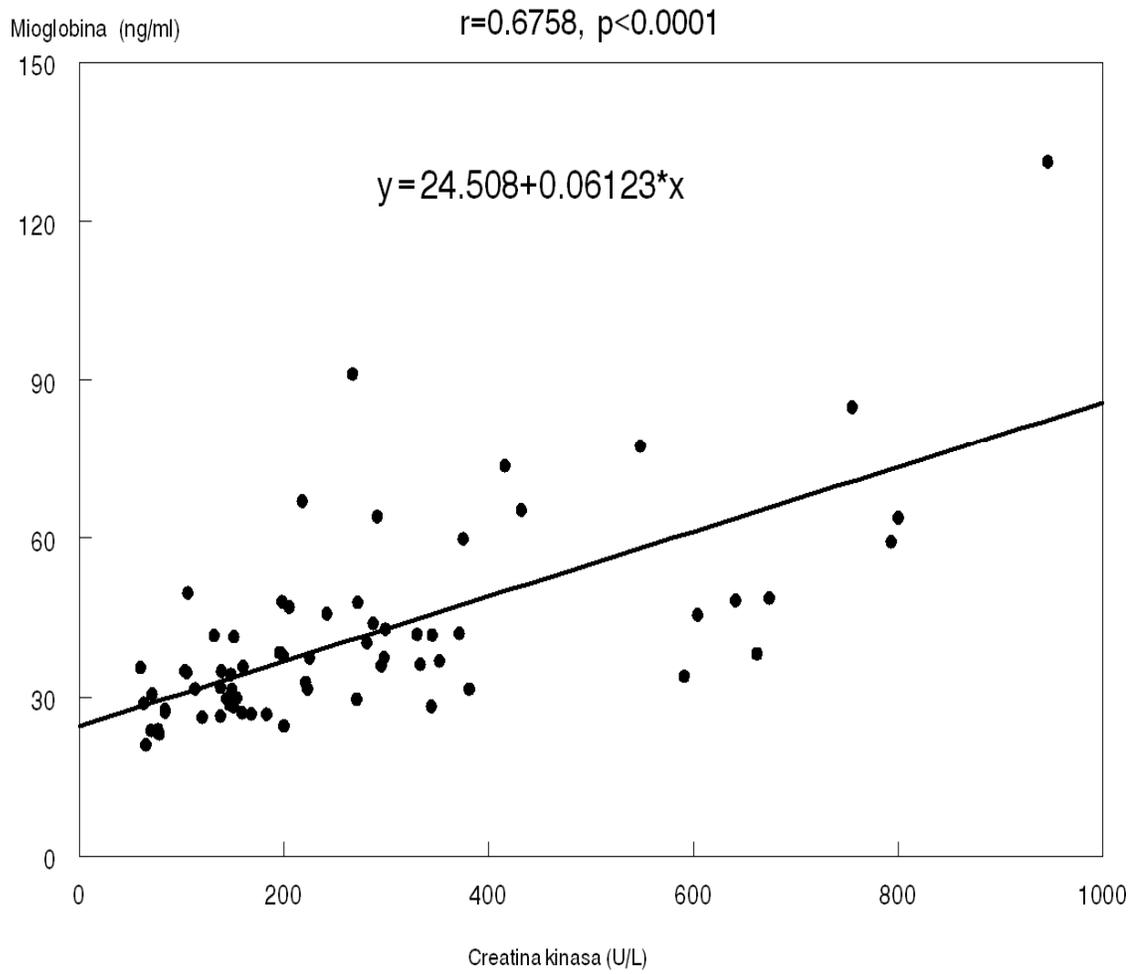


Figura No. 19

MDA y 4-HDA en plasma medido en reposo durante entrenamiento

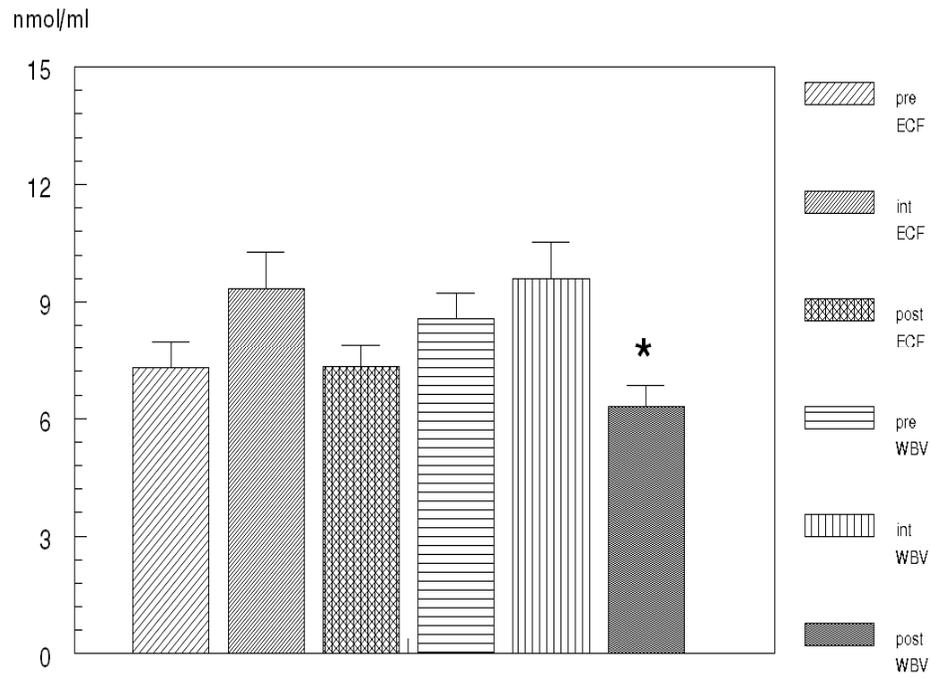


Figura No. 20

Nitritos plasmaticos medidos en reposo durante entrenamiento

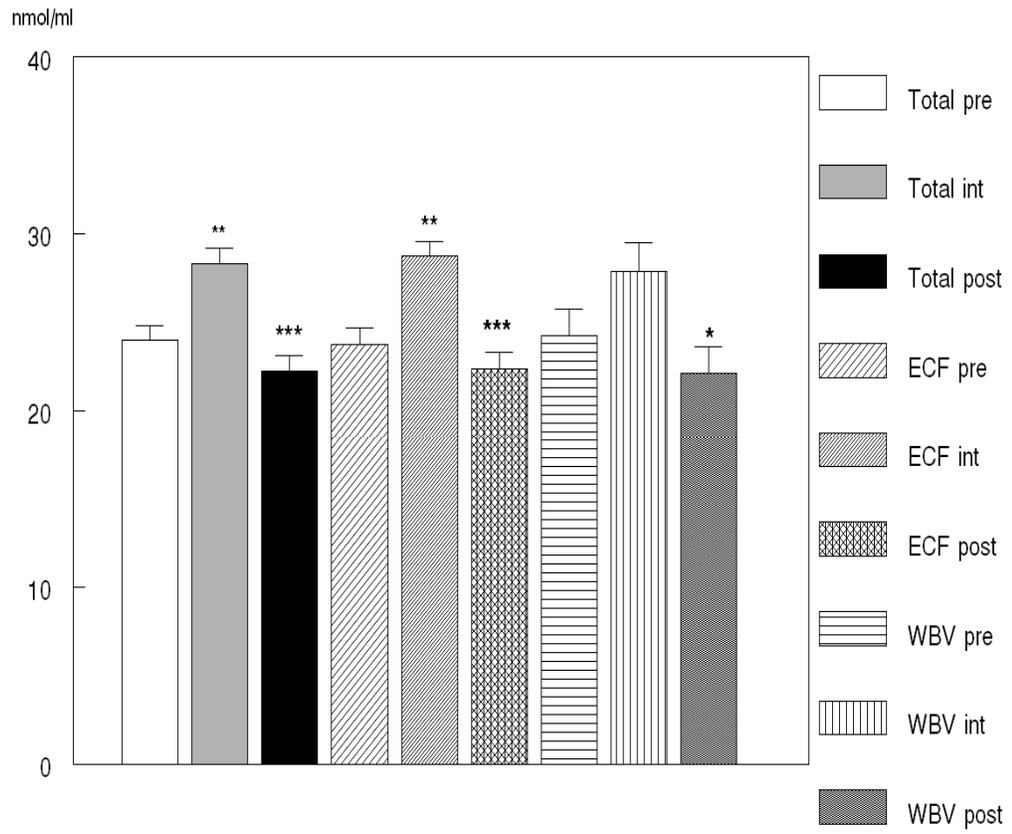


Figura No. 21

IL-6 plasmatica medido en reposo durante entrenamiento

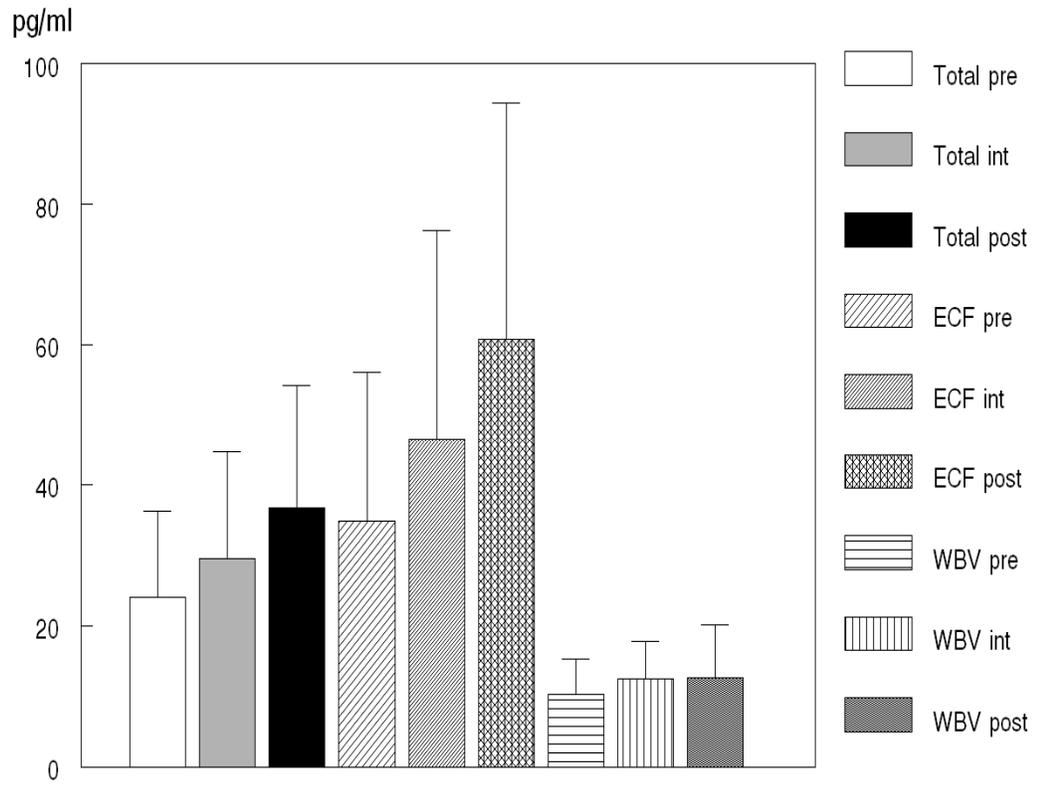


Figura No. 22

TNF- α plasmática medida en reposo durante entrenamiento

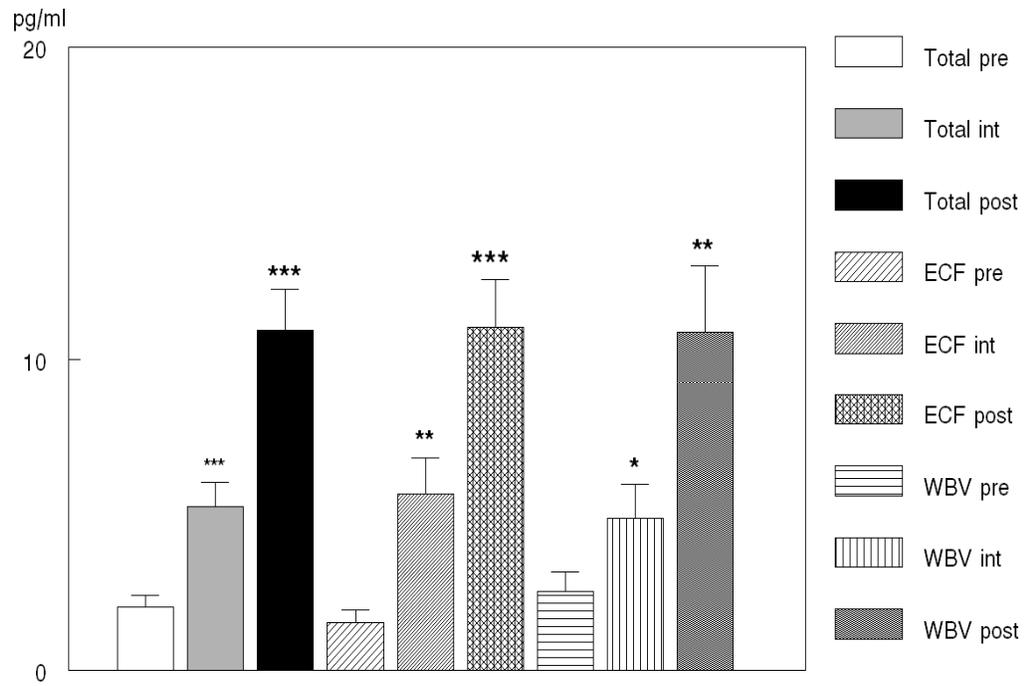


Figura No. 23

IL-1 β plasmática medida en reposo durante entrenamiento

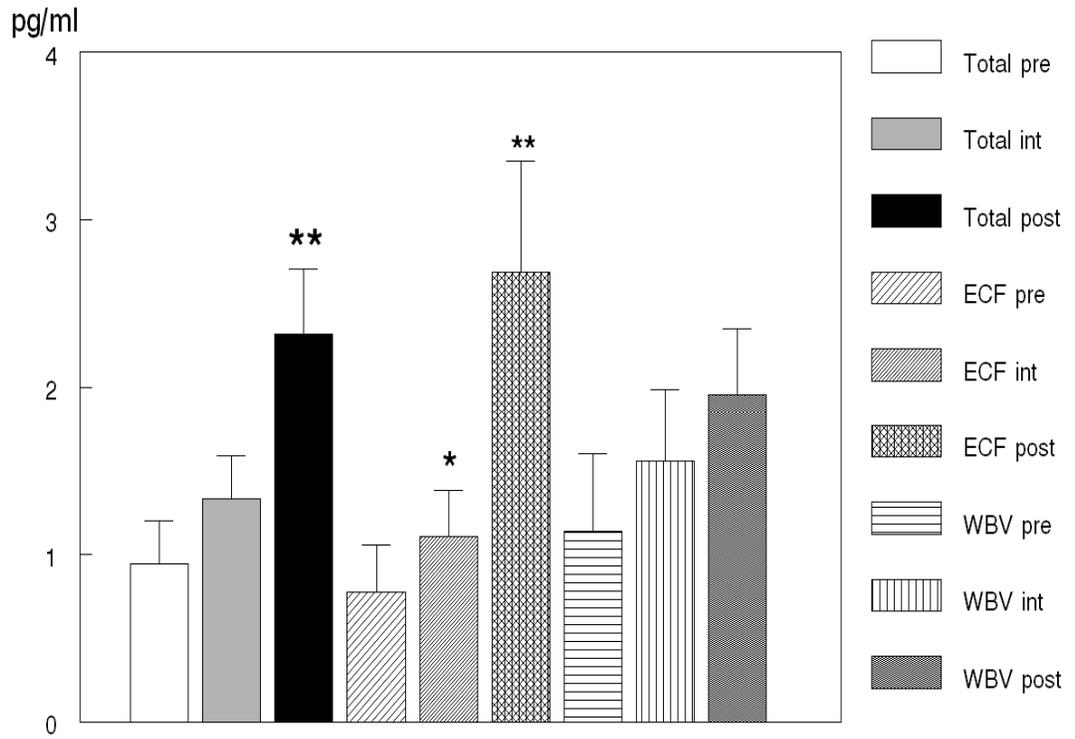


Figura No. 24

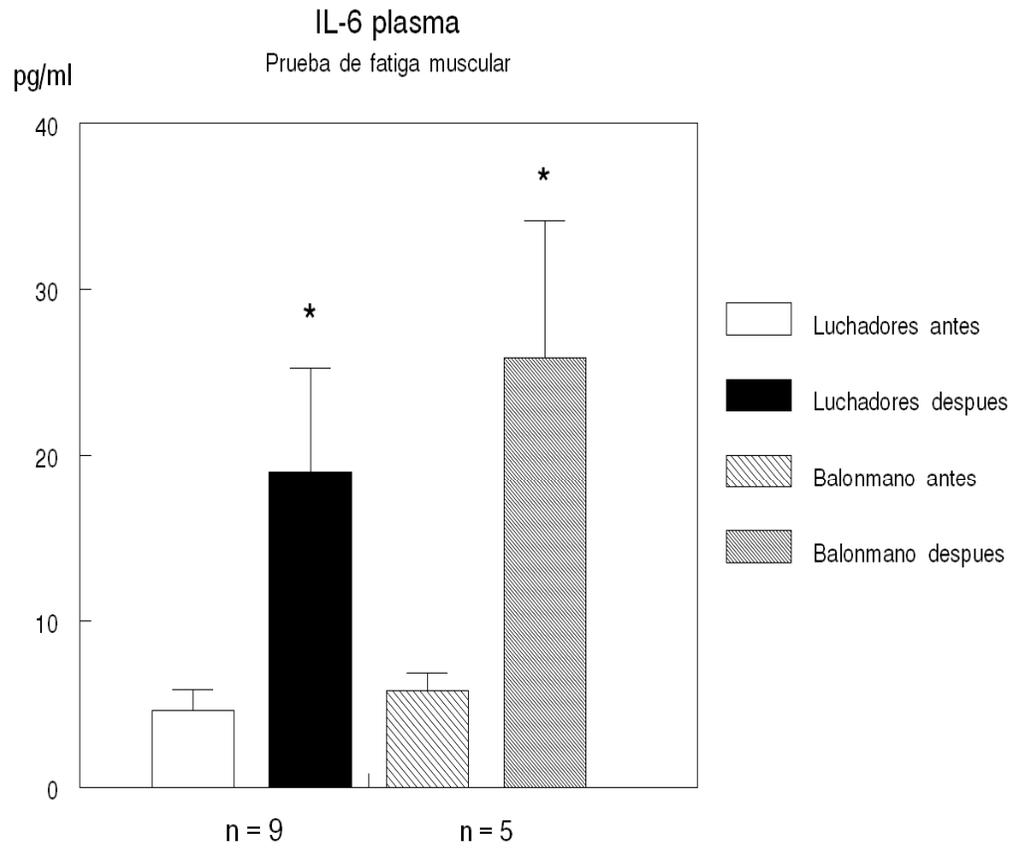


Figura No. 25

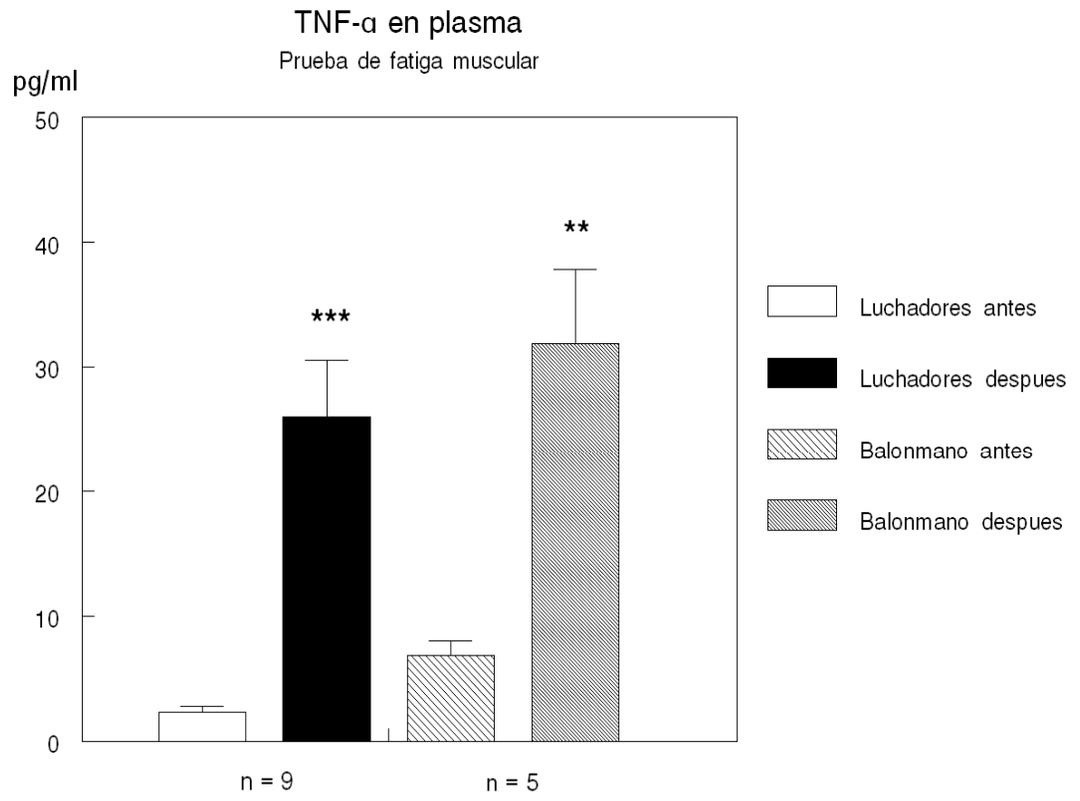


Figura No. 26

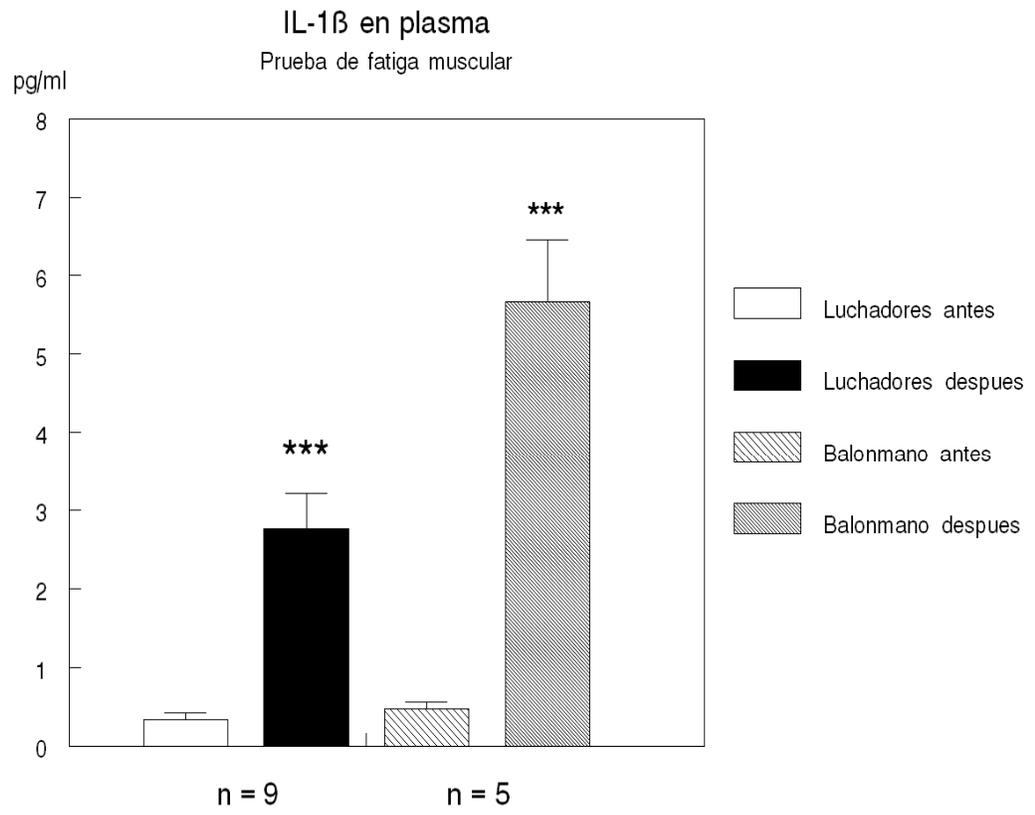


Figura No. 27

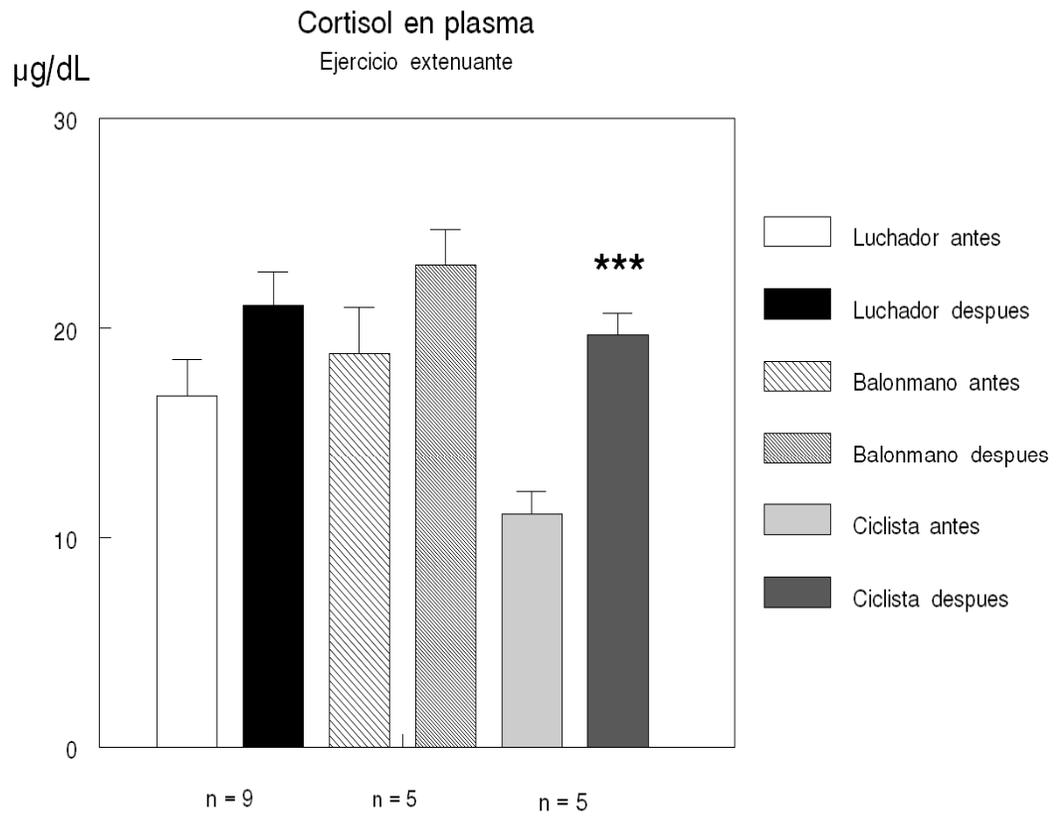


Figura No. 28

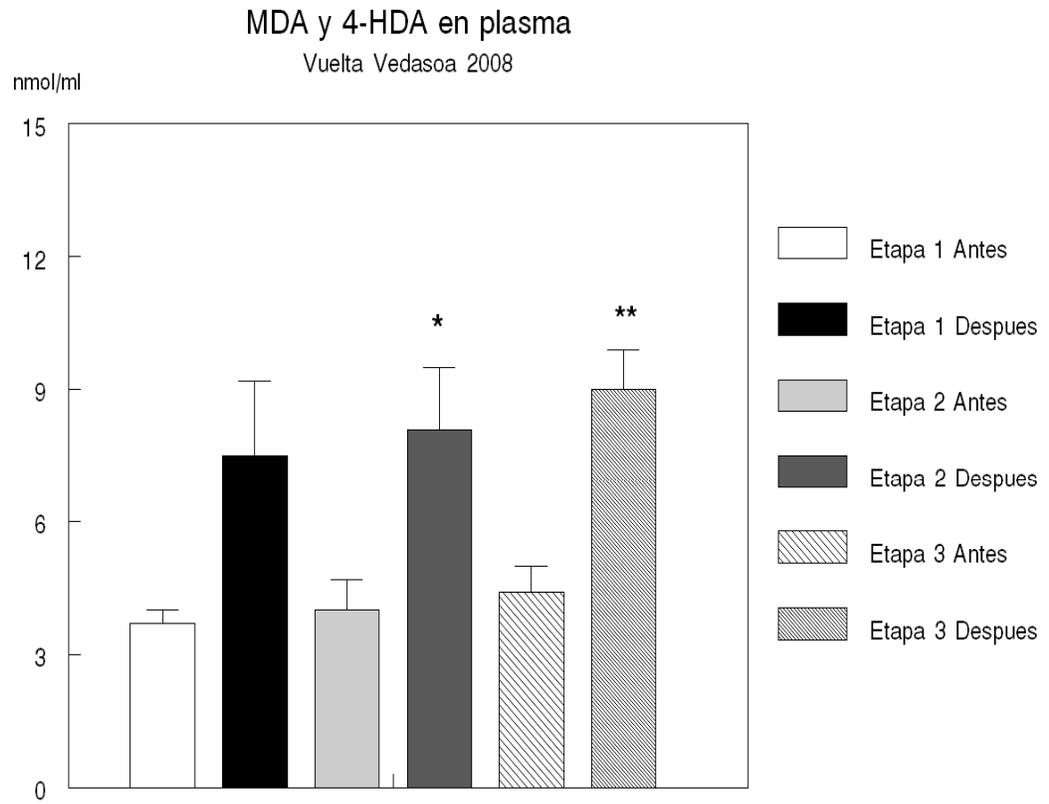


Figura No. 29

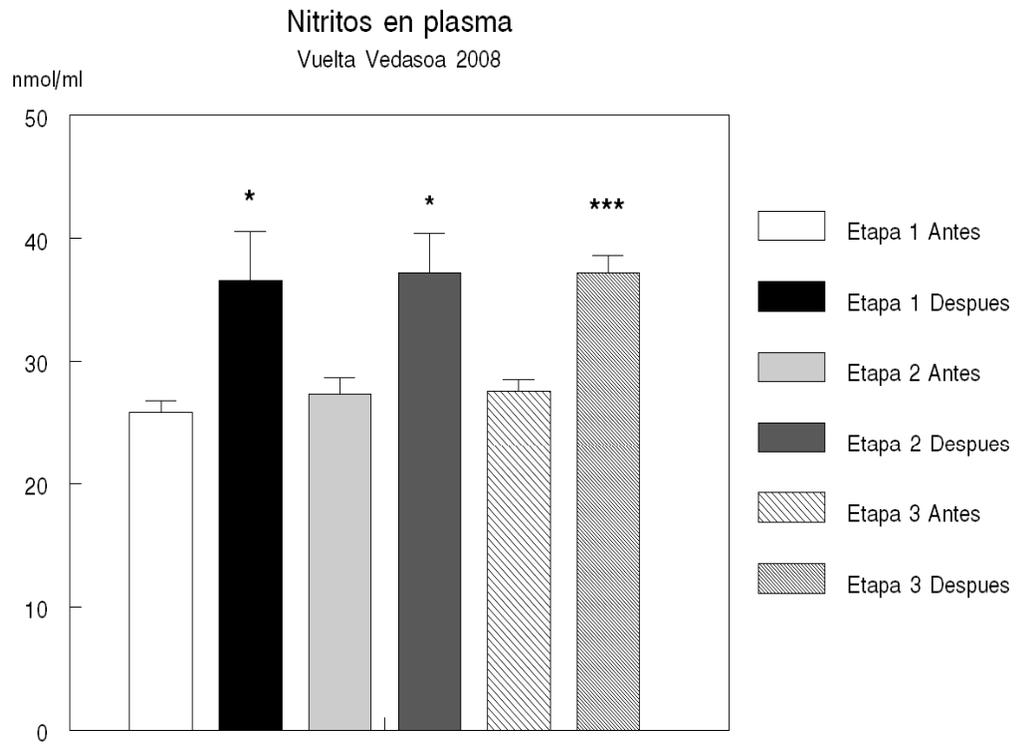


Figura No. 30

